

**MICHAELREAKTIVE VERBINDUNGEN
ALS NEUE KLASSE DER
5-LIPOXYGENASE-INHIBITOREN**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

Vorgelegt am Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Isabelle Viktoria Maucher

aus Lörrach

Frankfurt am Main (2017)

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Jürgen Maier

Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Einreichung:

Datum der Disputation:

Meiner Familie

Αὐτοῦ γὰρ καὶ Ῥόδος καὶ πῆδημα

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
2. Die 5-LO	3
2.1 Struktur der 5-LO	3
2.2 Enzymatische Funktion der 5-LO.....	5
2.3 Regulation der 5-LO.....	7
2.4 Rezeptoren der 5-LO-Produkte	9
LTB ₄ -Rezeptoren	9
CysLT-Rezeptoren	10
2.4.1 Oxoeicosanoid-Rezeptoren	11
2.4.2 FOG ₇ --Rezeptoren	11
2.4.3 Inhibitionsmöglichkeiten der LT-Effekte.....	12
2.4.4 FLAP-Inhibitoren.....	13
2.5.1 Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren.....	14
2.5.2 Nichtredoxaktive 5-LO-Inhibitoren.....	14
2.5.3 Eisenligand-Inhibitoren	15
2.5.4 Michaelreaktive Verbindungen.....	16
2.5.5 Cysteine der 5-LO.....	16
2.6	
3. Entzündungsprozesse	18
4.1 Michaelreaktive Verbindungen.....	19
4.1.1 Benzochinone	20
4.1.2 NAPQI	21
4.1.3 TQ	21
4.1.4 Primin	22
4.1.5 Embelin.....	23
4.2.1 AA861	23
4.2 Naphthochinone	24
Plumbagin	24
4.3 Ungesättigte Verbindungen	25
4.4 Polyphenole	26

4.5	Flavonoide	26
	Chalkone.....	27
4.6	Nitrostyrene	27
4.7	Arzneistoffe	28
5.	Ziel der Arbeit	29
4.5.1		
6.	Material	30
7.	Methoden	31
7.1	Isolation humaner PMNL aus Leukozytenkonzentraten	31
7.2	Herstellung und Aufreinigung von r5LO-wt	31
7.3	Herstellung von Zellhomogenaten	32
7.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	32
7.5	Festphasenextraktion und HPLC-Analyse	33
7.6	5-LO-Aktivitätsmessung von intakten PMNL	34
7.7	5-LO-Aktivitätsmessung von r5LO-wt und deren Mutanten	34
7.8	Reversibilitätsmessung	35
7.9	MALDI-MS	35
7.9.1	Probenvorbereitung für die MALDI-MS-Analyse	35
7.9.2	MALDI-MS-Messung	36
7.10	Datenbanksuche	36
7.11	DPPH-Versuch	36
7.12	Ferene S-Versuch	36
7.13	Zellviabilitätsmessung	37
7.14	LDH-Zytotoxizität-Versuch	37
7.15	Statistik	38
8.1.1		
8.1.2	Ergebnisse	39
8.1.3	Effekte auf die zelluläre 5-LO-Produktbildung	39
8.1.4	Benzochinone	39
8.1.5	Naphthochinone	42
8.1.6	Ungesättigte Verbindungen	44
8.1.7	Polyphenole	46
	Flavonoide	48
	Nitrostyrene	50
	Arzneistoffe	51

8.2	Einfluss auf die Produktbildung der r5LO-wt	52
	Benzochinone	52
	Naphthochinone	54
	Ungesättigte Verbindungen	56
	Polyphenole	58
8.2.1	Flavonoide	59
8.2.2	Nitrostyrene.....	61
8.2.3	Arzneistoffe	62
8.2.4	Arzneistoffe	62
8.2.5 8.2.6	8.3 Effekte auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C	63
8.2.7	Benzochinone	63
	Naphthochinone	65
8.3.1	Ungesättigte Verbindungen	66
8.3.2	Polyphenole	66
8.3.3	Flavonoide	67
8.3.4	Nitrostyrene.....	67
8.3.5	Nitrostyrene.....	67
8.3.6	Arzneistoffe	68
8.3.7	Arzneistoffe	68
8.4	Bedeutung der einzelnen Cysteine	69
8.5	Einfluss von Thiolen und thioldepletierenden Verbindungen.....	70
8.6	MALDI-MS-Analyse	73
8.6.1	Bindung von TQ und AA861 an GSH	73
8.6.2	Bindung von TQ an r5LO-wt	76
8.6.3	Bindung von TQ an r5LO-wt	76
	Bindung von NAPQI an r5LO-wt	79
8.7.1	Bindung von NAPQI an r5LO-wt	79
8.7.2 8.7.2	8.7 Pharmakodynamisches Profil.....	82
8.7.3	Einfluss verschiedener AA-Konzentrationen.....	82
8.7.4	Einfluss verschiedener Stimuli	83
8.7.5	Reversibilität der zellulären 5-LO-Produktbildung.....	84
8.7.6	Einfluss von oxidativem Stress	86
	Reduzierende Eigenschaften.....	87
	Radikalfängereigenschaften	88
8.8	Messung der Zellviabilität	90
8.9	Messung der Membranintegrität	91
9.	Diskussion.....	92
10.	Zusammenfassung	100

11.	Anhang.....	102
11.1	Benzochinone	102
11.2	Naphthochinone	104
11.3	Ungesättigte Verbindungen	105
11.4	Polyphenole	106
11.5	Flavonoide	107
11.6	Nitrostyren	107
11.7	Arzneistoffe	108
12.	Quellen.....	111
13.	Publikationen	130
14.	Danksagung.....	132
15.	Lebenslauf	136

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ASC	Ascorbinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adeninmonophosphat
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
cys	Cystein
cysLT-Rezeptor	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor
Da	Dalton
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FLAP	5-LO-aktivierendes Protein
fMLP	<i>N</i> -Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin
Gln	Glutamin
GSH	reduziertes Glutathion
H(P)ETE	Hydro(peroxy-)eicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminale Kinase
LDH	Lactatdehydrogenase
LT	Leukotriene
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Methoxy-Nitrostyren	3,4-Methylendioxy- β -Nitrostyren
Methoxy-BQ	2,3-Dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -Benzochinon
Methyl-BQ	2,5-Dimethyl-1,4-Benzochinon
MK2/3	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 und 3
MS	Massenspektrometrie

NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
k.I.	keine Inhibition
ns	nicht signifikant
OH-BQ	2,5-Dihydroxy-1,4- Benzochinon
PG	PBS/Glucose
PGB ₁	Prostaglandin B ₁
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RT	Raumtemperatur
r5LO-wt	rekombinante 5-Lipoxygenase- wildtyp
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
STI	Sojabohnen Trypsin-Inhibitor
TFA	Trifluouressigsäure
TQ	Thymochinon (<i>thymoquinone</i>)
Tyr	Tyrosin
5-LO	5-Lipoxygenase
vs	versus
wt	wildtyp

1. Einleitung

Die 5-Lipoxygenase (5-LO) ist das Schlüsselenzym für die Bildung proinflammatorischer Leukotriene (LT) aus Arachidonsäure (AA). LT gehören zur Klasse der Eicosanoide, einer Gruppe von Signalmolekülen, die durch Oxidation von Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen (griech. εἰκοσι, zwanzig) gebildet werden. Zu diesen Entzündungsmediatoren gehören unter anderem Leukotrien B₄ (LTB₄), welches für Phagozyten-Chemotaxis, Neutrophilen-Degranulation und Freisetzung von Superoxidanionen verantwortlich ist sowie die Cysteinyl-Leukotriene (cysLTs), die zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität beitragen und somit potente Bronchokonstriktoren darstellen [1]. Diese Eigenschaften bedingen, dass die 5-LO in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie zum Beispiel Atherosklerose, Psoriasis, Asthma bronchiale, allergische Rhinitis und auch diverser Krebserkrankungen involviert ist. Es ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse, neue Arzneimittel zu entwickeln, welche als 5-LO-Inhibitoren fungieren können. Einer der vielversprechendsten 5-LO-Inhibitoren war AA861, der im Jahr 1982 zum ersten Mal beschrieben wurde und klinische Entwicklungsstufe Phase-2 als Arzneistoff bei Allergien und Asthma bronchiale durchlief [2]. Seine geringe Bioverfügbarkeit und extensiver Metabolismus tragen allerdings dazu bei, dass die Verbindung oral als 5-LO-Inhibitor ineffektiv ist und keine ausreichende LT-Inhibition in klinischen Studien zeigen konnte [3]. Trotz großer Bemühungen, neue potente und auch gut verträgliche 5-LO-Inhibitoren in den letzten Jahrzehnten zu entwickeln, ist bis heute nur der Wirkstoff Zileuton zur Behandlung des Asthma bronchiale auf dem amerikanischen Markt zugelassen. Durch seine ungünstige Pharmakokinetik, seine schwache inhibitorische Wirkung auf die 5-LO-Produktbildung und sein Potential, schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorzurufen, ist der Einsatz dieses Eisenligand-Inhibitors jedoch limitiert [4]. Die Wirkungsweise von 5-LO-Inhibitoren zu verstehen und neue Angriffspunkte an diesem bedeutenden Enzym zu finden ist daher von äußerster Relevanz. Zu den neu entdeckten Angriffspunkten der 5-LO zählen vier Cysteine (Cys), welche sich in der Nähe der Eintrittspforte zum aktiven Zentrum der 5-LO befinden. Es konnte gezeigt werden, dass Nitrofettsäuren (NFS), welche hochreaktive elektrophile Moleküle darstellen, die 5-LO potent über Nitroalkylierung dieser Cysteinreste inhibieren. Diese direkte Inhibition kommt durch eine irreversible Nitroalkylierung der 5-LO an den Cysteinresten Cys416 und Cys418 zustande [5]. Strukturell gehören NFS zu einer chemischen Verbindungsklasse, die Michael-Akzeptoren genannt werden. Michael-Akzeptoren sind durch eine elektronenziehende Gruppe an einer Doppelbindung charakterisiert, wodurch die Struktur einen stark elektrophilen Charakter erhält.

Hierdurch können diese Verbindungen leicht Reaktionen mit Nukleophilen eingehen. Die so genannte Michael-Addition, bei der eine nukleophile mit einer elektrophilen Substanz reagiert, spielt eine wichtige Rolle bei der direkten kovalenten Modifikation von Protein-Thiolen. Für NFS konnten außerdem antiinflammatorische Effekte im Tiermodell für pulmonale Entzündung gezeigt werden. Ihre Wirkung war Zileuton außerdem überlegen.. Neben NFS modifiziert auch U73122, das zuerst als Phospholipase C-Inhibitor (PLC-Inhibitor) beschrieben wurde, die 5-LO durch kovalente Bindung an Cysteinresten. Das geschieht über seine reaktive Maleinimidgruppe [6]. Obwohl Michael-Akzeptoren hochreaktive Verbindungen darstellen, können sie doch, durch gezielte Einstellung der Elektrophilität der elektronenziehenden Gruppe oder Anpassung bestimmter Strukturmerkmale, selektive Reaktionen eingehen. Dadurch können die so veränderten Verbindungen mit bestimmten Gruppen von Proteinen z.B. Thiolgruppen reagieren oder eine Konjugation mit Glutathion (GSH) eingehen. Das genaue Einstellen einer bestimmten Elektrophilität des Substituenten am Michael-Akzeptor kann beispielsweise zu verbesserten therapeutischen Eigenschaften bei Chalkonderivaten führen [7]. Bisher ist allerdings unbekannt, ob es sich bei der Bindung und Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen um einen Klasseneffekt der Michael-Akzeptoren handelt oder ob ganz bestimmte strukturelle Eigenschaften für die Interaktion mit den katalytisch relevanten Cysteinen der 5-LO nötig sind. Eine Vielzahl von Michael-Akzeptoren sind bereits als antiinflammatorisch wirksame Verbindungen beschrieben worden, doch es gibt häufig nur wenige Erkenntnisse über den Wirkmechanismus dieser Substanzen. Innerhalb dieser Arbeit wurden deshalb verschiedenste Klassen von michaelreaktiven Verbindungen auf ihr Potential, die 5-LO über Interaktion mit ihren Cysteinen zu inhibieren, getestet. Kapitel 11 enthält hierzu alle innerhalb dieser Arbeit getesteten michaelreaktiven Substanzen, die alle relevanten Strukturtypen von Michael-Akzeptoren abdecken sollen, mit den erhaltenen IC_{50} -Werten. Die untersuchten Michael-Akzeptoren lassen sich in sieben verschiedene Gruppen einteilen: Benzochinone, Naphthochinone, ungesättigte Verbindungen, Polyphenole, Flavonoide, Nitrostyrene und Arzneistoffe die innerhalb dieser Arbeit genauer erläutert werden.

2. Die 5-LO

2.1 Struktur der 5-LO

Die 5-LO wird, im Einklang mit ihrer Funktion als Mediator bei Immunreaktionen, vor allem in Granulozyten (PMNL, polymorphkernige Leukozyten), Monozyten (Vorläufer der Makrophagen), Mastzellen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert [1]. PMNL können in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterteilt werden (Abb. 1), die allesamt 5-LO exprimieren [8]. Sie sind Teil der angeborenen Immunantwort und bekämpfen unspezifisch Pathogene. Ihr Bildungsort ist das Knochenmark (*Medulla ossium*). Von dort werden sie in das Blut abgegeben.

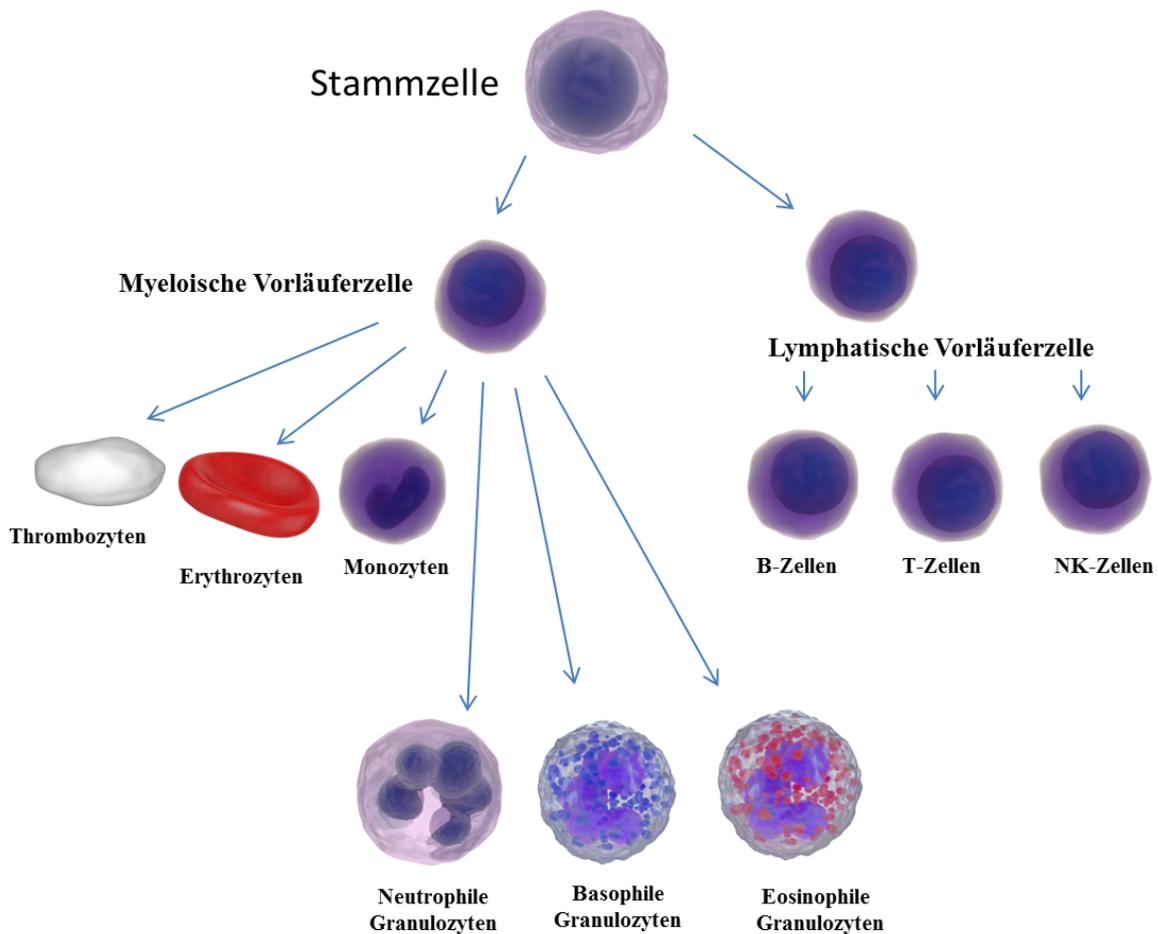


Abb. 1: Stammbaum der Immunzellen nach Galli *et al.* [9].

Die 5-LO besteht aus einer regulatorischen N-terminalen C2-ähnlichen Domäne und aus einer katalytischen C-terminalen Domäne. In letzterer liegt das nicht hämgebundene Eisen im inaktiven Zustand als Fe^{2+} im aktiven Zentrum der 5-LO vor. Durch Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} , z.B. durch Lipidhydroperoxide, wird die 5-LO aktiviert. Die C2-ähnliche-Domäne interagiert, entsprechend ihrer regulatorischen Funktion, mit zahlreichen Lipiden sowie Ca^{2+} oder Mg^{2+} . Unter normalen Bedingungen wird die katalytische Domäne von zwei Aminosäuren (Phenylalanin 177 und Tyrosin 181) verdeckt, die zusammen den sogenannten „FY cork“ (F177 and Y181) bilden (Abb. 3) [10]. Es wird angenommen, dass durch Konformationsänderung der Aminosäuren, welche den „FY cork“ bilden, ein Eintritt des Substrates in die katalytische Domäne gewährt wird [10]. In direkter Nachbarschaft zur Substrateintrittsstelle befinden sich vier Cysteine (Cys159, Cys300, Cys416 und Cys418). Abb. 2 zeigt die Struktur der stabilen 5-LO (Abb. aus Hörnig *et al.* entnommen).

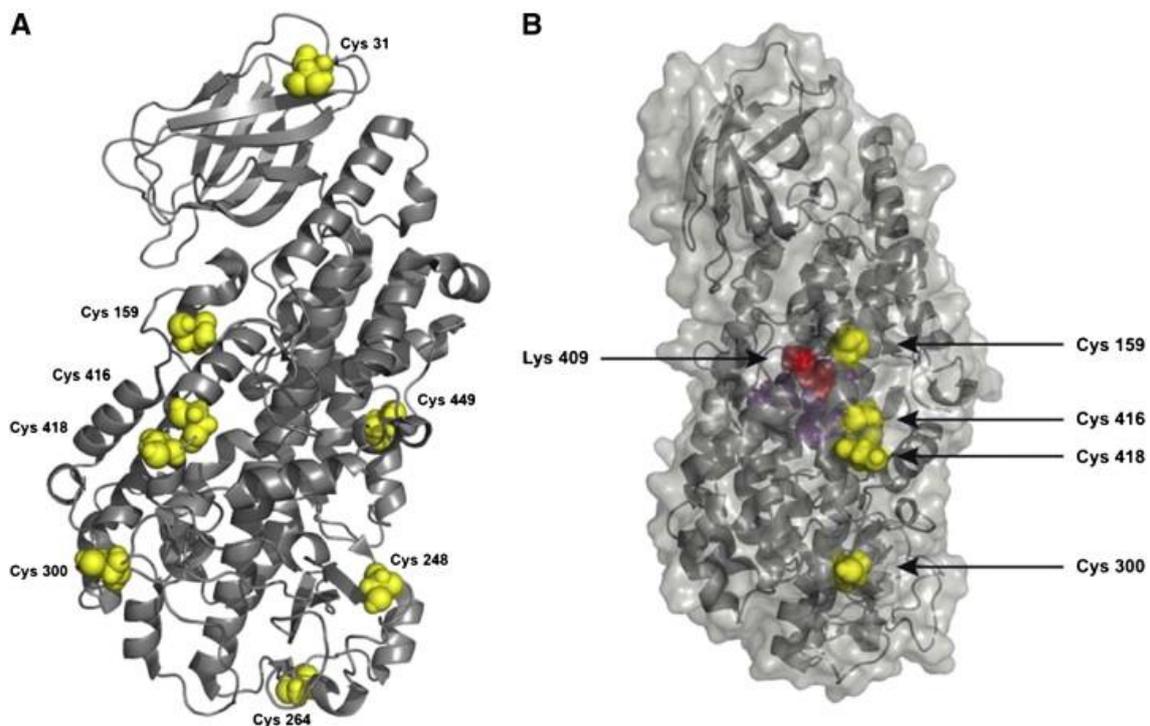


Abb. 2: Struktur der stabilen 5-LO nach Hörnig *et al.* [6]:

(A) Darstellung des Rückgrats der stabilen 5-LO-Kristallstruktur (PDB-Code: 3o8y [11]). In gelb sind die oberflächlichen Cysteine der 5-LO dargestellt. (B) Seitenansicht der stabilen 5-LO [10]; In rot die angenommene Substrateintrittsstelle, die durch Lysin (Lys) 409 angezeigt wird. In gelb sind die Cysteinreste Cys159, Cys416, Cys418 und Cys300 dargestellt; In lila Reste des aktiven Zentrums.

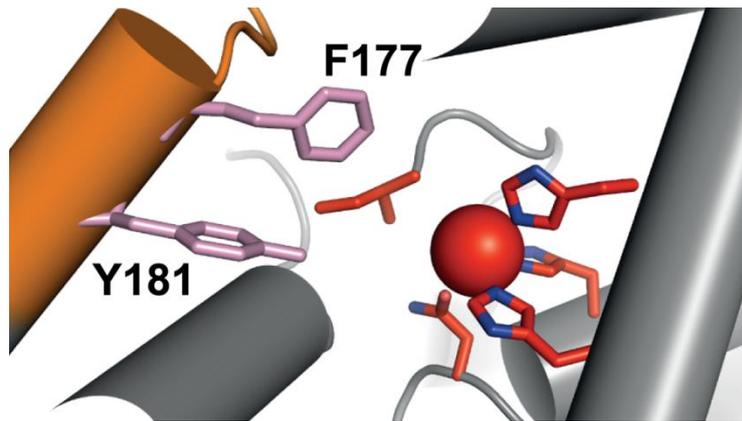


Abb. 3: Modell des „FY cork“: In grau Teile der katalytischen Domäne der 5-LO, in rot das Nicht-Häm-gebundene Eisen und die koordinierenden Aminosäuren; In rosa der „FY cork“ F177, Y181. (Abb. aus Häfner *et al.* [12]).

2.2 Enzymatische Funktion der 5-LO

Die Aktivität der 5-LO ist, gemäß ihrer Funktion in der Zelle, streng kontrolliert. Im unstimulierten, ruhenden Zustand der Zelle befindet sich die 5-LO im Cytosol oder Nukleus [13]. Nach Aktivierung, bspw. durch Calcium, transloziert die 5-LO zur Kernmembran, wo ihr durch die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂, *cytosolic phospholipase A₂*) AA aus Phospholipiden der Kernmembran bereitgestellt wird [13]. Damit die 5-LO AA effizient nutzen kann, steht ihr ein Helfer-Protein, das sogenannte 5-LO-aktivierende Protein (FLAP) zur Verfügung [14]. Die 5-LO katalysiert in einer zweistufigen Reaktion die Umwandlung von AA über 5-HPETE (*5(S)-Hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraensäure*) zu LTA₄ [13]. Dieses ist aufgrund seiner Epoxid-Struktur sehr instabil und wird durch die LTA₄—Hydrolase weiter zu LTB₄ umgewandelt oder durch Konjugation mit Glutathion zu LTC₄ vereint. Die Bildung von 5-HETE (*5-Hydroxyeicosatetraensäure*) findet durch Reduktion von 5-HPETE statt. [15]. Dieses kann dann mittels der 5-HEDH (*5-Hydroxyeicosanoid-Dehydrogenase*), einer NADP⁺-abhängigen Dehydrogenase, weiter zu 5-OXO-ETE oxidiert werden. Auf diese Weise können im Zusammenspiel mit der 12- und/ oder 15-LO auch entzündungshemmende Lipoxine (Lipoxin B₄, Lipoxin A₄) gebildet werden [16] (Abb. 4).

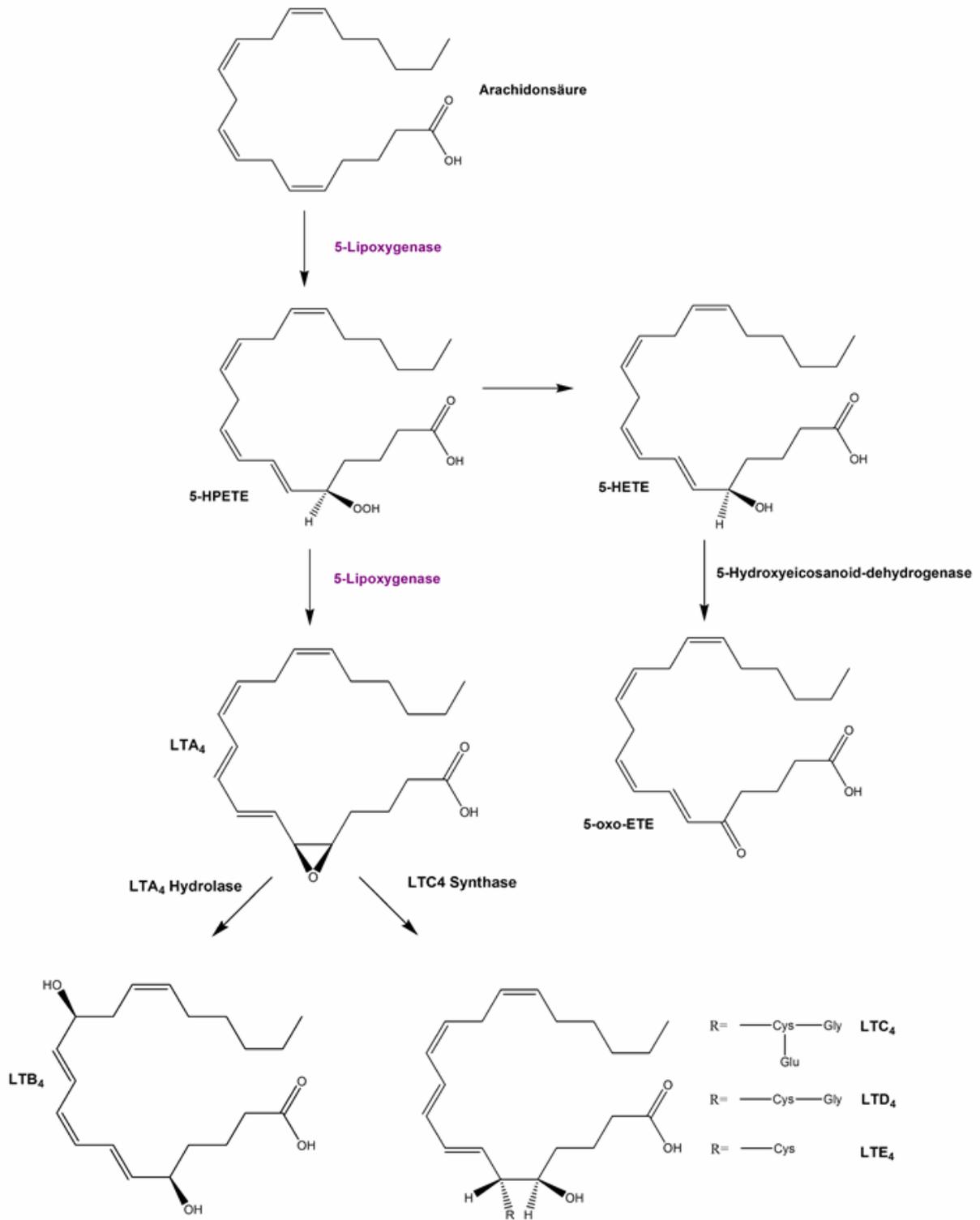


Abb. 4: Der 5-LO-Pathway in Anlehnung an [17].

2.3 Regulation der 5-LO

Die Bildung von 5-LO-Produkten ist ein streng kontrollierter Prozess, welcher zahlreichen modulierenden Einflüssen in der Zelle unterliegt [18]. Eine Stimulierung erfolgt unter anderem durch *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP), den Plättchen-aktivierenden-Faktor (PAF), Zytokine, Mikroben, aber auch durch Calcium bereitstellende Verbindungen wie Ionophor, Thapsigargin, sowie durch phagozytierende Partikel wie Urate, opsonisierendes Zymosan oder auch Phosphatkristalle [19]. Stimulierungen wie diese können gleichzeitig cPLA₂ aktivieren, was die Translokation der 5-LO zur perinukleären Region initiiert. Hier befindet sich die 5-LO in unmittelbarer Nähe zu FLAP, welches an die Membran assoziiert ist [20]. Des Weiteren führen verschiedenste Formen des Zellstress, z.B. durch osmotischen Schock (z.B. NaCl), durch oxidativ oder genotoxisch wirkende Substanzen (z.B. Natriumarsenit), zu einer calciumunabhängigen Stimulierung durch Phosphorylierung. Diese aktiviert über p38, eine mitogenaktivierte Proteinkinase, den MAP-Kinase-Weg, was wiederum die Phosphorylierung der 5-LO an Serin 271 zur Folge hat [19][21]. Ein weiterer Mechanismus, über den die 5-LO durch Phosphorylierung aktiviert werden kann, ist über ERK (*extrazellulär signalregulierte Kinase 1/2*) [13], durch welche Serin 663 aktivierend phosphoryliert wird [22]. Steigende cAMP-Spiegel der Zelle führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und können die 5-LO in ihrer Aktivität negativ beeinflussen, indem Serin 523 phosphoryliert wird [23]. Die verminderte Aktivität der 5-LO beruht hierbei auf der Inhibition der nukleären Importfunktion einer nukleären Lokalisationssequenz. Das hat die Anreicherung von 5-LO im Cytoplasma zur Folge. Eine Lokalisation der 5-LO im Cytoplasma bedeutet gleichzeitig eine Verringerung der LT-Biosynthese [23]. Eine weitere Modulierungsmöglichkeit der 5-LO-Aktivität erfolgt durch das humane *coactosin-like protein* (CLP) [1]. Es wird angenommen, dass die Translokation der 5-LO zur Kernmembran zur Bildung von LTA₄ führt und CLP hierbei mit der 5-LO während der Translokation mitmigriert [1]. Während AA zu 5-HPETE und schließlich zu LTA₄ umgewandelt wird, verursacht die 5-LO eine Wasserstoffabspaltung an den Kohlenstoffomen 7 und 10. Die Abspaltung am Kohlenstoffatom 10 wird wahrscheinlich durch die Bindung der 5-LO mit CLP und der Membran unterstützt, welche eine aktive 5-LO-Konformation darstellt [24]. Die Anwesenheit von CLP und Phosphatidylcholin führt zu einer dreifach höheren LTA₄-Produktion [24]. Ein weiterer aktivierender Modulator ist Adenosintriphosphat (ATP). Dieses bindet an die 5-LO und erhöht die Enzymaktivität. Es wird angenommen, dass ATP die 5-LO über eine Stabilisierung der Proteinstruktur aktiviert [25]. Die hohe Affinität der 5-LO zu ATP wird

außerdem zur 5-LO-Aufreinigung über ATP-Säulen genutzt (siehe Kapitel Methoden). Auch der Redoxstatus der Zelle hat großen Einfluss auf die Enzymfunktion der 5-LO, da, je nach Status, das zentrale Eisen der 5-LO zu Fe^{3+} oxidiert werden kann, was wiederum eine Enzymaktivierung zur Folge hat. Lipidhydroperoxide (LOOH) sind hierbei wichtige Parameter für den Redoxstatus der Zelle. Sie werden vor allem unter Bedingungen gebildet, welche Lipidperoxidation begünstigen, z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die Zugabe von Peroxiden, die Hemmung von Glutathionperoxidase (GPx) oder die Depletion von Glutathion (GSH) [26]. Abb. 5 zeigt hierzu die verschiedenen Regulationsmöglichkeiten der 5-LO.

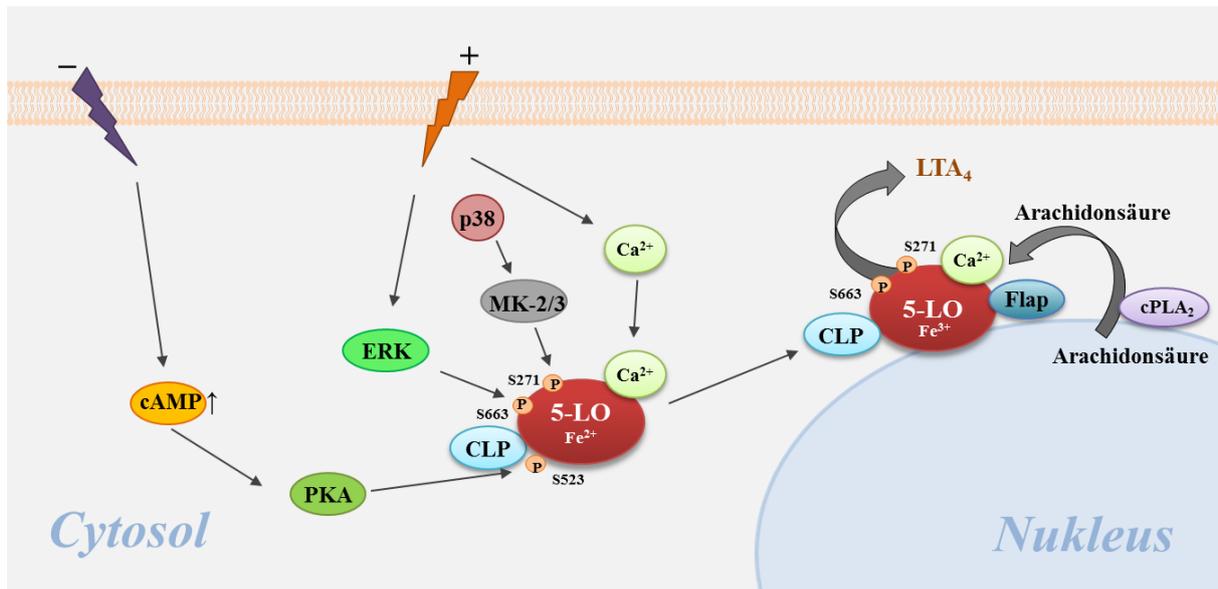


Abb. 5: Die 5-LO-Regulation in Anlehnung an [1]. In ruhenden Zellen ist die 5-LO entweder im Cytosol oder innerhalb des Nucleus lokalisiert. Bei Aktivierung wandert die 5-LO zur Kernmembran, wo ihr die cytosolische Phospholipase 2 (cPLA₂) und das 5-LO-aktivierende Protein (FLAP) bei der Leukotrienbiosynthese helfen. cPLA₂ setzt hierbei AA aus Phospholipiden frei, während membrangebundenes FLAP vermutlich den Transport von AA zur 5-LO ermöglicht. Das coaktosin-ähnliche Protein (CLP) scheint immer in einem Komplex mit der 5-LO vorzuliegen und bei Aktivierung durch Calcium mit ihr im Verbund zur Kernmembran zu gelangen. Nukleäre Importsequenzen der 5-LO bestimmen den Import in den Nucleus. Stimuli der LT-Biosynthese führen zu einem Anstieg von Calcium und/ oder aktivieren mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Bei Aktivierung der 5-LO wird das Eisen der 5-LO durch Lipidhydroperoxide oxidiert. Serin 271 der 5-LO wird durch die p38 regulierte MK2/3 (MAPK abhängige PK) phosphoryliert, was zu einer Steigerung der 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen führt. Die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) phosphoryliert die 5-LO an Serin 663. Erhöhte cAMP-Spiegel aktivieren die Proteinkinase A, was die 5-LO-Aktivität über eine Phosphorylierung an Serin 523 hemmt [1].

2.4 Rezeptoren der 5-LO-Produkte

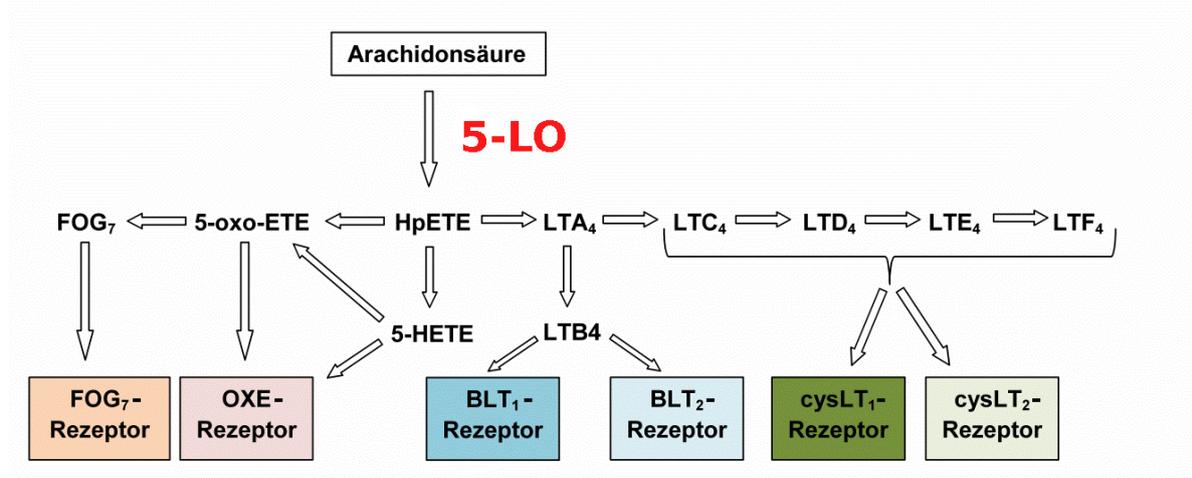


Abb. 6: Rezeptoren der 5-LO-Produkte nach Rubin [27].

Die biologischen Funktionen der 5-LO-Produkte werden erst nach Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Targetzellen vermittelt (Abb. 6). Folgende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind dafür bekannt [17]:

1. BLT₁-Rezeptor
2. BLT₂-Rezeptor
3. CysLT₁-Rezeptor
4. CysLT₂-Rezeptor
5. OXE-Rezeptor

2.4.1 6. FOG₇-Rezeptor

LTB₄-Rezeptoren

Es gibt zwei verschiedene LTB₄-Rezeptoren (BLT-Rezeptoren). Der BLT₁- und der BLT₂-Rezeptor haben eine Homologie von 36-45 % zueinander [17], wobei LTB₄ eine höhere Affinität zum BLT₁-Rezeptor aufweist [28]. Der BLT₁-Rezeptor wird vor allem in Leukozyten exprimiert und stellt einen wichtigen Mediator für die Chemotaxis dar. So wird LTB₄ auch mit Erkrankungen wie Atherosklerose, Asthma bronchiale und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang gebracht [29]. Der BLT₂-Rezeptor wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert, man findet ihn aber auch auf neutrophilen Granulozyten. 12(*S*)-Hydroxy-5*Z*,8*E*,10*E*-Heptadecatriensäure (12-HHT) bindet mit einer höheren Affinität als LTB₄ an den BLT₂-Rezeptor [17]. Bis heute sind Substanzen, welche mit den BLT-Rezeptoren

interagieren, nicht weit entwickelt worden - im Gegensatz zu den cysLT-Rezeptor-Antagonisten [17].

CysLT-Rezeptoren

Die cysLTs LTC₄, LTD₄ und LTE₄ unterscheiden sich durch ihre Bindungsaffinitäten zu den beiden Gq-Protein-gekoppelten cysLT-Rezeptoren. LTD₄ zeigt, gefolgt von LTC₄ und LTE₄, die stärkste agonistische Potenz am cysLT₁-Rezeptor. LTC₄ und LTD₄ zeigen zum cysLT₂-Rezeptor eine ähnlich starke Affinität, wohingegen LTE₄ hier nur ein schwacher Agonist ist [30]. Der cysLT₁-Rezeptor findet sich vor allem auf eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Zellen der glatten Bronchialmuskulatur [31], der cysLT₂-Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Lungen-Makrophagen und Endothelzellen [17]. Der cysLT₁-Rezeptor vermittelt Gefäßpermeabilität, Bronchokonstriktion, Reifung dendritischer Zellen und deren Einwanderung. Der cysLT₂-Rezeptor scheint vor allem für die endotheliale Zellaktivierung zuständig zu sein, wohingegen beide Rezeptoren zur Makrophagen-Aktivierung und Proliferation sowie Fibrose glatter Gefäßmuskulatur beitragen [17]. Da diese Rezeptoren eine wichtige Bedeutung für die Pathogenese des Asthma bronchiale haben, wurden sie intensiv beforscht und cysLT-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, von denen es Montelukast in Deutschland und den USA und Zafirlukast in den USA bis zur Marktzulassung geschafft haben [32]. Aktuell gibt es eine beschriebene Verbindung (Gemilukast), die auch in der Lage ist, den cysLT₂-Rezeptor zu antagonisieren [17]. Abb. 7 zeigt Angriffspunkte von LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ und LTF₄ nach Freisetzung aus der Zelle.

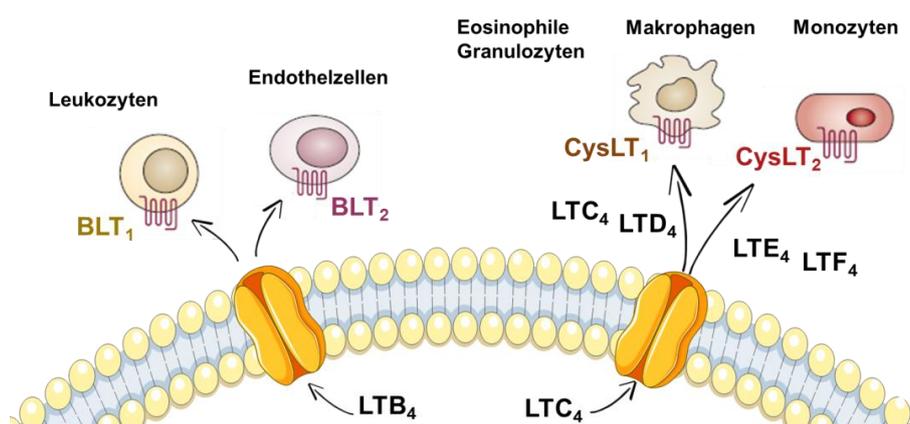


Abb. 7: Angriffspunkte von LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄ und LTF₄ nach Freisetzung aus der Zelle.

Oxoicosanoid-Rezeptoren

Der Oxoicosanoid-Rezeptor (OXE-Rezeptor) zählt zu den G_i-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und wird von 5-OXO-ETE (*5-Oxo-eicosatetraensäure*) adressiert, welches aus 5-HETE durch 5-HEDH gebildet wird. 5-OXO-ETE besitzt zum einen chemotaktische Eigenschaften auf eosinophile und neutrophile Granulozyten, zum anderen induziert es die Aktin-Polymerisation, Calcium-Mobilisierung, Integrin-Expression sowie Degranulierung und stimuliert das Wachstum von Prostatakarzinomzellen [33, 34, 17].

FOG₇--Rezeptoren

5-OXO-ETE kann weiter zu FOG₇ (*5-OXO-7-glutathionyl-8,11,14-eicosatetraensäure; five-oxo glutathione*) umgewandelt werden, dessen Rezeptor bisher noch nicht charakterisiert wurde [27, 35]. FOG₇ entsteht durch Michael-Addition von 5-OXO-ETE mit GSH an Position 7. Es stimuliert die Migration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, doch sind diese Effekte im Gegensatz zu 5-OXO-ETE eher schwach ausgeprägt, weil durch den Glutathionrest an Position 7 eine Wirkung über den OXE-Rezeptor sehr unwahrscheinlich ist [36]. Ein weiteres Glutathion-Addukt ist LTC₄, welches seine Effekte über den cysLT-Rezeptor auslöst [35]. Wie genau die Wirkungen von FOG₇ hervorgerufen werden, ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

2.5 Inhibitionsmöglichkeiten der LT-Effekte

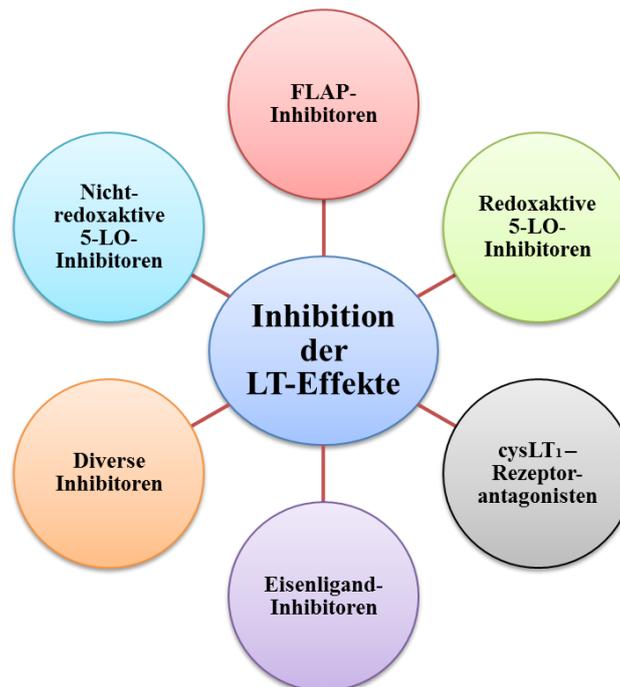


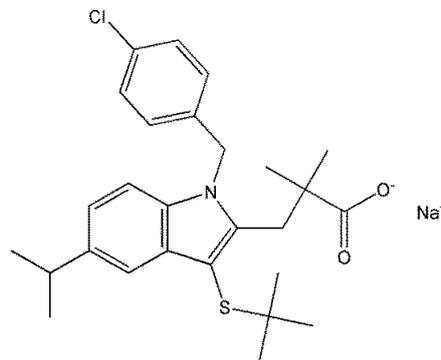
Abb. 8: Möglichkeiten die Effekte und Auswirkungen von LT zu inhibieren.

Geeignete Targets für die pharmakologische Inhibition der LT-Bildung sind cPLA₂, 5-LO, FLAP, LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase, wobei die 5-LO die bedeutendste Rolle spielt. Eine direkte Inhibition der 5-LO-Aktivität führt zur Unterdrückung der Bildung von LTB₄, cysLT sowie 5-H(P)ETE [26]. Zu den direkten 5-LO-Inhibitoren gehören die redoxaktiven 5-LO-Inhibitoren, die Eisenligand-Inhibitoren und die nicht-redoxaktiven 5-LO-Inhibitoren. Weiter finden sich auch die indirekten Inhibitoren, zu denen man die FLAP-Inhibitoren und cysLT-Inhibitoren zählt. Verbindungen, deren genauer Mechanismus noch nicht geklärt ist, werden der Klasse der diversen Inhibitoren zugeordnet. Abb. 8 können die verschiedenen Möglichkeiten, LT-Effekte zu inhibieren, entnommen werden. Der einzige bisher zugelassene 5-LO-Inhibitor ist der Eisenligand-Inhibitor Zileuton, welcher zur Behandlung des Asthma bronchiale in den USA auf dem Markt erhältlich ist. So groß die anfängliche Hoffnung, die in diesen Arzneistoff gesetzt wurde auch war, seine Lebertoxizität, seine irreversible Inhibition der Glutathion-S-Transferase [37] und seine ungünstige Pharmakokinetik mit kurzer Halbwertszeit [38], die mehrmals tägliche Gaben notwendig machen, stellen große Nachteile dieses Arzneistoffes dar. Deshalb ist es bis heute das Ziel zahlreicher Forschungsgruppen, einen 5-LO-Inhibitor mit hoher Potenz, günstiger Bioverfügbarkeit sowie Gewebeverteilung, guter klinischer Effizienz und gutem Sicherheitsprofil zu entwickeln [39]. Inzwischen ist eine

retardierte Arzneiform von Zileuton (Zyflo CR® [40]) zugelassen, die der ungünstigen Pharmakokinetik entgegenwirkt. Möglichkeiten, um neue Inhibitoren zu entwickeln, sind u.a., bereits bekannte Verbindungen in ihren Eigenschaften zu verbessern oder neue Angriffspunkte zu finden [39]. Die in der Forschung am weitesten fortgeschrittene Verbindung ist Atreleuton, welches wie Zileuton ein *N*-Hydroxyurea-Derivat ist, das sich zur Zeit in verschiedenen klinischen Phase-2-Studien für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und vaskulären Entzündungen befindet [41].

FLAP-Inhibitoren

2.5.1



MK886

Abb. 9: FLAP-Inhibitor MK886

Die Identifikation von FLAP erfolgte über die Fähigkeit von MK886 (Abb. 9) an FLAP zu binden [28]. MK886 hat durch seine Struktur die Fähigkeit, die Bindungstasche für das Substrat AA auszufüllen und dadurch mit AA um die Bindung zu konkurrieren [42]. Studien haben gezeigt, dass FLAP die Prozessierung exogener AA durch die 5-LO verstärken kann, hierfür aber nicht zwingend notwendig ist [14]. Klinische Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass der nächste auf dem Markt verfügbare LT-Biosynthese-Inhibitor sehr wahrscheinlich ein FLAP-Inhibitor sein wird. Die hier am weitesten entwickelte Substanz ist Licofelon [43]. Licofelon erreichte die klinische Entwicklungsstufe Phase-3 zur Behandlung einer Kniegelenksarthrose und weist bei gesunden Probanden im Vergleich zu anderen nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) eine verbesserte gastrointestinale Verträglichkeit und ein geringeres Risiko für Ulzerationen auf [44]. Licofelon zählt durch seine zusätzliche inhibierende Wirkung auf die COX-1 und COX-2 zu den dualen Inhibitoren. Die Entwicklung von Verbindungen, welche mehrere Zielstrukturen adressieren, wie zum Beispiel FLAP, die mikrosomale Prostaglandin-E-Synthase-1 (mPGES₁) und/ oder die lösliche Epoxidhydrolase, bringt zum einen den Vorteil, dass eine verstärkte antiinflammatorische Effizienz erreicht

werden kann und zum anderen, dass meist weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen unter diesen Substanzen auftreten [39].

Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren

2.5.2

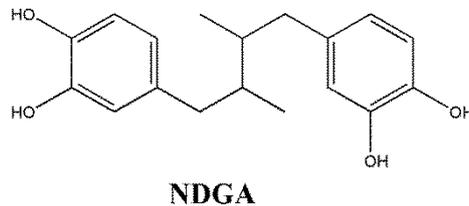


Abb. 10: Der redoxaktive 5-LO-Inhibitor NDGA.

Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren sind hauptsächlich lipophile und reduzierend wirkende Verbindungen wie Nordihydroguajaretsäure (NDGA) (Abb. 10), Flavonoide, Indazolinone [45] oder Coumarine [17]. Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren sind in der Lage, das Eisen im aktiven Zentrum der 5-LO zu reduzieren und so den katalytischen Kreislauf zu entkoppeln. Redoxaktive Verbindungen sind oft wenig selektiv für die 5-LO und verursachen durch ihre mögliche Interferenz mit anderen Redoxsystemen oder durch Bildung von ROS zahlreiche unerwünschte Arzneimittelwirkungen (z.B. Methämoglobinbildung) [46, 17]. Obwohl sie in *in vitro* meist sehr potente Wirkstoffe darstellen, verfügen sie nur über eine geringe orale Bioverfügbarkeit. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass redoxaktive 5-LO-Inhibitoren aufgrund ihrer unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen biologischen Systemen eine Marktzulassung erreichen werden [47].

Nichtredoxaktive 5-LO-Inhibitoren

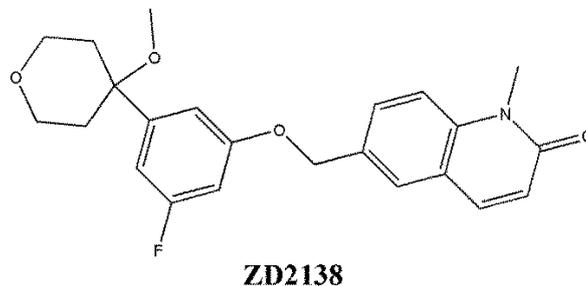


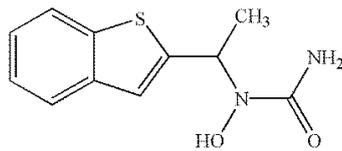
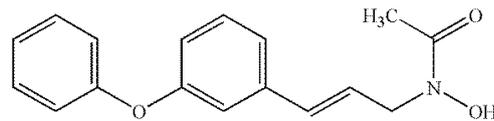
Abb. 11: Der nichtredoxaktive 5-LO-Inhibitor ZD2138.

Verbindungen dieser Klasse konkurrieren mit AA um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum der 5-LO. Strukturell gesehen weisen Vertreter dieser Gruppe große Unterschiede zueinander

auf, zeichnen sich aber durch eine hohe Selektivität aus. ZD2138 (Abb. 11) ist ein Beispiel dafür, wie aus kaum wasserlöslichen Substanzen (Methoxyalkylthiazolen oder Methoxytetrahydropyranen) mit gleichzeitig kurzen Halbwertszeiten durch Strukturoptimierung oral bioverfügbare Verbindungen entwickelt werden können [17].

Eisenligand-Inhibitoren

2.5.4

**Zileuton****BWA4C****Abb. 12:** Die Eisenligand-Inhibitoren Zileuton und BWA4C.

Eisenligand-Inhibitoren sind durch ihre Struktur in der Lage, das im aktiven Zentrum der 5-LO befindliche Eisen zu chelatieren. Eisenligand-Inhibitoren sind meist Hydroxamsäurederivate, wie BWA4C oder Hydroxyharnstoffderivate wie Zileuton (Abb. 12), wobei die Hydroxyharnstoffstruktur hydrolytisch stabiler ist. BWA4C wurde aufgrund seines starken inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung in intakten Granulozyten mit einem IC_{50} -Wert von ~ 40 nM [48] in dieser Arbeit als Kontrollsubstanz verwendet. Zileuton ist, wie einleitend beschrieben, die bisher einzige Substanz, welche eine Marktzulassung auf dem Gebiet der 5-LO-Inhibitoren erreichen konnte. Mit einem IC_{50} -Wert von $4,1$ μ M [49] hemmt Zileuton die 5-LO-Produktbildung in intakten Granulozyten allerdings weniger stark als BWA4C.

Michaelreaktive Verbindungen

2.5.5

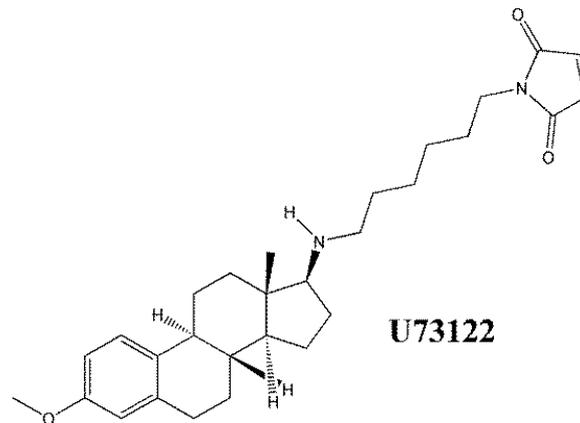


Abb.13: Struktur von U73122

Thiolreaktive oder auch michaelreaktive Verbindungen können die 5-LO über Modifikation ihrer Cysteinreste inhibieren. Sie weisen ein anderes pharmakologisches Verhalten auf als die bis hier besprochenen Inhibitoren der LT-Effekte und lassen sich strukturell nicht zu einer bereits klassifizierten Gruppe zusammenfassen. So ist z.B. die Substanz U73122 (Abb. 13) weder ein redoxaktiver bzw. nichtredoxaktiver 5-LO-Inhibitor, noch lässt sie sich den Eisenligand-Inhibitoren zuordnen. Die Verbindung inhibiert die 5-LO durch kovalente Modifikation des Cysteinrestes Cys416 [6]. Diese Entdeckung ist ein Neuansatz, michaelreaktive Substanzen als eine neue Klasse der 5-LO-Inhibitoren zu definieren [6].

2.6 Cysteine der 5-LO

Cysteine sind redoxaktive Aminosäuren, die aufgrund ihres chemischen Charakters leicht nukleophile Reaktionen oder disulfidische Verknüpfungen eingehen können. Sie sind wichtig für die Signaltransduktion, die Proteinfunktion und die Proteinregulation durch posttranslationale Modifikationen [50–53]. Die Cysteine Cys159, Cys300, Cys416 und Cys418 sind in unmittelbarer Nachbarschaft zur Substrateintrittsstelle der 5-LO lokalisiert [6]. Ein Unterschied zwischen humaner und muriner 5-LO besteht darin, dass Cys418 nur in humaner 5-LO vorhanden ist [6]. Die Nähe der genannten Cysteinreste zur Eintrittsstelle in das aktive Zentrum der 5-LO, machen sie zu einem neuen und sehr interessanten Target. Abb. 14 zeigt die Kristallstruktur der stabilen 5-LO [6]. Angefügt findet sich die mögliche Reaktion eines Thiolrestes (SH) mit einer durch Elektronenzug aktivierten Doppelbindung. Diese Reaktion nennt man Michael-Addition.

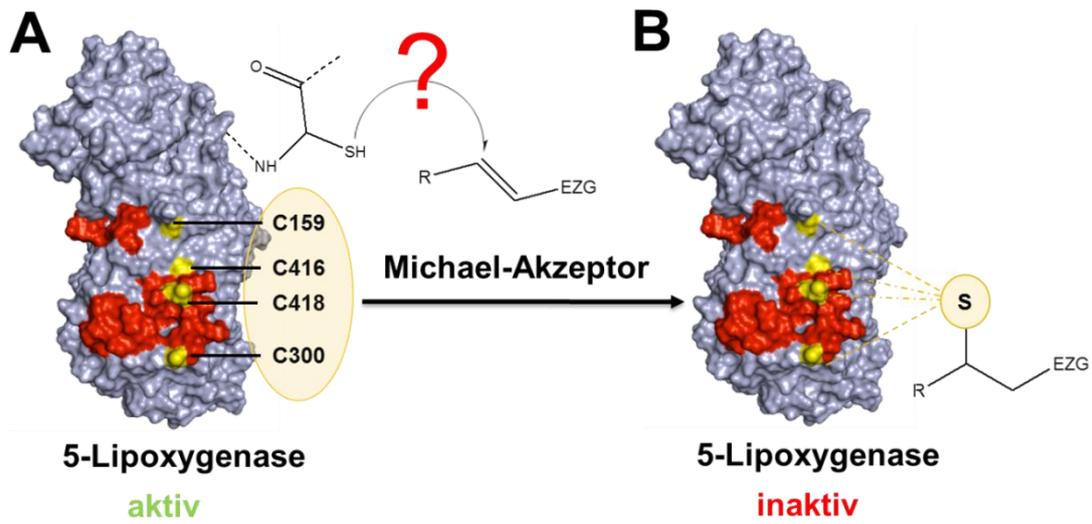


Abb. 14: Schematische Darstellung einer Michael-Addition an die Cysteinreste der 5-LO. (A) Kristallstruktur der stabilen 5-LO mit in gelb markierten Cysteinresten in der Nähe des aktiven Zentrums und der möglichen Michael-Addition eines Cysteinrestes mit einer aktivierten Doppelbindung eines Michael-Akzeptors. (B) zeigt die inaktive 5-LO nach Bindung mit einer michaelreaktiven Verbindung an einem der Cysteinreste C159, C416, C418 und C300.

3. Entzündungsprozesse

Das Immunsystem spielt beim Eindämmen von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle und schützt den Organismus vor Pathogenen wie z.B. Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen. Für diese Funktion gibt es zum einen die angeborene Immunantwort, welche unspezifisch z.B. durch Phagozytose oder physiologische Barrieren den Körper vor Eindringlingen schützt, zum anderen die anpassungsfähige adaptive Immunantwort. Letztere entwickelt sich über die gesamte Lebensdauer des Organismus und ist dementsprechend wesentlich spezifischer. Bei einer Entzündung kommt es zu einer Vasodilatation. Durch den daraus resultierenden erhöhten Blutfluss entsteht eine Rötung (Rubor) und Wärme (Calor). Eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße führt zu einer Exsudation von Plasmaproteinen und Flüssigkeiten in das Gewebe, wodurch ein Ödem entsteht, das sich als Schwellung (Tumor) manifestiert. Durch freigesetzte Mediatoren wie z.B. Bradykinin kommt es dann zum Schmerz (Hyperalgesie, Dolor), der Grund für einen Funktionsverlust (Functio laesa) der entzündeten Stelle ist. Da eine Entzündung eine allgemeine Abwehrreaktion des Immunsystems ist, wird dieses durch zahlreiche Mechanismen kontrolliert, um den Körper vor immunologischen Überreaktionen zu schützen. Für diese Regulation der Immunantwort sind posttranslationale Modifikationen von Proteinen sehr wichtig [54]. Modifikationsmöglichkeiten sind vor allem über Aminosäurereste gegeben, welche phosphoryliert (z.B. Serin), methyliert (z.B. Lysin, Arginin), alkyliert und nitrosyliert (z.B. Cystein, Tyrosin) werden können und so das Protein in seiner Funktion beeinflussen. Störungen des Immunsystems können zu Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und Tumoren führen. Da Leukotriene hochwirksame Mediatoren entzündlicher und auch allergischer Reaktionen darstellen, bietet die 5-LO einen wichtigen Angriffspunkt, um diese Prozesse im Körper, durch Entwicklung neuartiger Modulatoren bzw. Inhibitoren ihrer Enzymaktivität, zu beeinflussen.

4. Michaelreaktive Verbindungen

Michaelreaktive Verbindungen sind durch elektronenziehende Gruppen an einer Doppelbindung aktivierte und hochreaktive Verbindungen, welche sich durch eine ausgeprägte Elektrophilie auszeichnen. Dementsprechend reagieren sie innerhalb einer sogenannten Michael-Addition leicht mit nukleophilen Thiolgruppen (Michael-Donatoren). Bei einer Michael-Addition reagiert ein nukleophiler Michael-Donator mit einem elektrophilen Michael-Akzeptor (Abb.15).

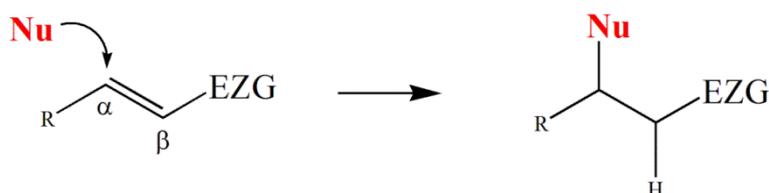


Abb. 15: Schematische Darstellung einer Michael-Addition. Eine nukleophile Verbindung (Nu), der Michael-Donator, bspw. ein Enolat eines Ketons oder Aldehyds, geht eine Additionsreaktion mit einer, über eine elektronenziehende Gruppe (EWG) aktivierten, α,β -ungesättigten Carbonylverbindung (Michael-Akzeptor) ein.

Einige Studien konnten zeigen, dass eine Erhöhung der Elektrophilie des Michael-Akzeptors auch die Potenz des jeweiligen Wirkstoffes erhöhen kann. Chalkonderivate sind ein Beispiel für Verbindungen [7], für die bereits thiolalkylierende Eigenschaften beschrieben wurden. Für spezifische Reaktionen ist eine gezielte Einstellung der Elektrophilität wichtig: Ist diese zu niedrig, ist es unwahrscheinlich, dass die Verbindung in pharmakologisch erreichbaren Konzentrationen effektiv ist. Ist die Elektrophilität der Substanz zu hoch, kann diese unspezifisch mit Thiolen verschiedenster Proteine reagieren oder durch Glutathion abgefangen werden. Eine moderate Elektrophilität hingegen vermeidet einen schnellen Abbau und begünstigt die Reaktion mit einer geringen Anzahl von Proteinen, deren Thiolgruppen ungeschützt bzw. aktiviert vorliegen. Somit ist es möglich, dass diese Verbindungen an Protein-Redox-Regulationen teilnehmen wie am Beispiel von Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) oder NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zu sehen ist [7]. Eine direkte kovalente Modifikation von Proteinen an ihren Thiolen kann u.a. Nrf-2 (*nuclear respiratory factor 2*) aktivieren und NF- κ B inhibieren (durch Alkylierung der p65 Untereinheit), was zum Eindämmen von Entzündungsreaktionen führen kann [55]. Keap1 ist ein Regulator von Nrf-2; Wird Keap1 durch NFA beispielsweise alkyliert, führt dies zur Freisetzung von Nrf-2 aus dem Verbund mit Keap1, wodurch es zur Aktivierung des Nrf-2-Signalweges kommt [5]. Weiterhin konnte für monozyklische Cyanoenone gezeigt werden,

dass die Reaktivität ihrer Michael-Akzeptor-Struktur in Korrelation mit der biologischen Potenz steht [56]. Auch das Cyclopentenon-Prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), ein PPAR- γ (*Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren*)-Agonist, welcher in vielen Experimenten entzündungshemmende Effekte zeigte, modifiziert Proteine über deren Thiolgruppen [57].

4.1 Benzochinone

Benzochinonderivate sind in nahezu allen Formen des Lebens zu finden [58]. Wie auch andere sekundäre Metaboliten leiten sich Benzochinone von einigen Schlüsselintermediaten, hauptsächlich Acetat, Shikimat und Mevalonat ab [58]. Die primären Metaboliten Ubichinon und Plastochinon sind an vielen chemischen Prozessen wie der Photosynthese, dem Elektronentransport, der Proteinmodifikation und Zellsignalwegen beteiligt [59]. Benzochinone zeigen antioxidative, antiinflammatorische und antikanzerogene Eigenschaften [60]. Auch eine Wirkung gegen Malaria wurde bereits beschrieben [61]. Bisher sind nicht alle Effekte vollständig verstanden. Ein Teil der Wirkungen wird auf die Bildung von ROS zurückgeführt, welche durch Auslösen oxidativen Stresses, Infektionen in der Zelle eindämmen [61]. ROS lösen durch ihre Zytotoxizität, Immunotoxizität und Karzinogenese eine Reihe von Effekten aus, die den Organismus schädigen [62, 63]. Die Zytotoxizität von Benzochinonen in ruhenden oder sich nicht teilenden Zellen wird einer Oxidation essentieller Proteine durch ROS oder Alkylierung zugeschrieben [61]. Die zytotoxischen Effekte in sich schnell teilenden Zellen werden durch DNA-Modifikationen ausgelöst [64]. Neben der Bildung von ROS können *para*-Benzochinone als Michael-Akzeptoren fungieren und mit nukleophilen Resten z.B. cysteinyl-Thiolen oder Aminen von Proteinen reagieren, was als Folge die Zelle schädigen kann [62, 64]. Auch das im Jahr 1982 erstmals beschriebene AA861, welches zur Klasse der redoxaktiven-Inhibitoren gezählt wird, ist ein Benzochinondrivat. Es wurde angenommen, dass Benzochinone im zellulären Milieu zu einem Hydrochinon reduziert werden und dann entweder das Eisen im aktiven Zentrum der 5-LO reduzieren oder Lipidhydroperoxide abfangen, welche für die Aktivierung der 5-LO nötig sind [65, 66]. Diese Theorie ist allerdings fraglich, da viele Verbindungen auch im zellfreien System hochaktiv sind. Weiterhin besitzen 1,4-Benzochinone, welche die Produktbildung der 5-LO potent inhibieren, nur geringe antioxidative oder radikalabfangende Eigenschaften im zellfreien System [60]. Dies rückte die Bedeutung ihrer Lipophilie für die 5-LO-Inhibition in den Vordergrund [67]. So wurde vermutet, dass AA861 ein kompetitiver 5-LO-Inhibitor ist, der mit AA als Substrat um die

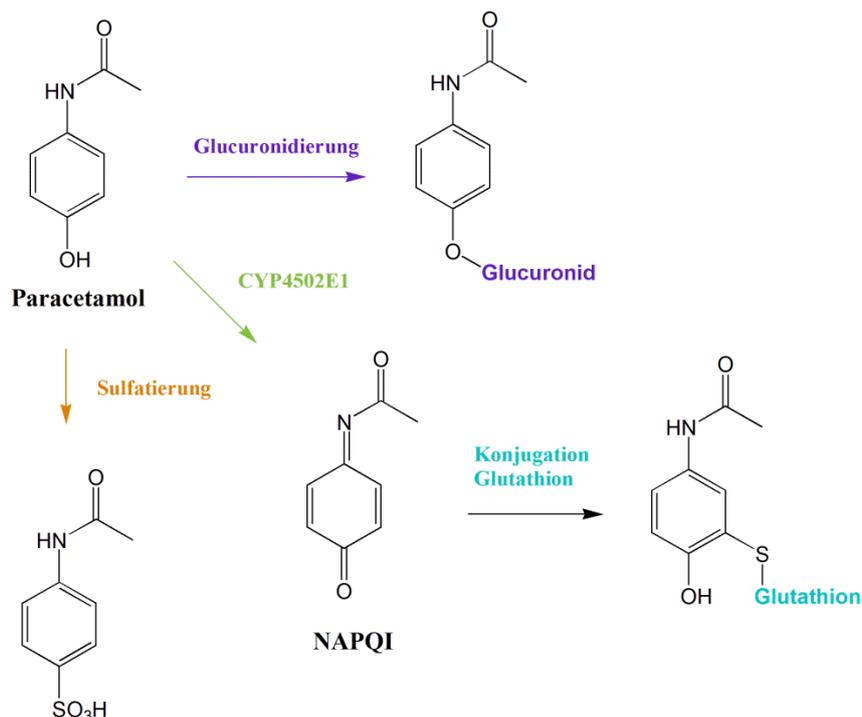
Bindung konkurrierte [68]. Obwohl der Mechanismus dieser Strukturen schon intensiv beforscht wurde, konnte der tatsächliche Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

NAPQI

NAPQI, *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin, ist der toxische Metabolit des Analgetikums sowie Antipyretikums Paracetamol. NAPQI ist bei einer Überdosierung mit Paracetamol für eine

4.1. hepatische Nekrose verantwortlich, die unbehandelt zum Tod des Patienten führen kann [69]. Die Elimination dieses schädlichen Metaboliten erfolgt über Konjugation mit Glucuronsäure und Schwefelsäure [70] sowie anschließender renaler Exkretion [69]. Bei therapeutischer Paracetamoldosis bildet das nukleophile Tripeptid GSH ein nicht toxisches Konjugat mit dessen elektrophilen Metaboliten. Bei Überdosierung erschöpfen sich zelluläre GSH-Speicher und die Konjugation kann nicht mehr stattfinden, so dass toxische Effekte hervorgerufen werden [71].

Abb. 16 zeigt den Metabolismus des Paracetamols.



4.1.2

Abb. 16: Metabolismus des Paracetamols.

TQ

TQ ist einer der wichtigsten aktiven Hauptinhaltsstoffe des flüchtigen Anteils des Schwarzkümmelöls (*volatile oil*) aus der Pflanze *Nigella sativa* (echter Schwarzkümmel) der Familie Ranunculaceae [72] [73]. Der feste Anteil (*fixed oil*) des Schwarzkümmelöls besteht hauptsächlich aus ungesättigten Fettsäuren wie der C20:2 Arachinsäure und der

Eicosadiensäure [74, 73]. Schwarzkümmelöl besitzt antiinflammatorische, analgetische, antipyretische und antineoplastische Eigenschaften [75]. Neue wissenschaftliche Studien konnten zeigen, dass die entzündungshemmende Wirkung des Schwarzkümmelöls vor allem auf dessen Inhaltsstoff TQ zurückzuführen ist [75, 76]. Die antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften von TQ spielen außerdem bei neuroinflammatorischen Prozessen im ZNS eine große Rolle [77–80]. Seine neuroprotektiven Wirkungen [81] sind u.a. für Versuchsmodelle der Multiplen Sklerose [82] und für ethanolinduzierte Neurodegeneration von Bedeutung [83, 84]. Viele der antineuroinflammatorischen Effekte von TQ können auf dessen Fähigkeit, die NF- κ B-Aktivierung (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und deren molekulare Targets zu blockieren, zurückgeführt werden [85, 86, 76]. Des Weiteren kann TQ die Wirkung des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), von Interleukin-1 β (IL-1 β) [87], NO (Stickstoffmonoxid)/ iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase), IL-6, IFN- γ (Interferon- γ), PGE₂ [88], TGF- β ₁ (*transforming growth factor β ₁*) [89], 5-LO [90] und Cyclooxygenase-2 (COX-2) [91, 92] abschwächen.

Primin

4.1.3

Primin ist im Sekret der Drüsenhaare von *Primula obconica* und anderen Primelarten der Familie Primulaceae zu finden [93, 61]. Primin konnte allerdings auch schon aus anderen Pflanzenarten wie zum Beispiel aus *Miconie* (Melastomaceae) [94, 95] und *Iris* (Iridicaceae) [96] isoliert werden. Es ist ein natürlich vorkommendes Benzochinonderivat, welches eine allergische Kontaktdermatitis, die sog. Primrose-Dermatitis, auslösen kann [97, 98]. Dieser sensibilisierende Effekt lässt sich vermutlich auf eine kovalente Bindung mit einem epidermalen Rezeptorprotein am C3 oder C5 des Benzochinonrings zurückführen [99]. Sie nimmt mit Verlängerung der Alkylkette zu, wobei der maximale Effekt bei einer Kettenlänge von 11 oder 12 Kohlenstoffatomen auftritt. Ab einer Kettenlänge von 13 Kohlenstoffatomen nimmt der sensibilisierende Effekt wieder ab. Das stärkste allergene Potential hat demnach ein chinoides Grundgerüst mit einer Alkylkette von 10 oder 11 Kohlenstoffatomen [100]. Weiterhin sind für Primin antimikrobielle, insektizide [101], molluscizide [102] antineoplastische [94, 103] und antiparasitäre [104] Effekte beschrieben worden [61, 105]. Primin und andere *para*-Benzochinone wirken durch Bildung freier Radikale und nachfolgender DNS-Strangbrüche außerdem zytotoxisch auf die humane Leukämiezelllinie KG-1a [103].

Embelin

Embelin ist in Extrakten von *Embelia ribes* der Familie Myrsinaceae zu finden [60]. Viele verschiedene Tierstudien konnten für Embelin antiinflammatorische Eigenschaften *in vivo* zeigen [60]. Hierunter befinden sich z.B. ein Colitismodell in Ratten und Mäusen [106, 107],
4.1.4 ein Mausmodell für eine akute und chronische Inflammation der Haut [108] und ein Modell für ein carrageenininduziertes Pfotenödem in Ratten [109]. Aber auch analgetische [109], antikanzerogene [110], antikonvulsive [111] und neuroprotektive Effekte sind für Embelin in Tiermodellen beobachtet worden [112]. Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass Embelin die Myeloperoxidase-Aktivität, die NO-Produktion, die Expression induzierbarer NO-Synthase, TNF- α , IL-1 β und IL-6 in isoliertem Kolongewebe im Colitismodell an Mäusen hemmt [107]. Durch Inhibition der I κ B α -Kinase (*inhibitory kappa B α kinase*) unterdrückt Embelin außerdem die Aktivierung von NF- κ B, wodurch die Phosphorylierung und der Abbau von I κ B α eingeschränkt werden [113, 114]. Durch die Hemmung NF- κ B-abhängiger Gene, die am Tumorzellüberleben, der Proliferation, Invasion und Angiogenese beteiligt sind, könnte Embelin eine wichtige Rolle für die Krebstherapie spielen [110]. Weiterhin inhibiert Embelin Effekte der 5-LO und mPGES-1 (*microsomal prostaglandin E synthase-1*), wohingegen es keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität anderer Lipoxygenasen sowie COX-1 und COX-2 zu haben scheint [60].

4.1.5

AA861

AA861 war einer der vielversprechendsten 5-LO-Inhibitoren der vergangenen Jahrzehnte. Die Verbindung wurde im Jahr 1982 erstmals vorgestellt und erreichte die klinische Entwicklungsstufe Phase-2 mit der Indikation Allergie und Asthma bronchiale. Seine schlechte Bioverfügbarkeit und extensiver Metabolismus waren jedoch Gründe für seine orale Ineffektivität [115]. Die Inhibition der 5-LO durch AA861 war demnach nicht ausreichend, um therapeutische Effekte innerhalb der klinischen Studie zu erzielen [116].

4.2 Naphthochinone

Die Verteilung verschiedener Naphthochinonderivate ist sporadisch [58]. Knapp die Hälfte aller Vertreter kommen in höheren Pflanzenfamilien vor [58]. Das 1,4-Naphthochinon bildet die Grundstruktur verschiedener Vitamin-K-Derivate und spielt strukturell diesbezüglich eine große Rolle. Abb. 17 zeigt die Grundstruktur der Naphthochinone.

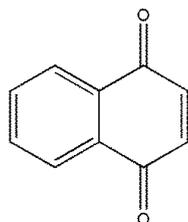


Abb. 17: Grundstruktur der Naphthochinone.

Schon im Jahr 1990 wurde beschrieben, dass 1,4-Naphthochinone einen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO besitzen und der Alkylsubstituent an Position 2 einen großen Einfluss auf die Potenz dieser Verbindungen zu haben scheint [117]. Antibakterielle, antimykotische, antivirale, antiinflammatorische sowie antipyretische Eigenschaften sind außerdem für sie beschrieben worden [118, 119].

4.2.1

Plumbagin

Das Naphthochinonderivat Plumbagin ist ein Inhaltsstoff der Heilpflanze *Plumbago zeylanica*, die über Jahrhunderte zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen wie mikrobieller Infektionen und allergischer Reaktionen in der indischen Ayurveda und der orientalischen Medizin verwendet wurde [120]. Plumbagin unterdrückt NF- κ B in aktivierten B-Zellen [121] sowie die direkte Bindung von nukleärem p65 und rekombinantem p65 an die DNA *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Bindung war durch Zugabe von Dithiothreitol sowohl *in vitro* als auch *in vivo* reversibel [121]. Weiterhin wurde in verschiedensten Zelllinien gezeigt, dass Plumbagin die CXCR4-Expression (*CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 expression*) inhibiert, wodurch es für Metastasierungsstudien eine interessante Verbindung darstellt [122]. Die Interaktion zwischen dem CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 (*CXC-Motiv-Chemokin 12*) ist in mehr als 90 Prozent der tumorassoziierten Todesfälle kritisch für die Metastasierung [122]. Verbindungen, die dementsprechend die CXCR4/CXCL12-Achse herunterregulieren können, haben das Potential, eine tumorassoziierte Metastasierung zu inhibieren [122]. Des Weiteren reduziert Plumbagin durch Apoptoseinduktion die Viabilität humaner Prostatakarzinomzellen

[120, 121]. Da dieser Effekt signifikant durch die Anwesenheit von NAC beeinträchtigt wird [120], ist es naheliegend, dass Thiolgruppen zellulärer Systeme mit dieser Art von Molekülen reagieren können und so deren Wirkungen beeinflussen.

4.3 Ungesättigte Verbindungen

Zu den in dieser Arbeit untersuchten ungesättigten Verbindungen zählen unter anderem die NFS. NFS sind hochreaktive Carbonsäurederivate, welche leicht mit nukleophilen Resten von Proteinen, wie Thiolaten oder Imidazolen, reagieren können [5]. Sie sind potente 5-LO-Inhibitoren, die das Enzym über eine Alkylierung des oberflächlichen Cystein 418 und des Eisen-koordinierenden Histidins 367 und 372 in seiner Funktion hemmen [5]. Weiterhin inhibieren NFS die Xanthinoxidase [123] und die NF- κ B-regulierte Genexpression durch Interaktion mit kritischen Cysteinresten der p65-Untereinheit [124]. Des Weiteren sind 10-Nitroölsäure (10-NFS) und Nitrolinolensäure Partialagonisten des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- γ (PPAR- γ) [125, 126]. NFS aktivieren außerdem durch Adduktbildung mit bestimmten Cysteinresten des Nrf2-regulatorischen Proteins Keap1 die Nrf2-abhängige Genexpression [127]. Abb. 18 zeigt schematisch die Modifikation eines Cysteinrestes durch 10-NFS.

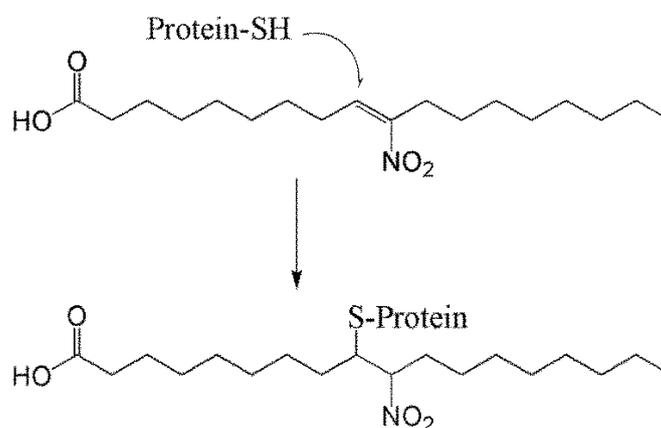


Abb. 18: Modifikation eines Cysteinrestes durch 10-NFS.

4.4 Polyphenole

Polyphenole sind aromatische Verbindungen mit mindestens zwei Hydroxylgruppen am aromatischen Ring. Zu ihnen gehören die in dieser Arbeit getesteten Verbindungen Curcumin, Kaffeesäure, Luteolin (gleichzeitig ein Flavonoid), die Benzochinone Embelin, Methoxy-BQ, OH-BQ, Sinapinsäure und Shogaol. Polyphenole weisen meist eine schlechte Bioverfügbarkeit auf. Dieser ungünstigen Eigenschaft soll durch Einbau eines Triazols entgegengewirkt werden [128]. Triazole zeichnen sich durch ihre metabolische Stabilität und bessere Wasserlöslichkeit aus und sind ein beliebtes Pharmakophor (z.B. bei HIV-Protease-Inhibitoren). Polyphenole besitzen starke antiinflammatorische Eigenschaften, die in myeloischen Zellen vor allem auf NF- κ B-Inhibition und Herunterregulierung proinflammatorischer Marker zurückzuführen sind [129]. Sie interferieren außerdem mit der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) [130].

4.5 Flavonoide

Flavonoide bestehen aus zwei phenolischen Ringen A und B, die über eine drei Kohlenstoffatome enthaltene Kette, meist aber einen oxygenierten Heterozyklus (Ring C), miteinander verbunden sind [131] (Abb. 19).

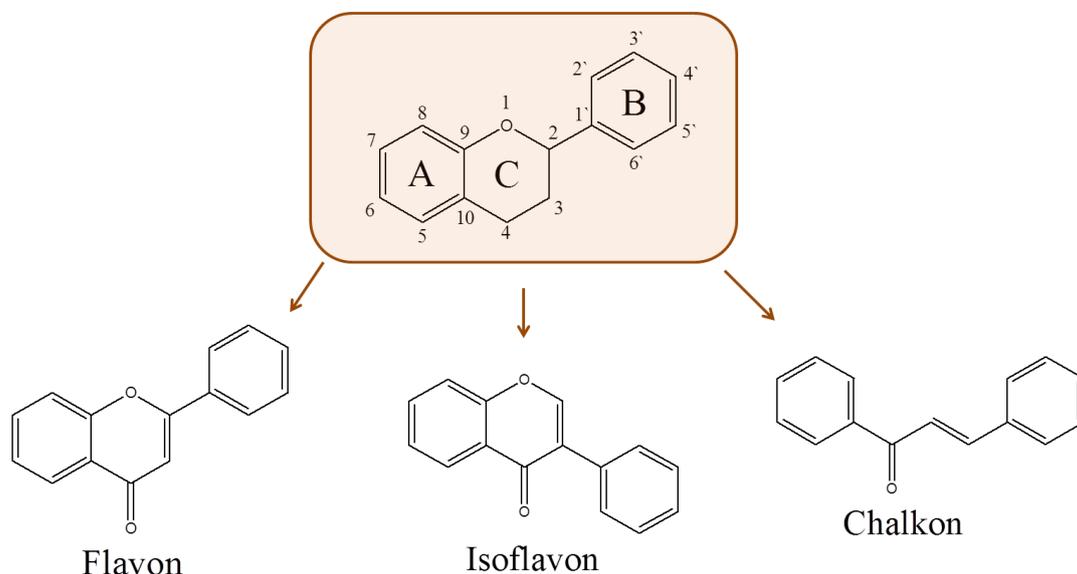


Abb. 19: Grundstruktur der Flavonoide [132].

Das aromatische konjugierte System mit Hydroxylgruppen macht diese Substanzen zu effizienten Elektronen- oder Wasserstoff-Donatoren, die freie Radikale und ROS neutralisieren

können [131]. Flavonoide besitzen starke Radikalfängereigenschaften und je nach umgebender Struktur mehr oder weniger stark ausgeprägte metallchelatierende Fähigkeiten [131]. Des Weiteren weisen Flavonoide eine höhere antioxidative Aktivität auf als Phenolsäuren [131]. Eine Katecholstruktur des Rings B, die 2,3-Doppelbindung und konjugierte 4-Oxo-Gruppe des Rings C sowie eine Hydroxylgruppe an Position 3 und 5 scheinen der Grund für ihre hohe metallchelatierende und radikalabfangende Aktivität zu sein [133].

Chalkone

Chalkone weisen ein breites pharmakologisches Wirkspektrum auf. Sie besitzen immunmodulatorische, antiinflammatorische, antikanzerogene, antivirale und antimikrobielle Eigenschaften [134]. Das Chalkonderivat Hesperidin-methyl-Chalkon (HMC) ist als topische Formulierung außerdem in der Lage, oxidativen Stress und Entzündungen der Haut, welche durch UV-B-Bestrahlung ausgelöst wurden, zu inhibieren [135]. UV-B-Bestrahlung induziert über vermehrte Cytokinproduktion wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 eine Inflammation der Haut [136]. Eine Interferenz von Chalkonen mit diesen Mediatoren ist somit naheliegend. Chalkone inhibieren weiterhin die 5-LO-Produktbildung und für Urenyl-Chalkon-Derivate konnte ein dual-inhibitorischer Effekt auf die COX-2 und die 15-LO gezeigt werden [134]. Zwei weitere Studien zeigten außerdem, dass Chalkonderivate die sekretorische Phospholipase-A2, die proinflammatorische Zytokinproduktion, die Chemotaxis, die Phagozytose und die Produktion von ROS inhibieren [134, 137, 138]. Das Chalkongrundgerüst ist außerdem als Leitstruktur für duale COX-, 5-LO-Inhibitoren bekannt [139]. Chalkone haben viele Targets, die in Entzündungsprozessen involviert sind wie z.B. NF-kB, Histon-Deacetylasen (HDACs), Cathepsine oder die β -Sekretase [140].

4.6 Nitrostyrene

Das Nitrostyren-Derivat 3,4-Methylenedioxy- β -Nitrostyren wurde als NLRP3-Inflammasom-Inhibitor (*NACHT*, *LRR and PYD domains-containing protein 3*) durch Michael-Addition beschrieben [141]. Das Inflammasom ist ein Proteinkomplex, der sich im Cytosol von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten befindet. Er ist ein Bestandteil des unspezifischen Immunsystems [142]. Eine Aktivierung von Inflammasomen induziert eine Caspase-1-Aktivierung und die Freisetzung von IL-1 β , einem proinflammatorischen Zytokin, welches sowohl bei der akuten, als auch bei der chronischen Entzündungsantwort eine Rolle spielt. Wird das Inflammasom inhibiert, resultiert daraus eine signifikant reduzierte

Inflammation, wie z.B. K^+ -Efflux, lysosomale Membran-Destabilisierung, ROS-Produktion und posttranslationale Modifikation von Ubiquitin [141]. Interessanterweise hemmen die meisten Inflammasom-Inhibitoren auch gleichzeitig NF- κ B [141].

4.7 Arzneistoffe

Die untersuchten Arzneistoffe bestehen aus einer Gruppe heterogener Michael-Akzeptoren, die entweder bereits als Arzneimittel zugelassen wurden oder gerade beforscht werden. Als Beispiel für Arzneistoffe, welche sich zur Zeit in der klinischen Entwicklung befinden, sind Bardoxolonmethyl (RTA 402, CDDO-methylester oder CDDO-Me) und Derivate zu nennen, welche potent die zelluläre Proliferation von humanen Brustkrebs- und Leukämiezelllinien sowie Entzündungsreaktionen hemmen [143]. CDDO reagiert als starker Michael-Akzeptor mit nukleophilen Thiolgruppen in einer reversiblen Reaktion [56]. Er inhibiert in RAW-Zellen die NO-Produktion, welche durch IFN- γ induziert wird und aktiviert zytoprotektive Enzyme wie z.B. NQO1 in murinen Hepalcl7-Hepatomzellen [56]. CDDO verursacht außerdem eine Apoptose von LPS-stimulierten Makrophagen und inhibiert die Sekretion von TNF- α und IL-1 β [56].

5. Ziel der Arbeit

Bis heute ist trotz der bereits breitflächig beforschten antiinflammatorisch wirksamen Verbindungen nicht klar, ob es sich bei der Antiinflammation durch michaelreaktive Verbindungen um einen Klasseneffekt handelt oder ob ganz spezielle strukturelle Eigenschaften Voraussetzung für eine Inhibition der 5-LO über Modifikation ihrer prominenten Cysteine in der Nähe des aktiven Zentrums sind. Da Michael-Akzeptoren in einer enormen Vielfalt vorkommen, versucht diese Arbeit, diese Verbindungen strukturell zu ordnen und innerhalb der erhaltenen Gruppen deren inhibitorische Effekte auf die 5-LO zu bestimmen. Die Inhibition der 5-LO-Produktbildung wurde zunächst in intakten Zellen und dann am rekombinanten Enzym (r5LO-wt) untersucht, um Aufschluss über direkte Modifikationen der 5-LO zu erhalten. Falls Verbindungen inhibitorische Effekte auf die rekombinante 5-LO zeigten, wurden diese im Anschluss an mutierter rekombinanter 5-LO getestet, deren vier Cysteine Cys159, Cys300, Cys416 und Cys418 durch Serin ersetzt wurden (r5LO-4C). Durch dieses Vorgehen kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch die jeweilige michaelreaktive Verbindung von einer nukleophilen Michael-Addition an die Cysteinreste ausgelöst wurde. Obwohl Michael-Akzeptoren hochreaktive Verbindungen sind, können sie doch selektive Reaktionen eingehen. Dies ist zum einen durch gezielte Einstellung der Elektrophilität der elektronenziehenden Gruppe, als auch durch die Struktur des gesamten Moleküls um den Michael-Akzeptor möglich. Diese Tatsache bewirkt, dass ganz bestimmte Proteine, vor allem solche mit freien Thiolgruppen an der Oberfläche, gezielt angesteuert werden können. Die Ergebnisse sollen weiterhin Aufschluss darüber geben, ob die Elektrophilität des Michael-Akzeptors entscheidend zu einer 5-LO-Inhibition beiträgt oder ob eventuell die strukturelle Umgebung von größerer Bedeutung ist. Nach diesen Versuchen wurde weiterhin getestet, welche der vier untersuchten Cysteine für die Inhibition der 5-LO-Produktbildung entscheidend sind. Hierzu wurden Versuche mit 5-LO-Mutanten durchgeführt, bei denen jeweils nur ein Cystein zu Serin mutiert worden ist. Auswasch-Versuche zeigten anschließend, ob es sich bei der Bindung um eine reversible oder irreversible Modifikation der 5-LO an ihren Cysteinen handelte. Versuche zum pharmakodynamischen Profil der Michael-Akzeptoren sollten schließlich die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch representative Verbindungen charakterisieren und eine MALDI-MS-Analyse die Bindung von TQ und NAPQI an r5LO-wt bestätigen.

6. Material

Substanz	Firma
AA, Calciumionophor A23187, BWA4C, Schwarzkümmelöl (black cumin seed oil), Dimethylsulfoxid, Dextran, Lysozym, PMSF ₁ , A23187, Afatinib, Arzanol, Baicalein, BWA4C, Kaffeesäure (caffeic acid), CDDO methylester (CDDO), Cefaclor, Chalcone-4-hydrat, Zimtsäure (cinnamic acid), Zimtsäure (cinnamic aldehyde), Coenzym Q2, Coenzym Q10, Cromoglicinsäure, Curcumin, Dexamethason, Dimethylfumarat, embelin, Entacapon, Genistein, glutathione reduced (GSH), Harpagosid, Juglon, Lapachol, Luteolin, Metronidazol, Minocyclin, Monomethylfumarat, Moxifloxacin, NAPQI (<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinone imine), Paracetamol (acetaminophen), Phyllochinon (phylloquinone), Plumbagin, Poloxim, Ranitidin, Shikonin, Shogaol, Sinapinsäure, Thymochinon, Triptolid, Warfarin, Zanamivir, Methoxy-BQ, Methyl-BQ	Sigma-Aldrich (München, Deutschland, St. Louis, MO, USA)
Bradfordreagenz (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad (München, Deutschland)
Ampicillin, DTT, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Appllichem (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Luria Broth (LB)-Medium	LifeTechnologies Corporation (Carlsbad, CA, USA)
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA Laboratory GmbH (Pasching, Österreich)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
STI	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bradfordreagenz (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad, München, Deutschland
α -Tocotrienol	Biomol, Santa Cruz
Primin	PhytoLab
PGB ₁ und 10-NFS (10-nitro-oleicacid)	Cayman

7. Methoden

7.1 Isolation humaner PMNL aus Leukozytenkonzentraten

Humane polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNL) wurden aus Buffycoats des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen (Frankfurt am Main) gewonnen. Nach Zugabe von Dextranlösung (5 %) in PBS im Verhältnis 1:5 (Endvolumen 50 ml) sedimentierten die Konzentrate eine halbe Stunde. Die Überstände wurden danach auf 10 ml Lymphozytenseparationsmedium zur Dichtezentrifugation gegeben und bei 800 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Pellets mit kaltem PBS resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 200 g für 10 Minuten bei RT mit Bremsfunktion. Danach wurden die erhaltenen Pellets mit 10 ml eiskaltem MilliQ-Wasser (MQ) (hypotone Lösung) für 45 Sekunden mit einem Vortexmischer vermischt und dann die dadurch verursachte Lyse der Erythrozyten mit 40 ml PBS abgestoppt. Zwei weitere Zentrifugationen unter gleichen Bedingungen, bei denen wiederum der Überstand verworfen wurde und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde, lieferten letztlich als Pellet die intakten PMNL (Reinheit 96-97 %). Die erhaltenen PMNL wurden dann in 1 mg/ml PBS/Glucose (PG)-Lösung pH 7,4 resuspendiert und die Zellen nach Trypanblaufärbung in einer Bürkerzählkammer gezählt. Die Methode wurde von Werz *et al.* beschrieben [22].

7.2 Herstellung und Aufreinigung von r5LO-wt

Zur Expression von r5LO-wt und 5-LO-Mutanten wurde das jeweilige Protein in *E. coli* BL21 (DE3), die mit dem Plasmid pT3-5LO transformiert wurden, überexprimiert [6][144],[145]. Eine Starterkultur wurde hierzu in 20 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C als Schüttelkultur anwachsen gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 5 ml Startkultur mit 100 µg/ml Ampicillin auf 500 ml LB-Medium überimpft und 5 Stunden bei 37 °C mit 180 rpm geschüttelt. IPTG-Zugabe (0,2 mM Endkonzentration) löste die Expression bei 22 °C mit 180 rpm über Nacht aus. Nach 16 Stunden wurden die Zellen schließlich durch Zentrifugation (7.000 g für 15 Minuten) bei RT geerntet und anschließend durch Homogenisierungspuffer (20 mM Triethanolamin-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 60 µg/ml STI, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mg/ml Lysozym) 15 Minuten lang auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden dann mittels Ultraschall homogenisiert (3 × 60 Sekunden, MS 73, *Sonoplus HD 200, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland*). Ein nachfolgender

Zentrifugationsschritt (10.000 g für 15 Minuten) bei 4 °C trennte gröbere Zellbestandteile ab, welche verworfen wurden. Der Überstand wurde bei 100.000 g für 70 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die finale Aufreinigung der 5-LO erfolgte, indem der S100 über eine ATP-Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt wurde. Für den ersten Schritt (ATP-Affinitätschromatographie) wurde in Anlehnung an Hammaberg *et al.* (1995) der S100 mit 10 ml PBS/EDTA (1 mM), 10 ml PB (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4)/EDTA (1 mM), NaCl (0,5 M) und 10 ml PB/EDTA (1 mM) gewaschen. Eluiert wurde mit einer 20 mM ATP-Lösung in PB/EDTA. Der zweite Schritt erfolgte durch Aufreinigung über eine Anionenaustauscherchromatographie (IEX). Hierzu wurden 10 ml des ersten Aufreinigungsschrittes auf eine ResourceQ-Säule (6 ml, *GE Healthcare, Uppsala, Schweden*) aufgetragen. Die Elution der 5-LO und ihrer Mutanten erfolgte dann über einen linearen Gradienten von 0-60 % von zwei Pufferlösungen: A: PB/EDTA (1 mM) und B: PB/EDTA (1 mM) + NaCl (0,5 M). Die fertig aufgereinigte 5-LO eluierte schließlich bei ca. 40 % des Puffers B. Das verwendete Gerät war eine Äkta purifier (*GE Healthcare, Uppsalla, Schweden*).

7.3 Herstellung von Zellhomogenaten

Für die Herstellung von Zellhomogenaten wurden $7,5 \times 10^6$ PMNL bei 4.000 g für 20 Minuten zentrifugiert und die erhaltenen Pellets anschließend in 1 ml PBS/EDTA mit 1 mM ATP resuspendiert. Die Suspension wurde dreimal für 10 Sekunden auf Eis geschallt und ATP (1 mM) hinzugefügt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für 10 Minuten wurden die Zellrückstände entfernt und die Testsubstanzen und Kontrollen zu den 1 ml Ansätzen gegeben. Die Inkubation fand für 10 Minuten auf Eis statt. Danach wurden die Homogenate für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und im Anschluss mit AA (20 µM) und CaCl₂ (2 mM) stimuliert. Nach 10 Minuten Stimulationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol abgestoppt.

7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die jeweilige Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde das aufgereinigte Protein über einen Bradford-Test analysiert. Hierzu wurde eine 96-well-Platte verwendet, auf die zum einen Triplets aus je 10 µl der zu analysierenden Proben und zum anderen eine Standardreihe aus BSA-Verdünnungen aufgetragen wurden. Das Ganze wurde mit 200 µl Bradfordreagenz verdünnt und nach 5 Minuten bei 595 nm über einen Mikroplattenleser (*Infinite M200, Tecan*

Group Ltd., Männedorf, Schweiz) vermessen. Anschließend ließ sich über die durch eine Eichgerade ermittelte Steigung die Konzentration der zu bestimmenden Proben errechnen.

7.5 Festphasenextraktion und HPLC-Analyse

Nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen bzw. den jeweiligen Kontrollen wurden die Proben mit jeweils 500 µl PBS-Puffer, 30 µl HCL (1 N) und 10 µl PGB₁ (20 ng/µl), welches als interner Standard fungiert, versetzt. Eine darauffolgende Zentrifugation bei 4.000 g für 10 Minuten trennte PMNL-Zellfragmente von der Zellsuspension ab. Rekombinante 5-LO konnte ohne Zentrifugation direkt auf die Säulen gegeben werden. Zur Extraktion wurden C18-Festphasenextraktiossäulen verwendet (*Clean-up[®] Extraction columns, United Chemicals Technologies, Bristol PA, USA*). Diese wurden zunächst mit jeweils 1 ml Methanol (100 %) und MQ konditioniert und anschließend die Proben aufgegeben. Zwei anschließende Waschschrte mit 1 ml MQ und Methanol (25 %) dienten als Reinigungsschritt. Schließlich wurden die 5-LO-Produkte durch die Zugabe von 300 µl Methanol (100 %) in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen, in die 125 µl MQ Wasser vorgelegt wurde, eluiert. Jeweils 100 µl der so enthaltenen Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert (*C-18 Radial Pack Säule; 100 mm, 5 mm I.D, 4 µm Partikelgröße, Waters, Eschborn, Deutschland*). Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Trifluoressigsäure (72/28/0,007). Die Produkte wurden bei einer Flussrate von 1,2 ml/Minute und einer Wellenlänge von 280 nm für die ersten 8 Minuten vermessen, danach bei 235 nm für die restlichen 22 Minuten. Die 5-LO-Produktbildung wurde bei PMNL-Proben als 5-LO-Produkte pro 10⁶ Zellen in ng angegeben. Bei Proben von r5LO-wt als 5-LO-Produkte pro eingesetzter Proteinmenge in ng. Die Inhibition der 5-LO-Aktivität wurde prozentual, bezogen auf die Kontrolle, welche die 5-LO-Produktbildung nicht inhibierte, angegeben (DMSO-Kontrolle 0,1 %). Zu den 5-LO-Produkten, welche vermessen wurden, gehören LTB₄ (nur in PMNL, nicht bei Messungen an r5LO-wt) mit den all-trans-Isomeren 6-trans-LTB₄ und 12-epi-6-trans-LTB₄ sowie 5-H(p)ETE. Abb. 20 zeigt ein typisches Chromatogramm, welches durch die verwendete HPLC bei der jeweiligen Wellenlänge erhalten wurde.

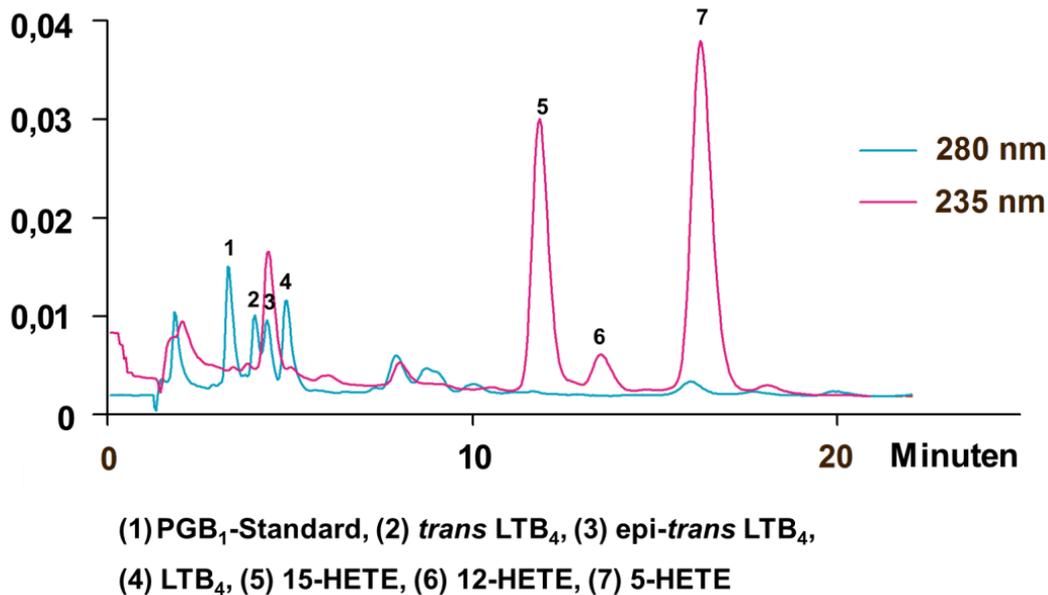


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm bei 280 nm (blau) und 235 nm (rosa).

7.6 5-LO-Aktivitätsmessung von intakten PMNL

Um die 5-LO-Produkte in intakten Zellen bestimmen zu können, wurden pro Ansatz 5×10^6 PMNL in 1 ml PG-Lösung resuspendiert und mit CaCl₂ (1 mM) versetzt. Die 1 ml-Ansätze wurden im Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten mit den Testsubstanzen oder der Kontrolle inkubiert und dann für 10 Minuten mit AA (2 μM oder 20 μM) und 2,5 μM Calciumionophor A23187 stimuliert. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Methanol. Bei den Stimulationsversuchen mit Natriumarsenit (10 μM) und Natriumchlorid (300 mM) wurden nach einer Inkubation von 12 Minuten mit den Testsubstanzen oder den Kontrollen bei 37 °C die Stimuli zugegeben und 3 Minuten vorinkubiert, bevor der Zusatz von 20 μM AA und die 10-minütige Stimulation erfolgte. Gestoppt wurde die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Methanol.

7.7 5-LO-Aktivitätsmessung von r5LO-wt und deren Mutanten

Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung an rekombinanter 5-LO erfolgte mit 3 μg Protein (entsprechend einer Grundaktivität von ~ 1.000 ng 5-LO-Produkten), welches in 1 ml PBS/EDTA aufgenommen und mit ATP (1 mM) versetzt wurde. Im Gegensatz zu der Inkubation mit intakten Zellen wurden hier die jeweiligen Testsubstanzen bzw. Kontrollen für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt, bevor

die Reaktion durch Zugabe von 20 μM AA und 2 mM CaCl_2 gestartet wurde. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt.

7.8 Reversibilitätsmessung

Um herauszufinden, ob es sich um eine irreversible Inhibition der 5-LO durch die getesteten Substanzen handelte, wurden PMNL für 15 Minuten mit den jeweiligen Verbindungen bei 37 °C inkubiert, danach bei 2.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und schließlich die Überstände verworfen. Die erhaltenen Zellpellets wurden dann in PG-Lösung mit Zusatz von CaCl_2 (1 mM) resuspendiert sowie unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und ausgewaschen. Das Auswaschen wurde dreimal wiederholt, bevor die Zellen mit Ionophor (2,5 μM) und AA (20 μM) für 10 Minuten bei 37 °C stimuliert wurden und die Reaktion mit 1 ml eiskaltem Methanol abgestoppt wurde. Als Kontrollen dienten der Eisenligand-Inhibitor BWA4C, welcher aufgrund seines Mechanismus ausgewaschen werden sollte und U73122, welches die 5-LO durch kovalente Bindung inhibiert und somit die 5-LO nicht reversibel inhibiert.

7.9 MALDI-MS

7.9.1 Probenvorbereitung für die MALDI-MS-Analyse

Aufgereinigte 5-LO und die zu testenden Substanzen (TQ oder NAPQI) wurden in PBS-Puffer pH 7,4 zu einer endgültigen Konzentration von 150 ng/ μL 5-LO und 100 μM TQ oder NAPQI zu einem Gesamtvolumen von 2 μL verdünnt. Die Inkubation wurde direkt auf einem *Thermo Scientific™ 384-well* Probenhalter durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der MALDI-Probenhalter für 30 Minuten in eine Feuchtigkeitskammer bei 37 °C gestellt. Nach der Inkubation mit TQ oder NAPQI wurde 1 μL Trypsin, Chymotrypsin oder eine Mischung beider Proteasen in einer Konzentration von 12,5 ng/ μL in 25 mM NH_4CO_3 auf das MALDI-Target gegeben. Der enzymatische Verdau erfolgte dann für eine Stunde. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μL α -Cyanohydroxymethylsäure-Matrix mit einer Konzentration von 3 mg/ml in einer Mischung aus Acetonitril/ H_2O /Trifluoressigsäure (TFA) (70/30/0,1) gestoppt. Nach Kristallisation wurde 2 μL gekühlte 5 %ige Ameisensäure auf die Matrixkristalle gegeben und sofort wieder entfernt, um Salzverunreinigungen durch den PBS-Puffer zu entfernen. Im Anschluss wurden die Proben durch 1 μL Acetonitril/ H_2O /TFA (80/20/0,1) rekristallisiert, um eine homogene Kristallgrößenverteilung zu erzielen.

MALDI-MS-Messung

MALDI-MS-Spektren wurden mit einer MALDI-LTQ-Orbitrap-XL aufgenommen (*Thermo Fisher Scientific*). Die experimentell bestimmten Peptidmassenspektren (*peptid mass fingerprint*) wurden mit einer Auflösung von 30.000 im FT-Orbitrap-analyser aufgenommen und 30 Subspektren zur Datenbanksuche akkumuliert. Tandem-MS-Spektren, der relevanten modifizierten und unmodifizierten Peptide, wurden nach kollisionsinduzierter Dissoziation in der linearen Ionenfalle aufgenommen. Für die Datenanalyse wurden 100 Subspektren akkumuliert. Das Massenfenster zur Isolation der relevanten Massen für Tandem-MS-Spektren betrug 0,4 Da.

7.10 Datenbanksuche

Nach der MALDI-MS-Messung wurden die Spektren dekonvolutiert und deisotopiert (aus der Isotopenverteilung wurde die monoisotopische Masse rechnerisch bestimmt) und in sogenannte mgf (*mgf = mascot generic files*), welche Massenintensitätslisten beinhalten, umgewandelt. Danach wurden die mgf der aufgenommenen Spektren mit der MASCOT-Datenbank ausgewertet.

7.11 DPPH-Versuch

Radikalfängereigenschaften von Verbindungen können über eine Reduktion von 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) erfasst werden [146, 147]. Hierzu wurden die jeweiligen Testsubstanzen oder die Vehikelkontrolle (DMSO) mit 5 nmol DPPH in acetatgepuffertem Methanol (0,1 M Acetatpuffer pH 5,5; Methanol 40/60 V/V) versetzt. Nach 30 Minuten vorsichtigen Schüttelns im Dunkeln wurde die Absorption mit einem Mikroplattenleser (*Infinite M200, Tecan Group Ltd, Crailsheim, Germany*) bei 517 nm vermessen. Jede Verbindung wurde unabhängig voneinander dreimal vermessen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) berechnet. Ascorbinsäure (100 µM) wurde als Kontrolle verwendet.

7.12 Ferene S-Versuch

Eine Eisenreduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ wurde durch einen spezifischen Fe²⁺-Detektor, (Ferene S) der Fe²⁺ spezifisch kolorimetrisch anzeigt, gemessen [148]. Die Testsubstanzen oder die Vehikelkontrolle (DMSO) wurden mit 50 µM FeCl₃ und 0,5 mM Ferene S in 0,15 M NaCl mit

1 % Tween-20 für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei 594 nm vermessen. Es wurde hierzu ein Mikroplattenleser (*Infinite M200, Tecan Group Ltd, Crailsheim, Germany*) verwendet. Nach Basislinienkorrektur mit der Vehikelkontrolle, wurden die Absorptionswerte auf die maximale Eisenreduktion normalisiert (NDGA 100 µM). Ascorbinsäure (100 µM) wurde als Kontrolle verwendet. Jede Probe wurde unabhängig voneinander dreimal vermessen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) berechnet.

7.13 Zellviabilitätsmessung

Die Zellviabilität wurde über einen WST-1-Versuch (*watersoluble tetrazolium 1*) (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*) abgeschätzt. Hep-G2-Zellen wurden auf 96-well-Platten mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro well ausgesät. Nach der Behandlung der Zellen mit den Verbindungen oder der Vehikelkontrolle (DMSO) für 48 Stunden in Anwesenheit von 10 % FCS, wurde die Zellviabilität nach Händlerprotokoll mit einem Mikroplattenleser (*Infinite M200, Tecan Group Ltd, Crailsheim, Germany*) vermessen. Die Absorption wurde nach 48 Stunden gemessen, die Basislinie um die Absorption des Zellkulturmediums plus WST-1 in Abwesenheit von Zellen korrigiert und auf die Vehikelkontrolle normalisiert (DMSO). Jede Verbindung wurde unabhängig voneinander dreimal vermessen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) berechnet. Zileuton und Rev-5901 (100 µM) wurden als Kontrollen verwendet.

7.14 LDH-Zytotoxizität-Versuch

Ein sogenannter Lactatdehydrogenase (LDH)-Versuch (*cytotoxicity detection kit; Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*) wurde durchgeführt, um einen LDH-Austritt zu bestimmen, nachdem Hep-G2-Zellen mit der jeweiligen Verbindung behandelt wurden. Ein LDH-Austritt wurde hierbei als Surrogat für die Zellmembranintegrität herangezogen. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen sowie der Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO) für 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Verbindungen erneut hinzugegeben. Von den Zellüberständen wurden Aliquots entnommen und auf eine Mikroplatte aufgetragen. Die LDH-Freisetzung wurde schließlich nach Herstellerprotokoll unter Verwendung eines Mikroplattenlesers (*Infinite M200, Tecan, Crailsheim, Germany*) bestimmt. Die maximale LDH-Freisetzung wurde über die

Kontrollverbindung Triton X-100 (Detergenz, welches die Membranintegrität zerstört) definiert und als 100 % gesetzt.

7.15 Statistik

Alle Messungen sind Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen, wenn nicht anders angegeben. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden mindestens drei verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen vermessen und mittels nichtlinearer Regression für normalisierte Daten ermittelt. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$) wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism Version 6.07 (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*) verwendet.

8. Ergebnisse

8.1 Effekte auf die zelluläre 5-LO-Produktbildung

Verschiedenste michaelreaktive Verbindungen wurden auf ihren inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung in Calciumionophor A23187 stimulierten und mit 2 μM exogener AA versetzten PMNL untersucht. A23187 ist ein Stimulus, der die 5-LO durch Anstieg des intrazellulären Calciums aktiviert, wobei größtenteils eine rezeptorvermittelte Aktivierung (z.B. durch MAPK, welche zu einer Phosphorylierung der 5-LO führt) umgangen wird. Die geringe Konzentration von 2 μM AA wurde verwendet, um auch inhibitorische Aktivitäten auf FLAP zu erfassen, da eine hohe Konzentration exogen zugegebener AA die Effektivität von FLAP-Inhibitoren reduziert [43]. Verbindungen, welche inhibitorische Effekte auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten, wurden dann weiter an r5LO-wt auf ihren hemmenden Effekt getestet. Die IC_{50} -Werte aller getesteten Verbindungen können Kapitel 11 entnommen werden.

8.1.1 Benzochinone

Innerhalb dieser Gruppe wurden AA861, Coenzym Q2, Coenzym Q10, Durochinon, Embelin, Methyl-BQ, Methoxy-BQ, NAPQI, OH-BQ, Poloxim, Primin und TQ untersucht. AA861, Embelin, Methoxy-BQ, Methyl-BQ, Primin und TQ zeigten hemmende Effekte auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL (Abb. 21).

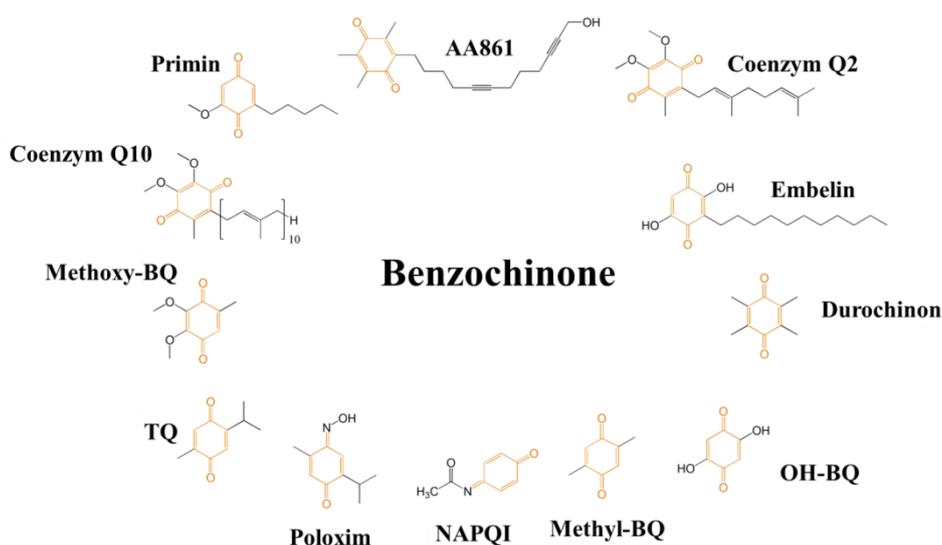


Abb. 21: Strukturen der untersuchten Benzochinonderivate.

AA861 inhibierte die 5-LO-Produktbildung in PMNL mit einem IC_{50} -Wert von $0,2 \mu\text{M}$ [68], gefolgt von Primin (IC_{50} -Wert $2,8 \mu\text{M}$), Embelin (IC_{50} -Wert $3,5 \mu\text{M}$), Methoxy-BQ (IC_{50} -Wert $4,2 \mu\text{M}$), TQ (IC_{50} -Wert $4,3 \mu\text{M}$) und Methyl-BQ (IC_{50} -Wert $6,3 \mu\text{M}$). Abb. 22 illustriert die Hemmung der 5-LO-Produktbildung durch die einzelnen Benzochinonderivate bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in PMNL. Die Messergebnisse von Coenzym Q2 hatten eine sehr hohe Standardabweichung, weshalb keine konkrete Aussage über dessen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung getroffen werden kann. Durochinon, Coenzym Q10, OH-BQ und Poloxim zeigten keinen signifikant hemmenden Effekt auf die zelluläre 5-LO-Produktbildung in PMNL. Des Weiteren wurde Schwarzkümmelöl in verschiedenen Verdünnungen auf hemmende Effekte der 5-LO-Produktbildung in PMNL getestet (Abb. 23). Bei einer Verdünnung von 1:20.000 lag die 5-LO-Produktbildung bei 63,3 % bezogen auf die Kontrolle. Abb. 24 zeigt die Strukturen und IC_{50} -Werte in PMNL der untersuchten Benzochinonderivate.

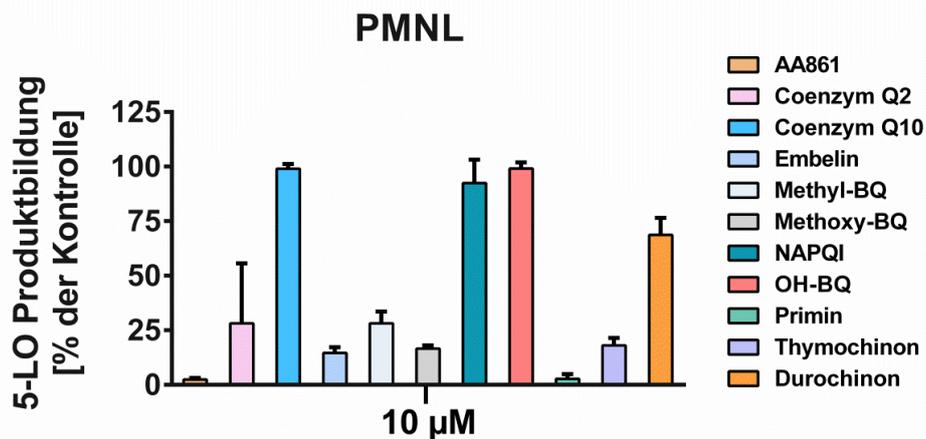


Abb. 22: Einfluss verschiedener Benzochinonderivate auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit den jeweiligen Verbindungen in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ oder mit der Kontrolle ($0,1 \%$ DMSO) für 15 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und danach mit $2,5 \mu\text{M}$ A23187 plus $2 \mu\text{M}$ AA für 10 Minuten bei ebenfalls $37 \text{ }^\circ\text{C}$ stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 2 \pm \text{SEM}$. Wurde kein inhibitorischer Effekt auf die 5-LO-Produktbildung gesehen, wurde der Versuch nur einmal wiederholt. Substanzen, welche einen hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung zeigten, sind als $n \geq 3 + \text{SEM}$ dargestellt.

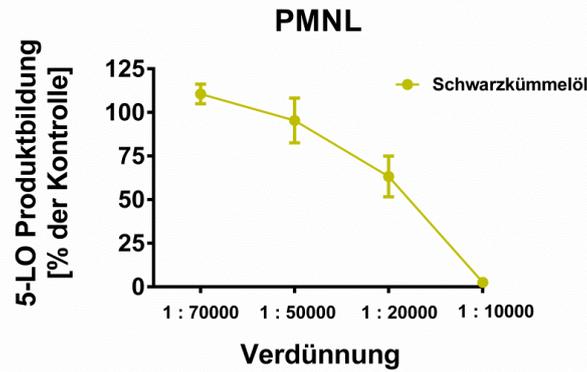


Abb. 23: Einfluss verschiedener Verdünnungen von Schwarzkümmelöl auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL.

PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des Schwarzkümmelöls oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mit 2,5 μ M A23187 plus 2 μ M AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=3 \pm$ SEM.

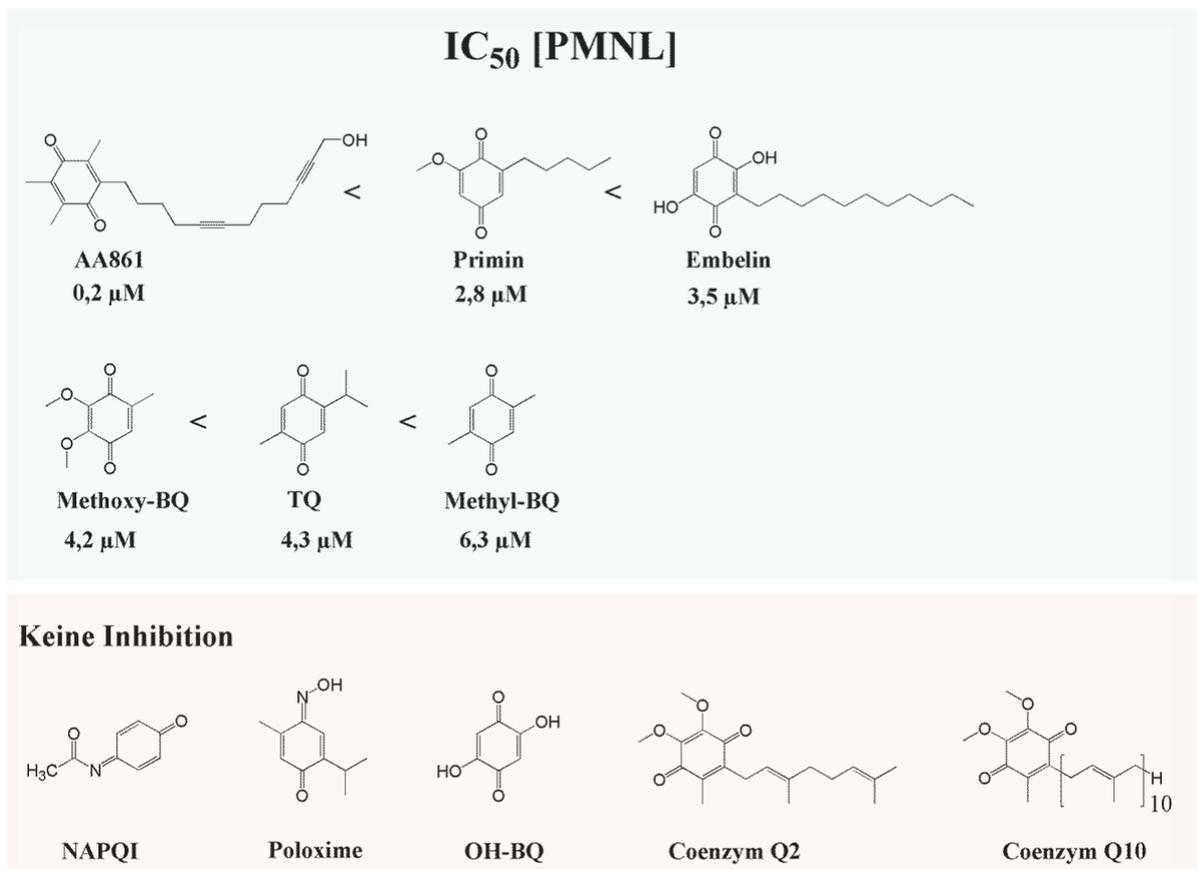


Abb. 24: Strukturen und IC₅₀-Werte in PMNL der untersuchten Benzochinonderivate. In blau sind die Strukturen dargestellt, welche eine signifikante Hemmung auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten. In rot die Substanzen, die keine pharmakologisch relevante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten.

Naphthochinone

Zu den untersuchten Naphthochinonen gehören Juglon, Lapachol, Plumbagin, Shikonin und Phyllochinon (Abb. 25).

8.1.2

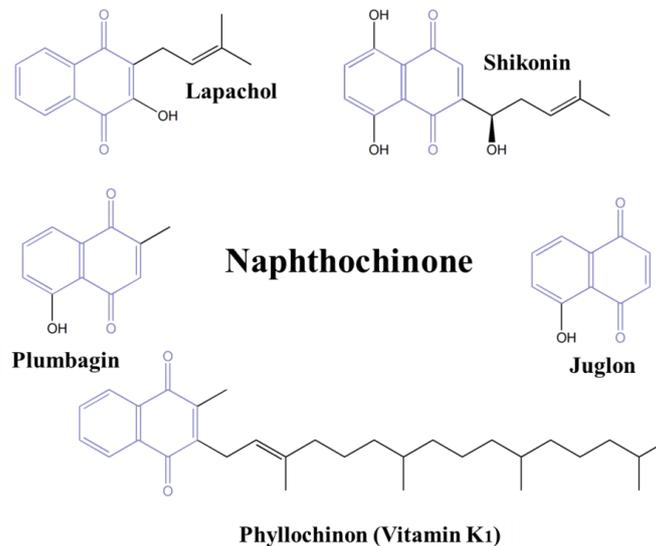


Abb. 25: Strukturen der untersuchten Naphthochinon-Derivate: Lapachol, Shikonin, Juglon, Phyllochinon und Plumbagin.

Shikonin zeigte unter den untersuchten Naphthochinonen mit einem IC_{50} -Wert von $1,54 \mu M$ die stärkste Inhibition der 5-LO-Produktbildung in PMNL. Plumbagin zählt mit einem IC_{50} -Wert von $7,0 \mu M$ zu den eher moderaten Inhibitoren der 5-LO-Produktbildung in PMNL. Lapachol, Phyllochinon und Juglon (*Hydroxy-1,4-Naphthochinon*) hatten bis zu einer Konzentration von $10 \mu M$ keinen signifikant hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. Abb. 26 zeigt die Effekte der Naphthochinonderivate auf die 5-LO-Produktbildung bei einer Konzentration von $10 \mu M$. Die IC_{50} -Werte der Naphthochinonderivate in PMNL können Abb. 27 entnommen werden.

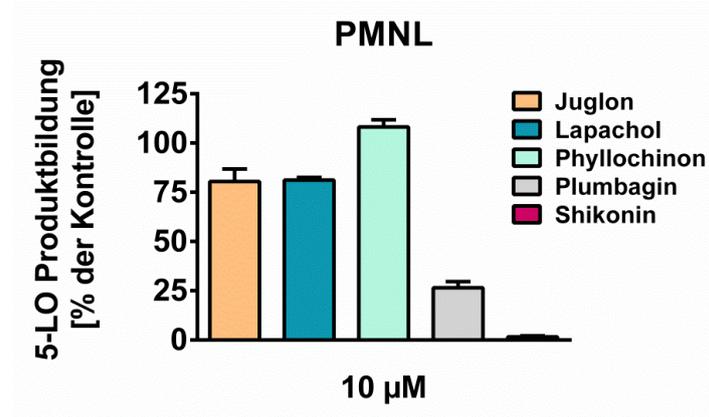


Abb. 26: Vergleich der Effekte der Naphthochinonderivate Juglon, Lapachol, Phyllochinon, Plumbagin und Shikonin auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit den jeweiligen Verbindungen in angegebener Konzentration oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach mit 2,5 µM A23187 plus 2 µM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=2-4$ + SEM. Substanzen, welche einen hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung zeigten, sind als $n \geq 3$ + SEM dargestellt.

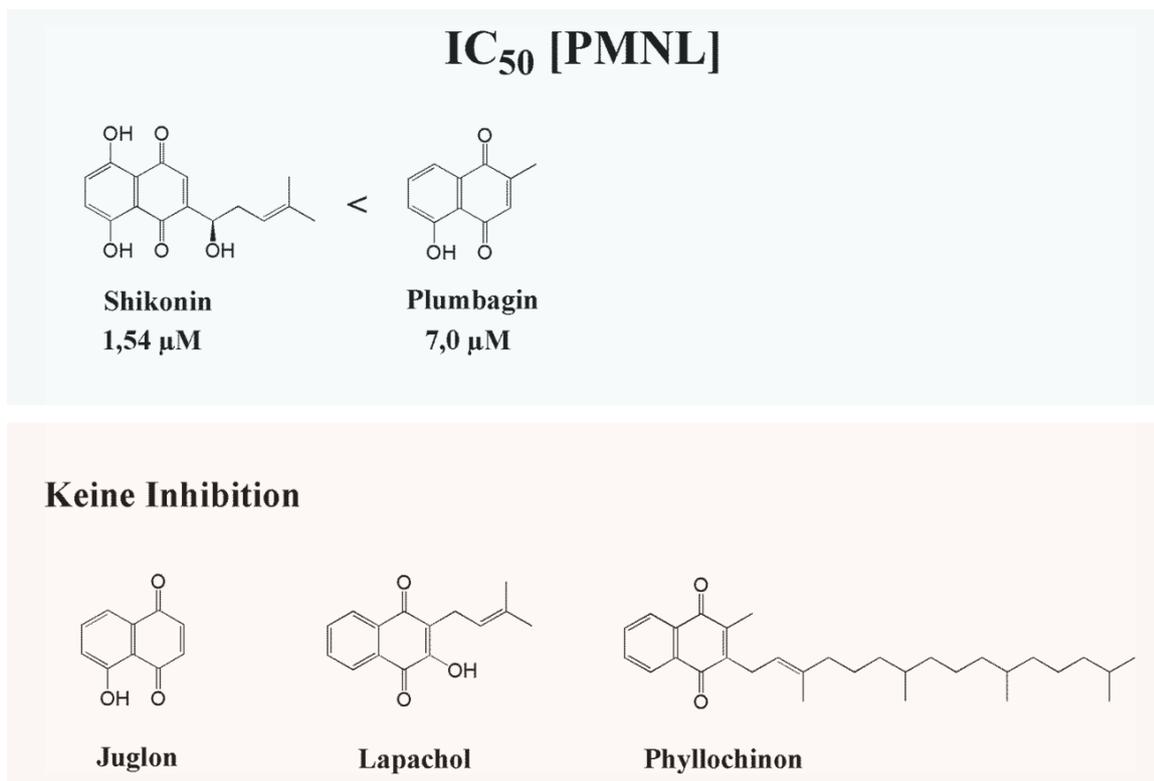


Abb. 27: Strukturen und IC₅₀-Werte in PMNL der untersuchten Naphthochinonderivate. In blau sind die Strukturen dargestellt, welche eine signifikante Hemmung auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten. In rot die Substanzen, die keine pharmakologisch relevante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL verzeichneten.

Ungesättigte Verbindungen

In der Gruppe der ungesättigten Verbindungen wurden α -Tocotrienol, BWA4C, Harpagosid, Kaffeesäure, 6-NFS (6-nitro-6-trans-dodecensäure, 6-NO-Dodecensäure), 10-NFS (10-nitro-9-trans-octadecensäure, 10-NO-Ölsäure), Sinapinsäure, Shogaol, U73122, Zimtaldehyd und Zimtsäure untersucht (Abb. 28).

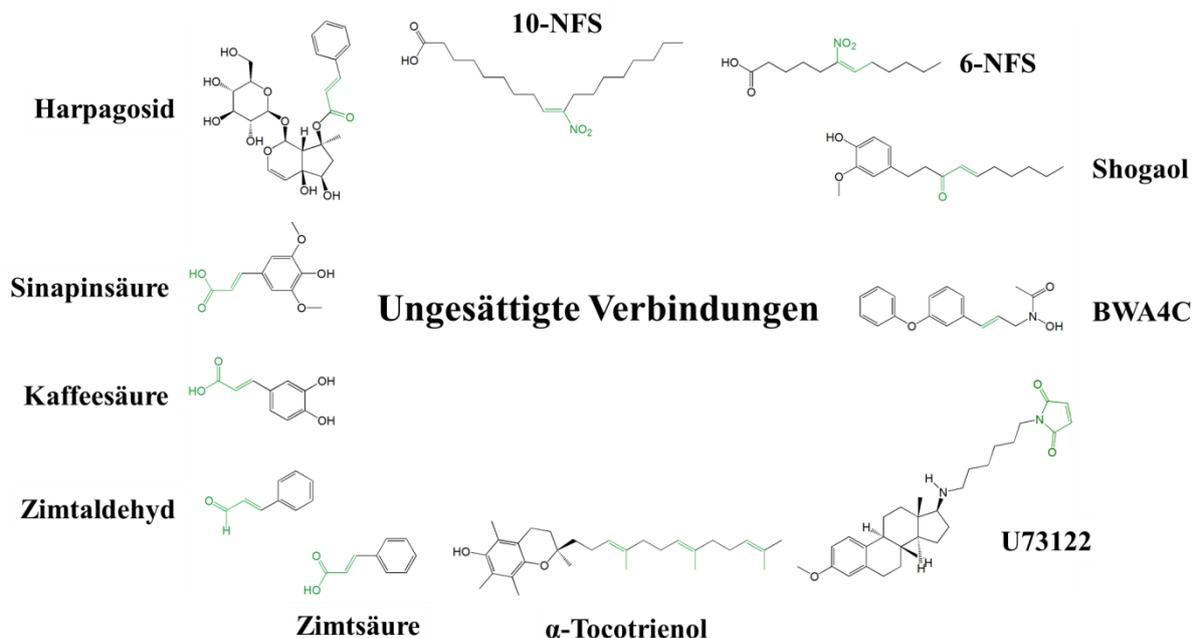


Abb. 28: Strukturen der untersuchten ungesättigten Verbindungen: α -Tocotrienol, BWA4C, Harpagosid, Kaffeesäure, 6-NFS (6-Nitro-6-trans-Dodecensäure), 10-NFS (10-nitro-9-trans-octadecensäure), Sinapinsäure, Shogaol, U73122, Zimtaldehyd und Zimtsäure.

Unter ihnen zeigte, wie auch bereits durch Awwad *et al.* 2014 beschrieben [5], 10-NFS eine Hemmung der 5-LO-Produktbildung mit einem IC_{50} -Wert von 5 μ M im intakten Zellsystem. BWA4C und U73122 wurden in diese Gruppe aufgenommen, da sie in vielen durchgeführten Versuchen als Kontrollsubstanzen dienten. BWA4C zeigte einen IC_{50} -Wert von 0,15 μ M, U73122 einen IC_{50} -Wert von 6,97 μ M und Shogaol einen IC_{50} -Wert von 8,2 μ M in PMNL (Abb. 29).

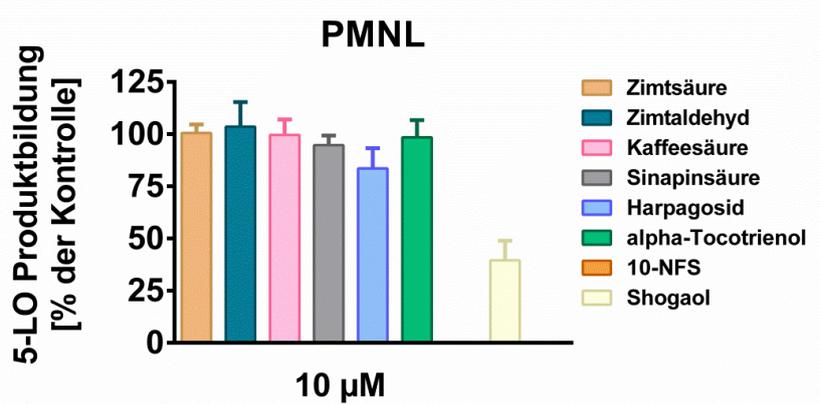


Abb. 29: Einfluss der ungesättigten Verbindungen Zimtsäure, Zimtaldehyd, Kaffeesäure, Sinapinsäure, Harpagosid, α -Tocotrienol, 10-NFS und Shogaol auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit den angegebenen Testsubstanzen in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μ M A23187 plus 2 μ M AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 + \text{SEM}$.

Eine durch Kooperation synthetisierte NFS [149] mit einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen und einer Nitrierung an Position 6 (6-NFS) hatte genauso wie α -Tocotrienol, Harpagosid, Kaffeesäure, Sinapinsäure, Zimtsäure und Zimtaldehyd keine inhibitorische Wirkung auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL (Abb. 30).

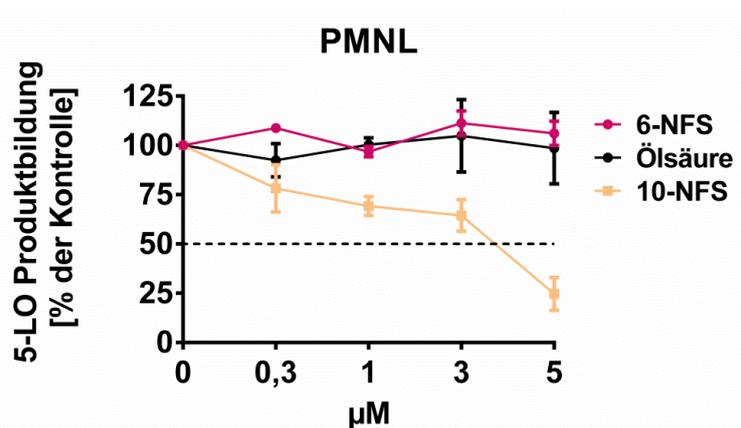


Abb. 30: Einfluss von Ölsäure, 6-NFS und 10-NFS auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Ölsäure, 6-NFS und 10-NFS in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μ M A23187 plus 2 μ M AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

Die Strukturen und IC_{50} -Werte der untersuchten ungesättigten Verbindungen in PMNL können Abb. 31 entnommen werden.

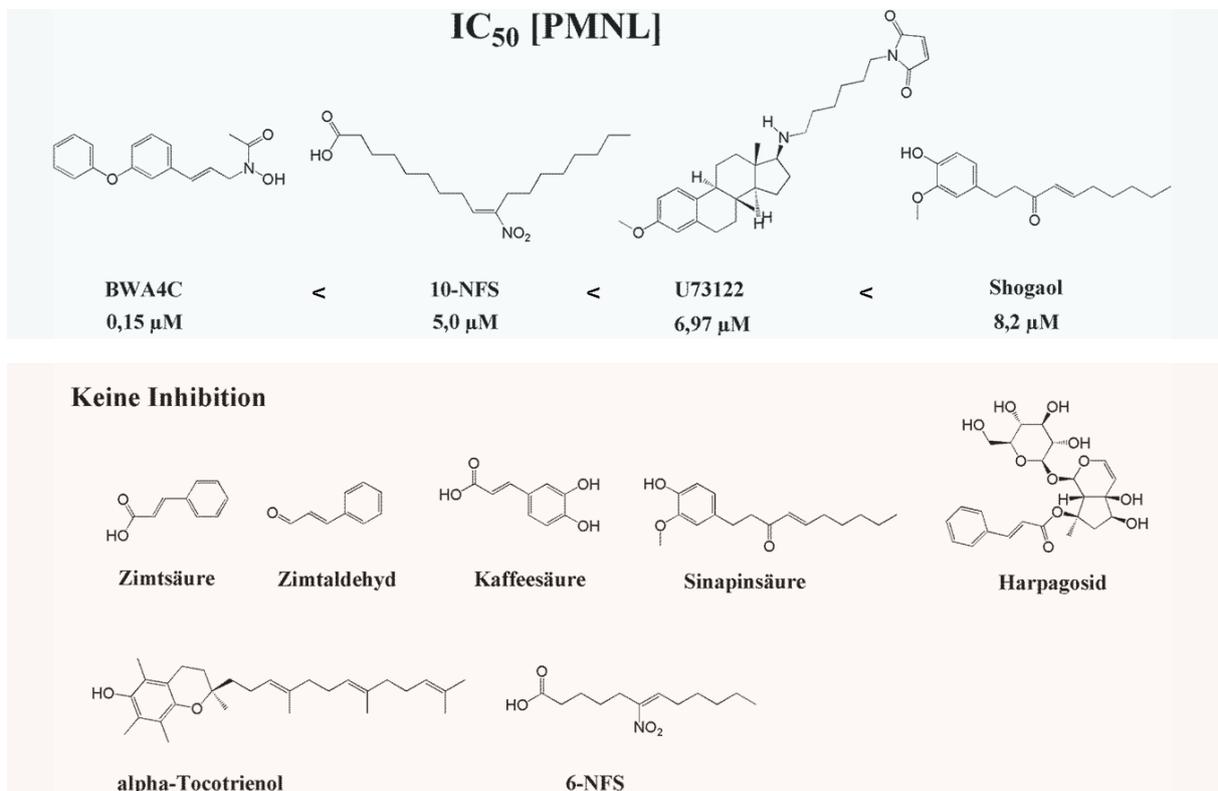


Abb. 31: Strukturen und IC_{50} -Werte in PMNL der untersuchten ungesättigten Verbindungen. In blau sind die Strukturen dargestellt, welche eine signifikante Inhibition der 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten. In rot die Substanzen, die keine pharmakologisch relevante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL verzeichneten.

8.1.4

Polyphenole

Die Gruppe der Polyphenole umfasst zahlreiche Verbindungen, die zum Teil anderen Gruppen zugeordnet wurden, wenn sie strukturell eher mit diesen vergleichbar waren. In die Gruppe der Polyphenole wurden deshalb nur Curcumin und Arzanol zugeordnet (Abb. 32).

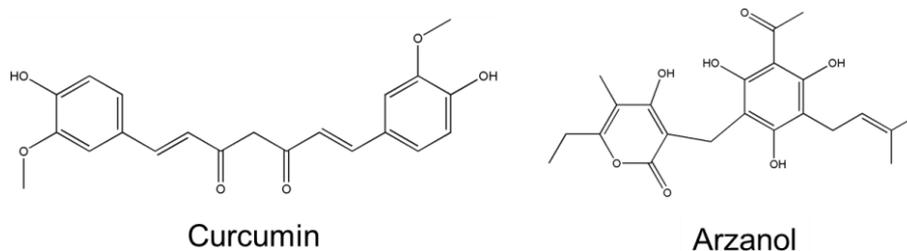


Abb. 32: Strukturen der Polyphenole Curcumin und Arzanol.

Arzanol zeigte bis 10 μM keinen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. Curcumin hatte hingegen einen IC_{50} -Wert von 1,6 μM in PMNL (Abb. 33). Strukturen und IC_{50} -Werte von Curcumin und Arzanol in PMNL können Abb. 34 entnommen werden.

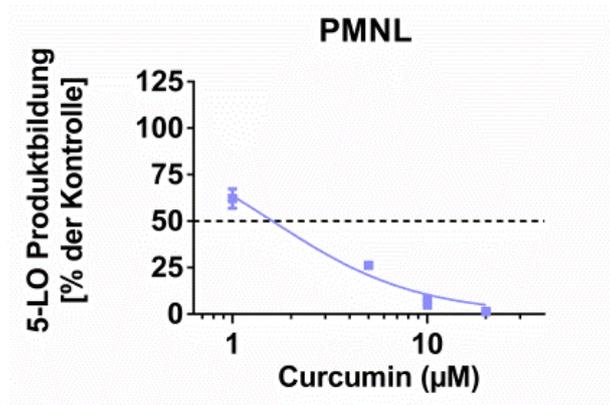


Abb. 33: Einfluss von Curcumin auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Curcumin in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μM A23187 plus 2 μM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

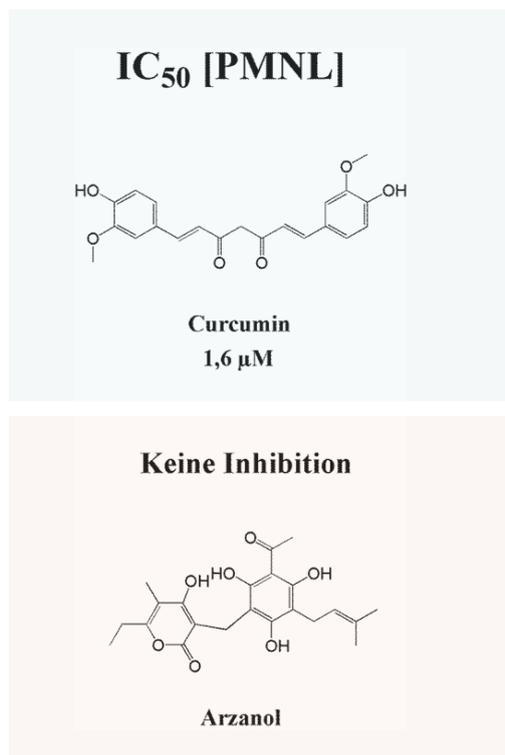


Abb. 34: Strukturen und IC_{50} -Werte in PMNL von Curcumin und Arzanol. In blau ist Curcumin zu sehen, welches eine signifikante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigte. In rot Arzanol, das keine pharmakologisch relevante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigte.

Flavonoide

In der Gruppe der Flavonoide wurden Baicalein, Chalkon, Genestein Flavopiridol und Luteolin auf ihre Effekte auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL untersucht (Abb. 35).

8.1.5

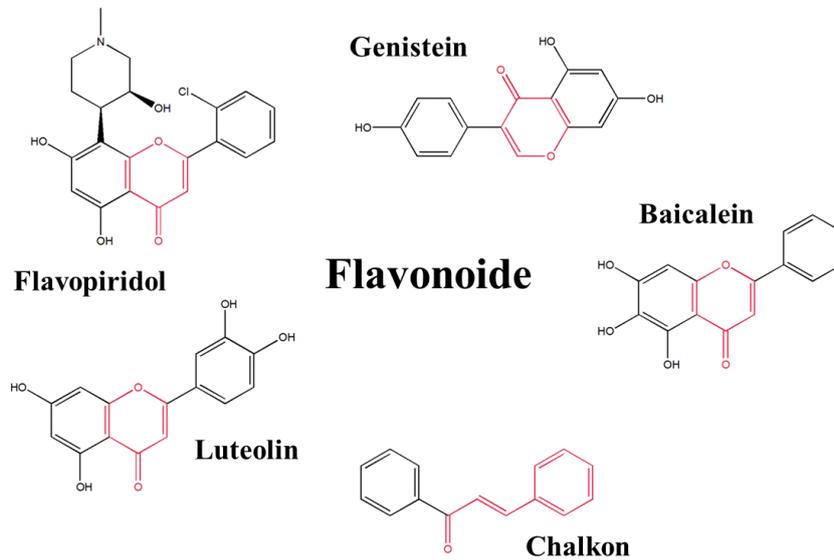


Abb. 35: Strukturen der untersuchten Flavonoide.

Abb. 36 zeigt den Einfluss von Baicalein, Chalkon und Luteolin auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL. Für Luteolin wurde in PMNL ein IC_{50} -Wert von $0,6 \mu M$, für Baicalein ein IC_{50} -Wert von $1,35 \mu M$ und für Chalkon ein IC_{50} -Wert von $6,0 \mu M$ ermittelt. Flavopiridol und Genestein hatten bis $10 \mu M$ keinen signifikant hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL. Strukturen und IC_{50} -Werte der untersuchten Flavonoide können Abb. 37 entnommen werden.

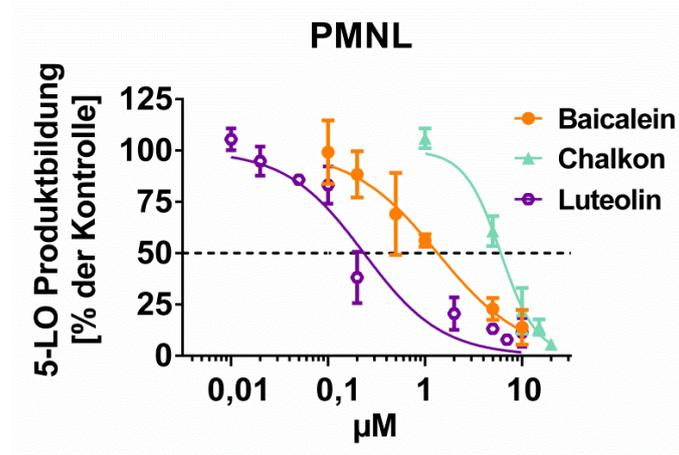


Abb. 36: Einfluss von Luteolin (lila), Baicalein (orange) und Chalkon (grün) auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL.

PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Luteolin, Baicalein und Chalkon in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μM A23187 plus 2 μM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=3-5 \pm$ SEM.

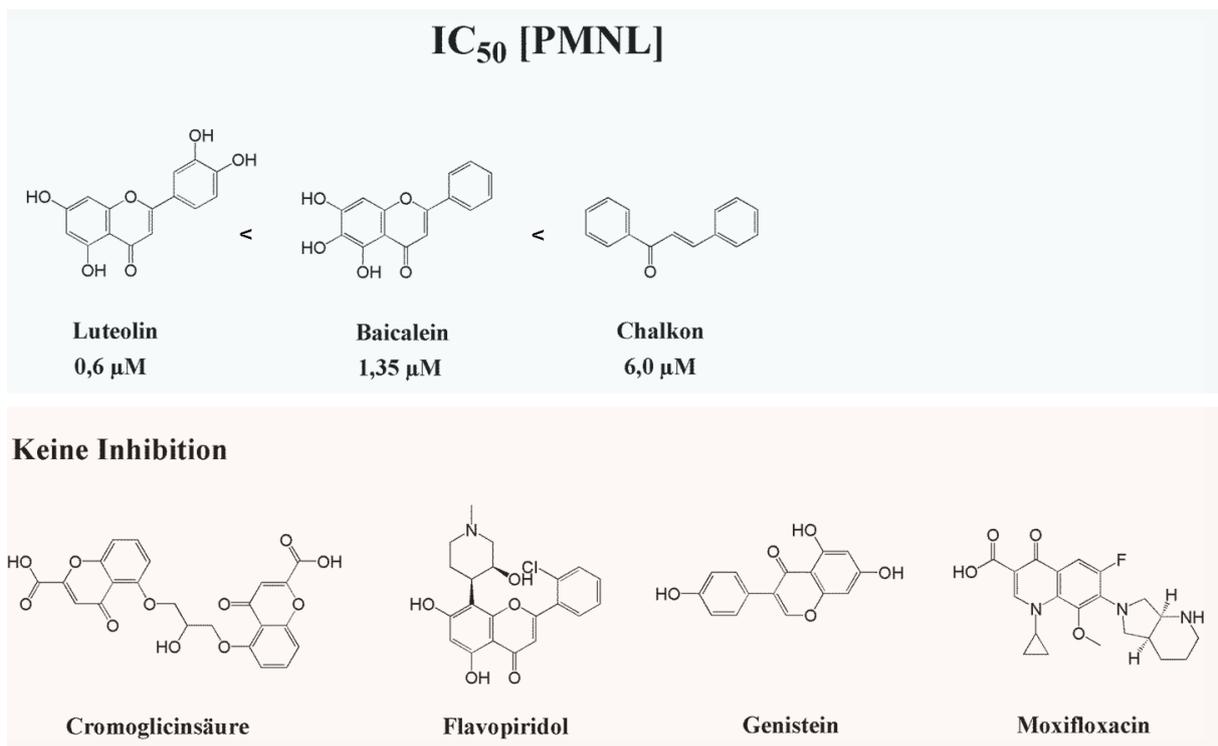


Abb. 37: Strukturen und IC₅₀-Werte in PMNL der untersuchten Flavonoide. In blau sind die Strukturen dargestellt, welche eine signifikante Hemmung auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten. In rot die Substanzen, die keine pharmakologisch relevante Inhibition auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten.

Nitrostyrene

In der Gruppe der Nitrostyrene wurde das 3-Methoxy- β -Nitrostyren (Methoxy-Nitrostyren) untersucht. Methoxy-Nitrostyren zeigte im intakten Zellsystem einen IC_{50} -Wert von $10,8 \mu M$ (Abb. 38). Abb. 39 zeigt den Einfluss von Methoxy-Nitrostyren auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL.



Abb. 38: Struktur von 3-Methoxy-beta-Nitrostyren und dessen IC_{50} -Wert in PMNL.

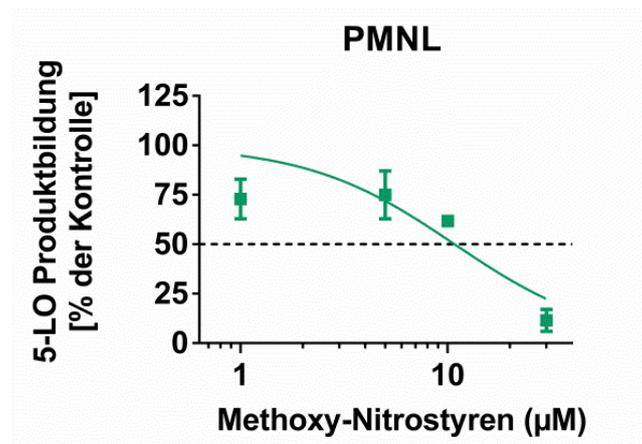


Abb. 39: Einfluss von Methoxy-Nitrostyren auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Methoxy-Nitrostyren in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert und dann mit $2,5 \mu M$ A23187 plus $2 \mu M$ AA für 10 Minuten bei ebenfalls $37^\circ C$ stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=3 \pm SEM$.

Arzneistoffe

In die Gruppe der Arzneistoffe wurden Afatinib, CDDO, Cefaclor, Cromoglicinsäure, Dexamethason, Dimethylfumarat (DMF), Entacapon, 4-Methylumbeliferon, Metronidazol, Minocyclin, Monomethylfumarat (MMF), Moxifloxacin, Paracetamol, Ranitidin, Triptolid, 8.1.7 Warfarin und Zanamivir eingeordnet (Abb. 40).

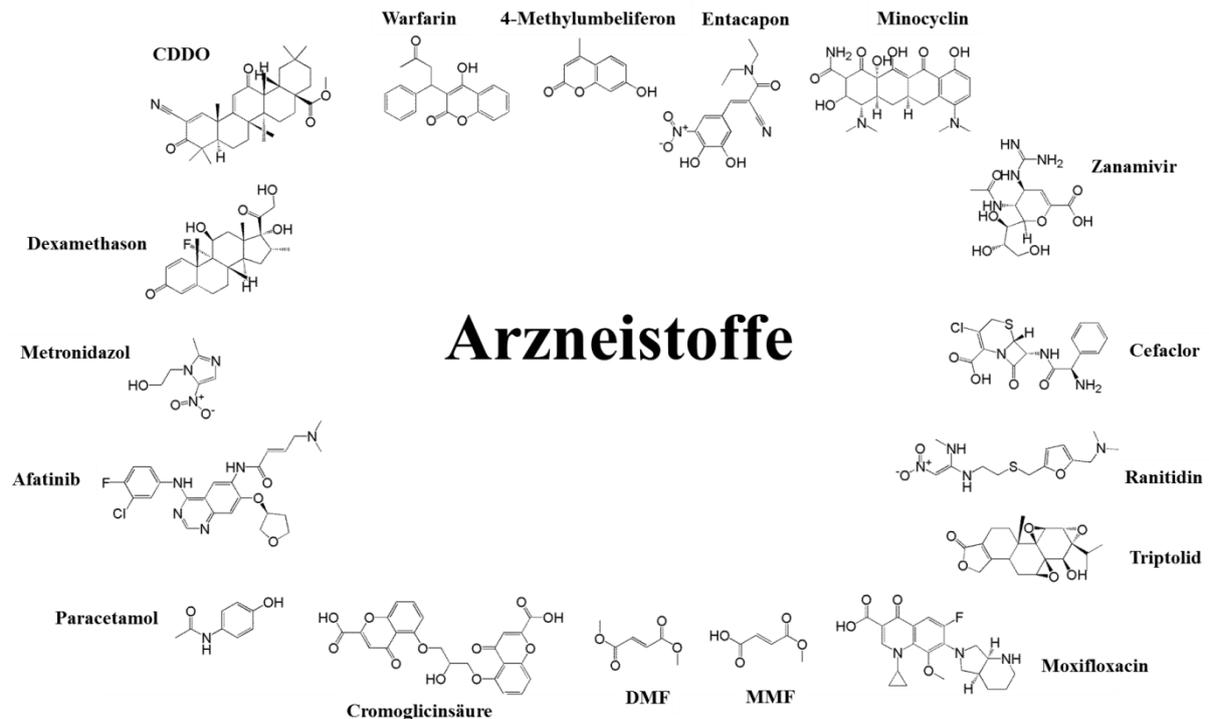


Abb. 40: Strukturen der untersuchten Arzneistoffe.

Keine der genannten Verbindungen hatte bis zu einer Konzentration von 10 μM einen signifikant hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem. Lediglich Afatinib zeigte in einer Konzentration von 10 μM eine Inhibition der 5-LO-Produktbildung von ca. 50 Prozent bezogen auf die Vehikelkontrolle DMSO (Abb. 41).

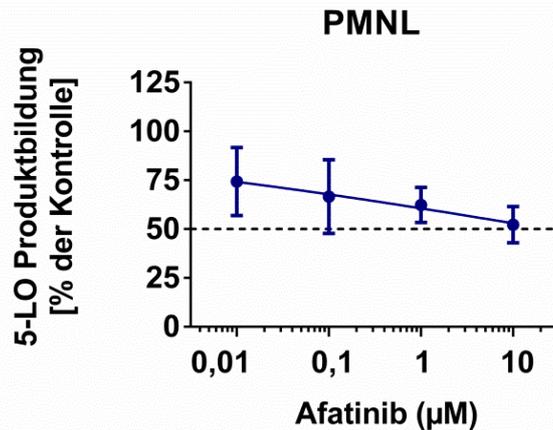


Abb. 41: Einfluss von Afatinib auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Afatinib in angegebenen Konzentrationen oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 µM A23187 plus 2 µM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=2 \pm$ SEM.

8.2 Einfluss auf die Produktbildung der r5LO-wt

Verbindungen, welche inhibitorische Effekte auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten oder für die ein direkter Effekt auf die 5-LO angenommen wurde, wurden an r5LO-wt getestet. Hierzu wurden 3 µg aufgereinigte r5LO-wt zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden dann für 15 Minuten mit r5LO-wt bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit 2 mM CaCl_2 und 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert.

Benzochinone

Unter den Benzochinonderivaten zeigte Embelin an r5LO-wt den niedrigsten IC_{50} -Wert mit 0,23 µM, gefolgt von Primin (0,6 µM), Methyl-BQ (2,8 µM), Methoxy-BQ (3,0 µM), NAPQI (3,0 µM), AA861 (3,8 µM), TQ (6,1 µM), OH-BQ (6,3 µM) und Coenzym Q2 (8,6 µM). Coenzym Q10 und Poloxim blieben bis 10 µM ohne Effekt auf die 5-LO-Produktbildung. Abb. 40 zeigt den Effekt der Benzochinonderivate auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem (PMNL) im Vergleich zum aufgereinigten Enzym (r5LO-wt). Die inhibitorische Wirkung von AA861 auf die 5-LO-Produktbildung war am aufgereinigten Enzym im Vergleich zum intakten Zellsystem stärker (IC_{50} -Wert [PMNL]: 3,8 µM; IC_{50} -Wert [r5LO-wt]: 1,2 µM). NAPQI, OH-BQ und Coenzym Q2 zeigten keine signifikanten inhibitorischen Effekte auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL, wohingegen sie an r5LO-wt einen IC_{50} -Wert von 3,0 µM

(NAPQI), 6,3 μM (OH-BQ) und 8,6 μM (Coenzym Q2) aufwiesen. Für Embelin, Methyl-BQ, Methoxy-BQ, Primin und TQ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt im Vergleich zu PMNL. Abb. 42 und Abb. 43 zeigen die Effekte von Benzochinonen auf die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL und an r5LO wt auf.

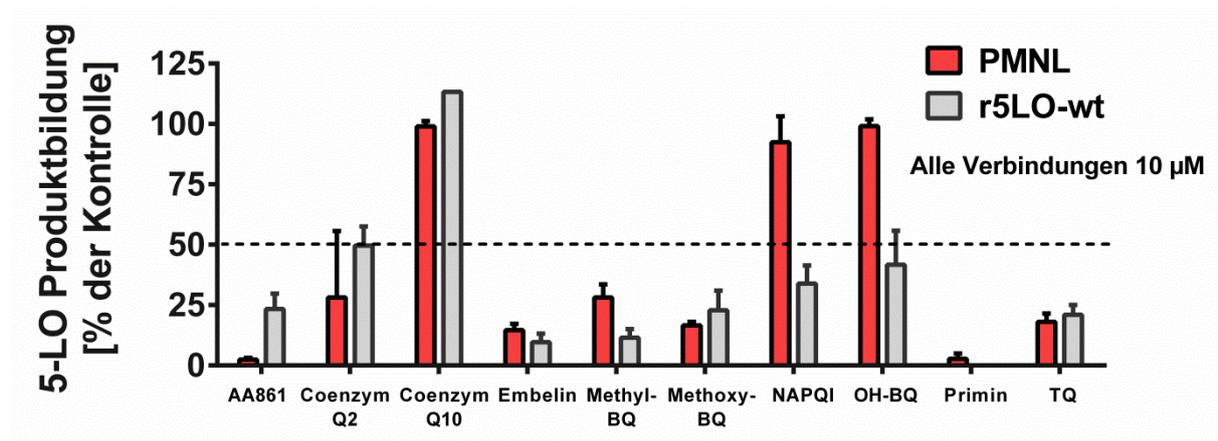


Abb. 42: Vergleich des Effektes von Benzochinonen auf die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL (rot) und an r5LO-wt (grau). Rot: PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit den Testsubstanzen oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μM A23187 plus 2 μM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert. Grau: 3 μg aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Testsubstanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl_2 (2 mM) und 20 μM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=2-7$ + SEM (zeigte sich keine Inhibition der 5-LO-Produktbildung, wurde das Experiment nur einmal mit betreffender Substanz wiederholt, dadurch $n=2$ bei Substanzen ohne signifikanten Effekt auf die 5-LO-Produktbildung).

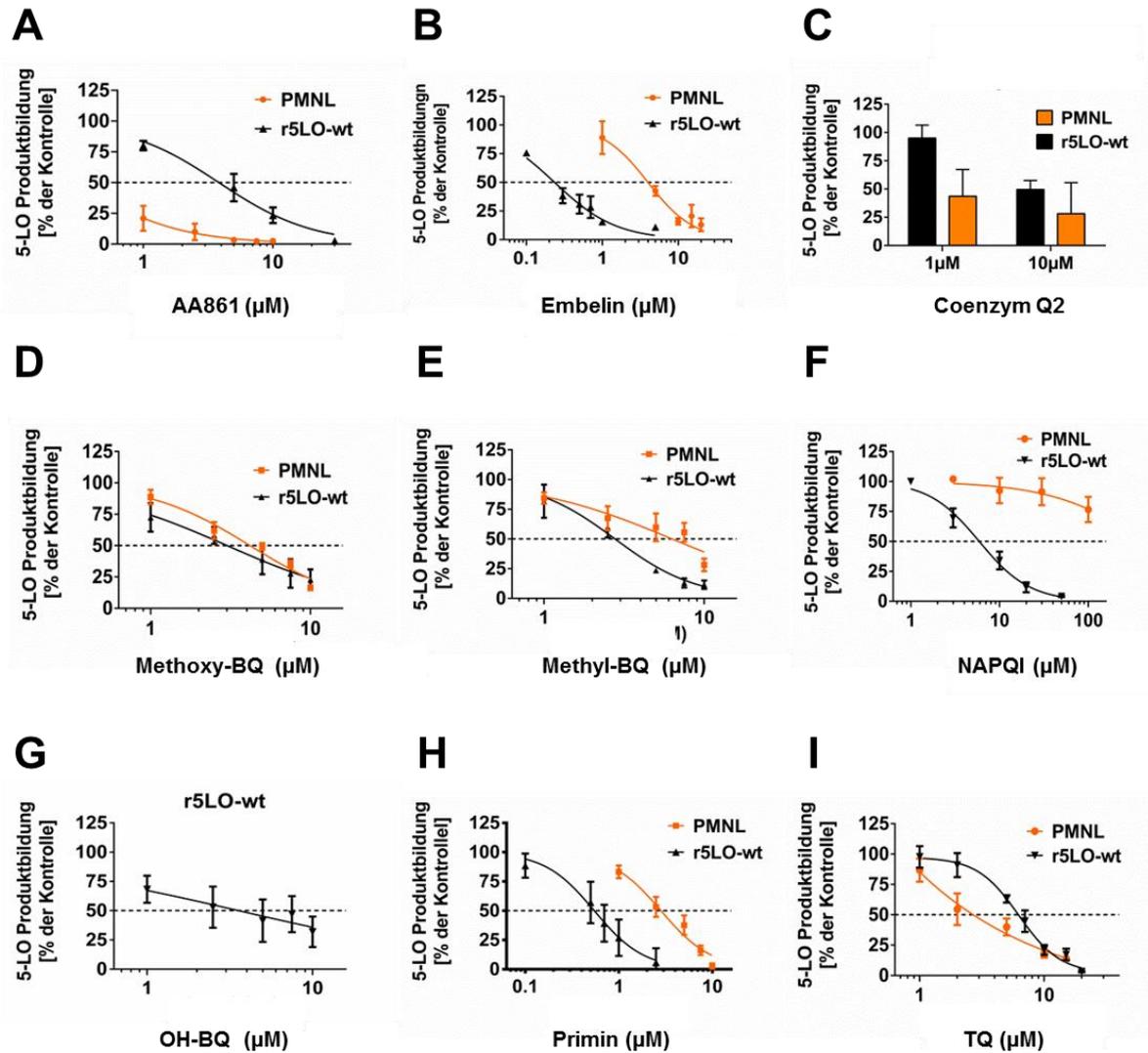


Abb. 43: Einfluss von AA861 (A), Embelin (B), Coenzym Q2 (C), Methoxy-BQ (D), Methyl-BQ (E), NAPQI (F), OH-BQ (G), Primin (H) und TQ (I) auf die 5-LO-Produktbildung im intakten Zellsystem (orange) und an r5LO-wt. PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Methoxy-Nitrostyren in angegebener Konzentration oder mit der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 μM A23187 plus 2 μM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. 8.2.2 Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=3 \pm \text{SEM}$.

Naphthochinone

Von den Naphthochinonen wurden nur Shikonin und Plumbagin an r5LO-wt getestet, da die anderen Verbindungen keinen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL zeigten. Shikonin zeigte an r5LO-wt mit einem IC_{50} -Wert von 0,5 μM einen deutlich stärker hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung als Plumbagin mit einem IC_{50} -Wert von 14,3 μM (Abb. 44).

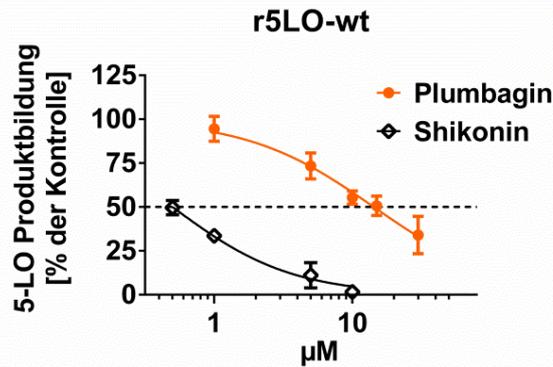


Abb. 44: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch die beiden Naphthochinonderivate Plumbagin (orange) und Shikonin (schwarz) am aufgereinigten Enzym (r5LO-wt). 3 µg aufgereinigte r5LO-wt wurde zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

Der inhibitorische Effekt von Plumbagin auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt nahm am aufgereinigten Enzym im Vergleich zu PMNL ab (7,0 µM vs. 14,3 µM); Für Shikonin nahm er leicht zu (1,54 µM vs. 0,5 µM) (Abb. 42).

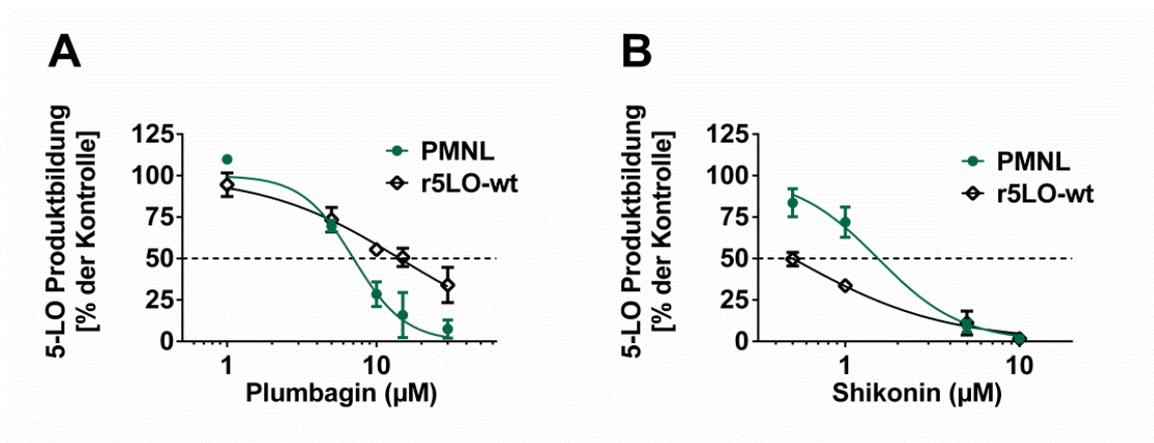


Abb. 45: Effekte der Naphthochinone Plumbagin (A) und Shikonin (B) auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL. Grüne Kurve: PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Plumbagin, Shikonin oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 µM A23187 plus 2 µM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$. Schwarze Kurve: 3 µg aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Plumbagin, Shikonin oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

Zusammenfassend zeigte Shikonin sowohl in PMNL als auch an r5LO-wt einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung als Plumbagin. An r5LO-wt war der inhibitorische Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch Plumbagin geringer als in PMNL (Abb. 46).

IC₅₀ [PMNL] und [r5LO-wt]

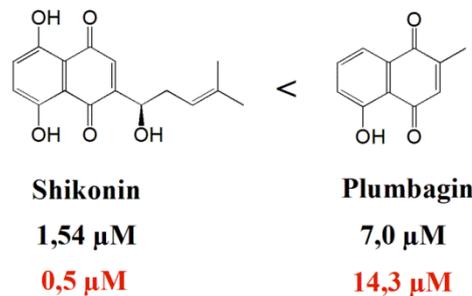


Abb. 46: Strukturen und IC₅₀-Werte von Shikonin und Plumbagin. Die IC₅₀-Werte [PMNL] sind in schwarz dargestellt, die IC₅₀-Werte [r5LO-wt] in rot.

8.2.3 Ungesättigte Verbindungen

Innerhalb dieser Gruppe wurden α -Tocotrienol, BWA4C, Harpagosid, Kaffeesäure, 10-NFS, Shogaol, Sinapinsäure, U73122 und Zimtsäure an r5LO-wt getestet. BWA4C, Shogaol und 10-NFS zeigten an r5LO-wt einen IC₅₀-Wert von 0,2 µM (BWA4C) und jeweils 0,6 µM (Shogaol sowie 10-NFS). U73122 wies unter den Verbindungen dieser Gruppe den niedrigsten IC₅₀-Wert mit 0,17 µM an r5LO-wt auf. 10-NFS, Shogaol und U73122 hatten einen signifikant stärker inhibitorischen Effekt auf die Produktbildung der r5LO-wt im Vergleich zu PMNL. 10-NFS war um den Faktor 8 stärker inhibitorisch an r5LO-wt (IC₅₀-Wert [PMNL]: 5,0 µM; IC₅₀-Wert [r5LO-wt] 0,6 µM), Shogaol fast um den Faktor 14 (IC₅₀-Wert [PMNL]: 8,2 µM; IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 0,6 µM) und U73122 sogar um den Faktor 41 (IC₅₀-Wert [PMNL]: 6,96 µM; IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 0,17 µM) (Abb. 47). Alle anderen Substanzen zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt. Abb. 48 zeigt die Strukturen und IC₅₀-Werte von BWA4C, 10-NFS, Shogaol und U73122 auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL.

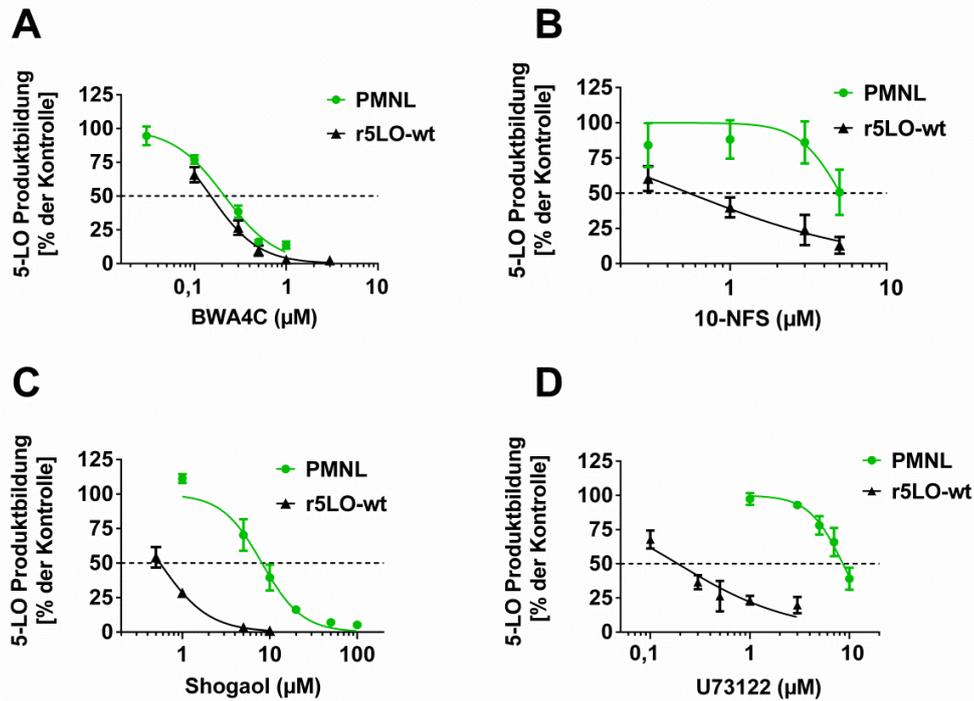


Abb. 47: Effekte von BWA4C (A), 10-NFS (B), Shogaol (C) und U73122 (D) auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL. Grüne Kurve: PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit genannten Verbindungen oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 µM A23187 plus 2 µM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$. Schwarze Kurve: 3 µg aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl_2 (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

IC₅₀ [PMNL] und [r5LO-wt]

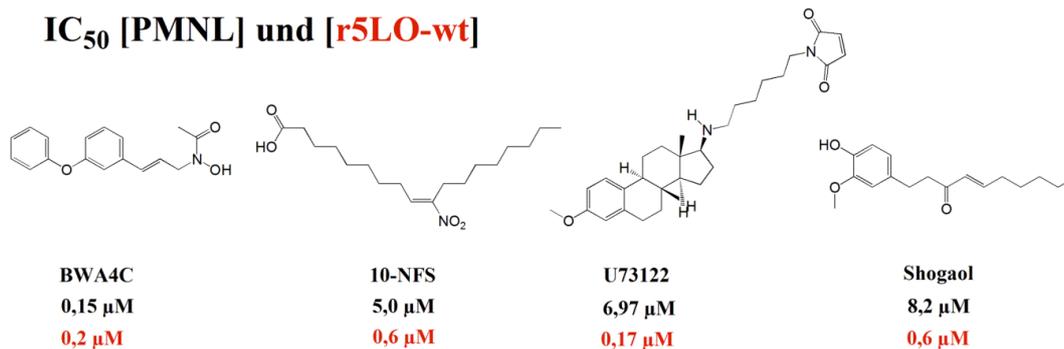


Abb. 48: Strukturen und IC₅₀-Werte von BWA4c, 10-NFS, U73122 und Shogaol. Die IC₅₀-Werte [PMNL] sind in schwarz dargestellt, die IC₅₀-Werte [r5LO-wt] in rot.

Polyphenole

Am rekombinanten Enzym wurde innerhalb dieser Gruppe Curcumin getestet. Curcumin zeigte an r5LO-wt einen IC_{50} -Wert von $1,4 \mu\text{M}$ welcher fast exakt dem IC_{50} -Wert in PMNL von $1,6 \mu\text{M}$ entspricht (Abb. 46). Abb. 50 zeigt die Struktur und die IC_{50} -Werte von Curcumin in PMNL und an r5LO-wt.

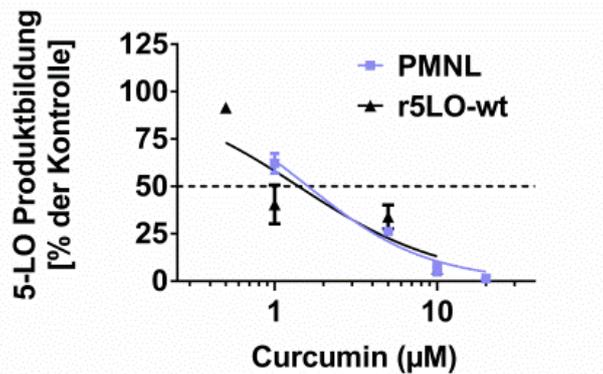
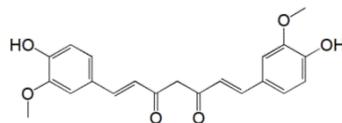


Abb. 49: Effekt von Curcumin auf die 5-LO Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL. Blaue Kurve: PMNL (5×10^6 Zellen/mL) wurden mit Curcumin oder der Kontrolle (0,1% DMSO) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit $2,5 \mu\text{M}$ A23187 plus $2 \mu\text{M}$ AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37°C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 mL eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$. Schwarze Kurve: $3 \mu\text{g}$ aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 mL PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1% DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37°C vorgewärmt und mit CaCl_2 (2mM) sowie $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 mL eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

IC_{50} [PMNL] und [r5LO-wt]



Curcumin

1,6 μM

1,4 μM

Abb. 50: Struktur und IC_{50} -Wert von Curcumin. Der IC_{50} -Wert [PMNL] ist in schwarz dargestellt, der IC_{50} -Wert [r5LO-wt] in rot.

Flavonoide

An r5LO-wt wurden von den Flavonoiden Baicalein, Chalkon und Luteolin getestet. Luteolin zeigte am aufgereinigten Enzym mit einem IC_{50} -Wert von $0,06 \mu\text{M}$ den stärksten inhibierenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung innerhalb dieser Gruppe. Für Baicalein ergab sich ein IC_{50} -Wert von $0,29 \mu\text{M}$ und für Chalkon ein IC_{50} -Wert von $0,7 \mu\text{M}$ (Abb. 51).

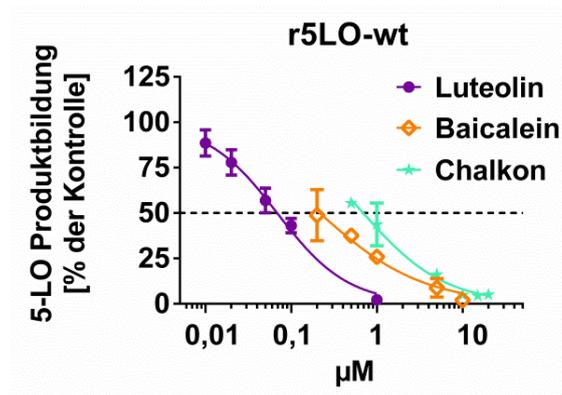


Abb. 51: Vergleich der Effekte auf die 5-LO-Produktbildung durch Luteolin (lila), Baicalein (orange) und Chalkon (grün) am aufgereinigten Enzym (r5LO-wt). $3 \mu\text{g}$ aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37°C vorgewärmt und schließlich mit CaCl_2 (2 mM) sowie $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=3-4 \pm \text{SEM}$.

Sowohl Chalkon als auch Luteolin erzielten an r5LO-wt gegenüber PMNL niedrigere IC_{50} -Werte (Chalkon IC_{50} -Wert [PMNL]: $6,0 \mu\text{M}$; IC_{50} -Wert [r5LO-wt]: $0,7 \mu\text{M}$; Luteolin IC_{50} -Wert [PMNL]: $0,6 \mu\text{M}$; IC_{50} -Wert [r5LO-wt]: $0,06 \mu\text{M}$). Die Effekte von den Flavonoiden Baicalein, Chalkon und Luteolin auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL können Abb. 52 entnommen werden. Die IC_{50} -Werte von Luteolin, Baicalein und Chalkon in PMNL und an r5LO-wt können Abb. 53 entnommen werden.

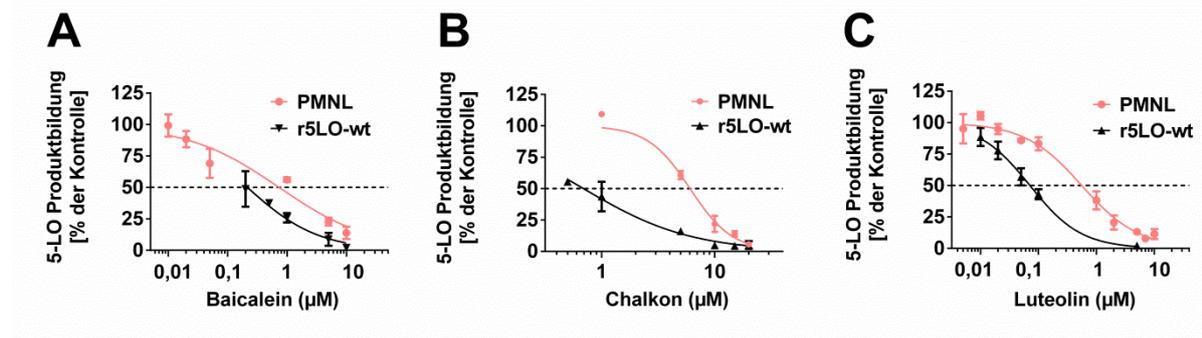


Abb. 52: Effekte von den Flavonoiden Baicalein (A), Chalkon (B) und Luteolin (C) auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL. Rosa Kurve: PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit genannten Verbindungen oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 2,5 µM A23187 plus 2 µM AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$. Schwarze Kurve: 3 µg aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

IC₅₀ [PMNL] und [r5LO-wt]

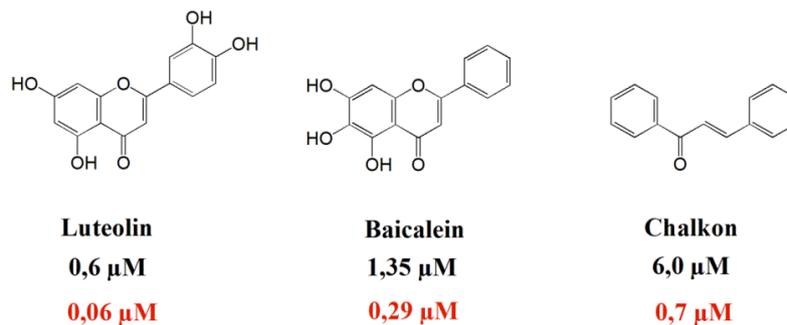


Abb. 53: Strukturen und IC₅₀-Werte von Luteolin, Baicalein und Chalkon. Die IC₅₀-Werte [PMNL] sind in schwarz dargestellt, die IC₅₀-Werte [r5LO-wt] in rot.

Nitrostyrene

Für das Nitrostyren-Derivat Methoxy-Nitrostyren wurde an r5LO-wt ein IC_{50} -Wert von $2,9 \mu\text{M}$ ermittelt. In PMNL zeigte Methoxy-Nitrostyren einen schwächer hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung als an r5LO-wt (Abb. 54). Die IC_{50} -Werte von Methoxy-Nitrostyren in ^{8.2.6}PMNL und an r5LO-wt können Abb. 55 entnommen werden.

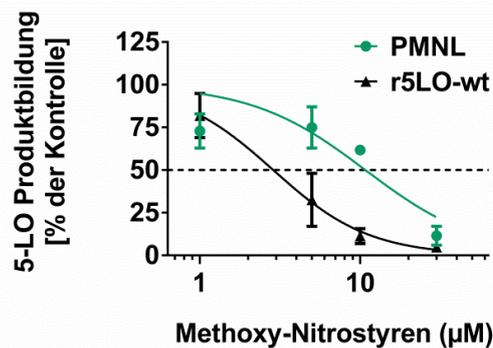
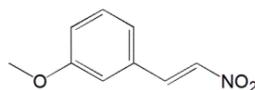


Abb. 54: Effekt von Methoxy-Nitrostyren auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und in PMNL. Grüne Kurve: PMNL (5×10^6 Zellen/ml) wurden mit Methoxy-Nitrostyren oder der Kontrolle (0,1 % DMSO) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und dann mit $2,5 \mu\text{M}$ A23187 plus $2 \mu\text{M}$ AA für 10 Minuten bei ebenfalls 37°C stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$. Schwarze Kurve: $3 \mu\text{g}$ aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle (0,1 % DMSO) wurden für 15 Minuten bei 4°C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37°C vorgewärmt und schließlich mit CaCl_2 (2 mM) sowie $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n \geq 3 \pm \text{SEM}$.

IC_{50} [PMNL] und [r5LO-wt]



3-Methoxy-beta-Nitrostyren

10,8 μM

2,9 μM

Abb. 55: Struktur und IC_{50} -Wert von 3-Methoxy-beta-Nitrostyren. Der IC_{50} -Wert [PMNL] ist in schwarz dargestellt, der IC_{50} -Wert [r5LO-wt] in rot.

Arzneistoffe

Unter den Arzneistoffen wurden CDDO, Entacapon, Moxifloxacin, Afatinib, DMF, Metronidazol, MMF und Paracetamol an r5LO-wt getestet. Innerhalb dieser Gruppe wies CDDO an r5LO-wt einen IC_{50} -Wert von $6,6 \mu\text{M}$, Moxifloxacin einen IC_{50} -Wert von $27,19 \mu\text{M}$ (allerdings mit großen Standardabweichungen; 95 %-Konfidenzintervall: $14,14 \mu\text{M} - 52,31 \mu\text{M}$) und Entacapon mit $30,9 \mu\text{M}$ (auch mit hohen Standardabweichungen; 95 %-Konfidenzintervall: $21,1 \mu\text{M} - 45,3 \mu\text{M}$) auf (Abb. 56). Afatinib (getestet bis $10 \mu\text{M}$), DMF (getestet bis $100 \mu\text{M}$), Metronidazol, MMF (getestet bis $100 \mu\text{M}$) und Paracetamol (getestet bis $100 \mu\text{M}$) blieben ohne hemmenden Effekt auf die Produktbildung der r5LO-wt. Die IC_{50} -Werte von CDDO in PMNL und an r5LO-wt können Abb. 57 entnommen werden.

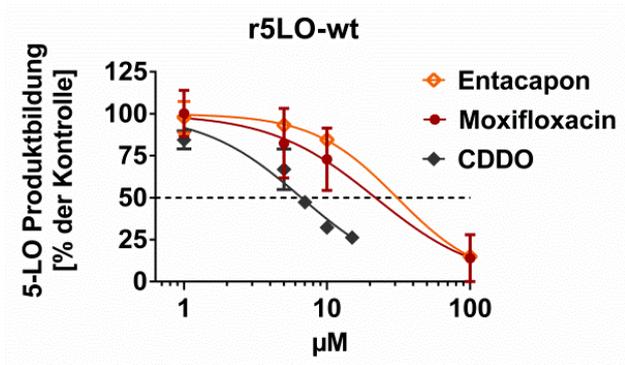


Abb. 56: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung am aufgereinigten Enzym (r5LO-wt) durch Entacapon (orange), Moxifloxacin (rot) und CDDO (schwarz). $3 \mu\text{g}$ aufgereinigte r5LO-wt wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben. Die jeweiligen Substanzen oder die Kontrolle ($0,1 \%$ DMSO) wurden in angegebener Konzentration für 15 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, dann für 30 Sekunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt und schließlich mit CaCl_2 (2 mM) sowie $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; $n=2-4 \pm \text{SEM}$.

IC_{50} [PMNL] und [r5LO-wt]

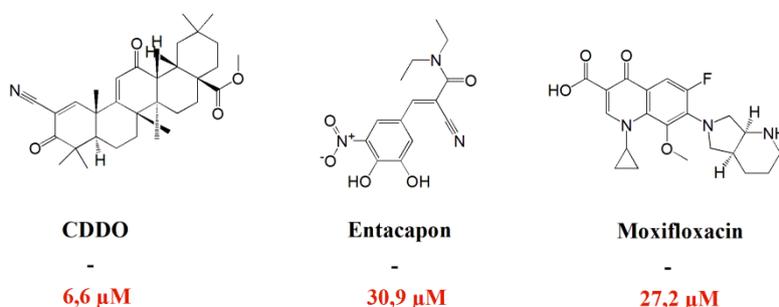


Abb. 57: Struktur und IC_{50} -Wert von CDDO, Entacapon und Moxifloxacin. IC_{50} -Wert [PMNL] ist in schwarz dargestellt, IC_{50} -Wert [r5LO-wt] in rot.

8.3 Effekte auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C

Um beurteilen zu können, ob ein Grund für die Inhibition der 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt durch michaelreaktive Verbindungen in der Interaktion mit den Cysteinen in Nähe des aktiven Zentrums liegt, wurde ein Versuch mit einer 5-LO-Mutante durchgeführt. Diese Mutante hat vier zu Serin mutierte Cysteine (Cys159, Cys300, Cys416, Cys418), die direkt an der Substrateintrittsstelle lokalisiert sind (r5LO-4C) [150]. Wie bereits durch Hörnig *et al.* 2011 beschrieben, beeinträchtigen diese Mutationen nicht die Aktivität der r5LO-4C im Vergleich zu r5LO-wt [151]. Als Kontrolle dienten 10-NFS (Abb. 58B) und U73122 [152] (Abb. 58C), die die 5-LO durch kovalente Bindung an Cys416 inhibieren [151] sowie BWA4C (Abb. 58A), ein Eisenligand-Inhibitor, der die 5-LO unabhängig von ihren Cysteinen inhibiert [153].

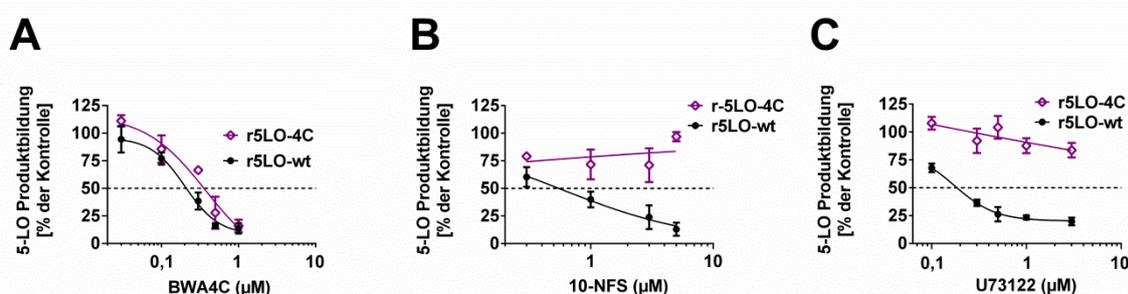


Abb. 58: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch BWA4C(A), 10-NFS (B) und U73122 (C) an r5LO-4C (lila) und r5LO-wt (schwarz). 3 μg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt oder r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit den Kontrollen BWA4C (A) n=3± SEM, 10-NFS (B) n=3± SEM, U73122 (C) n=3 ± SEM für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und mit CaCl₂ (2 mM) und 20 μM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert. Die durchschnittlichen 5-LO-Produkte aller Inkubationen mit der DMSO-Kontrolle an r5LO-wt betragen 1469 ± 135 ng/ml, an r5LO-4C 1007 ± 131 ng/ml.

8.3.1

Benzochinone

Unter den Benzochinonderivaten verloren AA861 (Abb. 59A), Coenzym Q₂ (Abb. 59B), OH-BQ (Abb. 59D), Methoxy-BQ (Abb. 59E), Methyl-BQ (Abb. 59F), NAPQI (Abb. 59G) und TQ (Abb. 59I) an der r5LO-4C nahezu vollständig ihren hemmenden Effekt auf die 5-LO-Produktbildung. Primin zeigte an r5LO-4C eine Abschwächung des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung von einem IC₅₀-Wert [r5LO-wt] von 0,6 μM auf einen IC₅₀-Wert [r5LO-4C] von 2,5 μM. Für Embelin blieb der IC₅₀-Wert an r5LO-4C im Vergleich zu r5LO-wt nahezu äquivalent: Der IC₅₀-Wert [r5LO-wt] nahm von 0,23 μM auf einen IC₅₀-Wert [r5LO-4C] von 0,14 μM ab. Coenzym Q₂ wurde nur bei 3 verschiedenen

Konzentrationen vermessen, weshalb eine Aussage über Unterschiede auf die inhibitorischen Effekte zwischen r5LO-wt und r5LO-4C nicht signifikant wären. Auch bei Schwarzkümmelöl trat ein Verlust des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C auf. Die Inhibition der 5-LO-Produktbildung wurde durch die Mutation allerdings nicht komplett aufgehoben wie bei dessen Inhaltsstoff TQ (Abb. 60).

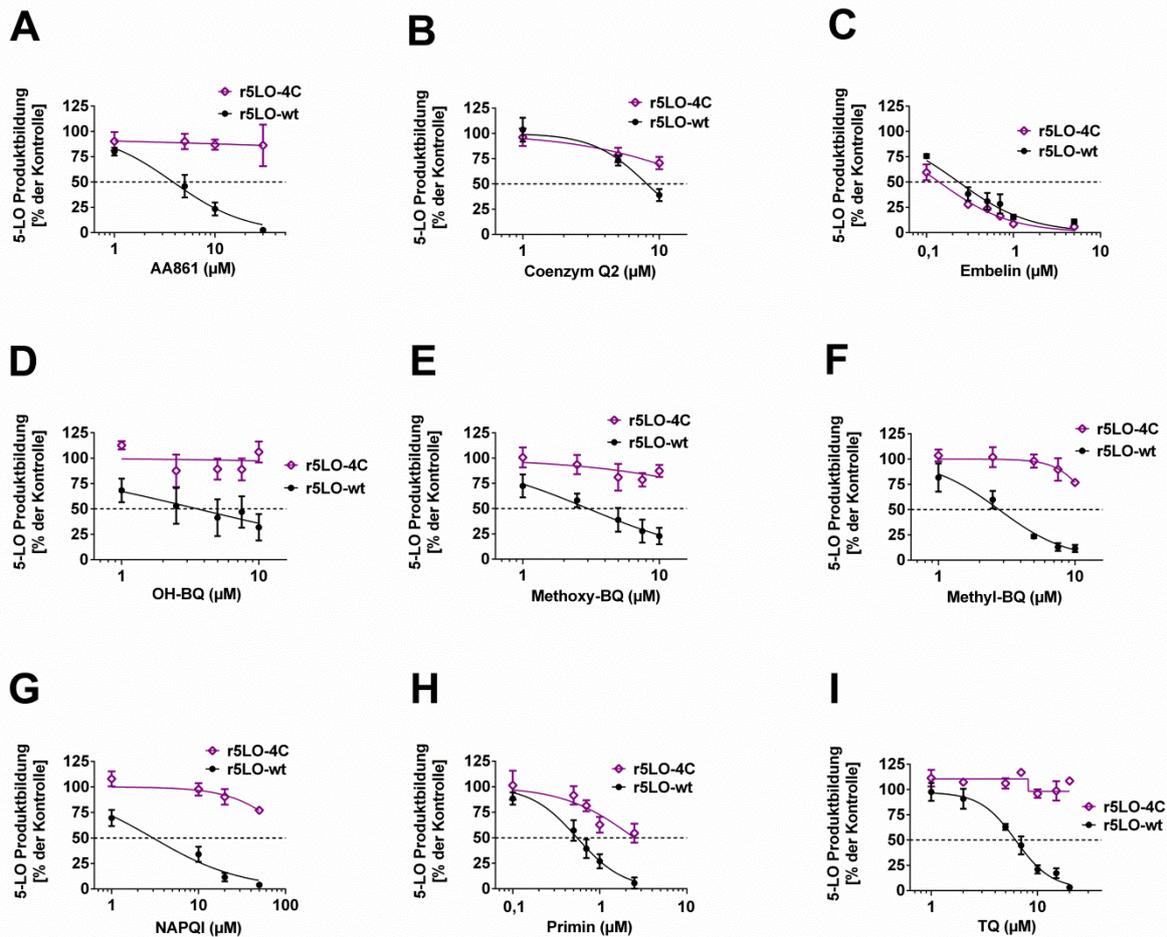


Abb. 59: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch AA861 (A), Coenzym Q2 (B), Embelin (C), OH-BQ (D), Methoxy-BQ (E), Methyl-BQ (F), NAPQI (G), Primin (H) und TQ (I) an r5LO-wt und r5LO-4C. 3 μg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit den Benzochinonverbindungen und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 μM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n≥3 ± SEM.

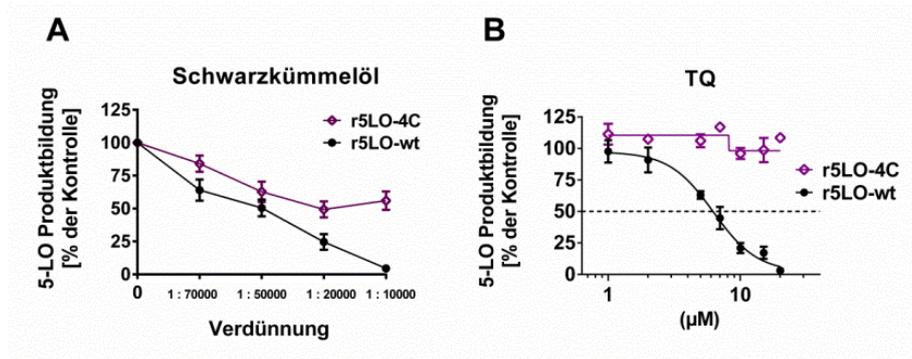


Abb. 60: Vergleich der Effekte von Verdünnungen des Schwarzkümmelöls (A) gegenüber dessen Inhaltsstoff TQ (B) auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C und r5LO-wt. 3 μg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit Verdünnungen des Schwarzkümmelöls, TQ und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 μM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n≥3 ± SEM.

Naphthochinone

8.3.2

Unter den Naphthochinonderivaten wurden Plumbagin und Shikonin innerhalb dieses Versuches untersucht. Plumbagin verlor seinen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C (IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 13,41 μM; IC₅₀-Wert [r5LO-4C]: >50 μM). (Abb. 61A). Die IC₅₀-Werte an r5LO-wt und r5LO-4C von Shikonin waren nicht signifikant verschieden (IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 0,5 μM; IC₅₀-Wert [r5LO-4C]: 1,8 μM) (Abb. 61B).

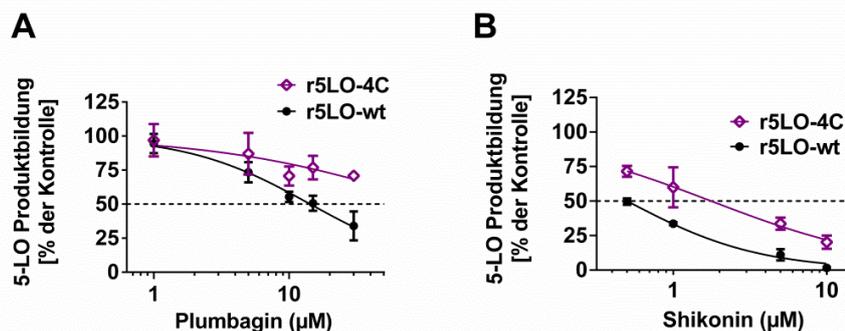


Abb. 61: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch die Naphthochinonderivate Plumbagin (A) und Shikonin (B) an r5LO-4C und r5LO-wt. 3 μg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit den Naphthochinonderivaten Plumbagin, Shikonin und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 μM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n≥3 ± SEM.

Ungesättigte Verbindungen

Da zu den ungesättigten Verbindungen auch 10-NFS und BWA4C miteinbezogen wurden, diese aber hier als Kontrolle dienten und schon in Abb. 58A und 58B gezeigt wurden, wird hier nur das Ergebnis von Shogaol dargestellt (Abb. 62). Shogaol zeigt an r5LO-4C einen nahezu gleichen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung wie an r5LO-wt (IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 0,6 μ M; IC₅₀-Wert [r5LO-4C]: 0,7 μ M).

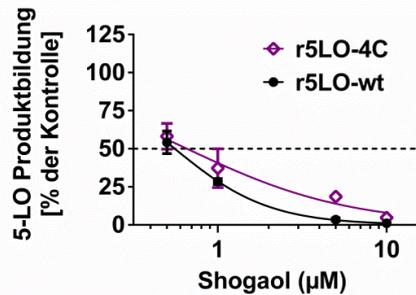


Abb. 62: Effekt von Shogaol auf die Produktbildung von r5LO-4C und r5LO-wt. 3 μ g des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit Shogaol und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 μ M AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n=3 \pm SEM.

8.3.4 Polyphenole

Für Curcumin ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung der 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und an r5LO-4C feststellen (Abb. 63). Der IC₅₀-Wert an r5LO-wt betrug 1,4 μ M und der IC₅₀-Wert an r5LO-4C 1,08 μ M.

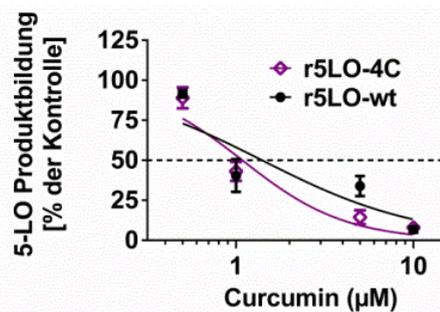


Abb. 63: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch Curcumin an r5LO-4C und r5LO-wt. 3 μ g des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit Curcumin und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 μ M AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n \geq 3 \pm SEM.

Flavonoide

Unter den untersuchten Flavonoiden Baicalein, Chalkon und Luteolin zeigte nur Chalkon an r5LO-4C eine Abnahme des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung im Vergleich zu r5LO-wt (IC₅₀-Wert [r5LO-wt]: 0,7 µM; IC₅₀-Wert [r5LO-4C]: 6,7 µM) ^{8.3.5}(Abb. 64A-C).

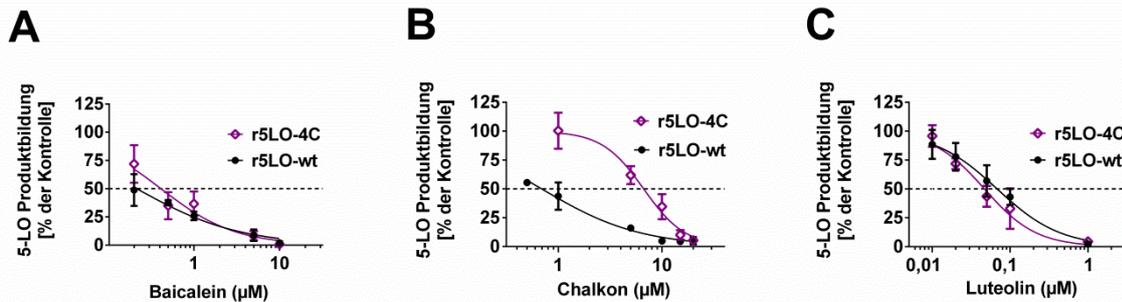


Abb. 64: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C und r5LO-wt durch Baicalein (A), Chalkon (B) und Luteolin (C). 3 µg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit den jeweiligen Flavonoiden und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n≥3 ± SEM.

8.3.6

Nitrostyrene

Das Nitrostyrenderivat 3-Methoxy-β-Nitrostyren (Methoxy-Nitrostyren) verzeichnete eine deutliche Abnahme des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C (Abb. 65). Im Vergleich dazu betrug der IC₅₀-Wert an r5LO-wt 2,9 µM, wohingegen er an r5LO-4C über 50 µM betrug. Die Hemmung der 5-LO-Produktbildung wurde somit nahezu komplett durch die Mutation aufgehoben.

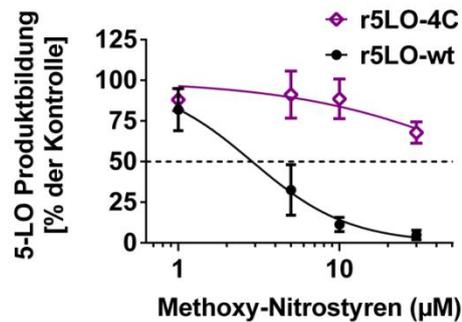


Abb. 65: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C und r5LO-wt durch Methoxy-Nitrostyren. 3 µg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit Methoxy-Nitrostyren und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n_≥3 ± SEM.

Arzneistoffe

8.3.7 Unter den Arzneistoffen wurden CDDO und U73122 (Abb. 58C) getestet. Der inhibitorische Effekt von CDDO auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt mit einem IC₅₀-Wert von 6,6 µM wurde an r5LO-4C nahezu komplett aufgehoben (Abb. 66).

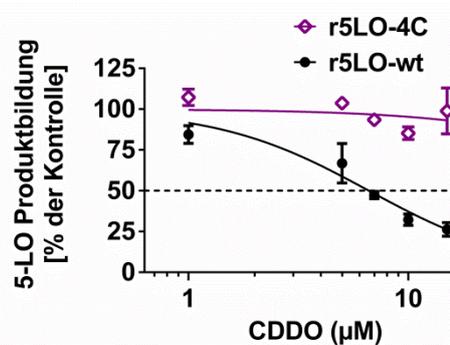


Abb. 66: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-4C und r5LO-wt durch CDDO. 3 µg des jeweiligen Proteins (r5LO-wt und r5LO-4C) wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM ATP gegeben. r5LO-wt und r5LO-4C wurden dann mit CDDO und den Kontrollen U73122 sowie BWA4C für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt und schließlich mit CaCl₂ (2 mM) sowie 20 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt und die 5-LO-Produkte via HPLC analysiert; n_≥3 ± SEM.

8.4 Bedeutung der einzelnen Cysteine

Um herauszufinden, welches Cystein bzw. welche Cysteine für die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch die jeweiligen Michael-Akzeptoren essentiell sind, wurden einzelne Cysteine zu Serin mutiert [6]. Je nach Struktur der michaelreaktiven Verbindung ergab sich ein unterschiedliches Inhibitionsmuster (Abb. 67). Wie bereits beschrieben, zeigte die Kontrollsubstanz U73122 einen Verlust des inhibitorischen Effektes an der Cys416-Mutante (r5LO-416C) [6]. Einen ähnlichen Effekt zeigte NAPQI, dessen inhibitorischer Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an der r5LO-416C aufgehoben wurde. Im Gegensatz dazu scheint Cys418 eine essentielle Rolle für die Hemmung der r5LO-wt durch TQ, Primin, AA861 und Methyl-BQ zu spielen. Diese zeigten einen signifikanten Verlust des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung bei der Inkubation mit r5LO-418C, wohingegen der Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und an mutiertem Cys416 nahezu gleich war. Als weitere Kontrolle diente BWA4C, das wie zu erwarten, keine Unterschiede in seinen inhibitorischen Effekten an r5LO-wt und den Cysteinmutanten zeigte.

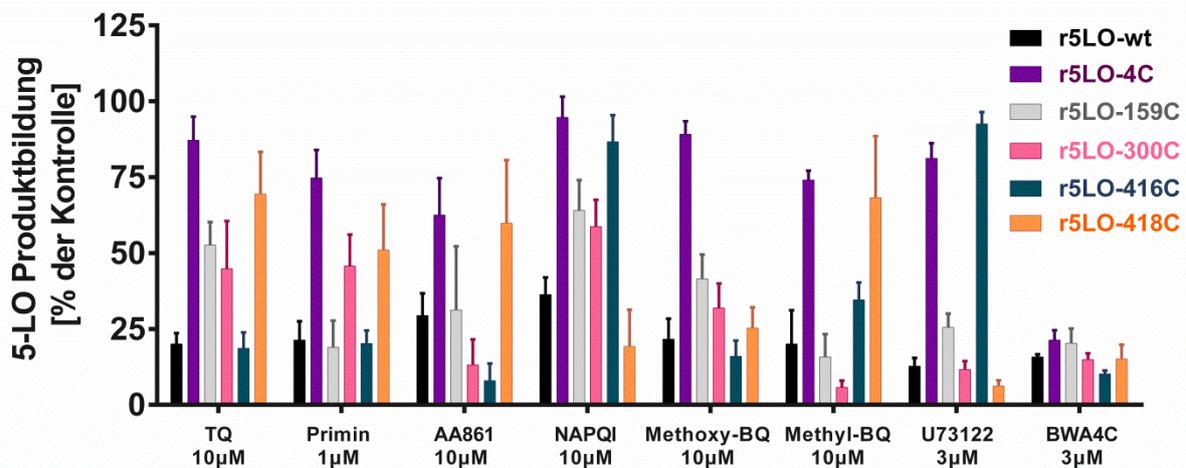


Abb. 67: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung an einzelnen Cysteinmutanten durch TQ, Primin, AA861, NAPQI, Methoxy-BQ, Methyl-BQ, U73122 und BWA4C. Die Cysteinreste der 5-LO (Cys159, Cys300, Cys416, Cys418, oder alle 4) wurden zu Serin mutiert. 3 μg Protein wurden zu 1 ml PBS pH 7,4 mit 1 mM EDTA und 1 mM ATP gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C mit den Testsubstanzen in angegebener Konzentration oder der Kontrolle (DMSO 0,1 %) inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 Sekunden bei 37 °C vorgewärmt, 20 μM AA sowie 2 mM CaCl₂ zugegeben und für 10 Minuten, weiterhin bei 37 °C, inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; n_≥3 + SEM. Die 5-LO-Produkte der Kontrolle betragen 1640 ± 148 ng/ml (C159-Mutante), 1652 ± 76 ng/ml (C300-Mutante), 1165 ± 344 ng/ml (C416-Mutante), 1669 ± 274 ng/ml (C418-Mutante), 1702 ± 222 ng/ml (r5LO-4C), 1420 ± 348 ng/ml (r5LO-wt).

8.5 Einfluss von Thiolen und thioldepletierenden Verbindungen

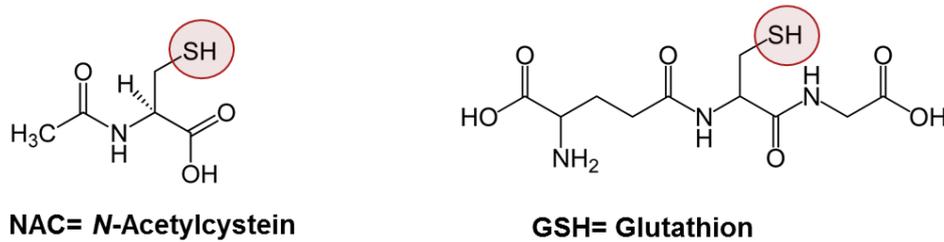


Abb. 68: Chemische Strukturen der verwendeten thiolgruppenliefernden Verbindungen NAC und GSH

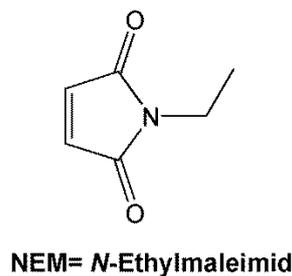


Abb. 69: Chemische Struktur der verwendeten thiolgruppenepletierenden Verbindung NEM

Da als Grund für die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen deren Thiolreaktivität angenommen wurde, sollten vier verschiedene Versuche diese Bedeutung bestätigen. Hierzu wurden intakte PMNL einmal mit *N*-Acetylcystein (NAC) (Abb. 68), welches im Gegensatz zu Glutathion (GSH) (Abb.68) zellgängig ist und einmal mit *N*-Ethylmaleinimid (NEM) (Abb. 69) versetzt; r5LO-wt und Homogenate wurden mit GSH (Abb. 68 und 70B) versetzt. Der Zusatz von 5 mM NAC führte zu einer signifikanten Abschwächung des inhibitorischen Effektes von TQ, U73122 und Primin auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL (Abb. 70A). Embelin und BWA4C zeigten nach NAC-Zusatz keine signifikante Abschwächung des inhibitorischen Effektes auf die 5-LO-Produktbildung in PMNL (Abb. 70A). Diese Daten bestätigen und unterstreichen die Bedeutung der Thiolreaktivität der untersuchten Substanzen für die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen im intakten Zellsystem. Des Weiteren wurde bei der Inkubation mit r5LO-wt (Abb. 70B) und Homogenaten (Abb. 70C) beobachtet, dass die Hemmung der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen, nach Zusatz von 1 mM GSH, abgeschwächt wurde. Da intrazelluläre Thiole das Potential besitzen, die Reaktivität michaelreaktiver Verbindungen zu beeinträchtigen, wurde außerdem ein Experiment durchgeführt, bei dem endogene Thiole durch Zusatz von 50 μ M NEM depletiert wurden.

Hierzu wurden 5×10^6 frisch isolierte PMNL mit $50 \mu\text{M}$ NEM für 30 Minuten vorinkubiert und schließlich mit den michaelreaktiven Verbindungen sowie der Kontrolle BWA4C für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit $2,5 \mu\text{M}$ Ionophor sowie $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert und weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Wie schon bereits publiziert, steigert eine zelluläre Thioldepletion die Reaktivität von U73122 für Thiolgruppen der 5-LO, was zu einer erhöhten Suppression der 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen führt [6]. Die Zugabe von NEM hatte keinen Effekt auf die Hemmung zellulärer 5-LO-Produktbildung durch BWA4C. Die NEM-Supplementation erhöhte allerdings den inhibitorischen Effekt von Embelin und TQ auf die 5-LO-Produktbildung, jedoch in geringerem Ausmaße als bei U73122. Die Zugabe von NEM bedingte außerdem, dass auch NAPQI und Paracetamol bei einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ die zelluläre 5-LO-Produktbildung inhibierten. Dies legt nahe, dass hohe intrazelluläre Thiolkonzentrationen die Zelle vor der Reaktivität potentiell toxischer Metaboliten schützen. Zusammenfassend bestätigt dieses Experiment die Wichtigkeit der Thiolreaktivität (Michaelreaktivität) der Michael-Akzeptoren für die Suppression der 5-LO-Produktbildung.

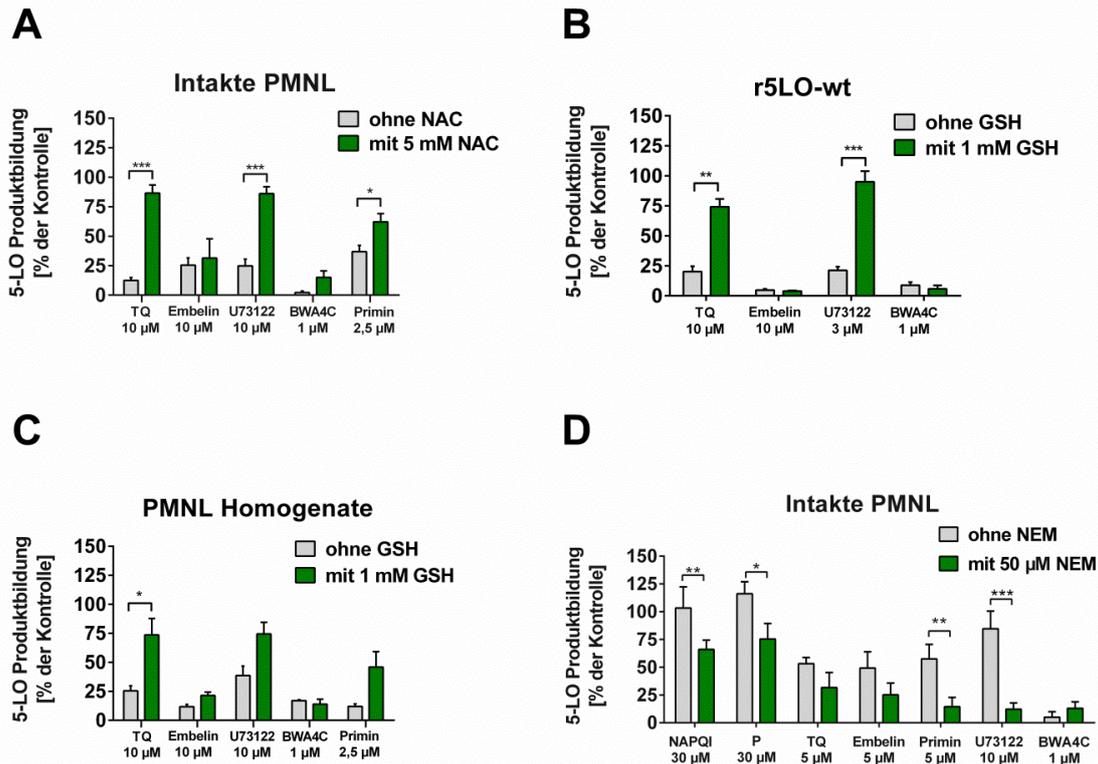


Abb. 70: Einfluss von Thiolen oder thioldepletierenden Verbindungen auf die Inhibition der 5-LO-Produktbildung.

Effekt der Zugabe von 5 mM NAC zu PMNL (A), von 1 mM GSH zu r5LO-wt (B) bzw. zu Homogenaten (C) und von 50 μ M NEM zu PMNL (D) auf die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen. Frisch isolierte PMNL (5×10^6 Zellen in 1 ml PG-Puffer) wurden mit 5 mM NAC (erhöht den Thiolspiegel in der Zelle) für 20 Minuten (A) oder mit 50 μ M NEM (um endogene Thiole zu depletieren) (D) für 30 Minuten versetzt, bevor die vorbehandelten Zellen für 15 Minuten mit den Verbindungen bei 37 °C inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit 2,5 μ M Ionophor sowie 20 μ M AA stimuliert und für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Rekombinante humane r5LO-wt (3 μ g/ml) (B) und Zellhomogenate (erhalten aus 5×10^6 PMNL) (C) wurden nach Zusatz von 1 mM ATP und 1 mM EDTA für 15 Minuten bei 4 °C mit den Testsubstanzen in angegebener Konzentration in An- und in Abwesenheit von 1 mM GSH (Thiolgruppendonor) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 20 μ M AA sowie 2 mM CaCl_2 gestartet und nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; n=3-7 + SEM (A), n=3-6 + SEM (B, D) und n=3 + SEM (C). Zur statistischen Analyse wurde ein students t-test (*, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001) durchgeführt. Die 5-LO-Produkte der Kontrolle ohne NAC, NEM und GSH betragen: (A) 157 ± 14 ng/ml, (B) 248 ± 53 ng/ml, (C) 53 ± 1 ng/ml and (D) 168 ± 24 ng/ml. Die 5-LO-Produkte der Kontrolle mit NAC, NEM and GSH betragen: (A) 20 ± 4 ng/ml (NAC), (B) 27 ± 61 ng/ml (GSH), (C) 85 ± 7 ng/ml (GSH) and (D) 39 ± 10 ng/ml (NEM).

8.6 MALDI-MS-Analyse

Die MALDI-MS-Analyse wurde in Kooperation mit Arbeitskreis Prof. Dr. Karas der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt von Michael Rühl durchgeführt.

Bindung von TQ und AA861 an GSH

Um die Thiolreaktivität von TQ und AA861 weiter zu bestätigen, wurden beide Substanzen in einer finalen Konzentration von 100 μM mit 1 mM GSH für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. 8.6.1 1 μL hiervon wurde auf einen 384-well Probenhalter des MALDI Orbitrap XL LTQ Massenspektrometers aufgetragen und mit 1 μL α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (3 mg/ml) versetzt. Die Messung erfolgte innerhalb eines Massenbereiches von 400.00–800.00 m/z mit einer Auflösung von 30.000. Für die Bestimmung der Präzisionsmasse wurden 30 Spektren im *FT-Orbitrap-Analysator* akkumuliert. Für die MS/MS-Daten wurden 100 Spektren im Ionenfallen-Analysator akkumuliert. Zur Analyse der Thiol-Bindung wurden die MS/MS-Spektren auf einen Massenverlust von 129,04 Da untersucht, welcher einem Massenverlust von Glutaminsäure entspricht. Sowohl für TQ als auch für AA861 wurde eine Bindung an GSH bestätigt. Abb. 71 zeigt den Vergleich der gemessenen Präzisionsmasse und der kalkulierten Präzisionsmasse des Reaktionsproduktes von TQ und GSH; Abb. 72 von AA861 und GSH.

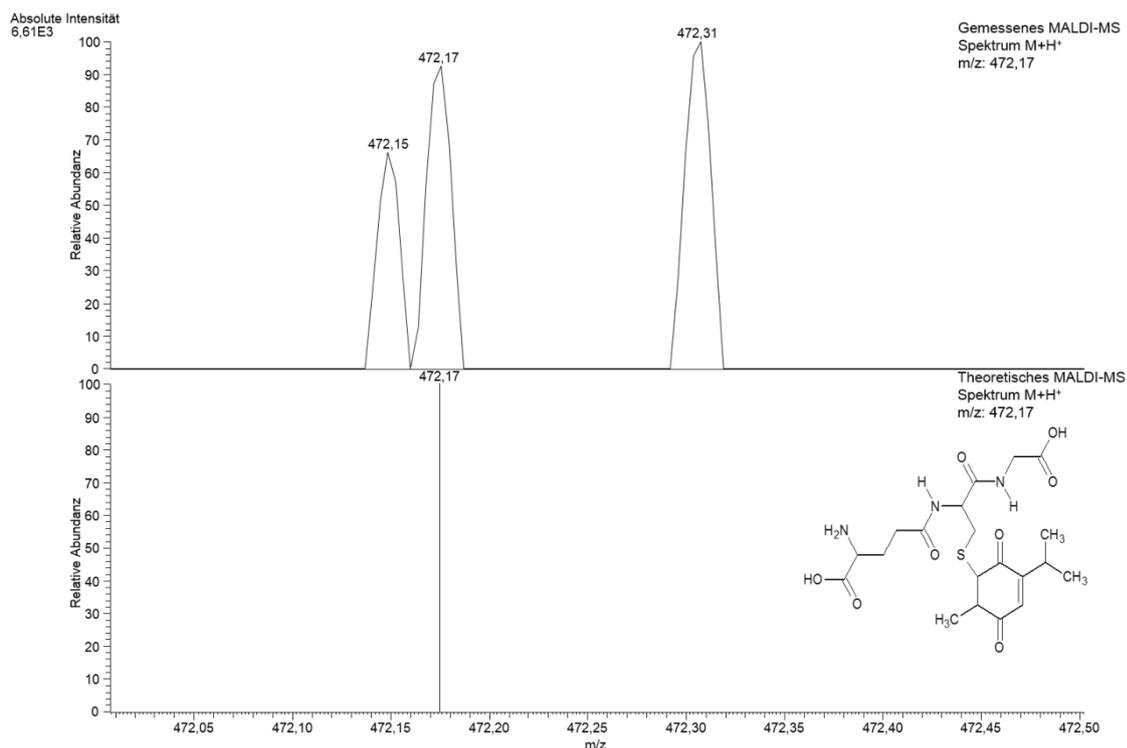


Abb. 71: Vergleich der gemessenen Präzisionsmasse und der kalkulierten Präzisionsmasse des Reaktionsproduktes von TQ und GSH. Das obere Spektrum zeigt die gemessene Masse des Reaktionsproduktes von GSH und TQ. Das untere Spektrum zeigt ein theoretisches Spektrum des Reaktionsproduktes GSH und TQ, was durch Xcalibur™ software (Thermo Scientific) erhalten wurde. Die eingezeichnete chemische Struktur zeigt das mögliche Produkt der Reaktion aus GSH und TQ.

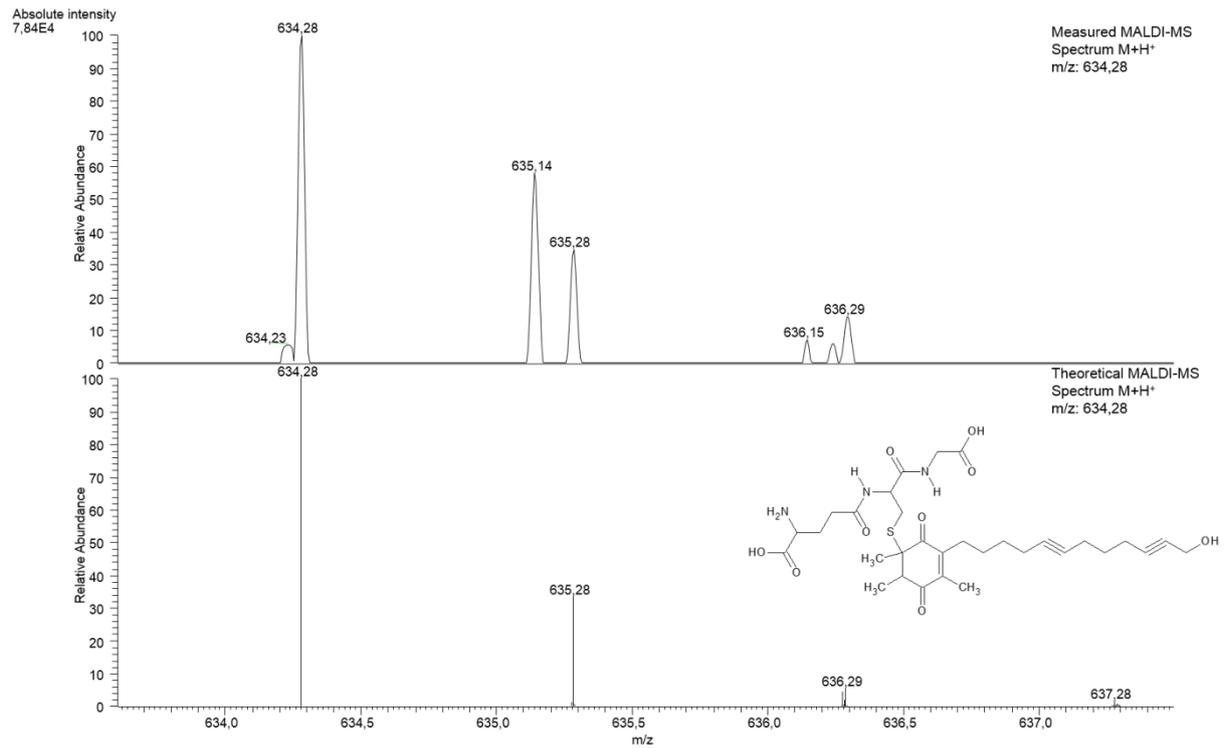


Abb. 72: Vergleich der gemessenen Präzisionsmasse und der kalkulierten Präzisionsmasse des Reaktionsproduktes von AA861 und GSH. Das obere Spektrum zeigt die gemessene Masse des Reaktionsproduktes von GSH und AA861 mit einer Isotopenverteilung von 2 Da. Das untere Spektrum zeigt ein theoretisches Spektrum des Reaktionsproduktes GSH und TQ, was durch die Xcalibur™ software (Thermo Scientific) erhalten wurde. Die Struktur zeigt das mögliche Produkt der Reaktion aus GSH und AA861.

Bindung von TQ an r5LO-wt

Um die Alkylierung der r5LO-wt durch michaelreaktive Verbindungen zu bestätigen und genauer zu spezifizieren, wurde für die folgenden Versuche TQ verwendet, weil es die 5-LO maßgeblich durch Modifikation von Cysteinen (siehe Abb. 59I) inhibiert. Abb. 73 zeigt die schematische Darstellung einer Michael-Addition von TQ an einen Cysteinrest der 5-LO.

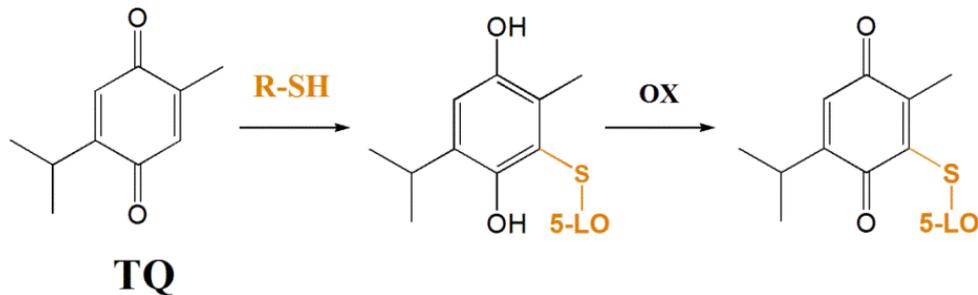


Abb. 73: Darstellung der Michael-Addition von TQ an die 5-LO (R).

Es wurden Datenbanksuchergebnisse mit den Spektren eines theoretischen Verdauers der modifizierten 5-LO verglichen. Die passenden modifizierten und unmodifizierten Peptide wurden unter Verwendung einer MS/MS-Analyse identifiziert. Im Anschluss an die Datenbankanalyse der Peptidmassenfingeraabdruckmessung wurden die übereinstimmenden Massen der Cystein enthaltenden Peptide fragmentiert und durch MS/MS-Analyse überprüft (Abb. 74).

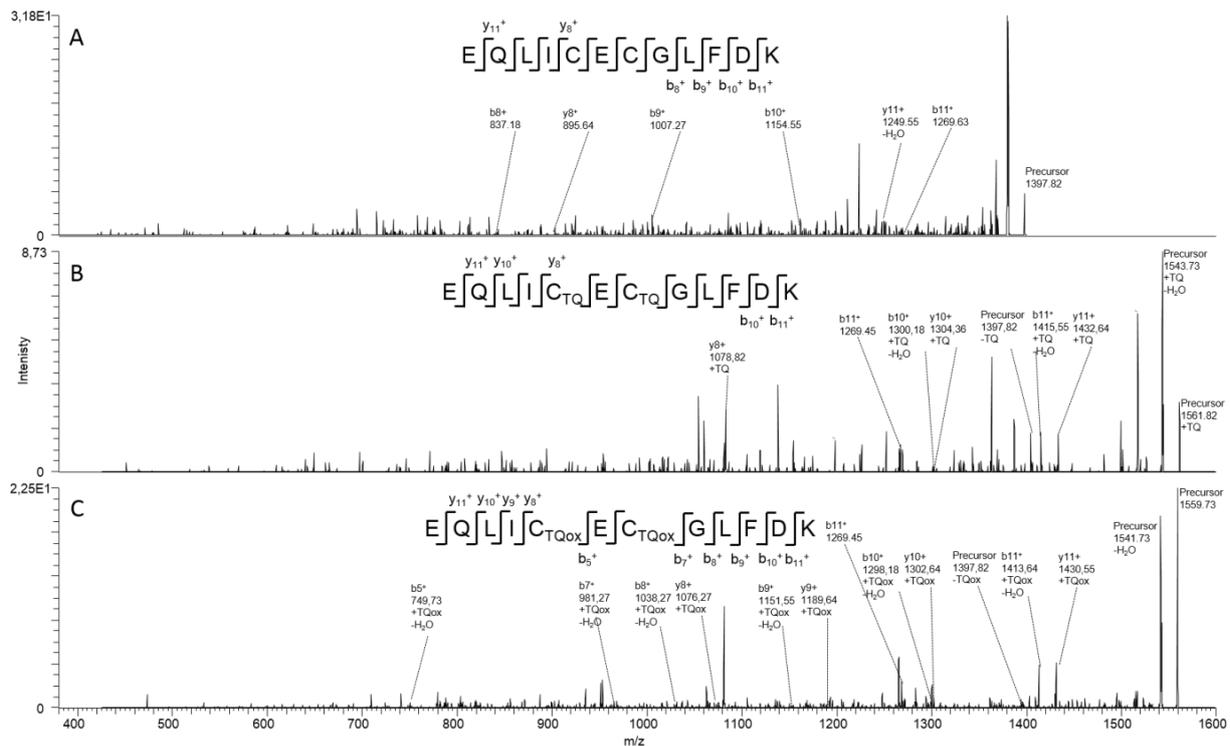


Abb. 74: MS/MS-Spektrum des reinen Peptids [412-423], des mit TQ modifizierten Peptids und des mit oxidiertem TQ modifizierten Peptids. (A) zeigt das Peptid ohne kovalente Modifikation durch TQ. (B) zeigt das mit TQ modifizierte Peptid. Die Massenverschiebung von 164,20 Da im Vergleich zum unmodifizierten Peptid zeigt die kovalente Modifikation mit TQ im CID-Spektrum an. (C) zeigt die kovalente Modifikation des Peptids mit oxidiertem TQ.

Als Nächstes wurden die modifizierten Peptide fragmentiert und mit den nicht modifizierten Peptiden verglichen. Eine Massenverschiebung von 164,20 für TQ und 162,18 für oxidiertes TQ zeigte die kovalente Peptidbindung an. Vergleicht man die MS/MS-Spektren des unmodifizierten Peptids mit dem modifizierten Peptid, zeigt sich ein Verlust der TQ-Bindung und bestätigt damit die Bindung von TQ an das jeweilige Peptid. Die Cysteinreste 416 und 418 wurden beide durch TQ modifiziert. Die beiden Fragmentmassen der kovalenten Bindung an Cystein 416 und 418, die nicht durch MS/MS getrennt werden konnten, sowie das zweifach modifizierte Peptid [412-423] zeigten keine Präferenz für eines der beiden Cysteinreste an. Die Cysteinreste 31, 240, 300 und 310 wurden nicht modifiziert. Cystein 99, 159, 248 und 449 hingegen zeigten eine Modifikation. Die kovalente Bindung von TQ konnte mit einer MS/MS-Analyse für die Cysteinreste 99, 248 und 449, aber nicht für 159 gezeigt werden (Abb. 75).

Cystein	erwartetes Peptid nach tryptischem Verdau	m/z des unmodifizierten Peptids	Masse detektiert	m/z des TQ-modifizierten Peptids	Modifikation detektiert	m/z von oxidiertem TQ-modifiziertem Peptid	Modifikation detektiert
300/310	297-314	2010.04	ja*	2174.13	-	2172.11	-
416/418	412 - 423	1397.64	ja*	1561.72	ja*/***	1559.71	ja*/***
31	1 - 34	3572.66	-	3736.74	-	3734.73	-
99	89 - 101	1597.71	ja*	1761.79	ja*	1759.78	ja*
159	159 - 165	868.45	ja*	1032.53	ja	1030.52	ja
240	222 - 246	3024.42	-	3188.50	-	3186.49	-
248	248 - 254	819.39	ja*	983.48	ja*	981.46	ja*
264	255 - 268	1606.78	ja*	1770.87	-	1768.85	-
449	442 - 455	1570.78	ja*	1734.87	ja*	1732.85	ja*
561	533 - 572	4541.17	-**	4705.25	-**	4703.24	-**
598	597 - 631	4163.02	-**	4327.10	-**	4325.09	-**

Abb. 75: Darstellung der Massen der verschiedenen Cysteinmodifizierungen an r5LO-wt durch TQ, welche nach tryptischem Verdau durch MALDI-MS erhalten wurden. Am wahrscheinlichsten findet die Reaktion mit dem nukleophilen Cysteinrest am sp²-Kohlenstoff, welcher am wenigsten sterisch gehindert ist, statt. Die Massenverschiebung von gebundenem TQ in aromatischer Form beträgt 164,20 Da. Die Massenverschiebung von oxidiertem TQ beträgt: 162,18 Da.

- * Bestätigte Cysteinbindung durch MS/MS und chymotryptischen Verdau
- ** Massen außerhalb des Detektionsbereiches
- *** Doppelt modifizierte Peptide gefunden
- **** Modifikation nur nach chymotryptischen/tryptischen-chymotryptischen Verdau gefunden

Bindung von NAPQI an r5LO-wt

Um beurteilen zu können, ob es sich bei der Inhibition der 5-LO durch michaelreaktive Verbindungen um unterschiedliche Modifikationsmuster handelt, wurden die Bindungen von TQ und NAPQI an r5LO-wt verglichen. Abb. 76 zeigt die schematische Darstellung einer Michael-Addition von NAPQI an einen Cysteinrest (R-SH) der 5-LO.

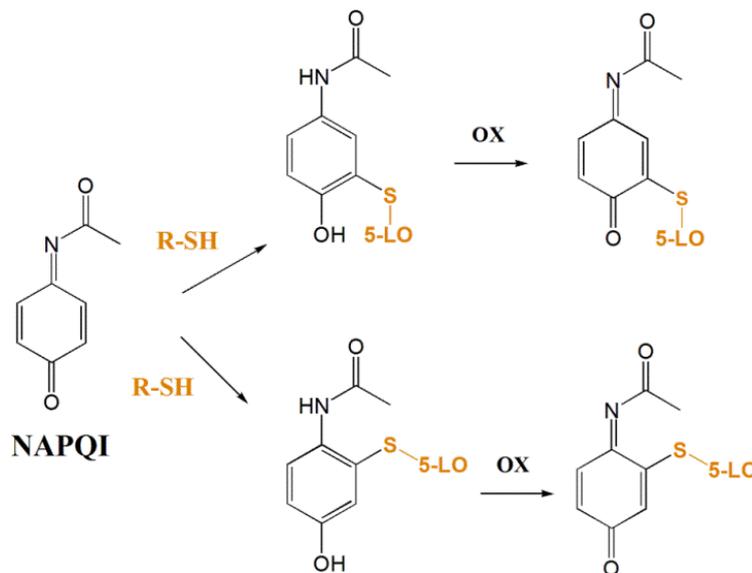


Abb. 76: Darstellung der Michael-Addition von NAPQI an die 5-LO (R).

Eine Massenverschiebung von 149,05 Da bzw. 147,03 Da im Vergleich zum unmodifizierten Peptid zeigte die kovalente Peptidbindung von NAPQI oder oxidiertem NAPQI an (Abb. 77). Durch NAPQI modifizierte Peptide traten im Vergleich zu TQ modifizierten Peptiden häufiger in reduzierter Form auf. Außerdem modifizierte NAPQI nicht Cysteinrest 449, sondern Cysteinrest 31. Cysteinreste nahe des Substrateingangs der 5-LO (Cys159, 300, 416 und 418) wurden sowohl von TQ, als auch von NAPQI modifiziert. Die MS/MS-Daten des NAPQI-modifizierten Peptids [412-423] zeigten eine verminderte Fragmentierung oder Ionisierung im Vergleich zu TQ, die vermutlich durch eine niedrige Konzentration modifizierten Peptids hervorgerufen wurde oder durch eine Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Peptids nach der Reaktion mit NAPQI. Eine niedrige Konzentration des mit NAPQI modifizierten Peptids kann erreicht werden, indem man eine langsamere Reaktionsgeschwindigkeit wählt als im Falle des TQ. Abb. 78 zeigt die Massen der verschiedenen Cysteinmodifizierungen an r5LO-wt durch NAPQI, welche nach tryptischem Verdau durch MALDI-MS erhalten wurden.

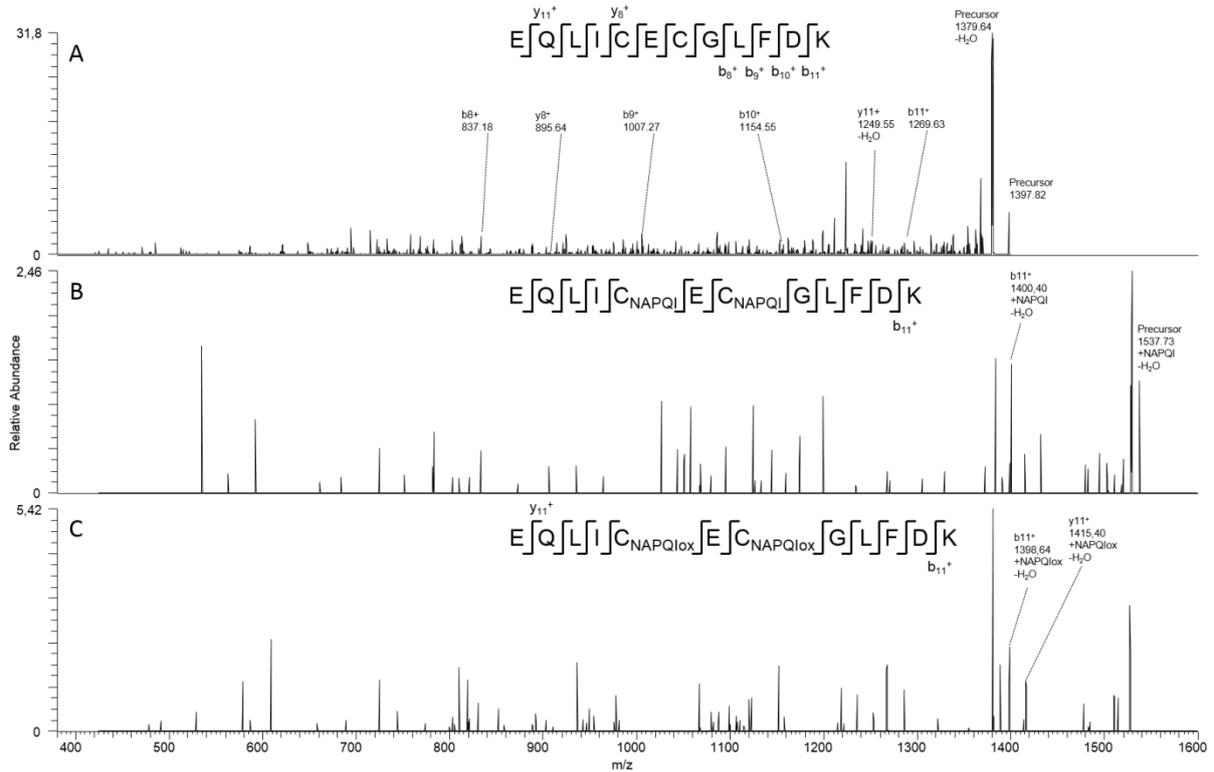


Abb. 77: MS/MS-Spektrum des reinen Peptids [412-423], des mit NAPQI modifizierten Peptids und des mit oxidiertem NAPQI modifizierten Peptids. (A) zeigt das Peptid ohne kovalente Modifikation durch NAPQI, (B) zeigt das mit TQ modifizierte Peptid. Die Massenverschiebung von 149,05 Da im Vergleich zum unmodifizierten Peptid zeigt die kovalente Modifikation mit NAPQI im CID-Spektrum an. (C) zeigt die kovalente Modifikation des Peptids mit oxidiertem NAPQI (Massenverschiebung: 147,03 Da).

Cystein	erwartetes Peptid nach tryptischem Verdau	m/z des unmodifizierten Peptids	Masse detektiert	m/z des NAPQI-modifizierten Peptids	Modifikation detektiert	m/z von oxidiertem NAPQI-modifiziertem Peptid	Modifikation detektiert
300/310	297-314	2010.04	ja*	2159.08	-	2157.06	-
416/418	412 - 423	1397.64	ja*	1546.67	ja*/	1544.66	ja*
31	1 - 34	3572.66	-	3721.69	ja****	3719.68	ja****
99	89 - 101	1597.71	ja*	1746.74	ja*	1744.73	-
159	159 - 165	868.45	ja*	1017.48	ja*	1015.47	-
240	222 - 246	3024.42	-	3173.45	-	3171.44	-
248	248 - 254	819.39	ja*	968.43	ja*	966.41	-
264	255 - 268	1606.78	ja*	1755.82	-	1753.80	-
449	442 - 455	1570.78	ja*	1719.82	-	1717.80	-
561	533 - 572	4541.17	-**	4690.20	-**	4688.19	-**
598	597 - 631	4163.02	-**	4312.05	-**	4310.04	-**

Abb. 78: Darstellung der Massen der verschiedenen Cysteinmodifizierungen an r5LO-wt durch NAPQI, welche nach tryptischem Verdau durch MALDI-MS erhalten wurden. Die Reaktion mit dem nukleophilen Cysteinrest kann an beiden sp²-Kohlenstoffen stattfinden. Der Massenshift von gebundenem NAPQI in aromatischer Form beträgt: 149,05 Da. Der Massenshift von oxidiertem NAPQI beträgt: 147,03 Da. NAPQI, *N-Acetyl-p-Benzochinonimin*.

- * Cysteinbindung durch MS/MS und chymotryptischen Verdau bestätigt
- ** Massen außerhalb des Detektionsbereiches
- *** Doppelt modifizierte Peptide gefunden
- **** Modifikation nur nach chymotryptischem/tryptisch-chymotryptischem Verdau gefunden

8.7 Pharmakodynamisches Profil

Um weitere Erkenntnisse über das pharmakodynamische Profil von Michael-Akzeptoren zu gewinnen, welche die 5-LO hauptsächlich über Interaktion mit ihren Cysteinen inhibieren, wurde repräsentativ TQ für weitere Versuche ausgewählt. Da verschiedene pharmakodynamische Parameter, wie z.B. der Aktivitätsverlust durch diverse 5-LO-Stimuli oder durch konkurrierende Anwesenheit von AA, einen entscheidenden Einfluss auf die klinische Effizienz besitzen können [154], sind folgende Versuche von sehr hoher Relevanz.

Einfluss verschiedener AA-Konzentrationen

Den Ergebnissen für U73122 [6] und 10-NFS [5] entsprechend, haben auch unterschiedliche AA-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die 5-LO-Produktbildung durch TQ in mit Ionophor stimulierten PMNL gezeigt (Abb. 79). Dies lässt vermuten, dass TQ die 5-LO sehr wahrscheinlich nicht über eine Beeinträchtigung von FLAP, cPLA₂ oder diverse Mechanismen, die der 5-LO AA zur Verfügung stehen, inhibiert. Trotz allem kann durch diesen Versuch nicht ausgeschlossen werden, dass TQ die 5-LO nicht auch zusätzlich über FLAP und/oder cPLA₂ inhibiert.

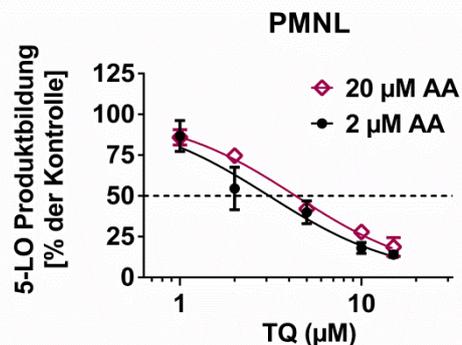


Abb. 79: Effekt verschiedener AA Konzentrationen auf die 5-LO Produktbildung durch TQ im intakten Zellsystem.

5×10^6 PMNL wurden mit der angegebenen Konzentration TQ für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2,5 µM Ionophor mit entweder 2 µM oder 20 µM AA für 10 Minuten bei 37 °C stimuliert. Und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; $n = 3-4 \pm \text{SEM}$. Die 5-LO-Produkte der Kontrolle betragen 105 ± 27 ng/ml (Ionophor, 20 µM AA) und 62 ± 8 ng/ml (Ionophor, 2 µM AA).

Einfluss verschiedener Stimuli

Um zu untersuchen, ob verschiedene Stimuli die Inhibition der zellulären 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen beeinträchtigen, wurden drei verschiedene Versuche durchgeführt. Die 5-LO-Produktbildung wurde entweder durch einen primär Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus (durch Ionophor 2,5 μM), durch chemischen Stress (Natriumarsenit 10 μM) oder durch hyperosmotischen Stress (NaCl 300 mM) aktiviert (Abb. 80). Die drei MAP-Kinase-Familien (ERK, JNK, p38 MAP-Kinase) spielen bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Immunantwort eine bedeutende Rolle [155, 156]. ERKs werden hauptsächlich durch Mitogene wie z.B. Wachstumsfaktoren oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Agonisten aktiviert [157]. Die JNK sowie p38 werden hauptsächlich durch verschiedene Formen des zellulären Stresses aktiviert [157]; p38 wird beispielsweise durch chemischen Stress z.B. Hyperosmolarität, UV-Licht, Hitzeschock, Natriumarsenit sowie durch Endotoxine und Zytokine (z.B. IL-1 und TNF) aktiviert [157].

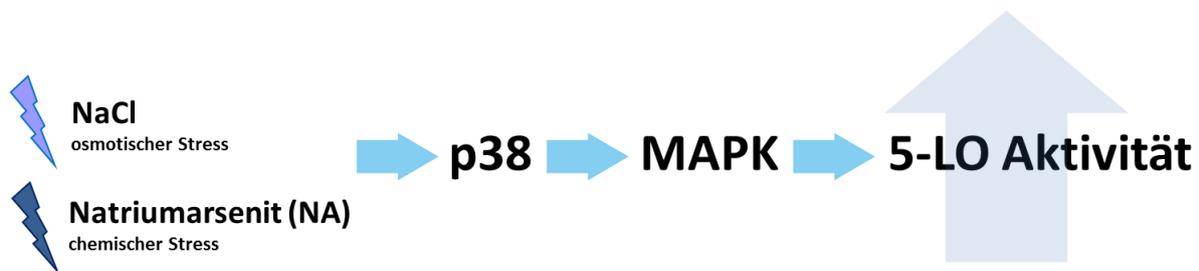


Abb. 80: Schematische Darstellung der 5-LO-Aktivierung

Natriumarsenit (NA) und osmotischer Stress (ausgelöst durch Zugabe von NaCl innerhalb des Versuches) führen durch Stimulierung von p38 schließlich zur Stimulierung von MK2/3, welches die Phosphorylierung der 5-LO in Leukozyten katalysiert [157][158]. Abb. 81 zeigt, dass die Suppression der 5-LO-Produktbildung durch BWA4C (Abb. 81A), U73122 (Abb. 81B) und TQ (Abb. 81C) unabhängig von dem jeweiligen 5-LO-Stimulus war.

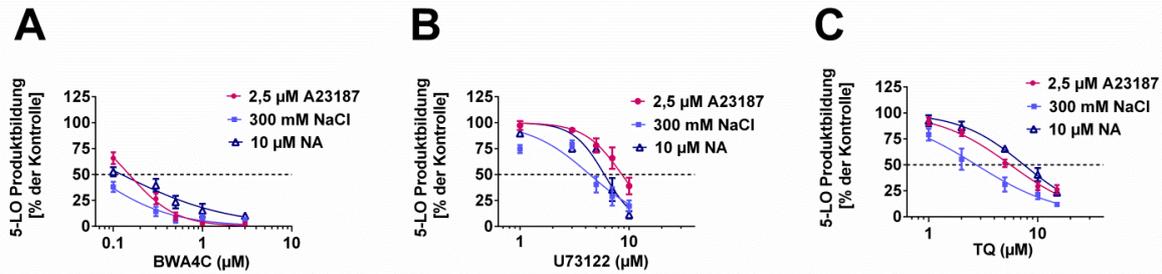


Abb. 81: Effekte verschiedener Stimuli auf die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen durch BWA4C (A), U73122 (B) und TQ (C). 5×10^6 PMNL wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Testsubstanzen für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze entweder mit 2,5 μ M Ionophor plus 20 μ M AA für 10 Minuten stimuliert oder mit 300 mM Natriumchlorid bzw. 10 μ M Natriumarsenit für 3 Minuten vorinkubiert und dann für weitere 10 Minuten nach Zugabe von 20 μ M AA bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskalten Methanol gestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; $n=3-4 \pm$ SEM (A), $n=3-7 \pm$ SEM (B, C) dargestellt. Die 5-LO-Produkte der Kontrolle betragen 105 ± 27 ng/ml (Ionophor, 20 μ M AA), 43 ± 10 ng/ml (NA) und 38 ± 7 ng/ml (NaCl).

Reversibilität der zellulären 5-LO-Produktbildung

8.7.3

Um aufzuklären, ob es sich um eine irreversible Modifikation der 5-LO durch TQ handelt, wurde ein sogenanntes „washout“-Experiment durchgeführt, bei dem die Proben nach einer 15-minütigen Inkubation mit den Testsubstanzen in PMNL dreimal gewaschen wurden. Abb. 82 zeigt, dass dreimaliges Auswaschen keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt auf die 5-LO-Produktbildung von TQ in einer Konzentration von 50 μ M hatte. U73122 und BWA4C dienten als Kontrollsubstanzen, da für U73122 die irreversible Bindung an die 5-LO bereits beschrieben wurde [6] und BWA4C als reversibler Eisenligand-Inhibitor keine irreversible Hemmung verursacht. Abb. 82 zeigt, dass nach dreimaligem Waschen die Inhibition zellulärer 5-LO-Produktbildung durch 10 μ M TQ geringfügig abgeschwächt wurde. Zusammengefasst zeigt der Versuch, dass TQ in höheren Konzentrationen irreversibel an die zelluläre 5-LO bindet, wohingegen es in niedrigeren Konzentrationen zumindest teilweise reversibel gebunden vorliegt. Trotz allem ließ sich auch nach dreimaligem Auswaschen immer noch eine 5-LO-Inhibition beobachten, wohingegen die Kontrolle BWA4C ihren inhibitorischen Effekt nach dreimaligem Auswaschen fast vollständig verlor.

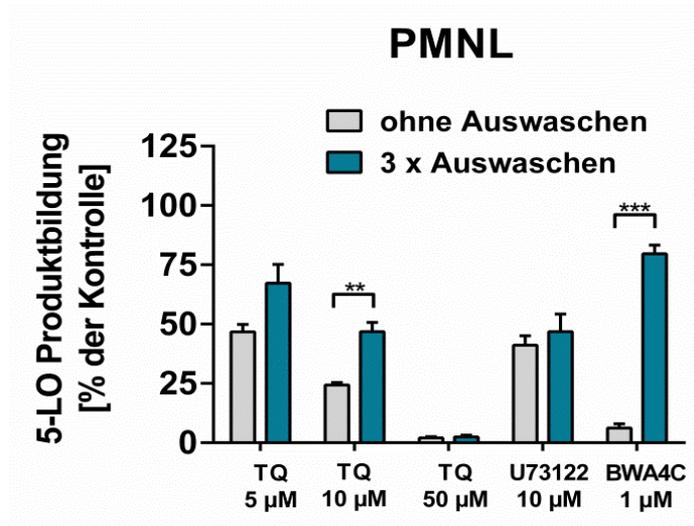


Abb. 82: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung nach dreimaligem Auswaschen („washout“) durch TQ (5 µM, 10 µM, 50 µM), U73122 (10 µM) und BWA4C (1 µM) in intakten PMNL. 5×10^6 PMNL wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann bei 2.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand der washout-Proben verworfen und wieder mit 1 ml PG-Puffer aufgefüllt. Das Ganze wurde zweimal wiederholt und dann die Zellen mit 2,5 µM Ionophor plus 20 µM AA für 10 Minuten stimuliert. Die Reaktion wurde dann mit 1 ml eiskaltem Methanol abgestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; $n=3 + SEM$. Die statistische Auswertung erfolgte über einen *students t-test* (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Die 5-LO-Produkte der Kontrollen, welche dreimal ausgewaschen wurden, betragen 552 ± 29 ng/ml. Die 5-LO-Produkte für die nicht-ausgewaschenen Kontrollen betragen 767 ± 59 ng/ml.

Um einen möglichen Zellverlust durch das Auswaschen zu kontrollieren, wurden die Zellen nach jedem Waschschrift gezählt. Der Versuch zeigte, dass auch nach dreimaligem Waschen noch eine Zellzahl von $4,2 \times 10^6$ /ml vorhanden war ($n=4$), was 78,8 % der ursprünglich eingesetzten Zellen entspricht (Abb. 83)

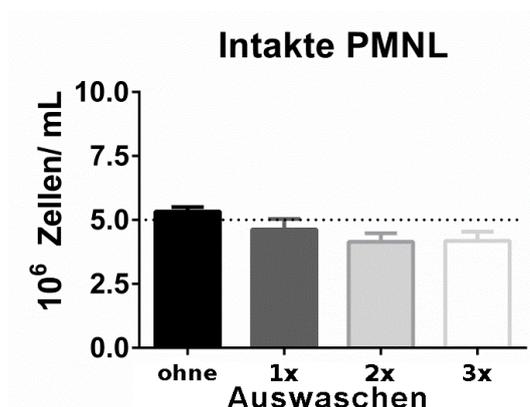


Abb. 83: Zellzahl pro 1 ml PG-Puffer nach jedem Waschschrift. PMNL wurden nach jedem Waschen bei 2.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wieder in 1 ml PG-Puffer aufgenommen. Nach jedem Waschschrift wurde die Zellzahl unter dem Mikroskop nach Trypanblaufärbung gezählt.

Um auszuschließen, dass hemmende Effekte durch Weiterreaktion der nicht ausgewaschenen Proben zustande kamen, wurde eine weitere Inkubation durchgeführt, in der der Einfluss der Inkubationszeit auf den Hemmeffekt der 5-LO-Produktbildung untersucht wurde. Abb. 84 zeigt, dass die Verlängerung der Inkubationszeit um die Dauer der möglichen Weiterreaktion während des Reversibilitäts-Versuches keinen signifikanten Einfluss auf den Hemmeffekt der 5-LO-Produktbildung durch TQ hatte.

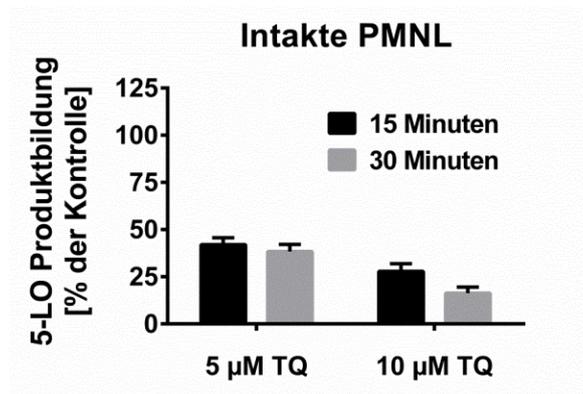


Abb. 84: Effekt auf die 5-LO-Produktbildung durch TQ nach 15 Minuten und nach 30 Minuten Inkubation.

5×10^6 PMNL wurden mit der angegebenen Konzentration TQ für 15 Minuten oder für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2,5 µM Ionophor und 20 µM AA für 10 Minuten bei 37 °C stimuliert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Nach anschließender Festphasenextraktion wurden die 5-LO-Produkte via HPLC bestimmt; n=3 + SEM.

8.7.4

Einfluss von oxidativem Stress

Um den Einfluss oxidativen Stresses auf die 5-LO-Inhibition durch michaelreaktive Verbindungen zu untersuchen, wurden intakte PMNL nach 15-minütiger Inkubation mit TQ, U73122 und BWA4C mit 500 µM Diamid versetzt. Diamid ist als thioloxidierende Substanz beschrieben, die oxidativen Zellstress bedingt [159, 160]. Generell ist eine S-Glutathionylierung eine Form reversibler posttranslationaler Modifikation, die durch oxidativen Stress, durch ROS und durch reaktive Nitrogenspezies (RNS) hervorgerufen wird und ist dadurch ein wichtiger Mechanismus redoxregulierter Signalwege [161]. Abb. 85 zeigt, dass der Zusatz von 500 µM Diamid zu intakten PMNL keinen signifikanten Einfluss auf die 5-LO-Inhibition durch BWA4C (1 µM), TQ (10 µM) und U73122 (10 µM) hatte.

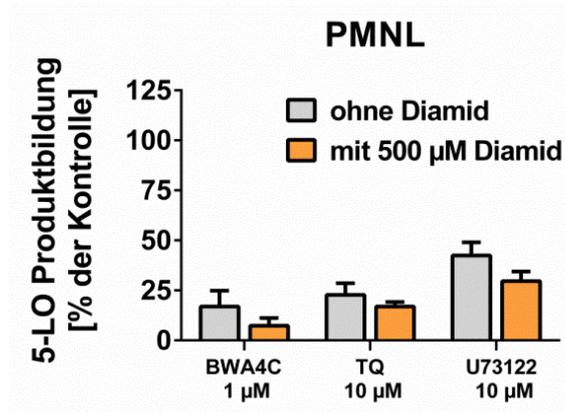


Abb. 85: Effekt von 500 µM Diamid auf die 5-LO-Produktbildung durch BWA4C, TQ und U73122 in intakten PMNL. 5×10^6 PMNL wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Testsubstanzen für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann mit 500 µM Diamid für 3 Minuten vorinkubiert, bevor 2,5 µM Ionophor und 20 µM AA plus 2,5 µM Ionophor zugegeben wurden. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol abgestoppt; n=3 + SEM.

Reduzierende Eigenschaften

8.7.5

Da die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} ein relevanter Mechanismus ist, um die Produktbildung der 5-LO zu inhibieren, wurden ausgewählte michaelreative Verbindungen auf reduzierende Eigenschaften hin untersucht. Ferene S ist ein kolorimetrisches Reagenz, welches mit Fe^{2+} eine farbige Struktur bildet [162] und somit detektiert werden kann. Die Struktur kann Abb. 86 entnommen werden. Die Substanzen wurden zunächst mit FeCl_3 -Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann die Absorption bei 517 nm vermessen. Als Kontrolle dienten Ascorbinsäure und NDGA, welche Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren. Die getesteten Michael-Akzeptoren TQ, AA861, Methyl-BQ, U73122 und Embelin zeigten keine Reduktion des Eisens (Abb. 88).

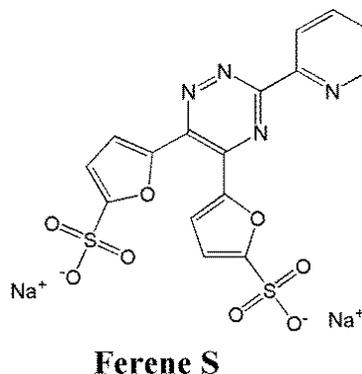
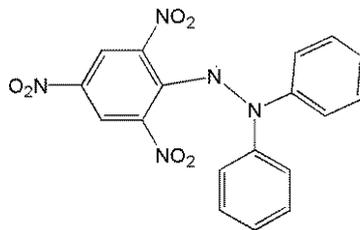


Abb. 86: Struktur von Ferene S

Radikalfängereigenschaften

Um die antioxidativen Eigenschaften einiger michaelreaktiver Verbindungen zu testen, wurde ein Versuch mit 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) durchgeführt. DPPH ist ein stabiles freies Radikal, welches spektrometrisch bei 517 nm vermessen werden kann [163]. Die Struktur von DPPH kann Abb. 87 entnommen werden. Durch Zugabe der michaelreaktiven Verbindungen kann so deren Radikalfänger-Eigenschaft getestet werden. NDGA und Ascorbinsäure (ASC) fungierten als Kontrollsubstanzen, da sie starke Radikalfänger-Eigenschaften besitzen [163]. Durch Reduktion des stabilen DPPH-Radikals kann das reduzierende Potential einer Verbindung abgeschätzt werden. Embelin zeigte leichte reduzierende Eigenschaften. TQ, AA861, Methyl--BQ, U73122 und Embelin blieben ohne Effekt (Abb. 88).



DPPH

Abb. 87: Struktur von DPPH

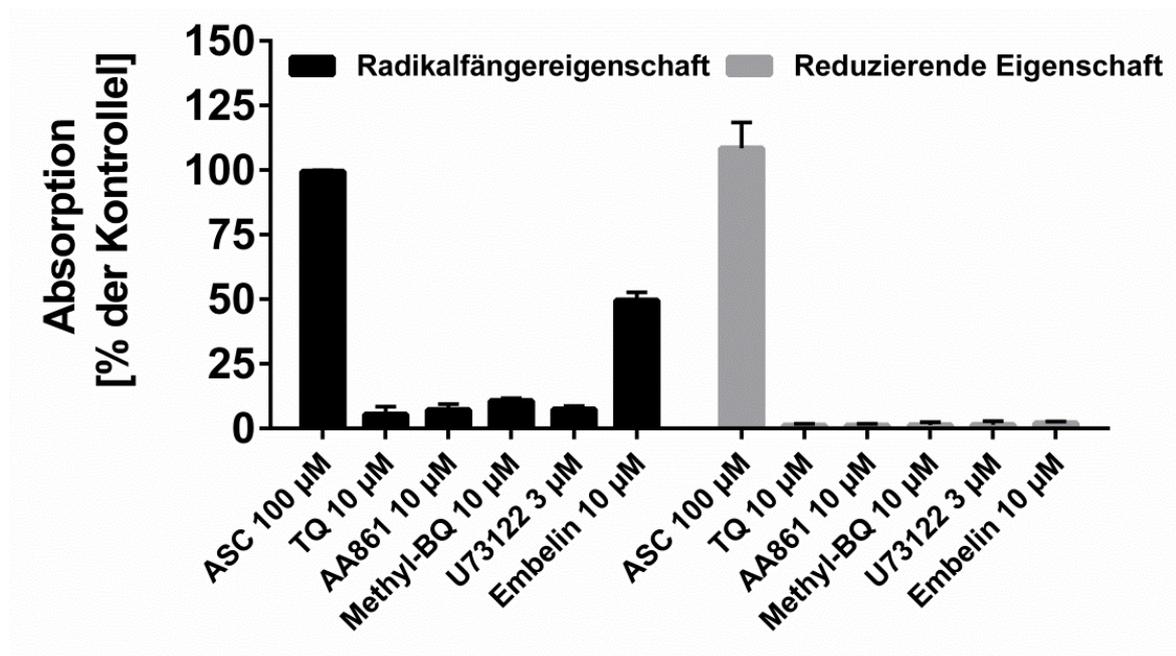


Abb. 88: Radikalfängereigenschaften (schwarz) und reduzierende Eigenschaften (grau) von michaelreaktiven Verbindungen. Schwarz: Ascorbinsäure (ASC), Thymochinon (TQ), AA861, Methyl-BQ, U73122, Embelin oder die Vehikelkontrolle (DMSO) wurden mit 5 nmol DPPH in Acetat gepuffertem Methanol (0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 und Methanol 40/60 V/V) für 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Absorption wurde bei 517 nm vermessen und auf NDGA normalisiert. Ascorbinsäure (100 µM) wurde als Kontrolle verwendet n=3. Grau: Ascorbinsäure (ASC), Thymochinon (TQ), AA861, Methyl-BQ, U73122, Embelin oder die Vehikelkontrolle (DMSO) wurden mit 50 µM FeCl₃ und 0.5 mM Ferene S, einem Fe²⁺-spezifischen kolorimetrischen Reagenz in 0,15 M NaCl mit 1 % Tween-20 für eine Stunde bei 37 °C in der Dunkelheit inkubiert.. Die Absorption wurde bei 594 nm vermessen und auf die NDGA (100 µM) Kontrolle normalisiert. Ascorbinsäure (100 µM) wurde als Kontrolle verwendet; n=3 + SEM.

8.8 Messung der Zellviabilität

Um die Zytotoxizität von TQ und NAPQI beurteilen zu können, wurde ein Zellviabilitätsversuch durchgeführt (Abb. 89, WST-1-Versuch). Das Assay-Prinzip basiert auf der Umwandlung des Tetrazoliumsalses WST-1 in einen farbigen Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenase-Enzyme. Das lösliche Salz wird dann in das Medium freigesetzt. Innerhalb eines gegebenen Zeitraums erzeugt die Reaktion eine Farbänderung, die direkt proportional zur Menge der mitochondrialen Dehydrogenase in einer gegebenen Kultur, also der Stoffwechselaktivität der Zellen, ist. Für den Versuch wurde eine humane hepatische Zelllinie (Hep-G2) verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation zeigten TQ, NAPQI und Zileuton im Vergleich zur Vehikelkontrolle keine Beeinträchtigung der Zellviabilität. Als Kontrolle diente Rev-5901, welches für seine Reduktion der Zellviabilität bekannt ist [164]. Die Messung der Zellviabilität sowie der Membranintegrität wurde von Simon B.M. Kretschmer des Arbeitskreises Prof. Dr. Steinhilber der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt.

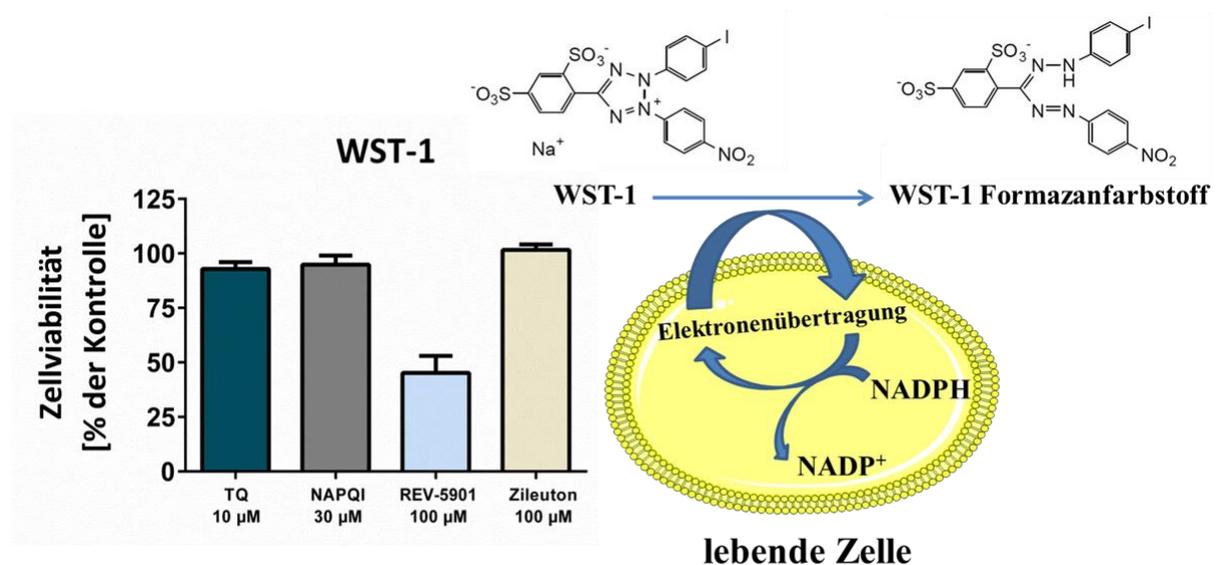


Abb. 89: Zellviabilitätsmessung von TQ, NAPQI und den Kontrollen REV-5901 sowie Zileuton. Die Zellen (3×10^4 Hep-G2) wurden mit den Testsubstanzen für 48 Stunden versetzt. Nach 24 Stunden folgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Verbindungen wurden erneuert. Die Absorption wurde nach Zugabe von Tetrazolium-1-Reagenz vermessen und anschließend auf die Vehikelkontrolle normalisiert; $n=3 + \text{SEM}$. Zileuton und Rev-5901 wurden als (nicht-)zytotoxische Kontrollen verwendet.

8.9 Messung der Membranintegrität

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist eine Oxidoreduktase, die die Umwandlung von Pyruvat und Lactat unter gleichzeitiger Konversion von NADH und NAD⁺ katalysiert. Über den LDH-Zytotoxizitätsversuch wird extrazelluläres LDH im Kulturmedium über die Bildung eines roten Formazan-Produkts spektrophotometrisch gemessen. LDH ist ein cytosolisches Enzym, das ein Indikator für die zelluläre Toxizität ist. Die Freisetzung von LDH kann als Index für die Membranintegrität verwendet werden und ist ein Anzeichen von Nekrose [164] (*in vitro cytotoxicity assay kit, LDH-based; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*). Hep-G2-Zellen wurden auf eine 96-well-Platte mit einer Dichte von 3×10^4 Hep-G2 pro well für 48 Stunden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ mit den Verbindungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Substanzen erneuert. Die Zelltoxizität wurde nach Herstellerprotokoll schließlich über einen Mikroplattenleser (*infinite M200, Tecan Group Ltd., Crailsheim, Germany*) vermessen. Die getesteten Verbindungen TQ, NAPQI und Zileuton zeigten im Vergleich zur Kontrollsubstanz Rev-5901 keinen Effekt auf die LDH-Freisetzung (Abb. 90).

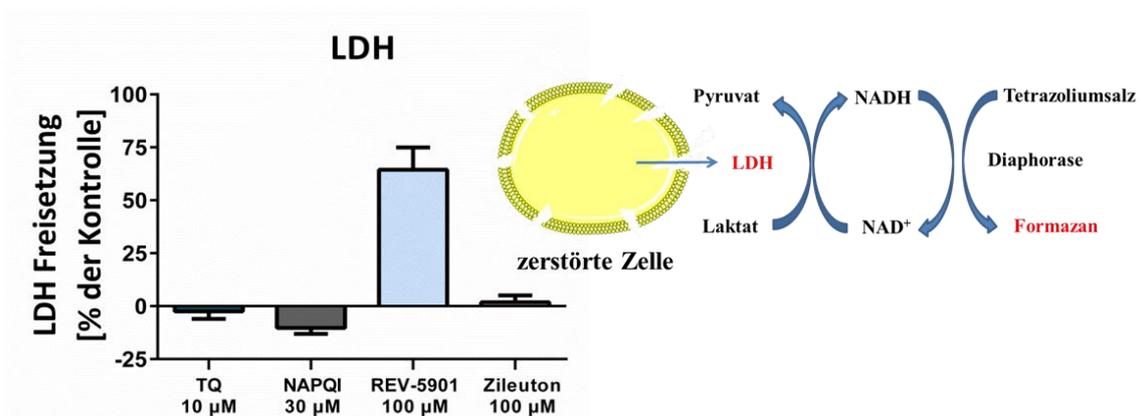


Abb. 90: Messung der LDH-Freisetzung durch TQ, NAPQI, REV-5901 und Zileuton in angegebener Konzentration.

Ein sogenannter LDH-Versuch (*cytotoxicity detection kit; Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany*) wurde verwendet, um die Freisetzung von LDH zu bestimmen, nachdem Hep-G2-Zellen mit der jeweiligen Verbindung behandelt wurden. Ein LDH-Austritt wurde hierbei als Surrogat für die Zellmembranintegrität herangezogen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen/well auf eine 96-well-Platte ausgesät und mit den Verbindungen sowie der Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO) für 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Verbindungen erneuert. Von den Zellüberständen wurden Aliquots entnommen und auf eine Mikroplatte aufgetragen. Die Zelltoxizität wurde schließlich nach dem Herstellerprotokoll unter Verwendung eines Mikroplattenlesers (*Infinite M200, Tecan, Crailsheim, Germany*), bestimmt. Die maximale LDH-Freisetzung wurde über die Kontrollverbindung (Triton X-100) definiert und als 100 % gesetzt; $n=3 \pm \text{SEM}$

9. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedenster michaelreaktiver Verbindungen auf ihre Fähigkeit untersucht, die 5-LO-Produktbildung zu inhibieren. Die erhaltenen Daten bestätigen die Hypothese, dass michaelreaktive Verbindungen als eine neue Klasse von 5-LO-Inhibitoren, welche das Enzym über kovalente Bindung der Cysteine 416 und/ oder 418 inhibieren, angesehen werden können. Für eine potente Hemmung der 5-LO-Produktbildung durch michaelreaktive Verbindungen spielen spezifische strukturelle Eigenschaften eine wichtige Rolle. Nach Einteilung der michaelreaktiven Verbindungen in verschiedene Gruppen, welche ihre chemischen Eigenschaften am besten charakterisieren, wurden die jeweiligen Verbindungsklassen zunächst in PMNL, danach an r5LO-wt und schließlich an r5LO-4C auf ihre hemmenden Effekte auf die 5-LO-Produktbildung getestet (Abb. 91).

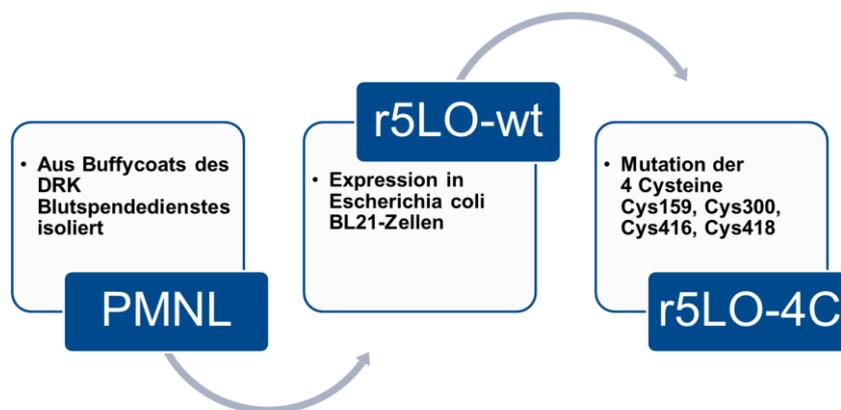


Abb. 91: Vorgehensweise der durchgeführten Versuche. Zuerst wurden die Testsubstanzen in PMNL auf ihre hemmenden Effekte auf die 5-LO-Produktbildung untersucht, danach an r5LO-wt und schließlich an r5LO-4C.

Unter den getesteten Verbindungen inhibierten NFS [5], Methoxy-Nitrostyren, TQ, Methoxy-BQ, Methyl-BQ, OH-BQ, CDDO und NAPQI die 5-LO über Interaktion mit ihren katalytisch wichtigen Cysteinen. Eine MALDI-MS-Analyse bestätigte für TQ und NAPQI eine kovalente Bindung an die Cysteinreste 99, 159, 416 und 418 der 5-LO. Die Cysteinreste 31, 300 und 449 zeigten sich in der MALDI-MS-Analyse zum Teil modifiziert, was dafür spricht, dass neben Cys416 und Cys418 auch andere Cysteine als Targets für 5-LO-inhibierende Michael-Akzeptoren in Frage kommen. Darüber hinaus deutet die unterschiedliche Cysteinalkylierung durch TQ und NAPQI darauf hin, dass diese Verbindungsklasse generell in der Lage ist, spezifische Targets strukturabhängig und zielgerichtet zu binden. In Anbetracht der vielen Indikationen einer Anti-LT-Therapie, ist die Entwicklung klinisch nutzbarer 5-LO-

Inhibitoren sehr bedeutend. Eine pharmakologische Unterdrückung der LT-Bildung kann neben der Inhibition der 5-LO auch durch Interaktion mit cPLA₂, FLAP, LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase erreicht werden. Die Inhibition der 5-LO wird jedoch als effektivste Methode angesehen, da hierdurch konkomitierend die Bildung von LTB₄, cysLT und auch 5-H(P)ETE blockiert wird [17]. 5-LO-Inhibitoren können in redoxaktive-, nichtredoxaktive- und Eisenligand-Inhibitoren eingeteilt werden. Redoxaktive-Inhibitoren interferieren durch ihre eisenreduzierenden Eigenschaften mit dem katalytischen Zyklus der 5-LO, Eisenligand-Inhibitoren chelatieren das Eisen im aktiven Zentrum (bspw. Zileuton) und nichtredoxaktive-Inhibitoren hemmen die 5-LO durch direkte Kompetition mit AA [68]. In den letzten 10 Jahren wurde eine große Anzahl neuer 5-LO-Inhibitoren identifiziert und entwickelt. Diese hatten jedoch meist den Nachteil einer schwachen Potenz und geringer Selektivität, die zum Teil schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen oder fehlende pharmakologische Effizienz in Tiermodellen und am Patienten mit sich brachte. Bis heute hat lediglich der Eisenligand-Inhibitor Zileuton (Zyflo[®], Zyflo CR[®]) Marktreife erreicht und wird in den USA zur Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt [165]. Der klinische Einsatz von Zileuton ist allerdings durch seine geringe Effektivität und seine potentielle hepatische Toxizität limitiert. Bereits beschriebene 5-LO-Inhibitoren, welche die 5-LO durch kovalente und irreversible Bindung an Cysteinen inhibieren, sind U73122 und NFS [5, 6]. U73122, welches ursprünglich als Phospholipase-C-Inhibitor identifiziert wurde, inhibiert die 5-LO durch Modifikation von Cys416 [6]. NFS, wie 10-NFS, hemmen die 5-LO über kovalente Modifikation von Cys418 [5]. Cys416 und Cys418 werden dementsprechend als vielversprechende Zielstrukturen für die Entwicklung neuer 5-LO-Inhibitoren angesehen [6]. Eine Modifikation dieser Cysteine blockiert effektiv die Eintrittspforte zum katalytischen Zentrum der 5-LO, was eine anhaltende Suppression der LT-Biosynthese bedingt, die auch *in vivo* beobachtet werden konnte [5]. In vorliegender Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedenster Michael-Akzeptoren auf ihre Fähigkeit, die 5-LO über kovalente Cysteinalkylierung zu inhibieren, getestet. TQ, Methoxy-BQ, Methyl-BQ, Methoxy-Nitrostyren, CDDO, AA861, OH-BQ und auch NAPQI inhibieren die 5-LO über Interaktion mit Cysteinen. Verbindungen wie Primin, Chalkon, Plumbagin und Shikonin scheinen die 5-LO durch eine Kombination aus Cysteinmodifikation und anderen Mechanismen zu inhibieren. Obwohl die Cysteine Cys416 und Cys418 in direkter Nachbarschaft zueinander liegen, scheinen spezielle strukturelle Eigenschaften der Michael-Akzeptoren ein gezieltes Targeting an eines der beiden Cysteine zu bewirken. Die Visualisierung der TQ-Bindungsstelle durch Dr. Bettina Hofmann (Arbeitskreis Prof. Dr. Steinhilber, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt), basierend auf der

Kristallstruktur der humanen 5-LO [10], zeigt die Interaktion zwischen TQ und Cys418. Cys418 befindet sich an einer Stelle, welche anfällig für starke strukturelle Veränderungen ist. Dies zeigt sich, wenn man die Struktur humaner 5-LO, gebunden mit dem Substrat AA, mit 5-LO ohne AA vergleicht (vgl. PDB 3V99 [166]) (Abb. 92).

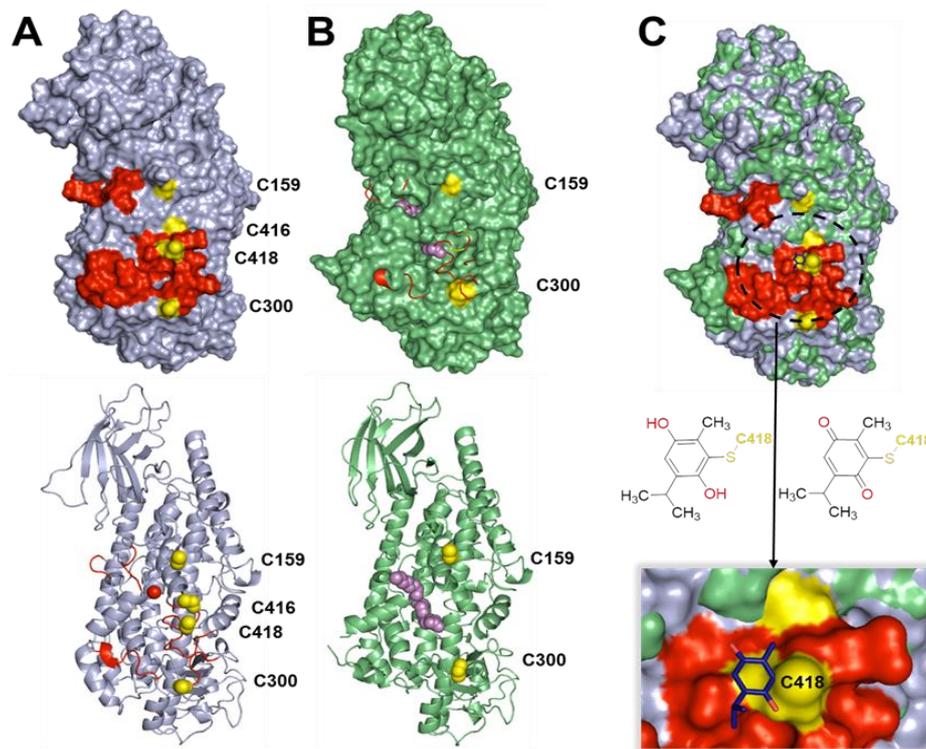


Abb. 92: Visualisierung der TQ-Bindung an die 5-LO in Anlehnung an die Kristallstruktur humaner 5-LO durch

Dr. Bettina Hofmann (Arbeitskreis Prof. Dr. Steinhilber, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt)

A: Darstellung der Oberfläche (oben) und des strukturellen Modells (unten) [167] in Anlehnung an die Kristallstruktur humaner 5-LO (PDB code: 3o8y [10]). Das Eisen des aktiven Zentrums ist als roter Punkt dargestellt. Flächen ausgeprägter struktureller Umstellungen, die in der Substrat gebundenen Co-Kristallstruktur der 5-LO (PDB:3V99 [166]) fehlen, sind in rot zu sehen. In gelb sind die vier Cysteinreste angezeigt, welche in der r5LO-4C mutiert wurden [167]. **B:** Substrat-gebundene 5-LO (PDB: 3V99 [10]). AA ist in lila dargestellt. Die Segmente, welche im kristallographischen Modell fehlen, sind überlagert und in rot (obere Abbildung) zu sehen. Cys416 und Cys418 sind unter den fehlenden Segmenten. **C:** Überlagerung beider Modelle mit der angenommenen Interaktion zwischen Cys418 und TQ (stick-Darstellung, Kohlenstoff: blau, Sauerstoff: rot). Reduzierte und oxidierte Form von TQ ist dargestellt. Die Strukturen wurden mit PyMol erstellt (De Lano Scientific Inc., <http://www.pymol.org>).

Die erhaltenen Strukturen zeigen einen Umbau von Helices, die das aktive Zentrum so verändern, dass die normalerweise verkapselte katalytische Maschinerie für die Umgebung und somit auch für AA zugänglich ist. Durch diesen strukturellen Umbau kann eine Bindung von TQ in dieser Umgebung eine starke Auswirkung auf die katalytische Aktivität der 5-LO haben. Interessanterweise ist die 5-LO-Inhibition durch Embelin unabhängig von den

vier Cysteinresten, obgleich Embelin auch eine elektrophile Benzochinonstruktur besitzt. Möglicherweise erklärt die lange Kohlenstoffkette von Embelin das gegensätzliche Reaktionsverhalten (Abb. 93).

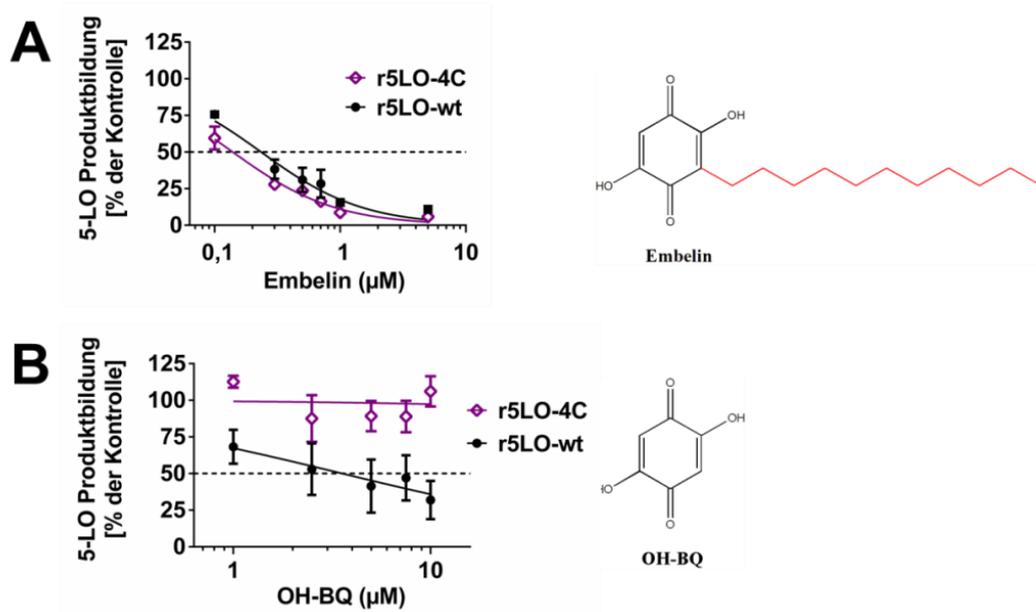


Abb. 93: Effekte auf die 5-LO-Produktbildung durch (A) Embelin und (B) OH-BQ. Die Einführung einer Alkylkette an das Benzochinongerüst im Falle des Embelins führt im Vergleich zu OH-BQ dazu, dass kein signifikanter Unterschied im Hemmeffekt auf die 5-LO-Produktbildung an r5LO-wt und r5LO-4C zu sehen ist.

Docking-Studien mit Embelin suggerieren eine Bindung durch die hydrophobe *n*-undecanyl-Kohlenstoffkette im aktiven Zentrum der 5-LO. Diese füllt dann den hydrophoben Kanal aus und blockiert so die Funktion der 5-LO (Abb. 94) [60].

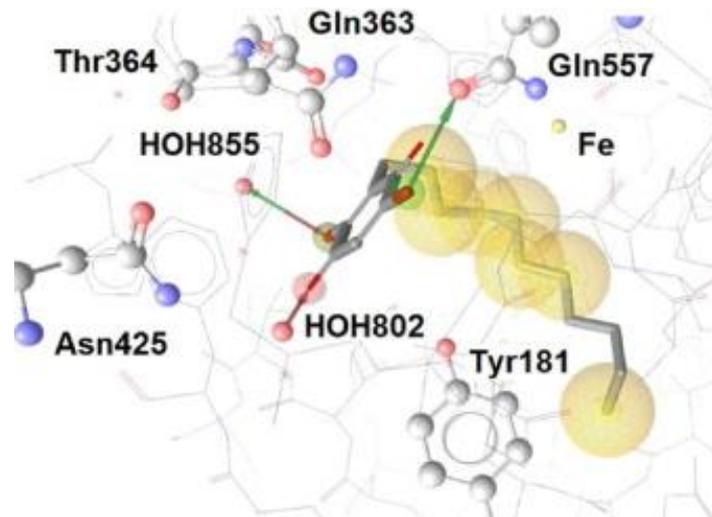


Abb. 94: Molekulare Docking-Simulation von Embelin an die 5-LO (entnommen aus Schaible *et al.* [60]).

Die *n*-undecanyl-Kohlenstoffkette von Embelin füllt den hydrophoben Substratkanal der 5-LO aus. Das Benzochinongerüst befindet sich zwischen Gln363, Gln557 und Tyr181 und wird durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Bindungstasche stabilisiert. In gelb sind die hydrophoben Wechselwirkungen dargestellt, in rot Wasserstoffbrückenakzeptoren, in grün –donatoren [60].

Weiterhin wurden in dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt, die kritische pharmakodynamische Parameter adressieren, welche in Vergangenheit die klinische Entwicklung einer Vielzahl neuer 5-LO-Inhibitoren verhinderten. Es wurde gezeigt, dass die inhibitorischen Effekte von TQ und anderen Michael-Akzeptoren auf die 5-LO-Produktbildung, unabhängig ist von diversen Stimuli, welche die 5-LO-Produktbildung anregen. Intrazelluläre Bedingungen, wie der Phosphorylierungsstatus (die 5-LO liegt im entzündeten Gewebe meist phosphoryliert vor), scheinen demnach vernachlässigbaren Einfluss auf die Hemmung der 5-LO-Produktbildung durch TQ und U73122 zu haben. Weitere Versuche ergaben zudem, dass die Inhibition der 5-LO-Produktbildung durch Benzochinonderivate vor allem durch irreversible Michael-Adduktbildung mit nukleophilen Thiolgruppen zustande kommt. Dies bestätigen die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Messungen auf Reversibilität. Hierbei zeigte 10-NFS, wie auch schon durch Awwad *et al.* beschrieben [5], eine nachhaltige und irreversible Inhibition der 5-LO. Für TQ konnte bei Konzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ eine gewisse, jedoch nicht vollständige Reversibilität der 5-LO-Aktivität festgestellt werden. Folglich hängt das Ausmaß der (Ir)Reversibilität der 5-LO-Inhibition signifikant von der Art der Michael-Akzeptorfunktion und den umgebenden Struktureigenschaften ab. Reversibilität ist außerdem mit einer geringeren Toxizität der jeweiligen Substanzen assoziiert [168]. Ein Beispiel hierfür ist RTA402 (CDDO-methylester), ein Michael-Akzeptor, der in klinischen Studien zur Behandlung von Pankreaskarzinomen

verwendet wurde und auch reversibel mit Thiolgruppen reagiert [168, 169]. RTA402 zeigt gute Verträglichkeit bei Patienten (Ausnahme: Patienten, welche eine Hospitalisierung aufgrund einer Herzinsuffizienz in ihrer Anamnese verzeichnen) [170]. Irreversibilität kann mit toxischen Eigenschaften der Michael-Akzeptoren einhergehen, was die relativ niedrige Toxizität von TQ (LD₅₀-Wert in Ratten: 2,4 g/kg [171]) erklären könnte. Interessanterweise inhibierte der reaktive Paracetamolmetabolit NAPQI, r5LO-wt mit einem IC₅₀-Wert von 2,98 µM, hatte aber keine Auswirkung auf die Produktbildung zellulärer 5-LO. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass NAPQI vermutlich durch intrazelluläres GSH unter Bildung von GSH-Konjugaten abgefangen wird. Somit kann es die 5-LO nicht mehr inhibieren. Die Forschungsergebnisse legen nahe, dass NAPQI nicht nur mit GSH reagiert, sondern auch zu einem Verlust von Proteinthiolgruppen in Hepatozyten führt [172]. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass kleine Unterschiede in der Elektrophilität des Michael-Akzeptors sowie in dessen sterischen Eigenschaften, große Veränderungen im pharmakodynamischen Profil hervorrufen können. Die GSH-abfangende Eigenschaft von NAPQI kann somit auch die potente r5LO-wt-Inhibition erklären. Die Fähigkeit mit Thiolen zu reagieren, kann auch der Grund für die im Vergleich zum wildtyp niedrigere inhibitorische Potenz von Primin, Embelin und Methyl-BQ in intakten PMNL sein. Somit sind das pharmakodynamische Profil und die zelluläre Aktivität von Michael-Akzeptoren abhängig von intrazellulären Thiolspiegeln und dem potentiellen Ausmaß der möglichen GSH-Reaktionen. Eine „Cystein-Reaktivität“ ist aber nicht per se als nachteilig zu bewerten und sollte nicht die erfolgreiche Entwicklung eines Medikamentes verhindern. Ein Beispiel ist Neratinib (HKI-272), welches kovalent an spezifische Cysteinreste bindet [173]. Neratinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher sich in klinischer Entwicklungsstufe Phase-3 zur Behandlung des Mammakarzinoms und anderer solider Tumore befindet [174]. Die Effektivität von Neratinib ist, wie von Feldinger *et al.* beschrieben, von der Michael-Akzeptorstruktur abhängig [173]. Andere cysteinreaktive Verbindungen wie Afatinib (Gilotrif®), das zur Behandlung eines Plattenzellkarzinoms der Lunge eingesetzt wird [175] oder Dimethylfumarat (Tecfidera®) zur first-line-Therapie der Multiplen Sklerose [176], sind bereits zugelassen worden. Viele Michael-Akzeptoren sind antiinflammatorisch wirksame Verbindungen. Dies ist insofern interessant, da durch die 5-LO-produzierten LT, Mediatoren inflammatorischer Prozesse sind [177]. TQ, der Hauptinhaltsstoff des Schwarzkümmelöls, wird traditionell zur Behandlung des Asthma bronchiale [178, 179] und der rheumatoiden Arthritis verwendet [180]. Diese durch TQ ausgelöste Antiinflammation spricht für eine wichtige Rolle der LT-Biosynthese-Inhibition [181–183]. Bis heute war der exakte Mechanismus der 5-LO-Inhibition durch TQ unbekannt.

Benzochinone sind zwar für ihre antiinflammatorischen, antikanzerogenen und antioxidativen Fähigkeiten bekannt [60], wie genau und ob die 5-LO durch diese Verbindungen inhibiert wird, ist meist ungewiss. Bisher wurde vermutet, dass Benzochinonderivate mit AA um die Bindungsstelle konkurrieren oder den Redoxzyklus, des im aktiven Zentrum der 5-LO befindlichen Eisens, durch ihre redoxaktiven Eigenschaften entkoppeln [60]. Innerhalb dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Reihe dieser Verbindungen kovalent an die Cysteine 416 und 418 der 5-LO binden (Abb. 95).

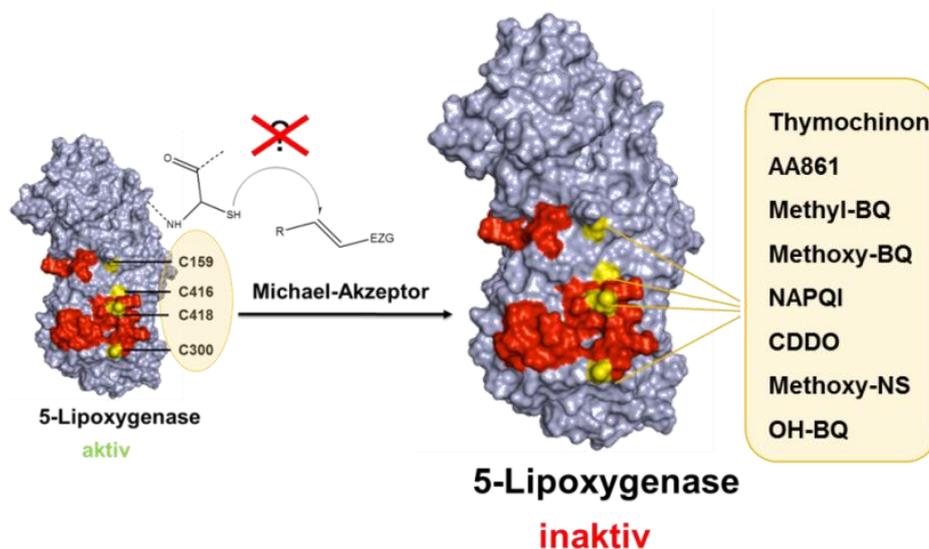


Abb. 95: Darstellung der Reaktion einer freien Thiolgruppe der 5-LO mit einer michaelreaktiven Verbindung.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte diese Reaktion für TQ, AA861, Methyl-BQ, Methoxy-BQ, NAPQI, CDDO, Methoxy-NS (Methoxy-Nitrostyren) und OH-BQ bestätigt (gelber Kasten).

Die Entdeckung dieses Mechanismus ist von fundamentaler Bedeutung, da auch weitere bereits bekannte antiinflammatorisch wirksame Verbindungen wie AA861 und Primin nach dem gleichen Mechanismus antiinflammatorische Effekte erzielen. In Vergangenheit wurden Michael-Akzeptoren von moderner Wirkstoffentwicklung ausgeschlossen, da z.B. hepatotoxische Wirkungen wie bei NAPQI sehr gefürchtet waren [184]. Michael-Akzeptoren können allerdings strukturell so verändert werden, dass sie selektiv mit Target-Nukleophilen reagieren [185] indem vorsichtig eine optimierte Reaktivität mit spezifischer Target-Komplementarität kombiniert wird [186]. Weiterhin können direkte Veränderungen sterischer Eigenschaften und der Reaktivität des Michael-Akzeptors Faktoren für eine Reduktion der Toxizität sein. Die Tatsache, dass auch andere Verbindungen, welche ihr Target kovalent binden, wie Clopidogrel, Afatinib, Omeprazol, Dimethylfumarat und Acetylsalicylsäure erfolgreich zugelassen wurden, unterstreicht diese Tatsache. Diese Arbeit zeigt, welche

michaelreaktiven Verbindungen die 5-LO über Interaktion mit Cysteinen inhibieren und welche strukturellen Eigenschaften hierfür wichtig sind. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen legt diese Arbeit nahe, dass es innerhalb der nächsten Dekade zu einem Wiederaufleben des Interesses an dieser wichtigen Strukturklasse kommen wird [184]. Innerhalb weiterer Studien könnten dann sterisch optimierte Verbindungen entwickelt werden, die die 5-LO über Interaktion an Cysteinen inhibieren können. Diese Wirkstoffklasse michaelreaktiver Verbindungen könnte eine vielversprechende Gruppe neuartiger 5-LO-Inhibitoren darstellen.

10. Zusammenfassung

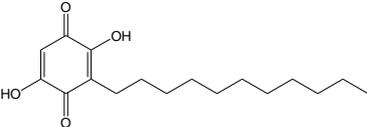
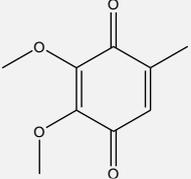
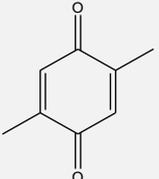
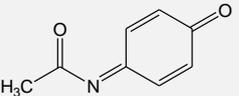
Die 5-LO ist ein Schlüsselenzym der LT-Biosynthese. Sie katalysiert in einem ersten Schritt zunächst die Umsetzung freigesetzter AA zu 5-HPETE und wandelt diese anschließend in LTA₄ um. LT sind starke Entzündungsmediatoren, die an entzündlichen und allergischen Reaktionen des Körpers beteiligt sind. Sie lösen eine Immunantwort aus und können zur Entstehung von Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und verschiedenen Krebserkrankungen beitragen [28]. NFS gehören zur Klasse der michaelreaktiven Verbindungen und inhibieren die 5-LO durch Interaktion mit katalytisch aktiven Cysteinresten in der Nähe der Substrateintrittspforte. Diese Tatsache macht michaelreaktive Verbindungen innerhalb der Entzündungsforschung zu einer interessanten Substanzklasse. Michaelreaktive Verbindungen besitzen eine durch Elektronenzug aktivierte Doppelbindung. Hierdurch verfügen diese Wirkstoffe über elektrophile Eigenschaften, wodurch sie leicht mit Nukleophilen reagieren können. Cysteine bestehen aus nukleophilen Thiolgruppen, die mit einer positiv polarisierten Doppelbindung, wie sie in michaelreaktiven Verbindungen vorliegt, reagieren können. Diese Tatsache kann sie zu effektiven und nachhaltigen Enzymaktivitätsmodulatoren machen. In dieser Arbeit wurde eine große Bandbreite verschiedenster michaelreaktiver Verbindungen auf ihre Fähigkeit untersucht, die 5-LO über Michael-Addition an ihren Cysteinen zu inhibieren. Zum einen wurden Pflanzeninhaltsstoffe mit antiinflammatorischen Eigenschaften, zugelassene Wirkstoffe mit Michael-Akzeptorfunktion und zum anderen Verbindungen, die durch gezielte Struktursuche ausgewählt wurden, untersucht. Die Testung verschiedenster Strukturen sollte Aufschluss über strukturelle Voraussetzungen für die 5-LO-Inhibition durch Interaktion mit Cysteinen liefern. Hierfür wurden die Substanzen zunächst im intakten Zellsystem und schließlich am aufgereinigten Enzym (r5LO-wt) auf ihre 5-LO-inhibierenden Eigenschaften untersucht. Nachfolgende Messungen an r5LO-4C, deren vier prominente Cysteine durch Serin mutiert wurden, zeigten an, ob die Inhibition der 5-LO-Produktbildung cysteinabhängig war. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ganz bestimmte strukturelle Eigenschaften des Michael-Akzeptors, Voraussetzung für eine Interaktion mit den Cysteinen der 5-LO sind. Vor allem Verbindungen mit chinoidem Grundgerüst stellten sich als thiolreaktive Verbindungen heraus, die die 5-LO hauptsächlich über Interaktion mit ihren Cysteinen inhibierten. Weiterhin zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass die strukturelle Umgebung um die aktivierte Doppelbindung des Michael-Akzeptors enorme Auswirkungen auf die Thiolreaktivität hatte. TQ hemmte die 5-LO hauptsächlich über Interaktion mit

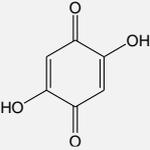
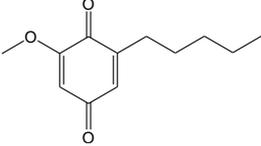
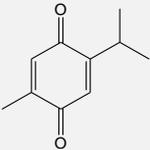
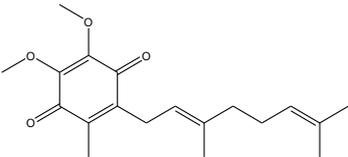
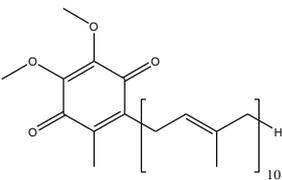
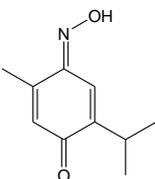
Cysteinen, wohingegen die 5-LO-Inhibition durch Embelin unabhängig von Cysteinen zu sein schien. Eine daraufhin durchgeführte MALDI-MS-Analyse bestätigte die Bindung von NAPQI und TQ an die Cysteine 416 und 418. Durch diese Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Reihe antiinflammatorisch wirksamer, natürlich vorkommender Verbindungen wie TQ, Plumbagin, Primin und auch synthetisch generierte Verbindungen wie AA861, CDDO, Methyl-BQ, Methoxy-BQ, Methoxy-Nitrostyren, NAPQI und OH-BQ die 5-LO über Interaktion mit ihren Cysteinen inhibieren.

11. Anhang

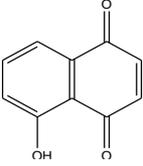
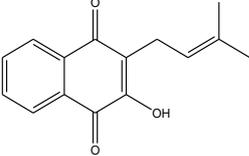
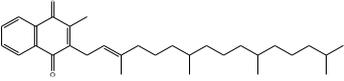
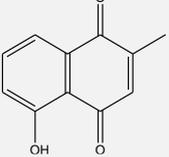
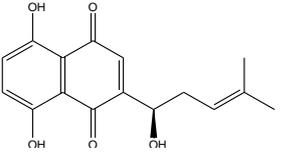
IC₅₀-Werte, 95 %-Konfidenzintervall (x) und Signifikanzen (*) der getesteten Verbindungen in intakten PMNL, r5LO-wt und r5LO-4C. Verbindungen, welche einen signifikanten Potenzverlust an r5LO-4C aufwiesen, sind in grau dargestellt. (*, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001). Keine Inhibition (k.I.), nicht signifikant (ns).

11.1 Benzochinone

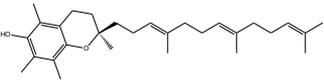
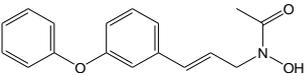
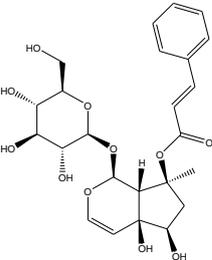
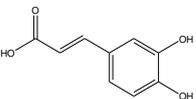
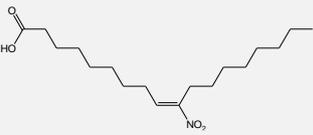
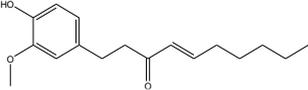
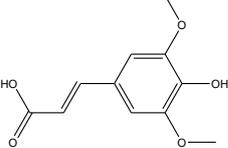
	PMNL [μM]	r5LO-wt [μM]	r5LO-4C [μM]	P-Wert
AA861 	0,2 ^a [187]	3,8 (2,7-5,5) ^x	>50	0,0230 *
Embelin 	3,5 (2,5-4,9) ^x	0,23 (0,18-0,31) ^x	0,14 (0,11-0,17) ^x	0,4495 ns
Methoxy-BQ 	4,2 (3,5-4,9) ^x	3,0 (1,9-4,9) ^x	k.I.	0,0025 **
Methyl-BQ 	6,3 (4,2-9,5) ^x	2,8 (2,1-3,7) ^x	k.I.	0,0054 **
NAPQI 	k.I.	3,0 (1,8-5,1) ^x	k.I.	0,0271 *

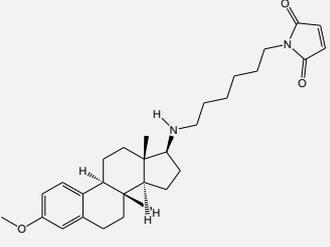
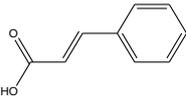
OH-BQ 	k.I.	6,3 (2,3-17,3) ^x	k.I.	0,0003 ***
Primin 	2,8 (2,2-3,5) ^x	0,6 (0,4-0,7) ^x	2,5 (1,2-5,1) ^x	0,0678 ns
TQ 	4,3 (3,7-5,1) ^x	6,1 (4,8-8,1) ^x	k.I.	0,0015 **
Coenzym Q2 	k.I.	8,6 (6,5-11,4) ^x	k.I.	0,6992 ns
Coenzym Q10 	k.I.	k.I.		
Poloxim 	k.I.	k.I.	k.I.	

11.2 Naphthochinone

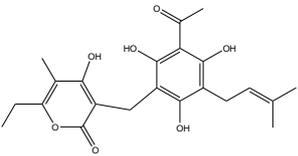
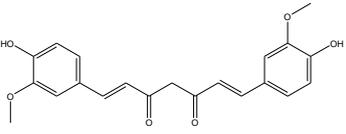
	PMNL	r5LO-wt	r5LO-4C	P-Wert
	[μM]	[μM]	[μM]	
Juglon 	k.I.			
Lapachol 	k.I.			
Phyllochinon 	k.I.			
Plumbagin 	7,0 (6,06-8,12) ^x	14,3 (10,3-19,9) ^x	k.I.	0,14 ns
Shikonin 	1,54 (1,12-2,12) ^x	0,5 (0,4-0,6) ^x	1,8 (1,0-3,0) ^x	0,4474 ns

11.3 Ungesättigte Verbindungen

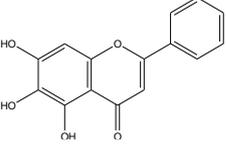
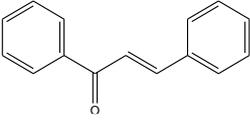
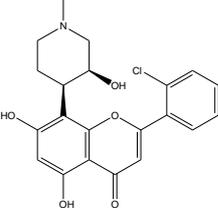
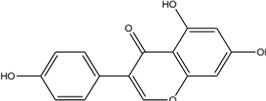
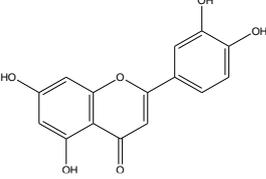
	PMNL	r5LO-wt	r5LO-4C	P-Wert
	[μM]	[μM]	[μM]	
α-Tocotrienol 	k.I.	k.I.		
BWA4C 	0,15 (0,13-0,18) ^x	0,20 (0,14-0,28) ^x	0,37 (0,08-1,71) ^x	0,5905 ns
Harpagosid 	k.I.			
Kaffeensäure 	k.I.			
10-NFS 	5,0 (3,3-7,7) ^x	0,6 (0,3-1,0) ^x	k.I.	0,0089 **
Shogaol 	8,2 (6,5-10,2) ^x	0,6 (0,5-0,7) ^x	0,7 (0,4-1,1) ^x	0,6605 ns
Sinapinsäure 	k.I.			

U73122	6,97 (4,55-10,69) ^x	0,17 (0,02-1,86) ^x	k.I.	0,0003 ***
				
Zimtsäure	k.I.			
				

11.4 Polyphenole

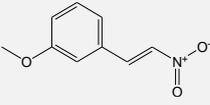
	PMNL [μ M]	r5LO-wt [μ M]	r5LO-4C [μ M]	P- Wert
Arzanol	k.I.	k.I.	k.I.	
				
Curcumin	1,6 (1,3-2,0) ^x	1,4 (0,80-2,45) ^x	1,08 (0,80-1,47) ^x	0,87 ns
				

11.5 Flavonoide

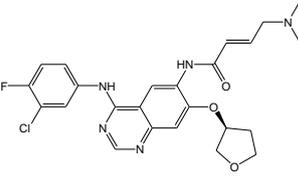
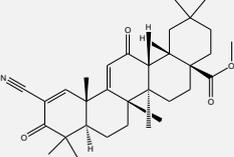
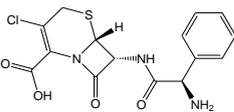
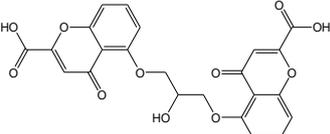
	PMNL	r5LO-wt	r5LO-4C	P-Wert
	[μ M]	[μ M]	[μ M]	
Baicalein 	1,35 (0,95-1,92) ^x	0,29 (0,18-0,43) ^x	0,4 (0,2-0,7) ^x	0,71 ns
Chalkon 	6,0 (5,4-6,8) ^x	0,7 (0,5-0,9) ^x	6,7 (5,0-8,8) ^x	0,297 ns
Flavopiridol 	k.I.			
Genistein 	k.I.			
Luteolin 	0,6 (0,4-0,8) ^x	0,06 (0,05-0,09) ^x	0,05 (0,04-0,06) ^x	0,8589 ns

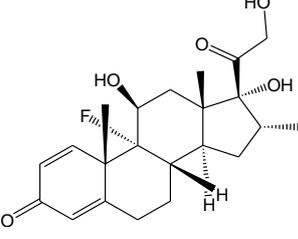
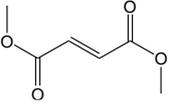
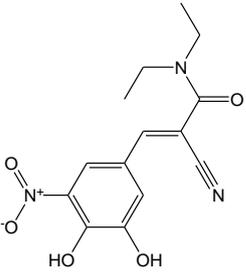
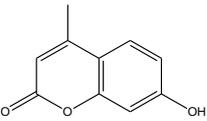
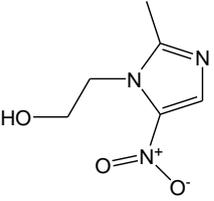
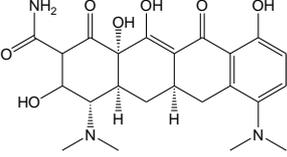
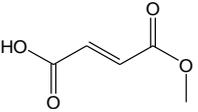
11.6 Nitrostyren

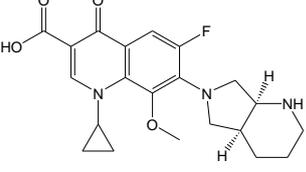
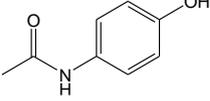
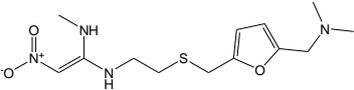
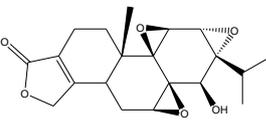
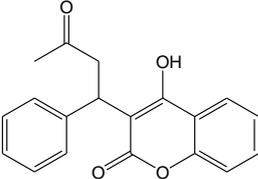
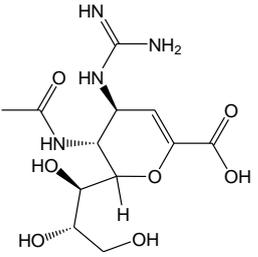
PMNL	r5LO-wt	r5LO-4C	P-Wert
------	---------	---------	--------

	[μM]	[μM]	[μM]	
Methoxy-Nitrostyren	10,8	2,9	k.I.	0,0309
	(6,2-19,0) ^x	(1,7-4,9) ^x		*

11.7 Arzneistoffe

	PMNL [μM]	r5LO-wt [μM]	r5LO-4C [μM]	P-Wert
Afatinib	k.I.	k.I.	k.I.	
				
CDDO	k.I.	6,6 (5,2-8,4) ^x	k.I.	0,0111 *
				
Cefaclor	k.I.			
				
Cromoglicinsäure	k.I.			
				
Dexamethason	k.I.			

					
DMF	k.I.	k.I.			
					
Entacapon	k.I.	30,9 (21,1-45,3) ^x	k.I.	0,52 ns	
					
4-Methylumbelliferon	k.I.				
					
Metronidazol	k.I.	k.I.			
					
Minocyclin	k.I.				
					
MMF	k.I.	k.I.			
					
Moxifloxacin	k.I.	27,19	k.I.	0,1103	

	(14,14-52,31) ^x	ns
Paracetamol	k.I.	k.I.
		
Ranitidin	k.I.	
		
Triptolid	k.I.	
		
Warfarin	k.I.	
		
Zanamivir	k.I.	
		

12. Quellen

1. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2007) 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends in Biochemical Sciences* 32(7): 332–341. DOI:10.1016/j.tibs.2007.06.002
2. Yoshimoto T, Yokoyama C, Ochi K, Yamamoto S, Maki Y, Ashida Y, Terao S, Shiraishi M (1982) 2,3,5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochimica et biophysica acta* 713(2): 470–473
3. Robinson C (1994) *Lipid Mediators in Allergic Diseases of the Respiratory Tract*. CRC Press
4. Pergola C, Werz O (2010) 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent developments and patents. *Expert opinion on therapeutic patents* 20(3): 355–375. DOI:10.1517/13543771003602012
5. Awwad K, Steinbrink SD, Fromel T, Lill N, Isaak J, Hafner A, Roos J, Hofmann B, Heide H, Geisslinger G et al. (2014) Electrophilic fatty acid species inhibit 5-lipoxygenase and attenuate sepsis-induced pulmonary inflammation. *Antioxidants & redox signaling* 20(17): 2667–2680. DOI:10.1089/ars.2013.5473
6. Hornig M, Markoutsas S, Hafner A, George S, Wisniewska JM, Rodl CB, Hofmann B, Maier T, Karas M, Werz O et al. (2012) Inhibition of 5-lipoxygenase by U73122 is due to covalent binding to cysteine 416. *Biochimica et biophysica acta* 1821(2): 279–286. DOI:10.1016/j.bbailip.2011.11.001
7. Rucker H, Al-Rifai N, Rasclé A, Gottfried E, Brodziak-Jarosz L, Gerhauser C, Dick TP, Amslinger S (2015) Enhancing the anti-inflammatory activity of chalcones by tuning the Michael acceptor site. *Organic & biomolecular chemistry* 13(10): 3040–3047. DOI:10.1039/c4ob02301c
8. Radmark O (2002) Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69: 211–234
9. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 12(11): 1035–1044. DOI:10.1038/ni.2109
10. Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME (2011) The structure of human 5-lipoxygenase. *Science (New York, N.Y.)* 331(6014): 217–219. DOI:10.1126/science.1197203

11. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28(1): 235–242
12. Hafner A, Beilstein K, Graab P, Ball A, Saul MJ, Hofmann B, Steinhilber D (2016) Identification and Characterization of a New Protein Isoform of Human 5-Lipoxygenase. *PloS one* 11(11): e0166591. DOI:10.1371/journal.pone.0166591
13. Radmark O, Samuelsson B (2005) Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochemical and biophysical research communications* 338(1): 102–110. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.08.013
14. Peters-Golden M, Brock TG (2003) 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 69(2-3): 99–109
15. Powell WS, Gravel S, Gravelle F (1995) Formation of a 5-oxo metabolite of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and its effects on human neutrophils and eosinophils. *Journal of lipid research* 36(12): 2590–2598
16. Serhan CN (2002) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69: 433–455
17. Werz O, Steinhilber D (2006) Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics* 112(3): 701–718. DOI:10.1016/j.pharmthera.2006.05.009
18. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2015) 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1851(4): 331–339. DOI:10.1016/j.bbalip.2014.08.012
19. Werz O, Burkert E, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99(3): 1044–1052
20. Radmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2015) 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1851(4): 331–339. DOI:10.1016/j.bbalip.2014.08.012
21. Luo M, Jones SM, Peters-Golden M, Brock TG (2003) Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21): 12165–12170. DOI:10.1073/pnas.2133253100
22. Werz O, Burkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Radmark O, Steinhilber D (2002) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 16(11): 1441–1443. DOI:10.1096/fj.01-0909fje
23. Luo M, Jones SM, Flamand N, Aronoff DM, Peters-Golden M, Brock TG (2005) Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase. *The Journal of biological chemistry* 280(49): 40609–40616. DOI:10.1074/jbc.M507045200
 24. Rakonjac M, Fischer L, Provost P, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B, Radmark O (2006) Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35): 13150–13155. DOI:10.1073/pnas.0605150103
 25. Radmark O, Samuelsson B (2005) Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochemical and biophysical research communications* 338(1): 102–110. DOI:10.1016/j.bbrc.2005.08.013
 26. Werz O (2002) 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Current drug targets. Inflammation and allergy* 1(1): 23–44
 27. Rubin P, Mollison KW (2007) Pharmacotherapy of diseases mediated by 5-lipoxygenase pathway eicosanoids. *Prostaglandins & other lipid mediators* 83(3): 188–197. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2007.01.005
 28. Peters-Golden M, Henderson WR, JR (2007) Leukotrienes. *The New England journal of medicine* 357(18): 1841–1854. DOI:10.1056/NEJMra071371
 29. Okuno T, Yokomizo T, Hori T, Miyano M, Shimizu T (2005) Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8. *The Journal of biological chemistry* 280(37): 32049–32052. DOI:10.1074/jbc.R500007200
 30. Brink C, Dahlen S, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T (2003) International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacological reviews* 55(1): 195–227. DOI:10.1124/pr.55.1.8
 31. Mellor EA, Maekawa A, Austen KF, Boyce JA (2001) Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 7964–7969. DOI:10.1073/pnas.141221498
 32. Kemp JP (2003) Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. *American journal of respiratory medicine : drugs, devices, and other interventions* 2(2): 139–156

33. Ghosh J, Myers CE (1998) Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(22): 13182–13187
34. Powell WS, Rokach J (2005) Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-EETE. *Progress in lipid research* 44(2-3): 154–183. DOI:10.1016/j.plipres.2005.04.002
35. Bowers RC, Hevko J, Henson PM, Murphy RC (2000) A novel glutathione containing eicosanoid (FOG7) chemotactic for human granulocytes. *The Journal of biological chemistry* 275(39): 29931–29934. DOI:10.1074/jbc.C000502200
36. Grant GE, Rokach J, Powell WS (2009) 5-Oxo-EETE and the OXE receptor. *Prostaglandins & other lipid mediators* 89(3-4): 98–104. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2009.05.002
37. Joshi EM, Heasley BH, Macdonald TL (2009) 2-ABT-S-oxide detoxification by glutathione S-transferases A1-1, M1-1 and P1-1: implications for toxicity associated with zileuton. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 39(3): 197–204. DOI:10.1080/00498250802651976
38. Braeckman RA, Granneman GR, Locke CS, Machinist JM, Cavannaugh JH, Awni WM (1995) The pharmacokinetics of zileuton in healthy young and elderly volunteers. *Clinical pharmacokinetics* 29 Suppl 2: 42–48
39. Steinhilber D, Hofmann B (2014) Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114(1): 70–77. DOI:10.1111/bcpt.12114
40. Nelson H, Kemp J, Berger W, Corren J, Casale T, Dube L, Walton-Bowen K, LaVallee N, Stepanians M (2007) Efficacy of zileuton controlled-release tablets administered twice daily in the treatment of moderate persistent asthma: a 3-month randomized controlled study. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 99(2): 178–184. DOI:10.1016/S1081-1206(10)60642-4
41. Tardif J, L'allier PL, Ibrahim R, Gregoire JC, Nozza A, Cossette M, Kouz S, Lavoie M, Paquin J, Brotz TM et al. (2010) Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome. *Circulation. Cardiovascular imaging* 3(3): 298–307. DOI:10.1161/CIRCIMAGING.110.937169

42. Charleson S, Evans JF, Leger S, Perrier H, Prasit P, Wang Z, Vickers PJ (1994) Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein. *European journal of pharmacology* 267(3): 275–280
43. Fischer L, Hornig M, Pergola C, Meindl N, Franke L, Tanrikulu Y, Dodt G, Schneider G, Steinhilber D, Werz O (2007) The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *British journal of pharmacology* 152(4): 471–480. DOI:10.1038/sj.bjp.0707416
44. Kulkarni SK, Singh VP (2008) Licofelone: the answer to unmet needs in osteoarthritis therapy? *Current rheumatology reports* 10(1): 43–48
45. Bruneau P, Delvare C, Edwards MP, McMillan RM (1991) Indazolinones, a new series of redox-active 5-lipoxygenase inhibitors with built-in selectivity and oral activity. *Journal of medicinal chemistry* 34(3): 1028–1036
46. McMillan RM, Walker ER (1992) Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences* 13(8): 323–330
47. Ford-Hutchinson AW, Gresser M, Young RN (1994) 5-Lipoxygenase. *Annual review of biochemistry* 63: 383–417. DOI:10.1146/annurev.bi.63.070194.002123
48. Tateson JE, Randall RW, Reynolds CH, Jackson WP, Bhattacharjee P, Salmon JA, Garland LG (1988) Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *British journal of pharmacology* 94(2): 528–539
49. Landa P, Kutil Z, Temml V, Malik J, Kokoska L, Widowitz U, Pribylova M, Dvorakova M, Marsik P, Schuster D et al. (2013) Inhibition of in vitro leukotriene B4 biosynthesis in human neutrophil granulocytes and docking studies of natural quinones. *Natural product communications* 8(1): 105–108
50. Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massignan T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(15): 9745–9749. DOI:10.1073/pnas.152168599
51. Huang Z, Pinto JT, Deng H, Richie JP, JR (2008) Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochemical pharmacology* 75(11): 2234–2244. DOI:10.1016/j.bcp.2008.02.026

52. Humphries KM, Juliano C, Taylor SS (2002) Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *The Journal of biological chemistry* 277(45): 43505–43511. DOI:10.1074/jbc.M207088200
53. Kil IS, Kim SY, Park J (2008) Glutathionylation regulates IkappaB. *Biochemical and biophysical research communications* 373(1): 169–173. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.06.007
54. Doyle HA, Mamula MJ (2001) Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends in Immunology* 22(8): 443–449. DOI:10.1016/S1471-4906(01)01976-7
55. Pande V, Sousa SF, Ramos MJ (2009) Direct covalent modification as a strategy to inhibit nuclear factor-kappa B. *Current medicinal chemistry* 16(32): 4261–4273
56. Zheng S, Santosh Laxmi YR, David E, Dinkova-Kostova AT, Shiavoni KH, Ren Y, Zheng Y, Trevino I, Bumeister R, Ojima I et al. (2012) Synthesis, chemical reactivity as Michael acceptors, and biological potency of monocyclic cyanoenones, novel and highly potent anti-inflammatory and cytoprotective agents. *Journal of medicinal chemistry* 55(10): 4837–4846. DOI:10.1021/jm3003922
57. Sanchez-Gomez FJ, Cernuda-Morollon E, Stamatakis K, Perez-Sala D (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Molecular pharmacology* 66(5): 1349–1358. DOI:10.1124/mol.104.002824
58. Thomson R (2012) Naturally occurring quinones. Elsevier
59. Wang X, Thomas B, Sachdeva R, Arterburn L, Frye L, Hatcher PG, Cornwell DG, Ma J (2006) Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10): 3604–3609
60. Schaible AM, Filosa R, Temml V, Krauth V, Matteis M, Peduto A, Bruno F, Luderer S, Roviezzo F, Di Mola A et al. (2014) Elucidation of the molecular mechanism and the efficacy in vivo of a novel 1,4-benzoquinone that inhibits 5-lipoxygenase. *British journal of pharmacology* 171(9): 2399–2412. DOI:10.1111/bph.12592
61. Tasdemir D, Brun R, Yardley V, Franzblau SG, Rüedi P (2006) Antituberculous and antiprotozoal activities of primin, a natural benzoquinone: In vitro and in vivo studies. *Chemistry & biodiversity* 3(11): 1230–1237
62. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* 13(3): 135–160

63. Monks TJ, Jones DC (2002) The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Current drug metabolism* 3(4): 425–438
64. O'brien PJ (1991) Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chemico-biological interactions* 80(1): 1–41
65. Ohkawa S, Terao T, Murakami M, Matsumoto T, Goto G (1991) Reduction of 2,3,5-trimethyl-6-(3-pyridylmethyl)-1,4-benzoquinone by PB-3c cells and biological activity of its hydroquinone. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 39(4): 917–921
66. Poeckel D, Niedermeyer THJ, Pham HTL, Mikolasch A, Mundt S, Lindequist U, Lalk M, Werz O (2006) Inhibition of human 5-lipoxygenase and anti-neoplastic effects by 2-amino-1,4-benzoquinones. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* 2(6): 591–595
67. Werz O (2007) Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta medica* 73(13): 1331–1357. DOI:10.1055/s-2007-990242
68. Hofmann B, Rodl CB, Kahnt AS, Maier TJ, Michel AA, Hoffmann M, Rau O, Awwad K, Pellowska M, Wurglics M et al. (2012) Molecular pharmacological profile of a novel thiazolinone-based direct and selective 5-lipoxygenase inhibitor. *British journal of pharmacology* 165(7): 2304–2313. DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01707.x
69. Holme JA, Dahlin DC, Nelson SD, Dybing E (1984) Cytotoxic effects of N-acetyl-p-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and N-hydroxyparacetamol. *Biochemical pharmacology* 33(3): 401–406
70. Malnoë A, Benedetti MS, Smith RL, Frigerio A (1977) Biliary Metabolites of Paracetamol in Relation to Dose Level and Various Pretreatments. In: *Biological Reactive Intermediates*. Springer, pp 387–393
71. Mitchell, JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette, JR, Brodie BB (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 187(1): 211–217
72. El-Dakhakhny M, Madi N, Lembert N, Ammon H (2002) Nigella sativa oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81(2): 161–164. DOI:10.1016/S0378-8741(02)00051-X
73. Houghton PJ, Zarka R, las Heras B de, Hoult JR (1995) Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta medica* 61(01): 33–36

74. El-Dakhakhny M (1963) STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUTION OF EGYPTIAN NIGELLA SATIVA L. SEEDS. II) THE ESSENTIAL OIL. *Planta medica* 11(04): 465–470
75. Ali BH, Blunden G (2003) Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research* : PTR 17(4): 299–305. DOI:10.1002/ptr.1309
76. Taka E, Mazzio EA, Goodman CB, Redmon N, Flores-Rozas H, Reams R, Darling-Reed S, Soliman KF (2015) Anti-inflammatory effects of thymoquinone in activated BV-2 microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* 286: 5–12. DOI:10.1016/j.jneuroim.2015.06.011
77. Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM (2002) Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell biochemistry and function* 20(2): 143–151
78. Gilhotra N, Dhingra D (2011) Thymoquinone produced antianxiety-like effects in mice through modulation of GABA and NO levels. *Pharmacological Reports* 63(3): 660–669
79. Tesarova H, Svobodova B, Kokoska L, Marsik P, Pribylova M, Landa P, Vadlejch J (2011) Determination of oxygen radical absorbance capacity of black cumin (*Nigella sativa*) seed quinone compounds. *Natural product communications* 6(2): 213–216
80. Idris-Khodja N, Schini-Kerth V (2012) Thymoquinone improves aging-related endothelial dysfunction in the rat mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 385(7): 749–758
81. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi H, Desin T (2002) Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomedical sciences instrumentation* 39: 440–445
82. Mohamed A, Afridi DM, Garani O, Tucci M (2004) Thymoquinone inhibits the activation of NF-kappaB in the brain and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biomedical sciences instrumentation* 41: 388–393
83. Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MOK (2012) Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC neuroscience* 13(1): 1
84. Radad K, Hassanein K, Al-Shraim M, Moldzio R, Rausch W (2014) Thymoquinone ameliorates lead-induced brain damage in Sprague Dawley rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66(1): 13–17

85. Xuan NT, Shumilina E, Qadri SM, Götz F, Lang F (2010) Effect of thymoquinone on mouse dendritic cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 25(2-3): 307–314
86. Kundu JK, Liu L, Shin J, Surh Y (2013) Thymoquinone inhibits phorbol ester-induced activation of NF- κ B and expression of COX-2, and induces expression of cytoprotective enzymes in mouse skin in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 438(4): 721–727
87. Tekeoglu I, Dogan A, Demiralp L (2006) Retracted: Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytotherapy research* 20(10): 869–871
88. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA (2012) Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico-biological interactions* 197(1): 40–46
89. Ammar EM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA (2011) Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *International Immunopharmacology* 11(12): 2232–2236
90. Landa P, Kutil Z, Temml V, Malik J, Kokoska L, Widowitz U, Pribylova M, Dvorakova M, Marsik P, Schuster D (2013) Inhibition of in vitro leukotriene B₄ biosynthesis in human neutrophil granulocytes and docking studies of natural quinones. *Natural product communications* 8(1): 105–108
91. Salem ML (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology* 5(13–14): 1749–1770. DOI:10.1016/j.intimp.2005.06.008
92. Yang W, Bhandaru M, Pasham V, Bobbala D, Zelenak C, Jilani K, Rotte A, Lang F (2012) Effect of thymoquinone on cytosolic pH and Na⁺/H⁺ exchanger activity in mouse dendritic cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 29(1-2): 21–30
93. Spektrum.de Lexikon der Biologie. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/primin/53688>
94. Gunatilaka AL, Berger JM, Evans R, Miller JS, Wisse JH, Neddermann KM, Bursuker I, Kingston DGI (2001) Isolation, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Bioactive Benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname Rainforest 1. *Journal of natural products* 64(1): 2–5
95. Marini-Bettolo GB, Delle-Monache F, Goncalves da Lima O, Barros-Coelho Sd (1971) Miconidin, a new hydroquinone from the wood of *Miconia* sp.(Melastomaceae). *Gaz Chim Ital*

96. Darwish FM, Abdallah OM, El-Emary NA, Ali AA (1995) Quinones From The Seeds Of *Iris Spuria* Var. *Halophila*. BULLETIN OF PHARMACEUTICAL SCIENCES-ASSIUT UNIVERSITY 18: 45
97. Hausen BM (1978) On the occurrence of the contact allergen primin and other quinoid compounds in species of the family of Primulaceae. Archives of dermatological research 261(3): 311–321
98. Aplin CG, Lovell CR (2001) Contact dermatitis due to hardy primula species and their cultivars. Contact Dermatitis 44(1): 23–29
99. Cremer D, Hausen BM, Schmalte HW (1987) Toward a rationalization of the sensitizing potency of substituted p-benzoquinones. Reaction of nucleophiles with p-benzoquinones. Journal of medicinal chemistry 30(9): 1678–1681
100. Hausen BM, Hetsch H, Borrman B, Koch D, Rathmann R, Richter B, König WA (1995) Structure-activity relationships in allergic contact dermatitis. Contact Dermatitis 33(1): 12–16
101. Bernays E, Lupi A, Bettolo RM, Mastrofrancesco C, Tagliatesta P (1984) Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol miconidin from *Miconia* spp. Experientia 40(9): 1010–1011
102. H. Schildknecht JL (1987, 42, 31)
103. Efferth T, Rücker G, Falkenberg M, Manns D, Olbrich A, Fabry U, Osieka R (1996) Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. Arzneimittel-forschung 46(2): 196–200
104. Pahn EM de, Molina PMP, Stoppani AO (1987) [Effect of quinones and nitrofurans on *Trypanosoma mega* and *Crithidia fasciculata*]. Revista Argentina de microbiologia 20(3): 107–118
105. Molina PMP, Pahn EM de, Galeffi C, Stoppani AO (1990) [Effect of lipophilic ortho-naphthoquinones on the growth of and production of peroxides by *Leptomonas seymouri* and *Crithidia fasciculata*]. Revista Argentina de microbiologia 23(1): 1–14
106. Thippeswamy BS, Mahendran S, Biradar MI, Raj P, Srivastava K, Badami S, Veerapur VP (2011) Protective effect of embelin against acetic acid induced ulcerative colitis in rats. European journal of pharmacology 654(1): 100–105
107. Kumar K, Dhamotharan R, Kulkarni NM, Honnegowda S, Murugesan S (2011) Embelin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. International Immunopharmacology 11(6): 724–731

108. Kumar GK, Dhamotharan R, Kulkarni NM, Mahat MYA, Gunasekaran J, Ashfaque M (2011) Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice. *European journal of pharmacology* 662(1): 63–69
109. Mahendran S, Badami S, Ravi S, Thippeswamy BS, Veerapur VP (2011) Synthesis and evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of most active free radical scavenging derivatives of embelin-A structure-activity relationship. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59(8): 913–919
110. Dai Y, Qiao L, Chan KW, Yang M, Ye J, Ma J, Zou B, Gu Q, Wang J, Pang R (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ contributes to the inhibitory effects of embelin on colon carcinogenesis. *Cancer research* 69(11): 4776–4783
111. Mahendran S, Thippeswamy BS, Veerapur VP, Badami S (2011) Anticonvulsant activity of embelin isolated from *Embelia ribes*. *Phytomedicine* 18(2): 186–188
112. Thippeswamy BS, Nagakannan P, Shivasharan BD, Mahendran S, Veerapur VP, Badami S (2011) Protective effect of embelin from *Embelia ribes* Burm. against transient global ischemia-induced brain damage in rats. *Neurotoxicity research* 20(4): 379–386
113. Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, Kannappan R, Yadav VR, Aggarwal BB (2010) Embelin suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B ligand and tumor cells in vitro through inhibition of the NF- κ B cell signaling pathway. *Molecular Cancer Research* 8(10): 1425–1436
114. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Embelin, an inhibitor of X chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein, blocks nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway leading to suppression of NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products. *Molecular pharmacology* 71(1): 209–219
115. Yoshimoto T, Yokoyama C, Ochi K, Yamamoto S, Maki Y, Ashida Y, Terao S, Shiraishi M (1982) 2, 3, 5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5, 10-dodecadiynyl)-1, 4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochimica et biophysica acta* 713(2): 470
116. Robinson C (1994) *Lipid Mediators in Allergic Diseases of the Respiratory Tract*. CRC Press
117. Yamashita A, Schaub RG, Bach MK, White GJ, Toy A, Ghazal NB, Burdick MD, Brashler JR, Holm MS (1990) 1,4-Dihydronaphthoquinones, hydroindoloquinones, benzofurans, and benzothiophenes as inhibitors of 5-lipoxygenase. Synthesis and structure-activity studies. *Journal of medicinal chemistry* 33(2): 775–781

118. Hernández-Pérez M, Rabanal RM, de la Torre, Ma Carmen, Rodríguez B (1995) Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta medica* 61(06): 505–509
119. Kobayashi K, Nishiumi S, Nishida M, Hirai M, Azuma T, Yoshida H, Mizushima Y, Yoshida M (2011) Effects of quinone derivatives, such as 1, 4-naphthoquinone, on DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory action. *Medicinal Chemistry* 7(1): 37–44
120. Powolny AA, Singh SV (2008) Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. *Pharmaceutical research* 25(9): 2171–2180
121. Sandur SK, Ichikawa H, Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB (2006) Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1, 4-naphthoquinone) suppresses NF- κ B activation and NF- κ B-regulated gene products through modulation of p65 and I κ B α kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *Journal of Biological Chemistry* 281(25): 17023–17033
122. Manu KA, Shanmugam MK, Rajendran P, Li F, Ramachandran L, Hay HS, Kannaiyan R, Swamy SN, Vali S, Kapoor S et al. (2011) Plumbagin inhibits invasion and migration of breast and gastric cancer cells by downregulating the expression of chemokine receptor CXCR4. *Molecular cancer* 10: 107. DOI:10.1186/1476-4598-10-107
123. Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, Woodcock SR, Bonacci G, Del Rio JM, Schopfer FJ, Lancaster JR, JR, Freeman BA, Tarpey MM (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *The Journal of biological chemistry* 283(52): 36176–36184. DOI:10.1074/jbc.M802402200
124. Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PRS, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP et al. (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *The Journal of biological chemistry* 281(47): 35686–35698. DOI:10.1074/jbc.M603357200
125. Li Y, Zhang J, Schopfer FJ, Martynowski D, Garcia-Barrio MT, Kovach A, Suino-Powell K, Baker PRS, Freeman BA, Chen YE et al. (2008) Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nature structural & molecular biology* 15(8): 865–867. DOI:10.1038/nsmb.1447
126. Schopfer FJ, Lin Y, Baker PRS, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen YE, Freeman BA (2005) Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(7): 2340–2345. DOI:10.1073/pnas.0408384102
127. Kansanen E, Jyrkkanen H, Volger OL, Leinonen H, Kivela AM, Hakkinen S, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Yla-Herttuala S et al. (2009) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *The Journal of biological chemistry* 284(48): 33233–33241. DOI:10.1074/jbc.M109.064873
128. Lucia D de, Lucio OM, Musio B, Bender A, Listing M, Dennhardt S, Koeberle A, Garscha U, Rizzo R, Manfredini S et al. (2015) Design, synthesis and evaluation of semi-synthetic triazole-containing caffeic acid analogues as 5-lipoxygenase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 101: 573–583. DOI:10.1016/j.ejmech.2015.07.011
129. González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, Medina FSD (2011) Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(4): 331–362. DOI:10.1080/10408390903584094
130. Chuang C, McIntosh MK (2011) Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual review of nutrition* 31: 155–176
131. Zhang H, Tsao R (2016) Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food microbiology • Functional foods and nutrition* 8: 33–42. DOI:10.1016/j.cofs.2016.02.002
132. Williams CA, Grayer RJ (2004) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports* 21(4): 539–573
133. van Acker SA, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, Van Der Vijgh, Wim JF, Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 20(3): 331–342
134. Lee JS, Bukhari SNA, Fauzi NM (2015) Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. *Drug design, development and therapy* 9: 4761
135. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione CV, Pala D, Baracat MM, Georgetti SR, Verri WA, Casagrande R (2016) Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* 15(4): 554–563

136. Vicentini, Fabiana T M C, He T, Shao Y, Fonseca MJV, Verri WA, JR, Fisher GJ, Xu Y (2011) Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway. *Journal of dermatological science* 61(3): 162–168. DOI:10.1016/j.jdermsci.2011.01.002
137. Bukhari SNA, Tajuddin Y, Benedict VJ, Lam KW, Jantan I, Jalil J, Jasamai M (2014) Synthesis and evaluation of chalcone derivatives as inhibitors of neutrophils' chemotaxis, phagocytosis and production of reactive oxygen species. *Chemical biology & drug design* 83(2): 198–206
138. Bukhari SNA, Lauro G, Jantan I, Bifulco G, Amjad MW (2014) Pharmacological evaluation and docking studies of α , β -unsaturated carbonyl based synthetic compounds as inhibitors of secretory phospholipase A 2, cyclooxygenases, lipoxygenase and proinflammatory cytokines. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22(15): 4151–4161
139. Araico A, Terencio MC, Alcaraz MJ, Dominguez JN, Leon C, Ferrandiz ML (2007) Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. *Life sciences* 80(23): 2108–2117. DOI:10.1016/j.lfs.2007.03.017
140. Zhou B, Xing C (2015) Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. *Medicinal Chemistry* 5(8): 388–404. DOI:10.4172/2161-0444.1000291
141. Baldwin AG, Brough D, Freeman S (2016) Inhibiting the Inflammasome: A Chemical Perspective. *Journal of medicinal chemistry* 59(5): 1691–1710. DOI:10.1021/acs.jmedchem.5b01091
142. Sakai N, Furuichi K, Wada T (2016) Inhibition of NLRP3 inflammasome as a therapeutic intervention in crystal-induced nephropathy. *Kidney International* 90(3): 466–468. DOI:10.1016/j.kint.2016.05.003
143. Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble GW, Leesnitzer LM, Stimmel JB, Willson TM (2003) The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. *Clinical Cancer Research* 9(7): 2798–2806
144. Zhang YY, Radmark O, Samuelsson B (1992) Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(2): 485–489
145. Fischer L, Steinhilber D, Werz O (2004) Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *British journal of pharmacology* 142(5): 861–868. DOI:10.1038/sj.bjp.0705860

146. BLOIS MS (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181(4617): 1199–1200
147. Sharma OP, Bhat TK (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113(4): 1202–1205. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
148. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Neri M, Cuccurullo C, Giamberardino MA, Cuccurullo F (2009) Inhibitory activity of salicylic acid on lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta* 1790(1): 25–30. DOI:10.1016/j.bbagen.2008.09.007
149. Hock KJ, Grimmer J, Göbel D, Gasaya GGT, Roos J, Maucher IV, Kühn B, Fettel J, Maier TJ, Manolikakes G (2016) Modular Regiospecific Synthesis of Nitrated Fatty Acids. *Synthesis*
150. Hafner A, Gerstmeier J, Hornig M, George S, Ball A, Schroder M, Garscha U, Werz O, Steinhilber D (2015) Characterization of the interaction of human 5-lipoxygenase with its activating protein FLAP. *Biochimica et biophysica acta* 1851(11): 1465–1472. DOI:10.1016/j.bbalip.2015.08.010
151. Hornig M, Markoutsas S, Hafner A, George S, Wisniewska JM, Rodl CB, Hofmann B, Maier T, Karas M, Werz O et al. (2012) Inhibition of 5-lipoxygenase by U73122 is due to covalent binding to cysteine 416. *Biochimica et biophysica acta* 1821(2): 279–286. DOI:10.1016/j.bbalip.2011.11.001
152. Awwad K, Steinbrink SD, Fromel T, Lill N, Isaak J, Hafner A, Roos J, Hofmann B, Heide H, Geisslinger G et al. (2014) Electrophilic fatty acid species inhibit 5-lipoxygenase and attenuate sepsis-induced pulmonary inflammation. *Antioxidants & redox signaling* 20(17): 2667–2680. DOI:10.1089/ars.2013.5473
153. Tateson JE, Randall RW, Reynolds CH, Jackson WP, Bhattacharjee P, Salmon JA, Garland LG (1988) Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *British journal of pharmacology* 94(2): 528–539
154. Fischer L, Szellas D, Radmark O, Steinhilber D, Werz O (2003) Phosphorylation- and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(8): 949–951. DOI:10.1096/fj.02-0815fje
155. Waskiewicz AJ, Cooper JA (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Current opinion in cell biology* 7(6): 798–805

156. Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences* 20(3): 117–122
157. Werz O, Klemm J, Samuelsson B, Rådmark O (2000) 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(10): 5261–5266
158. Feisst C, Albert D, Steinhilber D, Werz O (2005) The aminosteroid phospholipase C antagonist U-73122 (1-6-17-beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-ylaminoethyl-1H-pyrrole-2,5-dione) potently inhibits human 5-lipoxygenase in vivo and in vitro. *Molecular pharmacology* 67(5): 1751–1757. DOI:10.1124/mol.105.011007
159. Kosower NS, Kosower EM (1995) [11] Diamide: An oxidant probe for thiols. In: *Methods in Enzymology : Biothiols Part A Monothioles and Dithioles, Protein Thiols, and Thiyl Radicals*, Volume 251. Academic Press, pp 123–133
160. Hafner A, Gerstmeier J, Hornig M, George S, Ball A, Schroder M, Garscha U, Werz O, Steinhilber D (2015) Characterization of the interaction of human 5-lipoxygenase with its activating protein FLAP. *Biochimica et biophysica acta* 1851(11): 1465–1472. DOI:10.1016/j.bbaliip.2015.08.010
161. Grek CL, Zhang J, Manevich Y, Townsend DM, Tew KD (2013) Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation. *Journal of Biological Chemistry* 288(37): 26497–26504
162. Eskelinen S, Haikonen M, Raisanen S (1983) Ferene-S as the chromogen for serum iron determinations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 43(5): 453–455
163. Czapski GA, Czubowicz K, Strosznajder RP (2012) Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. *Pharmacological reports : PR* 64(5): 1179–1188
164. Fischer AS, Metzner J, Steinbrink SD, Ulrich S, Angioni C, Geisslinger G, Steinhilber D, Maier TJ (2010) 5-Lipoxygenase inhibitors induce potent anti-proliferative and cytotoxic effects in human tumour cells independently of suppression of 5-lipoxygenase activity. *British journal of pharmacology* 161(4): 936–949
165. Evans JF, Ferguson AD, Mosley RT, Hutchinson JH (2008) What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends in pharmacological sciences* 29(2): 72–78. DOI:10.1016/j.tips.2007.11.006
166. Gilbert NC, Rui Z, Neau DB, Waight MT, Bartlett SG, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME (2012) Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a

- point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *The FASEB Journal* 26(8): 3222–3229
167. Hafner A, Cernescu M, Hofmann B, Ermisch M, Hornig M, Metzner J, Schneider G, Brutschy B, Steinhilber D (2011) Dimerization of human 5-lipoxygenase. *Biological chemistry* 392(12): 1097–1111. DOI:10.1515/BC.2011.200
168. Lin D, Saleh S, Liebler DC (2008) Reversibility of Covalent Electrophile–Protein Adducts and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 21(12): 2361–2369. DOI:10.1021/tx800248x
169. Avonto C, Tagliatalata-Scafati O, Pollastro F, Minassi A, Di Marzo V, Petrocellis L de, Appendino G (2011) An NMR Spectroscopic Method to Identify and Classify Thiol-Trapping Agents: Revival of Michael Acceptors for Drug Discovery? *Angewandte Chemie International Edition* 50(2): 467–471
170. Chin MP, Reisman SA, Bakris GL, O'Grady M, Linde PG, McCullough PA, Packham D, Vaziri ND, Ward KW, Warnock DG et al. (2014) Mechanisms contributing to adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *American journal of nephrology* 39(6): 499–508. DOI:10.1159/000362906
171. Tubesha Z, Imam MU, Mahmud R, Ismail M (2013) Study on the potential toxicity of a thymoquinone-rich fraction nanoemulsion in Sprague Dawley rats. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18(7): 7460–7472. DOI:10.3390/molecules18077460
172. Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, Moldeus P (1985) Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Molecular pharmacology* 28(3): 306–311
173. Feldinger K, Kong A (2015) Profile of neratinib and its potential in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer : Targets and Therapy* 7: 147–162. DOI:10.2147/BCTT.S54414
174. Chan A, Delaloge S, Holmes FA, Moy B, Iwata H, Harvey VJ, Robert NJ, Silovski T, Gokmen E, Minckwitz G von et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 17(3): 367–377. DOI:10.1016/S1470-2045(15)00551-3
175. Lo Russo G, Proto C, Garassino MC (2015) Afatinib in the treatment of squamous non-small cell lung cancer: a new frontier or an old mistake? *Translational Lung Cancer Research* 5(1): 110–114. DOI:10.3978/j.issn.2218-6751.2015.12.02

176. Bomprezzi R (2015) Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 8(1): 20–30. DOI:10.1177/1756285614564152
177. Sharma JN, Mohammed LA (2006) The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology* 14(1-2): 10–16. DOI:10.1007/s10787-006-1496-6
178. Pejman L, Omrani H, Mirzamohammadi Z, Keyhanmanesh R (2014) Thymoquinone, the main constituent of *Nigella sativa*, affects adenosine receptors in asthmatic guinea pigs. *Iranian journal of basic medical sciences* 17(12): 1012–1019
179. Mansour M, Tornhamre S (2004) Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 19(5): 431–436. DOI:10.1080/14756360400002072
180. Khader M, Bresgen N, Eckl PM (2009) In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47(1): 129–133. DOI:10.1016/j.fct.2008.10.019
181. Werz O (2007) Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta medica* 73(13): 1331–1357. DOI:10.1055/s-2007-990242
182. El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC (2006) Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1760(7): 1088–1095
183. Houghton PJ, Zarka R, las Heras B de, Hoult JR (1995) Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta medica* 61(1): 33–36. DOI:10.1055/s-2006-957994
184. Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A (2011) The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* 10(4): 307–317. DOI:10.1038/nrd3410
185. Krishnan S, Miller RM, Tian B, Mullins RD, Jacobson MP, Taunton J (2014) Design of reversible, cysteine-targeted Michael acceptors guided by kinetic and computational analysis. *Journal of the American Chemical Society* 136(36): 12624–12630. DOI:10.1021/ja505194w
186. Serafimova IM, Pufall MA, Krishnan S, Duda K, Cohen MS, Maglathlin RL, McFarland JM, Miller RM, Frodin M, Taunton J (2012) Reversible targeting of noncatalytic

cysteines with chemically tuned electrophiles. *Nature chemical biology* 8(5): 471–476.
DOI:10.1038/nchembio.925

187. Hofmann B, Rodl CB, Kahnt AS, Maier TJ, Michel AA, Hoffmann M, Rau O, Awwad K, Pellowska M, Wurglics M et al. (2012) Molecular pharmacological profile of a novel thiazolinone-based direct and selective 5-lipoxygenase inhibitor. *British journal of pharmacology* 165(7): 2304–2313. DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01707.x

13. Publikationen

Inflammation update: Current treatment options using the example of rheumatoid arthritis

PZ Prisma, Januar 2014

Regulation of tumorigenic Wnt signaling by cyclooxygenase-2, 5-Lipoxygenase and their pharmacological inhibitors: A basis for novel drugs targeting cancer cells?

Pharmacology & Therapeutics, Oktober 2015

Role of Lipoxygenases in Pathogenesis of Cancer

Lipoxygenases in Inflammation pp.131-157, DOI: 10.1007/978-3-319-27766-0_7, Januar 2016

Europäischer Vergleich der Gesundheitssysteme

DAZ 28/2016 S.28, Juli 2016

Herzrhythmusstörungen im Visier. Katheterablation besser als medikamentöse Therapie?

DAZ 29/2016 S. 28, Juli 2016

Metamizol-eines der sichersten Analgetika?

DAZ 30/2016 S.32, Juli 2016

Die "Pille für den Mann". Das Pariser Manifest fordert ein zuverlässiges Kontrazeptivum für Männer bis 2026

DAZ 34/2016 S.24, August 2016

Hohes Gewicht, geringer Gripeschutz. Influenza-Impfstoff scheint Adipöse nicht zu schützen

DAZ 35/2016, S. 34, September 2016

Schlechte Presse für Statine. Einfluss der Medien auf die Therapietreue

DAZ 36/2016 S.28, September 2016

Modular Regiospecific Synthesis of Nitrated Fatty Acids

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, DOI: 10.1055/s-0036-1588314, September 2016

Characterization of the molecular mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by 2-aminothiazoles

Biochemical Pharmacology, September 2016

Infektionskrankheiten im Kommen

DAZ 39/2016, S. 58, Oktober 2016

Einer Demenz vorbeugen

DAZ 44/2016, S.36, November 2016

Michael acceptor containing drugs are a novel class of 5-lipoxygenase inhibitor targeting the surface cysteines C416 and C418

Biochemical Pharmacology, DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.004, November 2016

Blutzuckerteststreifen nicht um jeden Preis?

DAZ 48/2016, S.42, Dezember 2016

Das große Übel. Maßnahmen zur Behandlung von Schwangerschaftserbrechen

DAZ 50/2016, S.38, Dezember 2016

Hilft ein Gel gegen Borreliose?

DAZ 4/2017, S.33, Januar2017

14. Danksagung

„Gedenke der Quelle wenn du trinkst“

Getreu dieses Sprichwortes möchte ich meine Dankbarkeit all denen ausdrücken, die mir eine bedeutende Hilfe und Stütze während dieser Arbeit waren:

...Prof. Dr. Thorsten Jürgen Maier: Der größte Dank geht von ganzem Herzen an dich Thorsten! Du hast mir diese Arbeit ermöglicht und immer an mich geglaubt. Deine herzliche, ehrliche und loyale Art machen dich zu dem besten Chef, den man sich wünschen kann. Danke, dass Du unsere Gruppe auf so wundervolle Weise betreut und geleitet hast. Danke für die vielen lustigen Besprechungen und Arbeitskreisabende sowie die tolle Zeit in Aarhus. Danke, dass Du in jeder Situation die richtigen Worte findest und mich stets motiviert hast. Danke, dass Du dich, wie kaum ein anderer, um das Wohl deiner Doktoranden sorgst und immer ein offenes Ohr für unsere Wünsche, Sorgen und Anregungen hattest. Danke für die ereignisreichen Jahre, in denen Du mich unterstützt, animiert und bestärkt hast. Ich habe dir den bis hierhin wichtigsten Schritt meines Lebens zu verdanken. Ich verbleibe in ewiger Dankbarkeit.

...Prof. Dr. Dieter Steinhilber: Danke für die Möglichkeit innerhalb eines so tollen Arbeitskreises promovieren zu dürfen. Vielen Dank für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen zu diesem Projekt sowie die herzliche, nette und unterstützende Art mit der Du mir begegnet bist.

...Dr. Jessica Roos: Danke, dass Du mir die komplette Doktorarbeit über mit Rat und Tat zur Seite standest. Danke, dass Du immer da warst wenn man dich gebraucht hat! Sowohl fachlich als auch menschlich konnte ich immer auf dich zählen.

...Jun. Prof. Eugen Proschak: Danke, dass ich mit meinen Fragen immer zu dir kommen konnte und Du stets mit höchstem Engagement an meine Projekte geglaubt und mich unterstützt

hast. Vielen Dank für die witzige Studentenbetreuung mit dir, deinen Einfallsreichtum und deinen lieben, humorvollen Charakter.

...**Selina Bauer**: Danke für den Zuspruch, die Unterstützung, Anteilnahme und Herzlichkeit, die mir diese Zeit um so vieles erleichterte und mich jeden Tag bestärkt hat.

...**Benjamin Kühn**: Danke, dass du mir jeden Tag im Labor versüßt hast und mich stets zum Lachen bringen konntest. Vielen Dank, dass ich sowohl in der Uni als auch privat immer auf dich zählen konnte und Du mir stets als Fotomodel zur Verfügung standest.

...**Jasmin Fettel**: Danke, dass ich mit meinen Fragen immer zu dir kommen konnte und Du nie geögert hast mir zu helfen. Danke für deine hilfsbereite und liebe Art sowie die vielen lustigen Gespräche im Labor.

...**Anja Vogel**: Danke, dass Du mich so toll in die Laborwelt eingearbeitet hast und auch Fragen, über die man Lachen könnte, mit voller Ernsthaftigkeit und Hilfsbereitschaft beantwortet hast. Vielen Dank für deine enorme Unterstützung und die lustige „Cekta-Zeit“ mit dir.

...**Ann-Katrin Ball**: Danke für die schöne Freundschaft, die sich während unserer Laborzeit entwickelt hat und deine Unterstützung bei meinen ersten „Minis und Maxis“ sowie der grandiosen Translokation ☺.

...**Dr. Ann-Kathrin Häfner**: Danke für deine Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Cekta und HPLC sowie für die Cysteinmutanten.

...**Dr. Bernd Sorg**: Für deine ständige Bereitschaft bei allen Fragestellungen rund um den Arbeitskreis zu helfen, dein außerordentliches Engagement und deine wissenschaftlichen Anregungen während der Arbeitskreiseminare.

...**Dipl.-Pharm. Simon B.M. Kretschmer**: Danke für deinen Beistand während unseres gesamten Pharmaziestudiums und deiner Hilfe während der Doktorarbeit.

...**Sven Georg**: Danke für deine Hilfe bei allen technischen Fragen und dein unermüdbares Engagement unseren Arbeitskreis in Ordnung zu halten

...**Nathan Racine**: Danke, dass Du mich auf den richtigen Weg geführt hast! „*The only thing standing between you and your goal is the bullshit story you keep telling yourself as to why you can't achieve it.*”

...**Julia Martin**: Danke für die schöne Zeit mit dir in unserem Labor. Danke für die zahlreichen Gespräche und Andreas-Bourani-Lieder☺. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

...**Evelyne Kern**: „*Alte Freunde sind wie alter Wein: Er wird immer besser und je älter man wird, desto mehr lernt man, dieses unendliche Gut zu schätzen.*“

...**Luke Slater**: „*When we honestly ask ourselves which person in our lives means the most to us, we often find that it is those who, instead of giving advice, solutions, or cures, have chosen rather to share our pain and touch our wounds with a warm and tender hand. The friend who can be silent with us in a moment of despair or confusion, who can stay with us in an hour of grief and bereavement, who can tolerate not knowing, not curing, not healing and face with us the reality of our powerlessness, that is a friend who cares.*”

-Henri J.M. Nouwen

...**Enrico Kappus**: Danke, dass Du mich meine komplette „Pharmazie-Zeit“ über begleitet hast und für mich in jeder Situation da warst. Danke für deine unbezahlbare Freundschaft.

...**Josefine Beyer**: Danke, dass wir die letzten Jahre so Vieles miteinander erlebt haben und du während meiner Doktorarbeit immer für mich da warst, wenn ich dich gebraucht habe. Florida, Mexiko, New York...alles unvergessliche Momente.

...**Karsten Flügel**: Zu wenig Platz um alles aufzuzählen ;-)

...**Markus Halle**: Danke, dass Du mir in der Endphase meiner Doktorarbeit eine so große Stütze warst, Du mich mit *Word* nicht im Stich gelassen hast ;-) und mich trotz allem Schrecken der Technik immer zum Lachen bringen konntest. Vielen Dank für den Halt, die Geborgenheit und die Liebe, die ich von dir bekomme mein Herz.

...**Désirée Christin Maucher**: Jedes Dankeschön könnte nicht ausdrücken, wie viel Du mir bedeutest und wie dankbar ich dafür bin, eine so tolle Schwester zu haben! Danke für deine bedingungslose Unterstützung, deine Hilfe, deine Anteilnahme, deine Zeit, deine Ehrlichkeit und deine schwesterlichen Zickereien☺.

...meinen Eltern **Monika Pflüger-Maucher, Reimund Maucher** sowie meinen Großeltern **Irma Pflüger** und **Kurt Pflüger**: Ohne euch würde diese Doktorarbeit nicht existieren. Danke für eure uneingeschränkte und bedingungslose Unterstützung, euren Beistand, Fürsorge, Förderung, Hilfe, Halt, Anteilnahme und den Zusammenhalt unserer Familie.

15. Lebenslauf

Nicht öffentlich