

Inhibitorstudien und niedermolekulare Modifikationen der 5-Lipoxygenase

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Michael Hörnig
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2009)
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Prof. Dr. Oliver Werz

Datum der Disputation: 10. Juli 2009

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Einleitung	5
2.1. Zielsetzung	5
2.2. Lipoxygenasen	5
2.2.1. Entdeckung	5
2.2.2. Definition	6
2.3. 5-Lipoxygenase	8
2.3.1. 5-LO-Gen-/Protein-Expression	8
2.3.2. Struktur	10
2.3.3. Enzymatische Eigenschaften	11
2.3.4. Regulation der zellulären Aktivität	14
2.4. 5-LO/Protein-Interaktion	18
2.4.1. Coactosin-like protein (CLP)	18
2.4.2. Dicer	20
2.4.3. Growth factor bound receptor protein 2 (Grb2)	21
2.4.4. Transforming growth factor β receptor-associated protein 1 (TRAP-1)	22
2.5. Beteiligte Proteine an der Leukotrien-Bildung	22
2.5.1. Phospholipase A ₂	22
2.5.2. 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein (FLAP)	23
2.5.3. Leukotrien A ₄ -Hydrolase	25
2.5.4. Leukotrien C ₄ -Synthase	26
2.6. Inhibitoren der 5-Lipoxygenase	28
2.6.1. Chemisch definierte Inhibitoren	28
2.6.2. Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs	32
3. Materialien und Methoden	37
3.1. Materialien	37
3.2. Methoden	38
4. Ergebnisse und Diskussion	53
4.1. Niedermolekulare Modifikationen der 5-LO	53
4.1.1. U-73122 hemmt potent die 5-LO-Produktbildung	53
4.1.2. Cystein-Verteilung innerhalb der Lipoxygenasen und der 5-LO	55
4.1.3. 5-LO-Hemmung durch U-73122 in RAW 264.1-Zellen	60
4.1.4. 5-LO-Hemmung durch U-73122 in RBL-1-Zellen	61
4.1.5. Kovalente Bindung von U-73122 an 5-LO	62
4.1.6. Effekte von U-73122 an 5-LO-Mutanten aus BL21-E.coli	68
4.1.7. Glutathion bindet an 5-LO	73
4.1.8. Einfluss von Diamid auf die FLAP- und Cys-5-LO-Mutanten-Aktivität in HeLa-Zellen	75
4.1.9. Diskussion	108
4.2. Celecoxib	120
4.2.1. Effekte von Celecoxib und Rofecoxib auf die 5-LO-Aktivität in transfizierten HeLa-Zellen	121
4.2.2. Einfluss von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in RBL-1-Zellen	124
4.2.3. Einfluss von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in RAW 264.7-Zellen	125
4.2.4. Effekt von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in PMNL bei Zugabe von steigenden Mengen an Substrat 126	
4.2.5. Diskussion	128
4.3. ML-3000 (Licofelon)	130
4.3.1. ML-3000 und MK-886 teilen sich strukturelle Eigenschaften	130

4.3.2.	ML-3000 hemmt potent die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen.....	131
4.3.3.	Effekte von ML-3000/MK-886 auf die 5-LO Aktivität in PMNL	133
4.3.4.	Diamid hemmt moderat die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL	133
4.3.5.	Effekte von ML-3000/MK-886 auf die 5-LO Aktivität in PMNL nach Zugabe von Diamid	135
4.3.6.	Diskussion.....	136
4.4.	Garsubellin A	139
4.4.1.	Strukturelle Eigenschaften von Garsubellin A und seinen Partialstrukturen.....	140
4.4.2.	Garsubellin A hemmt die 5-LO-Aktivität	142
4.4.3.	Effekte der Garsubellin A-Derivate auf das 5-LO-Enzym	144
4.4.4.	Substanz 4, 5, 10 und 13 hemmen potent die 5-LO-Aktivität	145
4.4.5.	Vergleich der Effekte von Substanz 3 und 4 auf 5-LO und 3W-5-LO in Anwesenheit von PC ..	147
4.4.6.	Diskussion.....	149
4.5.	Herstellung eines monoklonalen 5-LO Antikörpers	153
4.5.1.	Vorbereitung der 5-LO für die Immunisierung von Mäusen.....	153
4.5.2.	Immunisierung und Herstellung von Hybridomzellen	154
4.5.3.	5-LO-Detektion mit Maus-Serum	154
4.5.4.	Screening von positiven Klonen auf 5-LO-Selektivität	155
4.5.5.	Zelltyp-abhängige Detektion mit dem 6A12-Antikörper	156
4.5.6.	Reinigung des 6A12-5-LO-Antikörpers.....	156
4.5.7.	Ausbeute der Antikörper-Aufreinigungen.....	157
4.5.8.	5-LO-Detektion in unterschiedlichen 5-LO-Proben mit dem 6A12-Antikörper	158
4.5.9.	Vergleich der Detektionsmöglichkeiten von verschiedenen 5-LO-Antikörpern	159
5.	Zusammenfassung	160
6.	Abkürzungen	162
7.	Geräte	163
8.	Anhang	164
9.	Literatur.....	174
10.	Danksagung	191
11.	Akademische Lehrer	192
12.	Publikationen	193
13.	Lebenslauf.....	194

2. Einleitung

2.1. Zielsetzung

Der Arachidonsäure-Stoffwechsel ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit. Es konnten bisher viele Eigenschaften und Wirkungen der Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Kaskade aufgeklärt werden. Obwohl eine Vielzahl von Arbeitsgruppen an der Entwicklung geeigneter Inhibitoren der 5-Lipoxygenase (5-LO) arbeiten, konnte bisher nur für Cyclooxygenasen erfolgsversprechende Inhibitoren identifiziert und zugelassen werden. Alle als potent eingestuften Inhibitoren der 5-LO scheiterten bei der Zulassung als Fertigarzneimitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass U-73122 potent die 5-LO-Produktbildung hemmen kann (1). U-73122 verfügt über eine reaktive Maleinimid-Gruppe, daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob zwischen U-73122 und der 5-LO eine kovalente Bindung existiert und ob diese Bindung essentiell für die 5-LO-Hemmung ist. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Glutathion (GSH) kovalent an 5-LO binden kann. Um einen Einfluß auf die 5-LO-Aktivität zu testen, wurde das Verhalten der 5-LO gegenüber Glutathion getestet.

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen mit den Substanzen Celecoxib, ML-3000 (Licofelon) sowie Garsubelin A bzw. Garsubellin-Derivaten und deren Hemmwirkung auf die 5-LO-Aktivität.

2.2. Lipoxygenasen

2.2.1. Entdeckung

Im Jahr 1940 haben Kellaway und Mitarbeiter (Australien) ein Material im Perfusat von anaphylaktisch reagierenden Meerschweinchenlungen identifiziert, das sie „langsam-reagierende Substanz“ bzw. *slow-reacting substance* (SRS) nannten, da die Substanz eine Konstriktion des isolierten Dünndarms von Meerschweinchen auslöste. Die Wirkung der SRS setzte langsam ein, war jedoch im Vergleich zu Histamin lang anhaltend (2).

Zwei Jahrzehnte später konnte Brocklehurst zweifelsfrei zeigen das die SRS nicht Histamin ist, da die zu diesem Zeitpunkt neu entwickelten Antihistaminika die Reaktion von SRS nicht hemmen konnten (3). Zwischen den Jahren 1956 bis 1979 setzte sich vermehrt durch, dass SRS eine extrem potente Substanz für die Kontraktion der glatten Lungenmuskulatur ist.

Daraufhin wurde das Material in „langsam-reagierende Substanz der Anaphylaxis“ bzw. *slow-reacting substances of anaphylaxis* (SRS-A) umbenannt. SRS-A wurde 1973 als eine Ansammlung niedermolekularer Fettsäuren identifiziert (4), welche in Ratten nach Stimulation mit Calcium-Ionophor A23187 freigesetzt wurden (5).

Im Jahr 1979 konnten in der Arbeitsgruppe von Bengt Samuelsson die chemische Struktur der SRS-A als Leukotriene (Abbildung 2.1) aufgeklärt werden (6,7).

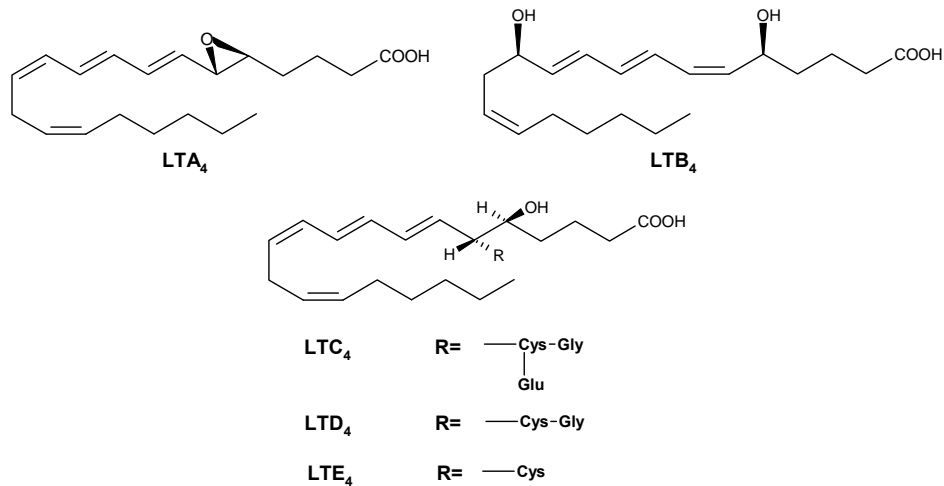


Abb. 2.1 Chemische Struktur von Leukotrienen A_4 , B_4 , C_4 , D_4 und E_4

2.2.2. Definition

Lipoxygenasen (LO) sind eine Familie von Enzymen, die die Oxygenierung von Arachidonsäure (AA), einer C-20 Tetraensäure, und anderen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren katalysiert. Die Lipoxygenasen werden anhand der Position des Sauerstoffs, den das Enzym im ersten Schritt der Katalyse in die Fettsäure einfügt, unterschieden und bezeichnet. Anhand von Abbildung 2.2 kann man die phylogenetische Einteilung der Lipoxygenasen, wie sie bei Säugetieren vorkommt, erkennen. Jede Lipoxygenase produziert bei der katalytischen Reaktion eine bestimmte Hydroperoxyeikosatetraensäure (HpETE), die nachfolgend zum korrespondierenden Alkohol (HETE) reduziert werden kann.

Lipoxygenasen kommen zumeist in höheren eukaryotischen Organismen (bis auf Hefen) vor. Die Nomenklatur der Lipoxygenasen (5-, 8-, 12-, 15-LO) orientiert sich an der Position in der C-20-Kette der Arachidonsäure, an der molekularer Sauerstoff durch die enzymatische Reaktion der Lipoxygenase eingefügt wird.

Mehr als 18 verschiedene Sequenzen von Säugetier-Lipoxygenasen sind bisher bekannt, wobei fünf dieser Enzyme im Menschen exprimiert werden (8,9). Die human exprimierten

Einleitung

Lipoxygenasen sind 5-LO, Retikulozyten-12/15-LO, Thrombozyten-12-LO und epidermale 12- und 15-LO (9,10).

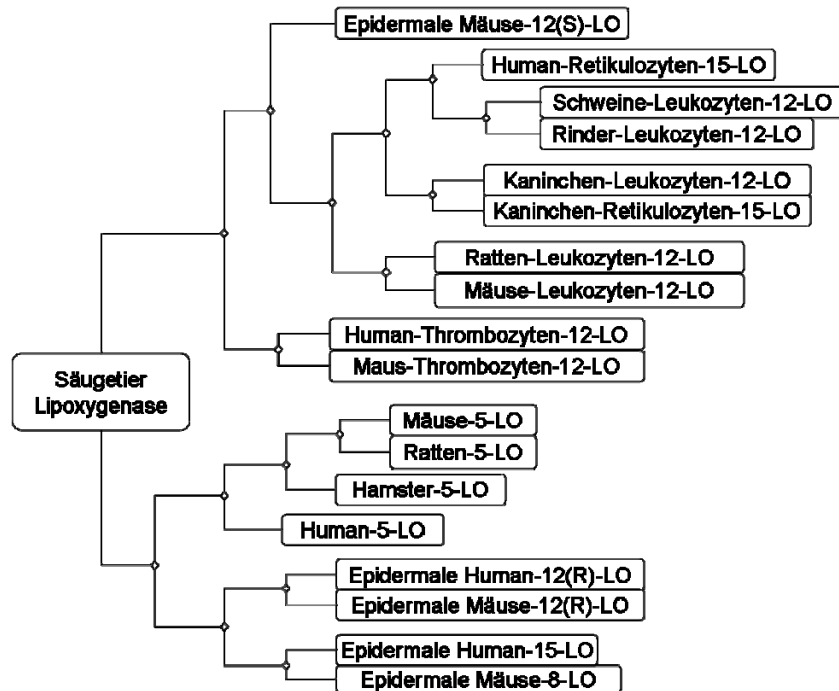


Abb. 2.2 Phylogenetische Ansicht der Lipoxygenasen von Säugetieren (8).

Das Molekulargewicht der Säugetier-Lipoxygenasen erstreckt sich von 72 bis 78 kDa. Alle Lipoxygenasen sind in eine größere katalytische (C-terminal) und eine kleinere regulatorische Domäne (N-terminal) strukturiert. Die regulatorische Domäne, die auch als C2-ähnliche Domäne bezeichnet wird, enthält sogenannte β -barrels beziehungsweise β -Sandwichs (11,12). Diese Struktur ist bei einigen Proteinen des Lipoxygenase-Stoffwechsel vorhanden, wie Lipoxygenasen, Phospholipase A₂ (PLA₂), Proteinkinase C (PKC) sowie bei mehr als 400 weiterer Proteine, die aber nicht näher mit dem Lipoxygenase-Stoffwechsel in Verbindung gebracht werden können (13).

Die C-terminale Domäne stellt den katalytischen Teil des Enzyms dar, da sie das aktive Zentrum mit einem nicht-Häm-Eisen(II)-Ion enthält, das durch drei Histidine fixiert bzw. „koordiniert“ wird. Zusätzlich helfen bei der Ausrichtung des Eisens eine Asparaginsäure und ein Isoleucin (14). Bisher konnte nur von Ratten-Retikulozyten-15-LO eine Kristallstruktur ermittelt werden. Alle anderen Lipoxygenasen, auch 5-Lipoxygenase, konnten bisher nicht strukturell aufgeklärt werden (15). Es konnte auf Basis der Strukturdaten der Kaninchen-Retikulozyten-15-LO ein homologes Modell der 5-Lipoxygenase *in silico* erstellt werden (16). Eine Möglichkeit der visuellen Umsetzung zeigt Abbildung 2.5.

Reinterpretationen der bekannten Kristallisationsdaten der 15-LO konnten zeigen, dass das Protein bei diesen Kristallisationsdaten als Dimer vorliegt und eine „offene“ und eine „geschlossene“ Form besitzt (Abb. 2.3) (17).

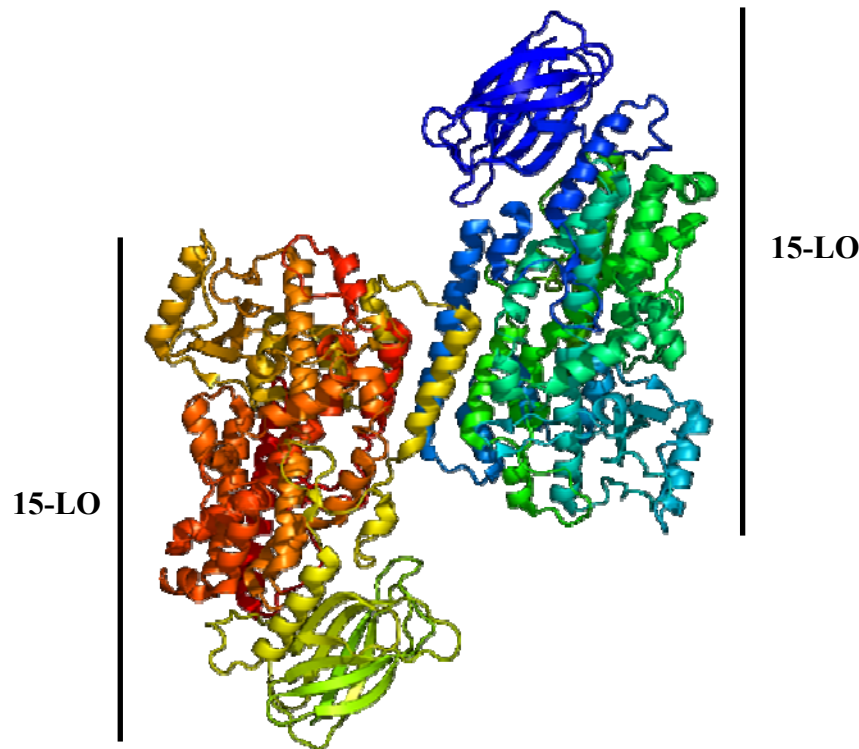


Abb. 2.3 Reinterpretierte Kristallstruktur-Daten der 15-LO. Das Homodimer hat seine Kontaktflächen auf der katalytischen Domäne. Die Ausrichtung erfolgt nach dem Muster head-body / body-head (17).

2.3. 5-Lipoxygenase

2.3.1. 5-LO-Gen-/Protein-Expression

Das humane 5-LO-Gen befindet sich auf Chromosom 10q11.2 und hat eine Länge von 82 Kilobasen (kb), der Promoter weist eine Länge von 6,1 kb auf und das 5-LO-Gen organisiert sich in 14 Exons und 13 Introns (18). Die meisten anderen Lipoxygenasen sind auf Chromosom 17p13 lokalisiert (19). Dem 5-LO-Promoter fehlen typische TATA- oder CCAAT-Transkriptions-Initialelemente, demgegenüber ist der Promoter sehr reich an G- und C-Basen. Entsprechende GC-Boxen wurden identifiziert, die potentielle Response-Elemente (Erkennungselemente) für SP-1/3 und Egr-1/2 enthalten, diese sind für die basale 5-LO-Transkription wichtig. Zusätzlich wurden innerhalb des 5-LO-Promoters weitere Konsensus-Bindungsstellen nachgewiesen, unter anderem für die Transkriptionsfaktoren myb, AP-2, und NF- κ B (20,21), für die nukleären Rezeptoren ROR α 1 und ROR α 4 (*retinoic acid receptor related orphan-receptor alpha*) (22) sowie für die Response-Elemente des Vitamin D-Rezeptors und für TGF β (23).

Einleitung

Die cDNA der humanen 5-Lipoxygenase kodiert für ein Protein aus 673 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 77,8 kDa (24). Die Expression des 5-LO-Proteins erfolgt vorwiegend in Zellen myeloiden Ursprungs und kann in Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden (25). T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten sind dagegen 5-LO-negativ. Einige andere Zelltypen weisen ebenfalls eine 5-LO-Expression auf, dazu zählen differenzierte Keratinozyten (26) sowie epidermale Langerhans-Zellen (27). Abbildung 2.4 zeigt eine visuelle Umsetzung der Screening-Daten, die durch eine Genexpressionsanalyse in Geweben durchgeführt wurde.

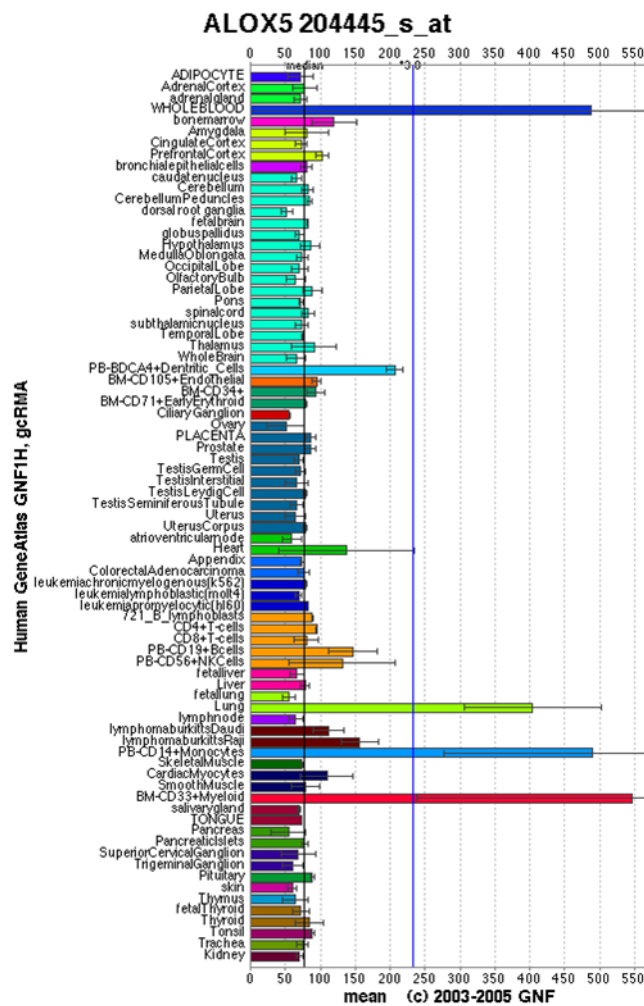


Abb. 2.4 Ergebnisse einer Hochdurchsatz-Genexpressions-Profilanalyse der Transkriptionsaktivität in ausgewählten, gepoolten Geweben, Organen und Zelllinien des Menschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Proben unter physiologischen Bedingungen verwendet wurden. Durch diese Annahme gibt die Auswertung einen Einblick auf die Verteilung der 5-LO unter Normalbedingungen. Die Abbildung zeigt die Häufigkeit des Auftretens der 5-LO-mRNA im Vergleich zum Mittelwert (28).

Die Expression der 5-LO findet häufig zusammen mit der Expression von FLAP (5-Lipoxygenase aktivierendes Protein) statt (25). Die Differenzierung der myeloiden Zelllinien HL-60 und MM6 mit Calcitriol und TGF β führt zu einer deutlichen Induktion der mRNA-

Menge, Proteinexpression und Enzymaktivität der 5-LO (29-31). DMSO, PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat), GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) oder Interleukin-3 führen ebenfalls zu einer Erhöhung der 5-LO mRNA-Menge in einigen leukozytären Zellen (32). Die 5-LO-Expression wird durch DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung reguliert. So führt die Behandlung von 5-LO-negativen Zelllinien U937 und HL-60TB mit demethylierendem Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu einer Hochregulation der Expression des 5-LO-Primärtranskripts und der mRNA-Reifung (33). Für die maximale Induktion der 5-LO-Genexpression durch Calcitriol und TGF β liegt der Promoter demethyliert vor. Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A vermag außerdem die Aktivität des 5-LO-Promoters in MonoMac 6-Zellen zu aktivieren (34).

2.3.2. Struktur

Die einzige Lipoxygenase die aus Säugetieren stammt und strukturell aufgeklärt ist, ist die Kaninchen-Retikulozyten-15-LO (genauer eine 12-/15-LO) (15). Basierend auf dieser Kristallstruktur wurde die 5-LO-Struktur *in silico* berechnet (Abb. 2.4). Das 5-LO-Modell wird als Monomer mit zwei Domänen (regulatorische und katalytische) dargestellt. Die dominierende katalytische C-terminale Domäne (Aminosäure 121 bis 673) enthält ein Eisenatom, das durch zwei konservierte Histidine und das C-terminale Isoleucin-673 in seiner Position fixiert wird. Das zentrale 2-Histidin-1-Carboxylat Gerüst ist ein typisches Merkmal eines Aktivitätszentrums eines nicht-Häm-Eisen(II)-Enzyms. Die kleinere N-terminale Domäne (Aminosäure 1 bis 114) ist eine C2-ähnliche Domäne mit β -Sandwichs mit typischen Ligandenbindungsschleifen (*Loops*). Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäurereste in diesen *Loops* Ca²⁺ und Membranlipide binden können (35,36).

Die Position N43, D44 und E46 im β -Sandwich sind als Ca²⁺-Bindungsstelle identifiziert worden, da nach Mutation die Bindungsaffinität für Ca²⁺ sank. Die Tryptophane 13, 75 und 102 sind für die Bindung von Phosphatidylcholin verantwortlich. Eine Mutation der Tryptophane bedingt eine fehlende Translokation der 5-LO nach zellulärer Aktivierung.

In der katalytischen Domäne sind fünf sogenannte Eisen-Liganden identifiziert worden (Histidin 367, 372, 550, Asparaginsäure 554 und Isoleucin 673).

Bisher sind drei potentielle Phosphorylierungsstellen entdeckt worden (Serin 271 durch MK2, LERQLS; Serin 663 durch ERK2, YLSP; Serin 523 durch PKA, RKSS).

Durch ein Labelling mit dem ATP-Analogon 2-Azido-ATP konnte eine potenzielle ATP-Bindungsstelle identifiziert werden, die aus den Tryptophanresten 75 und 201 gebildet wird.

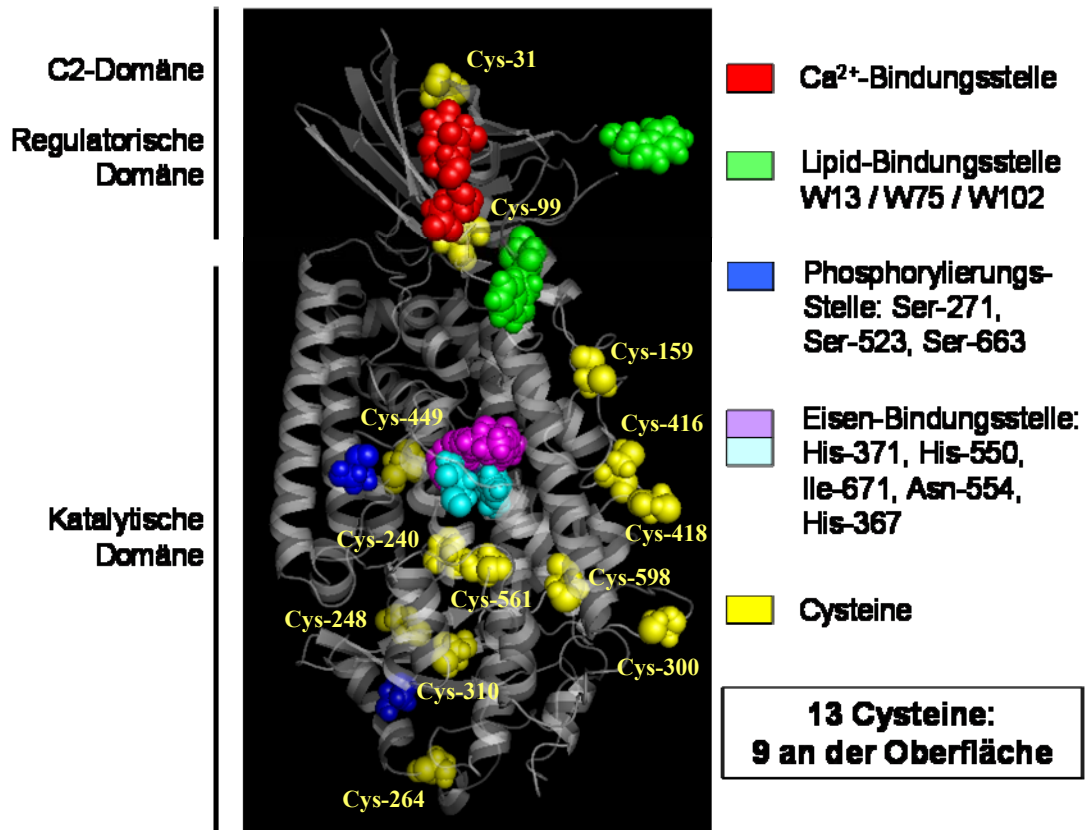


Abb. 2.5 Schematische Darstellung der 5-LO-Struktur basierend auf der Kristallstruktur von Kaninchen-15-LO.

2.3.3. Enzymatische Eigenschaften

Die 5-Lipoxygenase katalysiert in einer zweistufigen Reaktion Leukotrien A₄ (LTA₄) aus dem Substrat Arachidonsäure, das im zellulären Kontext aus einem Phospholipid wie Phosphatidylcholin durch die zytosolische Phospholipase A₂ freigesetzt wird. Die Katalyse unterteilt sich in die zuerst ablaufende Oxygenierung, d.h. dem Einfügen von molekularem Sauerstoff an Position 5 der Arachidonsäure und der nachfolgenden LTA₄-Synthase-Reaktion im zweiten Teil der Reaktion, wobei aus dem Hydroperoxid 5-HpETE (5-Hydroperoxyeicosatetraensäure), ein instabiles Epoxid gebildet wird, das LTA₄ (Abbildung 2.6).

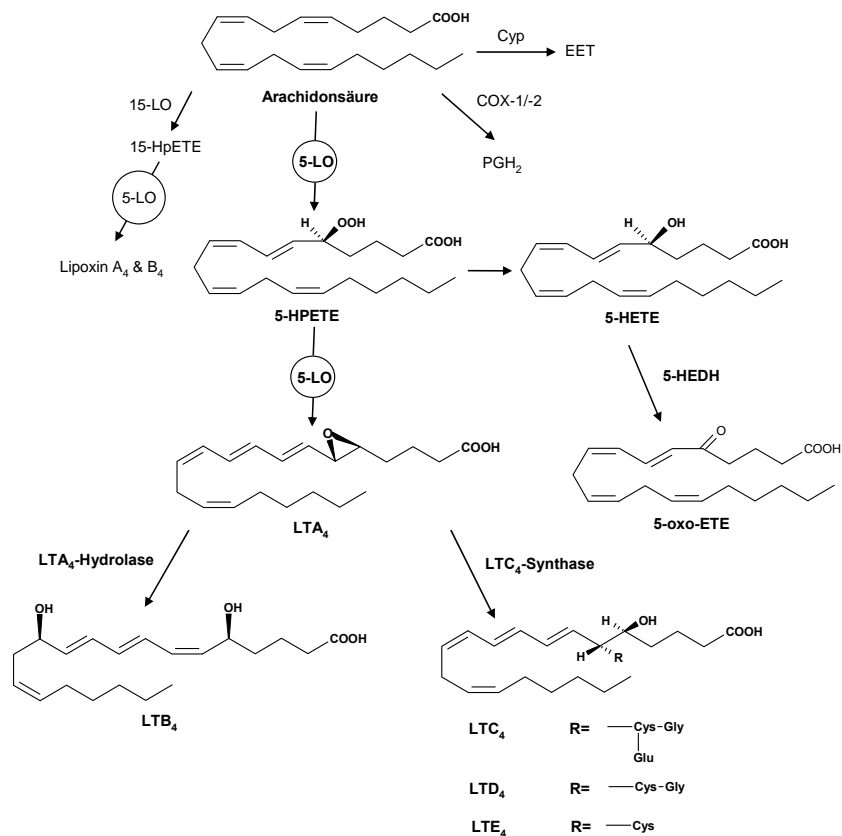


Abb. 2.6 Metabolisierungskaskade von Arachidonsäure mit Fokus auf die 5-Lipoxygenase.

LTA_4 wird durch LTA_4 -Hydrolase zu stabilem LTB_4 umgewandelt. LTC_4 -Synthase katalysiert, durch Konjugation von Glutathion an LTA_4 , Leukotrien C_4 (LTC_4), das durch nachfolgende enzymatische Prozesse zu LTD_4 und LTE_4 umgewandelt wird. LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 werden als Cysteinyl-Leukotriene zusammengefasst. 5-HpETE kann zu seinem korrespondierenden Alkohol 5-HETE reduziert werden. 5-HETE ist sehr stabil und kann durch 5-Hydroxyeicosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) zu 5-oxo-EETE umgewandelt werden. Alle aufgeführten Substanzen stellen potente Mediatoren dar, deren Wirkungen in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind und in Abbildung 2.7 dargestellt werden (37).

Mediator	Effekt	Rezeptor	Literatur
LTB_4	Proinflammatorische Funktionen (Aktivierung von Neutrophilen, Chemotaxis)	BLT-1,-2	(38,39)
$\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$	Kontraktion der glatte Muskelzellen der Bronchien; vaskuläre Permeabilität; Anlockung von Eosinophilen	CysLT-1, -2	(40)
5-HETE	Induktion von Entwicklung und Wachstum, Anlockung von Eosinophilen, Förderung der Tumorentwicklung	5-HETE-Rezeptor	(41-43)
5-oxo-EETE	Chemischer Lockstoff für Eosinophile und Granulozyten, proinflammatorisch	5-oxo-EETE-Rezeptor	(44,45)
Lipoxine	Antiinflammatorische Funktionen (Erniedrigung der Infiltration von Neutrophilen), Aktivierung von Makrophagen	ALX	(46,47)

Tabelle 2.1 Biologische Effekte von Produkten des 5-Lipoxygenase-Stoffwechsels.

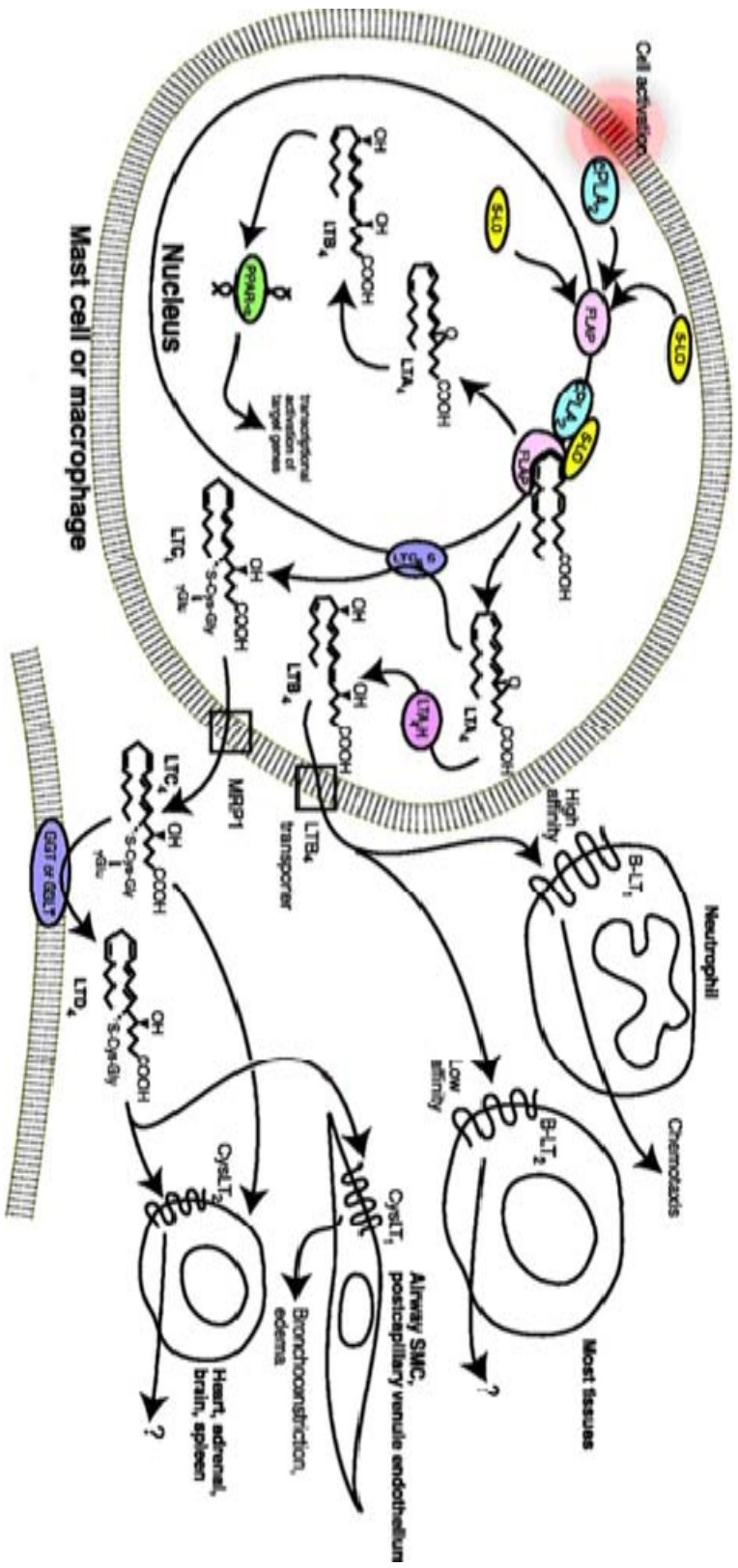


Abb. 2.7 Nach Aktivierung der zellulären Mastzelle oder Makrophage durch Immunglobulin E (IgE)-Antigen-Komplexe, Ionophor, oder andere Reize, beginnt eine Kaskade von zunächst zellulären Ereignissen. Die Zellaktivierung führt über verschiedene Stufen zur Biosynthese von Leukotrienen. cPLA₂, ebenso wie die 5-LO, transloziert an die Kernhülle, 5-LO transloziert entweder aus dem nukleären oder zytoplasmatischen Kompartiment. FLAP, ein integrales Protein der Kernhülle, dass als Arachidonsäure-transferierendes Protein fungiert und die Präsentation der AA für die 5-LO erleichtert, ist bei der Synthese von LTA₄ anwesend. LTA₄ und LTB₄ können auf beiden Seiten der Kernhülle gebildet werden, entweder von nukleären oder von zytoplasmatischen Pools der 5-LO und LTA₄-Hydrolase. Ein unbekannter Transporter erleichtert den Efflux von LTB₄ aus der Zelle. LTB₄ führt durch den BLT₁-Rezeptor zu einer Chemotaxis von Neutrophilen, der Mechanismus über den BLT₂-Rezeptor ist nicht bekannt. LTB₄ kann intrazellulär über die nukleären Transkriptionsfaktoren PPARα-Gene induzieren, die an der β-Oxidation beteiligt sind. Dies führt zu einer negativen Feedback-Schleife, die den metabolischen LTB₄-Abbau fördert, wodurch die proinflammatorischen Ereignisse eingeschränkt werden. LTA₄ kann durch LTC₄-Synthase zu LTC₄ konvertiert werden, einem FLAP-ähnlichen Protein, das in der Kernhülle lokalisiert ist. Das multidrug resistance-associated Protein (MRP1) erleichtert die Exozytose von LTC₄ aus der Zelle, wo es von extrazellulär lokalisiertem γ-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) oder von γ-Glutamyl-Leukotrienase (GGLT) zu LTD₄ verstoffwechselt werden kann. Glatte Muskelzellen der Lunge (SMC) können über CysLT₁ Rezeptoren durch LTD₄ aktiviert werden, wodurch eine Bronchokonstriktion ausgetriggert und Ödeme gebildet werden können.

2.3.4. Regulation der zellulären Aktivität

2.3.4.1. Calcium-Ionen

Ca^{2+} aktiviert die 5-LO, indem es die Translokation von zytosolischer 5-LO an die nukleäre Membran induziert. Dieser Effekt wird bei der Aktivierung von Leukozyten deutlich, da 5-LO vom Zytosol oder vom Kern zur perinukleären Membran wandert und die Leukotrienbildung forciert wird. Die dabei auftretende Zusammenlagerung von zytosolischer Phospholipase A_2 (cPLA_2), 5-LO und dem membranständigen FLAP (5-LO aktivierendes Protein) lässt sich dadurch begründen, dass als Quelle für das verwendete Substrat Arachidonsäure membrangebundenes Phospholipid dient. Peters-Golden und Brock zeigten, dass die Kernhülle, die neben FLAP auch LTC_4 -Synthase als integrale Membranproteine enthält, die Biosynthese von Leukotrienen unterstützt (48) (Abb. 2.8).

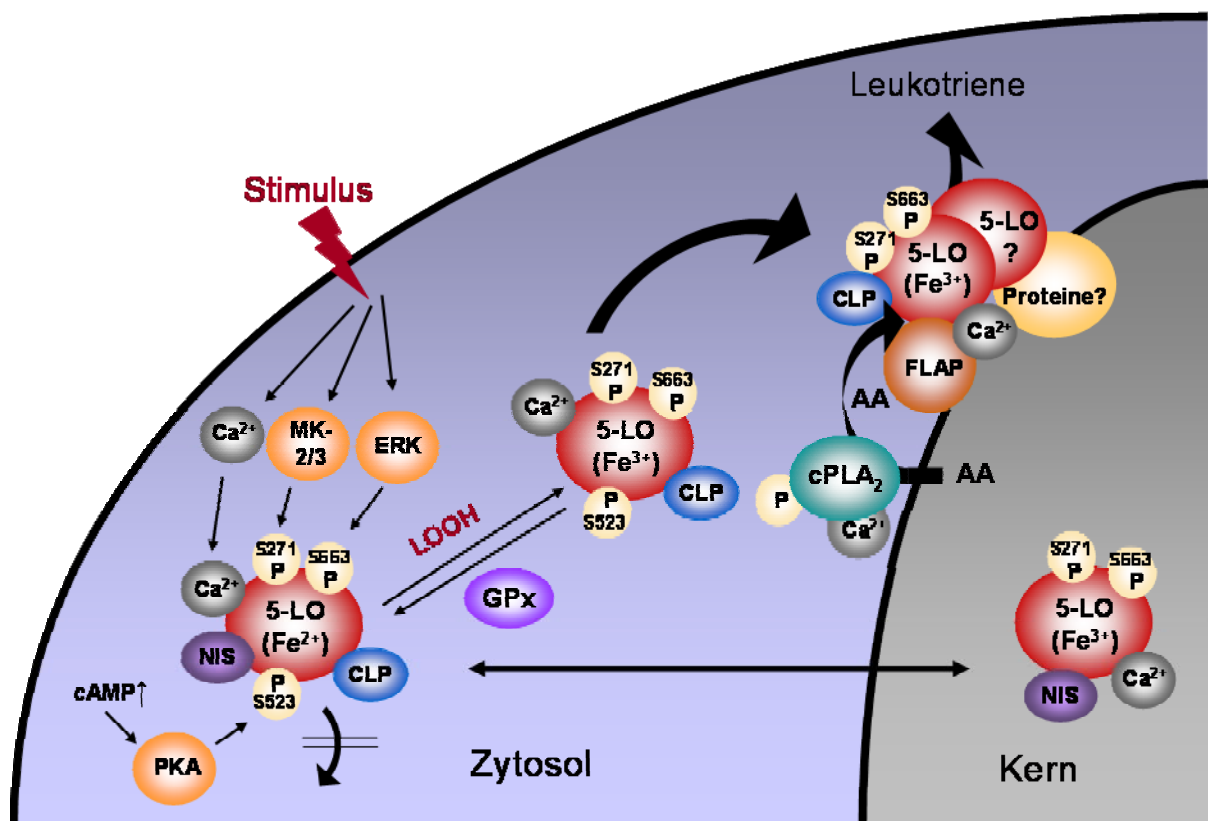


Abb. 2.8 Zelluläre 5-LO-Aktivierung (49).

Es gab frühe Erkenntnisse darüber, dass Ca^{2+} eine Rolle in der 5-LO-Regulation spielt. Als Bach et al. 1974 die SRS-A und Borgeat 1979 den Arachidonsäure-Metabolismus nach Aktivierung mit Ionophor beschrieb, war eine Beteiligung von Ca^{2+} an der Regulation der 5-LO-Aktivität vorgezeichnet. Die ersten Ergebnisse erzielte man mit einer subzellulären Präparation, die die 5-HETE-Synthese in Homogenaten von RBL1-Zellen stimulierte (50). Im zellfreien Assay konnte Ca^{2+} gereinigte 5-LO aktivieren, es gibt aber auch Veröffentlichungen

Einleitung

die beschreiben, dass die Aktivierung der gereinigten 5-LO auch ohne Ca^{2+} möglich ist (51-55).

Der EC_{50} -Wert für die Aktivierung von gereinigter 5-LO durch Ca^{2+} ist sehr niedrig (1 bis 2 μM), die volle Aktivierung wird bei 4 bis 10 μM erreicht (36,56,57). Es konnte gezeigt werden, dass die 5-LO reversibel Ca^{2+} bindet (35). Diese Versuche wurden mit Hilfe von Gleichgewichts-Dialysen durchgeführt und es konnte für das intakte Enzym ein K_d von annähernd 6 μM bestimmt werden. Die Stöchiometrie der maximalen Bindungskapazität an Ca^{2+} beträgt 2 Moleküle pro 5-LO. Vergleichbare Resultate (zwei Ca^{2+} pro 5-LO, K_{Ca} 7 bis 9 μM) wurden für die Histidin-getaggte C2-ähnliche Domäne (Aminosäuren 1 bis 115) gezeigt (58). Interessanterweise ist die K_d von 6 μM und die benötigte Ca^{2+} -Konzentration für die Aktivierung der gereinigten 5-LO um ein Vielfaches höher als die gemessene Ca^{2+} -Konzentration, die für die Stimulation der 5-LO in PMNL benötigt wird (ca. 200 nM) (59). C2-Domänen binden typischerweise Ca^{2+} über sogenannte Ligandenbindungsschleifen (*loops*). Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Aminosäuren N43A/D44A/E46A innerhalb der loop 2 der N-terminalen C2-ähnlichen Domäne (β -Sandwich) dazu führen, dass die Aktivierung der 5-LO durch Ca^{2+} verloren geht.

Ca^{2+} begünstigt die 5-LO-C2-Domänen-Membranassoziation und es führt zu einer weniger stark ausgeprägten Hemmung von GPx1-gehemmter 5-LO. Dieser Effekt konnte auch bei der loop2-5-LO-Mutante gezeigt werden, die eine reduzierte Ca^{2+} -Bindungsaffinität zeigt (11). Ca^{2+} erhöht möglicherweise die Affinität von 5-LO zu Fettsäureperoxiden, wodurch eine niedrigere Fettsäureperoxid-Konzentration ausreicht, um die Bildung des zentralen, aktiven Eisen(III)-Atoms zu stimulieren. Es gibt Hinweise, dass die 5-LO zwei Fettsäure-Bindungsstellen besitzt, wobei eine Bindungsstelle katalytische und eine regulatorische Eigenschaften besitzt (51,60).

2.3.4.2. ATP

ATP kann die Aktivität der gereinigten 5-LO um den Faktor sechs steigern. Andere Nukleotide, wie AMP, ADP, cAMP, CTP und UTP stimulieren in einem geringeren Ausmaß ebenfalls die 5-LO-Aktivität (61-63). Der ATP-Effekt ist Ca^{2+} -unabhängig und besitzt einen EC_{50} von 0,1 mM (54,62,64). In intakten Zellen agiert ATP in einem Komplex mit Mg^{2+} (55). ATP bindet in equimolarer Konzentration an die 5-LO (14).

2.3.4.3. Membrane und Membranbestandteile

Viele C2-Domänen vermitteln die Ca^{2+} -induzierte Membranassoziationen (12,65). Es wurde beobachtet, dass die 5-LO-Aktivität während der Aufreinigung der 5-LO aus humanen Leukozyten von mikrosomalen Membranen abhängig ist (52,66). Phosphatidylcholin (PC) wurde als stabilisierender Faktor zu den 5-LO-Aufreinigungen zugesetzt (67,68) und synthetische PC-Vesikel konnten die zellulären Membranen als stimulatorischen Faktor für die 5-LO-Aktivität ersetzen (69). PC wird für die basale und Ca^{2+} -abhängige Stimulierung der 5-LO-Aktivität *in vitro* benötigt (54,55). Es wird angenommen, dass 5-LO an einer Lipid-Wasser-Phase zwischen den Phasen im Zusammenspiel mit cPLA₂ aktiv ist (70,71). Zusätzlich zu diesen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Ca^{2+} eine Zusammenlagerung der 5-LO mit synthetischen PC-Liposomen verursacht (57), indem Ca^{2+} (Mg^{2+} ebenfalls) die Hydrophobizität der 5-LO erhöht. Dies wurde in einem Phasen-Trenn-Assay erfolgreich untersucht (35,55). In Gegenwart von Ca^{2+} besitzt die isolierte C2-ähnliche-5-LO-Domäne eine höhere Affinität zu zwitterionischen PC-Vesikeln als zu anionischen Phosphatidylserin (PS)- und Phosphatidylglycerol (PG)-Vesikeln. Durch Mutationsanalysen konnten drei Tryptophane (13, 75 und 102) identifiziert werden, die für die Membranbindung essentiell sind. Es konnte gezeigt werden, dass eine Triple-Mutante W13A/W75A/W102A-5-LO nicht mehr mit PC-Vesikeln interagiert und keine Membran-abhängige 5-LO-Aktivität zeigt. Die PC-Selektivität der C2-ähnliche-5-LO-Domäne gibt einen Hinweis auf die zielgerichtete Bindungsneigung der 5-LO an die Kernmembran (58), die durch Experimente mit GFP-5-LO-Konstrukten unterstützt wird, welche in Ionophor-stimulierten HEK 293-Zellen eine Translokation der GFP-5-LO-Konstrukte an die nukleäre Membran zeigen (72). Weitere Untersuchungen bestätigen nochmals die Ca^{2+} -induzierte Bindung von 5-LO an zwitterionischem PC-Vesikel, wodurch es zu einer Stimulierung der 5-LO-Aktivität kommt. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass negativ geladene Phospholipide, wie PG, PS, PA, PI, PIP und PIP₂ sowie Sphingolipide die 5-LO-Aktivität hemmen. DMEPC (Diacylglycerophospholipid) hingegen, ein kationisches Phospholipid, konnte in gemischten PC/DMEPC-Vesikeln Ca^{2+} -unabhängig an 5-LO binden, wobei die 5-LO-Aktivität Ca^{2+} -abhängig gesteigert war. Dies fördert die Annahme, dass für die 5-LO-Membranbindung ein produktiver und ein nicht-produktiver Zustand existiert, der Ca^{2+} -abhängig die 5-LO-Aktivität beeinflusst. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Assoziation zu einer Stabilisierung der Strukturen von 5-LO-Enzym und der Membran führt (73).

Einleitung

Eine Erhöhung der Membranfluidität durch Cholesterol, fördert eine 5-LO-/Membran-Assoziation. Die Zugabe von Cholesterol zu einer Membranpreparation reduzierte die 5-LO-Aktivität auf 50 Prozent (74).

Ähnlich wie bei der cPLA₂ (enthält eine C2- und eine katalytische Domäne) (75,76) und der 15-LO (77) sind einige Aminosäurereste der regulatorischen Domäne der 5-LO an der Membranbindung beteiligt.

Eine andere Lipidklasse, nämlich Diglyceride, aktivieren die 5-LO. OAG (1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol) ist das potenteste Lipid, das getestet wurde (78). Die 5-LO-Aktivierung durch OAG gelingt *in vitro* nur in Abwesenheit von Ca²⁺. Die Zugabe von Phospholipiden oder zellulären Membranen verhindern ebenfalls die Stimulierung durch OAG. Die Triple-Mutante W13/75/102A-5-LO ist durch OAG nicht stimulierbar, wodurch naheliegt, dass OAG an die postulierte Phospholipid-Bindungsstelle bindet, die durch Tryptophane 13, 75 und 102 gebildet wird.

2.3.4.4. 5-LO-Phosphorylierung

5-LO kann an drei Stellen phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung an Serin-271 durch MAPKAP Kinase 2 (79) und an Serin-663 durch ERK2 (80) führt zur Aktivierung der 5-LO. An Serin-523 wird die 5-LO durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert. Dies hat einen hemmenden Einfluss auf die 5-LO-Aktivität (81). Es konnte schon 1991 gezeigt werden, dass Kinasen die zelluläre Aktivität der 5-LO beeinflussen können, da Peters-Golden et al. eine Korrelation zwischen der PKC- und 5-LO-Aktivität in Makrophagen herstellen konnten (82). 1996 konnte durch Lepley et al. phosphorylierte 5-LO durch Immunopräzipitation aus einer subzellulären Fraktion nachgewiesen werden. Die dabei verwendeten HL60-Zellen wurden mit ³²P-Phosphat radioaktiv markiert und mit Ionophor stimuliert (83). Inhibitoren von Tyrosinkinase und einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase [PD098059] (MKK) konnten die 5-LO-Aktivität in Neutrophilen und HL60-Zellen reduzieren. Die Inhibitoren konnte die Translokation der 5-LO an den Zellkern hemmen. Möglicherweise kann eine 5-LO-Phosphorylierung die Bindung an andere Proteine beeinflussen (83,84).

Die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAP-Kinase) existiert in verschiedenen Isoformen, die jeweils durch Zellstress oder durch Behandlung der Zellen mit entzündungsrelevanten Zytokinen aktiviert werden (85). Aktivierte p38 MAP-Kinase wiederum phosphoryliert und aktiviert MAPKAP-Kinase 2 und 3 (MK2/3). Es konnte durch *in-gel* Kinase-Experimente gezeigt werden, dass 5-LO ein Substrat der MK2/3 darstellt, wobei die 5-LO-Kinasen aktiviert wurden, nachdem MonoMac 6 Zellen, PMNL und B-

Lymphozyten durch verschiedene Stimuli aktiviert wurden (79,86). Mutation von Serin-271 zu Alanin verhindert die 5-LO-Phosphorylierung durch MK2 *in vitro*. Die Phosphorylierung durch Kinasen, die aus PMNL und MonoMac 6-Zellen präpariert wurden, wurde ebenfalls deutlich reduziert, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass Serin-271 eine wichtige Rolle bei der zellulären Phosphorylierung der 5-LO darstellt (87). Vergleicht man die Stärke der 5-LO-Phosphorylierung mit dem idealen Substrat, dem Hitzeschockprotein-27, ist 5-LO *in vitro* durch MK2 nur schwach phosphoryliert. Die Zugabe von ungesättigten Fettsäuren (AA, Ölsäure und andere) erhöht die 5-LO-Phosphorylierung durch MK2 *in vitro* erheblich. Möglicherweise binden die ungesättigten Fettsäuren an eine regulatorische Fettsäure-Bindungsstelle der 5-LO (51,60), wodurch die 5-LO-Stimulation durch Phosphorylierung von Ser-271 oder Serin-663 verbessert wird.

2.4. 5-LO/Protein-Interaktion

Bisher konnte für vier Proteine eine Protein-/5-LO-Interaktion nachgewiesen werden. Bei drei Interaktionen wurde mit Hilfe des *yeast two-hybrid system* die Wechselwirkung experimentell gezeigt. Dabei wurde humane cDNA von Gewebe der Lunge als Quelle für das Screeningsystem verwendet (88). FLAP, cPLA₂, LTA₄-Hydrolase sowie LTC₄-Synthase konnten bisher nicht als direkte Interaktionspartner nachgewiesen werden. Besonders FLAP galt bzw. gilt als direkter Interaktionspartner für 5-LO, da FLAP als sogenannter Membrananker für die 5-LO beschrieben wird. Hierfür konnte bisher kein experimenteller Nachweis erfolgen.

2.4.1. Coactosin-like protein (CLP)

CLP (Genname: COTL1; SwissProt: Q14019) hat ein Molekulargewicht von 15,9 kDa und besteht aus 142 Aminosäuren. Die entsprechende genetische Information für CLP wird auf dem Chromosom 16q24.1 codiert. Die Proteinstruktur konnte 2004 aufgeklärt werden (Abb.2.9). CLP bindet an F-Actin, zeigt aber keinen Effekt auf die Actin-Polymerisation. CLP wird auch als Actin-bindendes Protein bezeichnet (89). Die Interaktion mit 5-LO konnte mit Hilfe des *yeast two-hybrid system* erstmals gezeigt werden (88) und durch weitere Experimente bestätigt werden. Die Bindung von CLP an die 5-LO erfolgt Ca²⁺-unabhängig, pH-abhängig und in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (90). CLP ist im Zytosol lokalisiert. Die Aminosäureposition Lysin-75 ist wichtig für die Wechselwirkung mit Actin (89) und Lysin-131 ist bei der Interaktion mit 5-LO beteiligt (90). Es konnte bisher kein Actin/CLP/5-LO-Komplex nachgewiesen werden, aber es konnte gezeigt werden, dass 5-LO

Einleitung

mit Actin um die Bindung an CLP konkurriert. Es konnte sogar gezeigt werden, dass 5-LO mit der Actin-Polymerisation interferiert (90).

CLP bindet ungesättigte Fettsäuren, wie 5-HETE und LTB₄. Dies konnte mit Hilfe von *pull down*-Experimenten mit biotinylierter 5-HETE bzw. LTB₄ aus Homogenaten von RBL-1-Zellen (Maus) gezeigt werden (91).

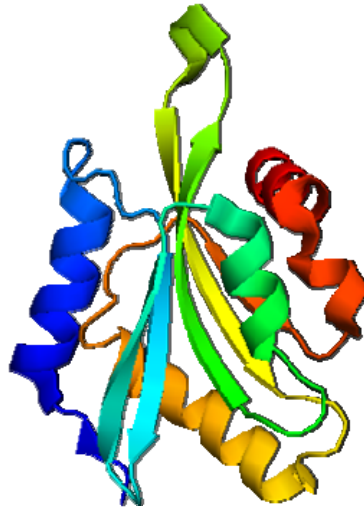


Abb. 2.9 CLP Struktur (92).

Ewing et al. konnten 2007 mehrere weitere Protein/CLP-Interaktionen zeigen (93). Dabei wurden 338 Proteine ausgewählt, die eine bedeutende Rolle bei Erkrankungen oder funktionellen Ereignissen haben. Die cDNA dieser Flag-getagten Proteine wurde in HEK293-Zellen transfiziert, die Zellen nach Kultivierung lysiert und die Homogenate über Agarose, an die Flag-spezifische Antikörper gebunden wurde, gegeben. Die resultierenden Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die erhaltenen positiven Banden wurden isoliert, verdaut und mit Hilfe von LC-ESI-MS/MS identifiziert. Für CLP konnten die folgenden interagierenden Proteine nachgewiesen werden: PINX1, VHL, PRKAB1 und IKBKE.

PINX1 steht für *Pin2-interacting protein XI* (bzw. *TRF1-interacting protein 1*). PINX1 ist ein potenter Telomerase-Inhibitor und am Zellzyklus beteiligt (94-96).

VHL steht für *Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor*, einem Protein, dass bei der Ubiquitinierung und dem nachfolgenden Abbau von Proteinen beteiligt ist. Das Protein ist Bestandteil des Elongin BC-Komplex, der in weiterer Folge unter anderem mit Hsp70 interagiert (97,98).

PRKAP1 steht auch für AMPK bzw. *5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-1*. AMPK ist für die Regulierung der Fettsäuresynthese durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-

Carboxylase verantwortlich. Zusätzlich ist es an der Regulierung der Cholesterolsynthese durch Phosphorylierung und Inaktivierung der Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase beteiligt. Die Untereinheit hat einen positiv regulierenden Einfluss auf die Aktivität des Gesamtproteins AMPK. Osler et al. berichten von AMPK als Schlüssel-Kinase der Lipidoxidation des Skelettmuskels (Review: (99)).

IKBKE steht für *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon*. Die Funktion besteht in der Phosphorylierung von IκB-Proteinen an Serinen, wodurch IκB ubiquitiniert und anschließend abgebaut wird (100). Durch den Abbau des IκB-Komplexes wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, dem eine wichtige Rolle bei Entzündung, Immunabwehr, Zellproliferation und Apoptose zuteil wird.

2.4.2. Dicer

Dicer gehört zur Familie der Ribonukleasen, den RNase III-Enzymen. Das Enzym besteht aus 1922 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 219 kDa. Die genetische Information ist auf Chromosom 14q32.13 codiert. Das Gen (DICER1) hat eine Länge von 10,2 kbp. Die Enzyme dieser Familie können doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) zu kleineren interferierenden, *small interference*, RNA-Moleküle (siRNA) schneiden. Diese Fragmente sind zwischen 20 und 25 Nukleotide lang. Die siRNA wird nach Degradierung des sense-Stranges in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) übertragen, der komplementär an die Ziel-mRNA bindet. Nach der Öffnung der Ziel-mRNA wird diese durch den RISC gespalten und durch endogene Prozesse abgebaut (101-103).



Abb. 2.10 Struktur von Dicer (*Giardia intestinalis*). Die RNase III-Bereiche sind grün gefärbt, die PAZ-Domäne gelb, die Basisdomäne rot und die Verbindungshelix ist blau. Die Distanz zwischen der RNase III und PAZ-Domäne und die Anordnung der Verbindungshelix könnte einen Hinweis auf die Länge der zu erhaltenen siRNA sein, die von den unterschiedlichen Dicer-Varianten erzeugt werden können (104). Eine Kristallstruktur der humanen Dicer-Variante ist auch verfügbar (105).

Dieser Prozess ist wichtig beim sogenannten *gen silencing*, d.h. es ist möglich, die Information, die von einem genetischen Abschnitt geliefert wurde (homologe mRNA), durch kurze RNA-Moleküle (siRNA) zu binden und zu inaktivieren.

Da man die benötigte Information für die siRNA berechnen kann, ist daraus eine wertvolle technische Anwendung für das molekularbiologische Labor erwachsen (RNA-Interferenz; RNAi) (106).

Mit Hilfe des *yeast two hybrid system* konnte eine Wechselwirkung zwischen der 5-LO und Dicer gezeigt werden (88). Eine biologische oder funktionelle Verbindung zwischen den Proteinen konnte bisher nicht gezeigt werden.

2.4.3. Growth factor bound receptor protein 2 (Grb2)

Grb2 (Swiss-Prot: P62993) ist ein Adapterprotein, das bei der Zell-Kommunikation und bei der Signalweiterleitung eine Rolle spielt. Es bindet den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und kann durch diese Bindung die nachgelagerten RAS-vermittelten Prozesse, wie z.B. ERK1/2-Aktivierung beeinflussen (107,108). Möglicherweise spielt eine Dimerisierung eine größere Rolle (109,110). Das Protein enthält eine SH2- und zwei SH3-Domänen (111). Die SH3-Domänen können mit Prolin-reichen Bereichen anderer Proteine in Wechselwirkung treten (112), die SH2-Domäne mit Phosphotyrosinen (113).

Das Protein besteht aus 217 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Die genetische Information ist auf Chromosom 17q24.3-q25 lokalisiert, das Gen hat eine Länge von 75 kb und besteht aus 5 Exons.

Die SH2/3-Domänen des Grb2 ermöglichen es dem Protein mit einer Vielzahl von weiteren Proteinen zu interagieren.

Die Interaktion von Grb2 an 5-LO wird über die SH3-Domäne des Grb2 und der Prolin-reiche Regionen der 5-LO vermittelt. Gereinigte 5-LO bindet an ein GST-Grb2-Fusionsprotein und an ein korrespondierendes Peptid. Diese Bindung an das korrespondierende Peptid, dass an SH3-bindende Bereiche der 5-LO binden kann, konnte die Ausbildung des 5-LO/Grb2-Komplexes inhibieren (114). Das Peptid konnte zusätzlich die Translokation der 5-LO vom Zytosol zur Kernmembran nach Stimulation mit Ionophor hemmen (114). Weiterführende Erkenntnisse über die biologische Funktion dieser Interaktion konnten bisher nicht gezeigt werden. Da Grb2 an dem Tyrosinkinase-vermittelten Signal-Transduktionsweg beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch die 5-LO in diesen zellulären Signalweg involviert ist.

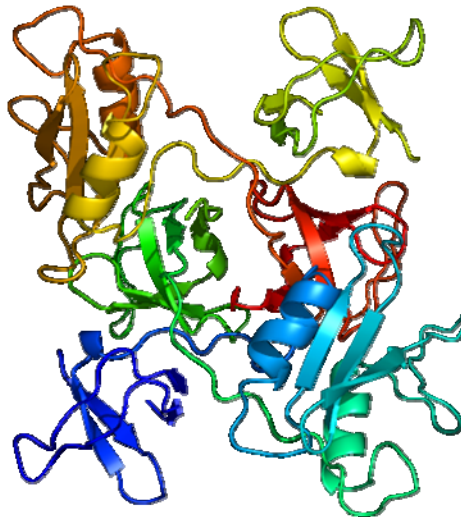


Abb. 2.11 Kristallstruktur von Grb2 (115).

2.4.4. Transforming growth factor β receptor-associated protein 1 (TRAP-1)

TRAP-1 (Genname: TGFBRAP1, SwissProt: O60466_HUMAN) steht für TGF β -Rezeptor-assoziiertes Protein 1. Das Protein besteht aus 860 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 97 kDa. Die genetische Information ist auf Chromosom 2q12.1-q12.2 lokalisiert. Es besteht eine Verwechslungsgefahr mit TNF receptor-associated protein 1, das auch als TRAP-1 (SwissProt: Q12931) bezeichnet wird und den Hitzeschockproteinen zugeordnet wird.

TRAP-1 bindet den aktivierten TGF β -Rezeptor. Durch Interaktion mit Smad4 kommt es zu einer Beeinflussung der Smad-vermittelten Signalweiterleitung (14). TRAP-1 wird die Funktion eines Smad4-Chaperons zugeschrieben (116). Die Bindung von 5-LO an den C-terminalen Teil von TRAP-1 konnte durch das *yeast two-hybrid system* gezeigt werden (88). Da TGF β und Calcitriol die 5-LO-Expression und –Aktivität erhöhen können (30), scheint eine Verbindung zwischen 5-LO und TRAP-1 nachvollziehbar.

2.5. Beteiligte Proteine an der Leukotrien-Bildung

2.5.1. Phospholipase A₂

Die meisten Mitglieder der Phospholipase A₂-Familie sind dadurch charakterisiert, dass sie die Hydrolyse des zentralen Esters (sn-2) des Phospholipid-Substrats katalysieren. Das PLA₂-Produkt Arachidonsäure stellt einen wichtigen *second messenger* (117) dar und ist ein Vorläufer der Eikosanoide (118). Die PLA₂-Familie umfasst 11 Gruppen, die in weitere

Einleitung

Untergruppen aufgeteilt ist. Die Enzyme unterscheiden sich in ihrer Aktivität, Sequenz, Homologie und den Splice-Varianten (119).

Säugetier-Zellen enthalten eine größere Zahl an PLA₂-Enzymen, wobei mehrere unterschiedliche Enzyme gleichzeitig in einer Zelle auftreten können.

Die Gruppe der niedermolekularen, 14 kDa großen sPLA₂ (*secreted* bzw. sezernierte PLA₂), gehört zu einer Gruppe, die millimolare Konzentrationen an Ca²⁺ für die Aktivierung benötigt, aber keine Fettsäurespezifität besitzt. sPLA₂ kann Lipide verdauen, ist bei chronischen Entzündungen und bei der AA-Freisetzung beteiligt (117).

Eine weitere Gruppe umfasst die Ca²⁺-unabhängigen PLA₂-Enzyme mit einem Molekulargewicht von 85 kDa, die bei dem Prozess der Wiederherstellung (*remodelling*) von Phospholipiden beteiligt sind. Diese Enzyme kommen ubiquitär vor und haben keine sn-2-Spezifität (120).

Im Jahr 1986 wurde der erste Vertreter einer zytosolischen Phospholipase A₂ in humanen Neutrophilen (121) und in Thrombozyten (122) nachgewiesen. Die Struktur basiert auf einer C2- und einer katalytischen Domäne, der sogenannten α/β -Hydrolase-Domäne (123). Dieses Enzym ist die einzige cPLA₂ dieser Familie mit sn-2-Spezifität für Arachidonsäure (124), mit einer starken Lysophospholipase-Aktivität (125) und einer schwachen Transacylase-Aktivität (126). Humane cPLA₂ wird in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert. Das Expressionslevel wird durch Cytokine und Wachstumsfaktoren reguliert (127).

Posttranslationale Ereignisse, wie die Ca²⁺-Bindung an die C2-Domäne oder Enzymphosphorylierung, sind Hauptfaktoren der Regulation der cPLA₂-Aktivität. Unter diesen Voraussetzungen erscheint es nachvollziehbar, dass Ionophor und Zymosan die AA-Freisetzung induzieren können, nachdem die cPLA₂ vom Zytosol an die Kernhülle bzw. an das endoplasmatische Retikulum transloziert (128). cPLA₂ kann an Ser-505 und Ser-727 durch MAP-Kinase bzw. MAP-Kinase-interagierende-Kinase phosphoryliert werden. Diese Kinasen bzw. diese Phosphorylierungsprozesse sind für die Aktivierung der Enzymaktivität wichtig (129,130).

cPLA₂ (SwissProt: PA24A_HUMAN; P47712) besteht aus 749 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 85 kDa. Die genetische Information ist auf Chromosom 1q25 lokalisiert. cPLA₂ besteht aus einer C2- und einer katalytischen Domäne.

2.5.2. 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein (FLAP)

Die Substanz MK-886 inhibiert 5-LO in intakten humanen Leukozyten, aber nicht in homogenisierten Zellen (131). Radioaktiv markiertes MK-886 wurde benutzt, um ein 18 kDa schweres Protein in Neutrophilen zu markieren. Dieses Protein, FLAP, konnte von Miller et

al. im Jahr 1990 isoliert werden (132). Die genetische Information für FLAP ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert. Das Gen besteht aus 31 kbp und wird von 5 kleineren Exons und 4 größeren Introns gebildet. Im Promoter konnte eine TATA-Box, ein AP2- und Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungselemente identifiziert werden (133). Betrachtet man die cDNA, kann von drei transmembranären Regionen und von zwei hydrophilen Schleifen (*loops*) ausgegangen werden.

Transfiziert man Osteosarkomzellen mit cDNA von 5-LO und/oder FLAP, stimuliert mit Ionophor, werden beide Proteine für eine LT Biosynthese benötigt (keine exogene AA anwesend) (134). Fast die gesamte Menge an FLAP, die in einer Zelle vorhanden ist, befindet sich in der nukleären Membran, ein geringerer Teil im endoplasmatischen Retikulum (135-139). Oftmals wird die Funktion von FLAP als ein Membrananker für 5-LO beschrieben, aber eine direkte Assoziation bzw. Interaktion konnte bisher nicht beschrieben werden. Manche Publikationen berichten von MK-886-Effekten auf die Hemmung der LT Biosynthese ohne direkten Effekt der Membranassoziation der 5-LO (137,140-143). Zusätzlich könnte FLAP, neben der Rolle als Helfer bei der Membranbindung von 5-LO, eine mögliche Funktion als Arachidonsäure-präsentierendes oder -transferierendes Protein ausführen.

FLAP bindet ein ¹²⁵I-markiertes, photoaffines Analogon der AA (144), AA und andere cis-ungesättigte Fettsäuren kompetieren die Bindung von 5-LO-Inhibitoren (BAY-X1005, MK-886), die an FLAP binden (145,146). Demnach ist FLAP äußerst wichtig für die Umwandlung von endogenem Substrat durch 5-LO, gleichwohl konnte gezeigt werden, dass FLAP in transfizierten Sf9-Zellen die Bereitstellung von exogener AA stimuliert (147), und in einem viel größeren Umfang (190-fach) die Bereitstellung eines anderen exogenen Substrats, dem 12(S)-HETE (148).

FLAP unterstützt die Umwandlung von 5-HpETE zu LTA₄ (147) und es konnte gezeigt werden, dass FLAP als Monomer und als Dimer in humanen PMNL vorliegen kann, wobei das Dimer mit der Leukotrien-Biosynthese korrelierte (149).

2007 konnte Ferguson et al. die Kristallstruktur von FLAP ermitteln. Das Protein wurde dabei mit dem gebundenen Inhibitor MK-0591 bzw. einem iodierten Analogon kristallisiert. Dadurch konnte die Bindungsstelle von MK-0591 bestimmt werden (Abb. 2.12) (150).

Einleitung

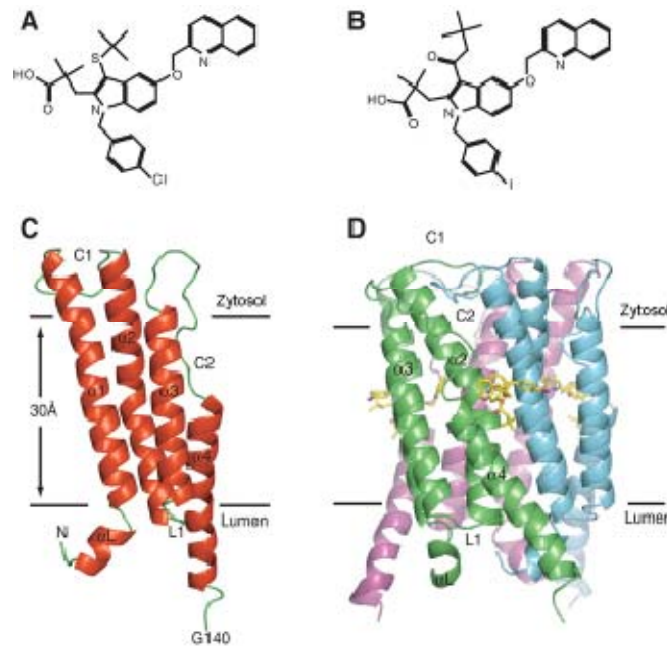


Abb. 2.12 Chemische Struktur von MK-0591 (A), das iodierte Analogon von MK-0591 (B), Kristallstruktur von FLAP als Monomer (C) und als Homotrimer mit gebundenem MK-0591 (D) (150).

2.5.3. Leukotrien A₄-Hydrolase

LTA₄-Hydrolase katalysiert die Umsetzung des instabilen LTA₄, dem Produkt der enzymatischen Reaktion der 5-LO, zum LTB₄ (151). Das Protein besteht aus 610 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 69 kDa und es konnte aus verschiedenen Quellen als Monomer isoliert werden (152). Es konnte die LTA₄-Hydrolase-cDNA von Menschen, Mäusen, Ratten und Schweinen kloniert und sequenziert werden (151). Die entsprechende genetische Information für LTA₄-Hydrolase wird auf dem Chromosom 12q22 codiert. Das Gen hat eine Größe von >35 kbp und enthält 19 Exons. Der entsprechende Promoter enthält ein Erkennungselement für den Transkriptionsfaktor AP-2 und zwei Erkennungselemente für Xenobiotika (XRE), aber keine definierte TATA-Box (153). Durch den Sequenzvergleich mit bekannten Zinkproteasen und Exopeptidasen, konnte ein Zinkbindungsmotiv in der katalytischen Domäne identifiziert werden (154,155). Zink bindet in stöchiometrischen Mengen an das Protein, wobei Histidin-295, -299 und Glutamin-318 Zink binden (156,157). Neben der LTA₄-Hydrolase-Aktivität zeigt das Enzym eine Peptidaseaktivität für das synthetische Substrat Alanin-4-Nitroanilid und Leucin-4-nitroanilid (158). Diese Aminopeptidase-Aktivität kann durch monovalente Anionen, wie Thiocyanat, Chlorid sowie Albumin aktiviert werden (159).

LTA₄-Hydrolase kann durch die kovalente Bindung seines Substrats LTA₄ im aktiven Zentrum der LTA₄-Hydrolase inaktiviert werden (160-162). Divalente Kationen können die

beiden enzymatischen Aktivitäten der LTA₄-Hydrolase mit unterschiedlicher Spezifität und Potenz hemmen (163).

Die Kristallstruktur von LTA₄-Hydrolase konnte im Komplex mit dem Inhibitor Bestatin aufgenommen werden. Dabei zeigte sich, dass das Protein in drei Domänen gefaltet vorliegt; in einer N-terminalen, einer katalytischen und einer C-terminalen Domäne. Zusammen bilden die drei Domänen eine Anordnung, die einem Zink-bindenden Motiv entspricht. Ausgehend von diesem Element weist eine tiefe hydrophobe Bindungstasche in das Enzym. Diese Tasche bildet eine L-Form aus, an die LTA₄ binden kann (164).

Es konnten noch andere Aminopeptidase-Inhibitoren identifiziert werden, die die LTA₄-Hydrolase hemmen können, wie Captopril (165). Der LTA₄-Hydrolase-Inhibitor SC-57461 (N-Methyl-N-[3-[4-(Phenylmethyl)-Phenoxy]Propyl]-β-Alanin) kann die Ionophor-induzierte LTB₄-Produktion in humanem Gesamtblut mit einem IC₅₀ von 49 nM hemmen (166).

LTA₄-Hydrolase kommt in den meisten Säugetieren vor und kann in nahezu allen Geweben und Blutzellen nachgewiesen werden. Viele Zellen exprimieren einerseits LTA₄-Hydrolase, aber kein 5-LO-Protein. Für die LTB₄-Bildung existiert daher ein transzellulärer Metabolismus (151,167).

Mäuse, denen die Möglichkeit genommen wurde LTA₄-Hydrolase zu exprimieren, verlieren vollständig die Eigenschaft LTB₄ zu produzieren. Die Mäuse entwickeln sich normal und sind gesund. LTA₄-Hydrolase^{-/-}-Mäuse zeigen sich resistent gegenüber den letalen Effekten des systemischen Schocks, der in 5-LO^{-/-}-Mäusen durch PAF ausgelöst wird (168).

2.5.4. Leukotrien C₄-Synthase

Die Leukotrien C₄-Synthase konjugiert LTA₄ mit Glutathion (GSH) zu LTC₄, dem ersten Vertreter der Cysteinyl-Leukotriene (169). Durch nachgeschaltete enzymatische Prozesse, die auch in anderen Zellen stattfinden können, wird durch gezielten Abbau des konjugierten GSH LTC₄, LTD₄ und LTE₄ erhalten (170). Das Enzym wird in Eosinophilen, Mastzellen, Basophilen, Monozyten/Makrophagen und einigen leukämischen Zelllinien (THP-1, KG-1) sowie in Thrombozyten, die keine 5-LO haben, exprimiert (171). Die genetische Information für die Leukotrien C₄-Synthase ist auf Chromosom 5q35 lokalisiert. Das Gen besteht aus 5 Exons und 4 Introns über eine Länge von 2,5 kbp. Das Enzym besitzt eine ähnliche genetische Organisation wie FLAP. Die Proteinsquenz ist zu 31 Prozent identisch (172).

Dies kennzeichnet die Einteilung in die sogenannte MAPEG-Familie (Membran-assoziierte Proteine im Eikosanoid- und GSH-Metabolismus). Die Klassifizierung MAPEG beschreibt Proteine, die sich in ihrer enzymatischen Aktivität, dem Sequenzmotiv und den strukturellen

Einleitung

Eigenschaften ähneln (173). FLAP, LTC₄-Synthase, Mikrosomale-Glutathion-S-Transferase (MGST)1-3, Prostaglandin E-Synthase und weitere homologe Proteine können in vier Subtypen eingeteilt werden. FLAP, LTC₄-Synthase und MGST2 bilden die erste Gruppe, MGST3 zusammen mit Homologen aus Pflanzen und Pilzen bilden die zweite Gruppe. Die Untergruppe drei und vier wird aus Proteinen gebildet, die aus Bakterien stammen bzw. durch MGST1/1-L1 (173).

Die Leukotrien C₄-Synthase besteht aus 150 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Es liegt als transmembranäres Homodimer vor (174). Die enzymatische Aktivität wird durch Mg²⁺-Ionen erhöht und durch Co²⁺ und MK-886 inhibiert (171). LTC₄-Synthase^{-/-}-Mäuse wachsen normal heran, zeigen aber ein abgeschwächtes Verhalten bei angeborenen immunologischen und entzündlichen Mechanismen (171). 2007 konnten zwei Arbeitsgruppen die Kristallstruktur der LTC₄-Synthase im Komplex mit GSH präsentieren. Die LTC₄-Synthase liegt dabei als Homotrimer vor, wobei jedes Monomer vier transmembranäre Segmente besitzt (Abb. 2.12 und 2.13) (175,176).

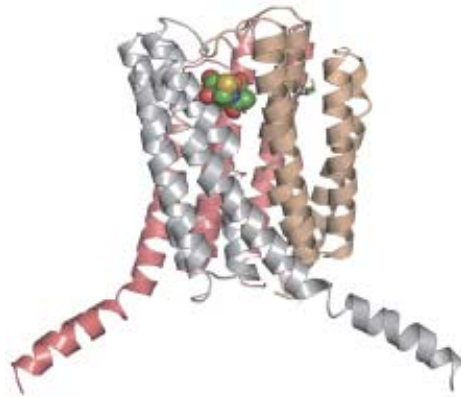


Abb. 2.13 Kristallstruktur der LTC₄-Synthase (Homotrimer) mit gebundenem GSH (175)

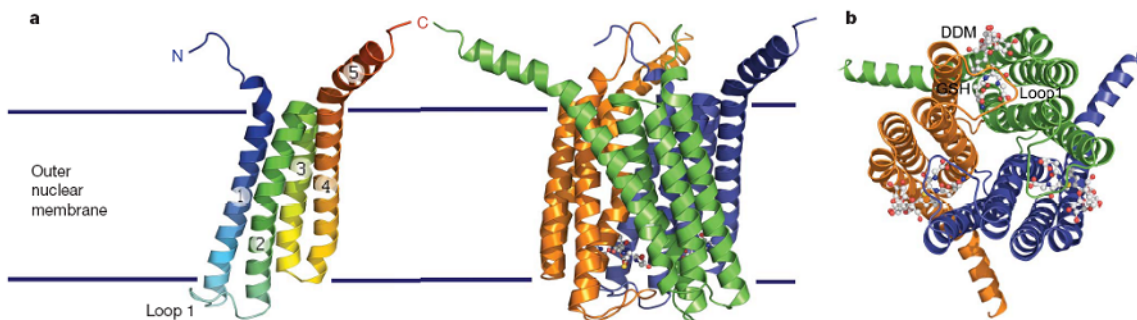
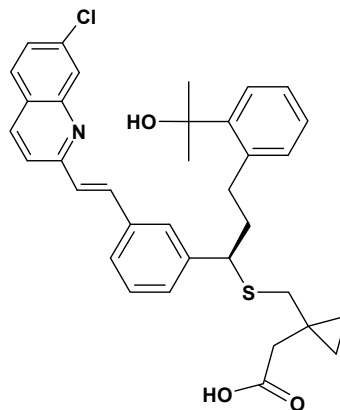


Abb. 2.14 a) Kristallstruktur der LTC₄-Synthase, links als Monomer; rechts als Homotrimer, b) Homotrimer mit gebundenem GSH (176).

2.6. Inhibitoren der 5-Lipoxygenase

Das 5-LO-Protein ist bei verschiedenen Erkrankungen, beispielsweise bei entzündlichen Erkrankungen, Allergien, Asthma und Atherosklerose in einer zentralen Rolle der Pathogenese beschrieben. Es wurden sehr umfangreiche Forschungsaktivitäten betrieben, um geeignete Inhibitoren zu identifizieren. Bisher konnte kein 5-LO-Inhibitor als Fertigarzneimittel zugelassen werden. Die meisten Substanzen konnten den Status eines pharmakologischen Inhibitors für Laborzwecke nicht überwinden, da die weitere Entwicklung hin zu einem Wirk- oder Arzneistoff meist an toxikologischen Problemen scheiterte. Daher verlagerte sich der Schwerpunkt der Entwicklungstätigkeit zu Enzymen, die in nachgeschalteten Stufen der Leukotrienkaskade gehemmt werden können oder es wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Wirkung der Leukotriene zu hemmen. Ein Beispiel ist der Cys-LT1-Rezeptor-Antagonist Montelukast (177).



Montelukast

Abb. 2.15 cys-LT1-Rezeptor-Antagonist.

2.6.1. Chemisch definierte Inhibitoren

Im Laufe der Zeit entwickelten die forschenden Unternehmen drei Strategien, um die 5-LO direkt hemmen zu können. So bildeten sich drei Inhibitorclassen aus: Erstens, die **redoxaktiven Inhibitoren**, zweitens, die **Eisenligand-Inhibitoren** und drittens die Klasse der **nicht-redoxaktiven Inhibitoren**. Zusätzlich konnten **duale COX-1/5-LO-Inhibitoren** sowie die Gruppe der **Inhibitoren mit pflanzlichem Ursprung** in der Vergangenheit vielversprechende Ergebnisse erzielen.

2.6.1.1. Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren

Die ersten Substanzen für die eine 5-LO-Hemmung gezeigt werden konnte, waren sogenannte redoxaktive Substanzen. Sie zeichnet eine lipophile Komponente aus, die das zentrale Eisen im aktiven Zentrum der 5-LO binden und die enzymatische Aktivität effektiv *in vitro* und *in*

Einleitung

in vivo hemmen können. Solche Substanzen sind zum Beispiel: NDGA, Flavonoide (z.B. Cirsiliol), Cumarine und Kaffeesäure (64).

Diese Klasse der 5-LO-Inhibitoren hat eine sehr hohe Strukturvielfalt, so dass eine rationale Weiterentwicklung bisher keinen Erfolg gebracht hat. Vielmehr besitzen diese Substanzen ein hohes Nebenwirkungspotential, da es zu einer Wechselwirkung mit anderen biologischen Redox-Systemen oder zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen kommen kann (178). So führt zum Beispiel der Inhibitor L-615.919 zu einer Hemmung der Leukotrienbiosynthese im nanomolaren Bereich, aber gleichzeitig auch zur Methämoglobinbildung.

Weitere 5-LO-Inhibitoren zeigten ein etwas geringeres Nebenwirkungspotential (AA-861, R-68151, E-6080, ICI-207968, BW755C, L-656,224). Bisher konnte keine dieser Substanzen die Marktreife erreichen.

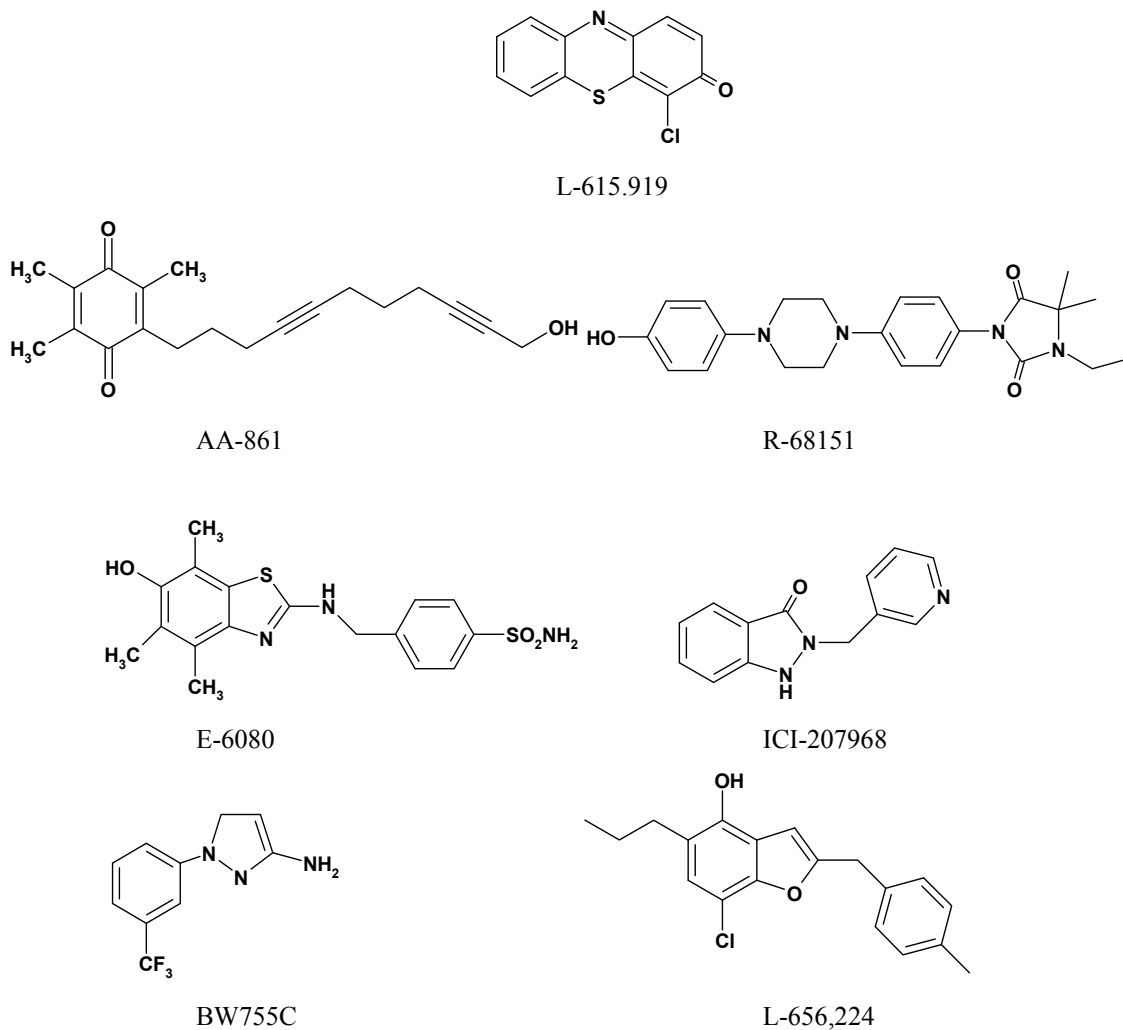


Abb. 2.16 Redoxaktive 5-LO-Inhibitoren.

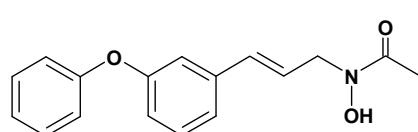
2.6.1.2. Eisen-Ligand 5-LO-Inhibitoren

Diese Klasse von 5-LO-Inhibitoren ist in der Lage das zentrale Eisen-Atom im aktiven Zentrum der 5-LO zu chelatisieren. Dadurch kommt es sehr effektiv zur Hemmung der enzymatischen Aktivität. Das funktionelle Charakteristikum dieser Wirkstoffklasse sind die N-Hydroxyharnstoffreste oder die Hydroxamsäure.

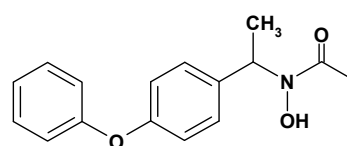
Zu den Vertretern mit einer funktionellen Hydroxamsäure-Gruppe gehören BWA4C und A-63162 (179,180). BWA4C hemmt in Granulozyten die 5-LO-Aktivität mit einer IC_{50} von 40 nM (181,182).

Da BWA4C sehr schnell inaktiviert wird, war eine Weiterentwicklung dieser potenten Leitstruktur das nächste Ziel. Durch die Einführung einer N-Hydroxyharnstofffunktion anstatt einer Hydroxamsäure und der Veränderung der lipophilen Komponente konnte die Verbindung Zileuton (A-64077) entwickelt werden. Die Verbindung ist hydrolytisch stabil und zeigt keine Bildung toxischer Nebenprodukte. Die Substanz stellt die einzige Verbindung dar, die es bis zur Marktreife geschafft hat. Zileuton wird in den Vereinigten Staaten bei Asthma eingesetzt (183,184). Zileuton hemmt in intakten Granulozyten und im Gesamtblut die 5-LO mit einer IC_{50} von 0,6 μ M (182,185). Es zeigt aber keine therapeutischen Effekte bei entzündlichen Erkrankungen wie allergischer Rhinitis, rheumathoider Arthritis oder bei Darmerkrankungen (186).

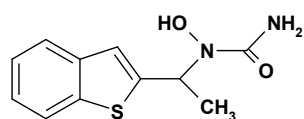
ABT-761 hemmt die 5-LO in PMNL und im Gesamtblut mit einer IC_{50} von 23 bzw. 150 nM, d.h. 5-fach potenter als Zileuton (187). ABT-761 hemmt die Bronchokonstriktion beim akuten Asthma-Anfall (188).



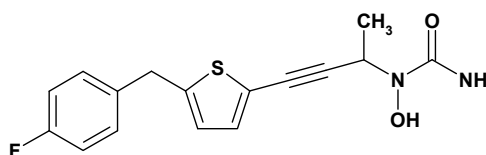
BWA4C



A-63162



Zileuton (A-64077)



ABT-761

Abb. 2.17 Eisen-Ligand Inhibitoren der 5-LO.

2.6.1.3. Nicht-redoxaktive 5-LO-Inhibitoren

Diese 5-LO-Inhibitoren hemmen durch die Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der 5-LO. Der erste Vertreter dieser Klasse war ZM-211965 mit einer IC_{50} von 8 nM in isolierten Maus-Makrophagen und 0,4 μ M im Gesamtblut von Menschen (189). Zwei Weiterentwicklungen in dieser Klasse sind ZD2138 und ZM230487. Sie hemmen die 5-LO im Gesamtblut mit einer IC_{50} von 20 bzw. 50 nM, sie sind also 10-fach potenter als ZM-211965 (190).

ZM230487 zeigt eine IC_{50} von 50 nM. Der IC_{50} -Wert verschlechterte sich durch die Zugabe des Hydroperoxids 13-HpODE auf 400 nM. Die Erhöhung des Peroxidlevels verschlechtert das inhibitorische Potential dieser Verbindung (191). Interessanterweise ist dies eine typische Eigenschaft der nicht-redoxaktiven Inhibitoren. Für BWA4C oder den FLAP-Inhibitor MK-886 konnte dieses Verhalten nicht gezeigt werden.

L-697,198 hemmt die LTB_4 -Bildung in PMNL mit einer IC_{50} von 1,5 nM und ist oral verfügbar (192). L-739,010 ist eine Weiterentwicklung, die die LTB_4 -Bildung in PMNL und im Gesamtblut mit einer IC_{50} von 1,6 nM bzw. 42 nM hemmt (193).

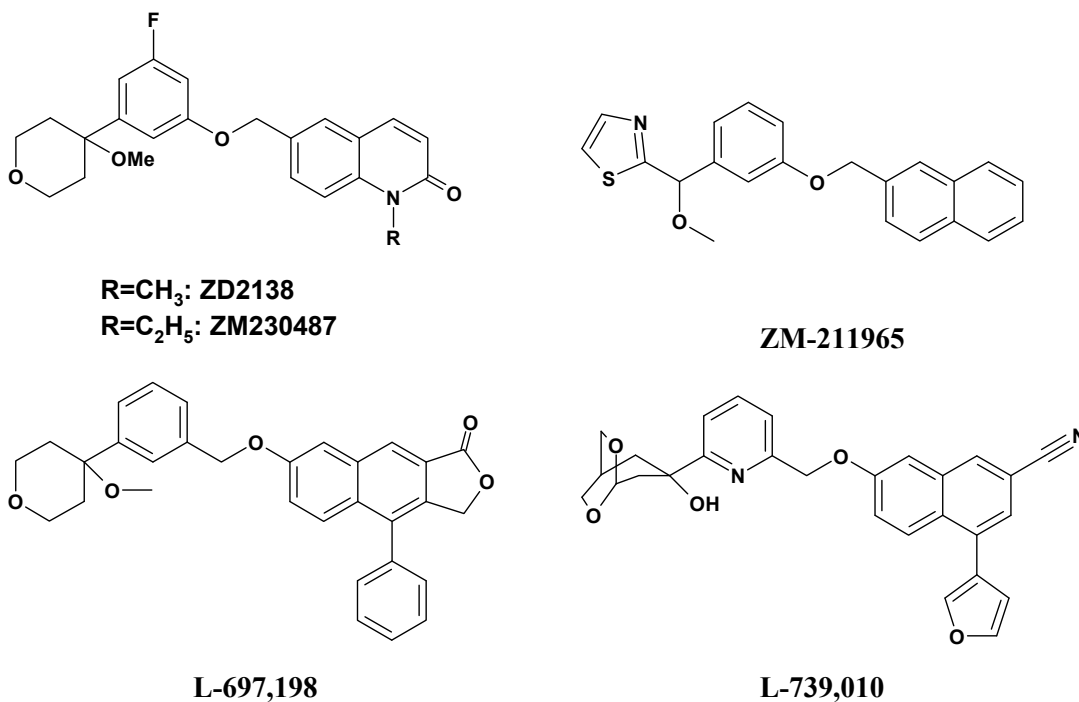
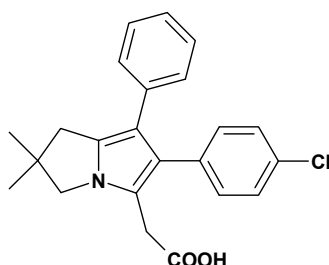


Abb. 2.18 Nicht-redoxaktive 5-LO-Inhibitoren.

2.6.1.4. Duale COX-1/5-LO-Inhibitoren

ML-3000 (Licofelone) hemmt neben der 5-LO auch die COX-1. Die Substanz hemmt die 5-LO in PMNL mit einer IC_{50} von $0,23 \mu\text{M}$ (194). Bei Hunden zeigte die Substanz eine signifikante Reduktion der Osteoarthritisprogression (195). Für diese Indikation wurde die Zulassung am Menschen beantragt.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass ML3000 neben 5-LO und COX-1 auch die isolierte mikrosomale Prostaglandin E-Synthase (mPGSE)-1 mit einer IC_{50} von $6 \mu\text{M}$ hemmen kann. In intakten, Interleukin- 1β -behandelten A549-Zellen kann die Bildung von Ionophor-induziertem PGE_2 (bei exogener Zugabe von AA) mit einer IC_{50} von unter $1 \mu\text{M}$ gehemmt werden. Interessant ist, dass bei dieser Konzentration eine Hemmung der COX-2 nicht beobachtet werden konnte (196).



ML-3000 (Licofelone)

Abb. 2.19 Dualer COX-1 / 5-LO-Inhibitor: ML-3000.

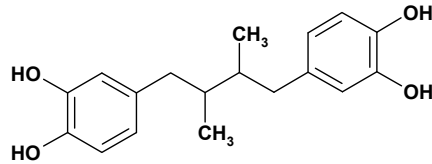
Die Entwicklung neuer Verbindungen wie duale PAF-Rezeptor-Antagonisten / 5-LO-Inhibitoren oder duale H_1 -Rezeptor-Antagonisten / 5-LO-Inhibitoren steht am Anfang der Forschungsaktivitäten.

2.6.2. Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs

Neben rational entwickelten 5-LO-Inhibitoren, war der Ausgangspunkt der ersten 5-LO-Inhibitoren in pflanzlichen Quellen zu suchen. In der Klasse der redoxaktiven 5-LO-Inhibitoren finden sich einige Beispiele für Verbindungen aus pflanzlichem Ursprung.

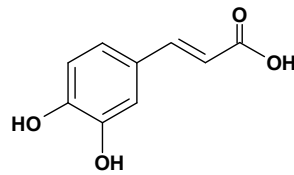
Seit den 1980er Jahren bis zum heutigen Zeitpunkt wurden in mehreren hundert Publikationen verschiedene pflanzliche Extrakte und/oder aktive Inhaltsstoffe beschrieben, die die 5-LO in intakten Zellen und/oder im gereinigten Zustand hemmen.

Einleitung



Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)
0,8 μM IC_{50} , intakte Zellen
28 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Larrea divaricata

Zu den ersten Vertretern gehörten Polyphenole wie NDGA (*nordihydroguaiaretic acid*) aus *Larrea divaricata* (197).



Kaffeesäure
n.g. μM IC_{50} , intact
3,7 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Artemisia rubripes

Ein weiteres Beispiel sind Kaffeesäure, Eupatilin und 4-Demethyleupatilin. Die Verbindungen wurden aus *Artemisia rubris* isoliert und hemmen die 5-LO im zellfreien Systemen, aber auch die LTC_4 - und D_4 -Bildung in Ionophor-stimulierten Mastozytoma Zellen (198).

Es konnte eine Vielzahl von Verbindungen identifiziert werden, die einen hemmenden Effekt auf die 5-LO-Aktivität besitzen. Einen Einblick zeigen die nachfolgend aufgeführten Strukturklassen, die exemplarisch dazu geeignet sind, einen Überblick über die heterogene Klasse der 5-LO-Inhibitoren mit pflanzlichem Ursprung zu erhalten.

Flavonoide

Es konnte gezeigt werden, dass Flavonoide, oftmals in Verbindung mit Polyphenolen, die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und die Eikosanoid-Biosynthese durch die Wechselwirkung mit cPLA_2 , COX und/oder 5-LO reduzieren können (199). Flavonoide stellen die größte Gruppe von 5-LO-Inhibitoren dar. Abbildung 2.20 stellt einige Verbindungen vor.

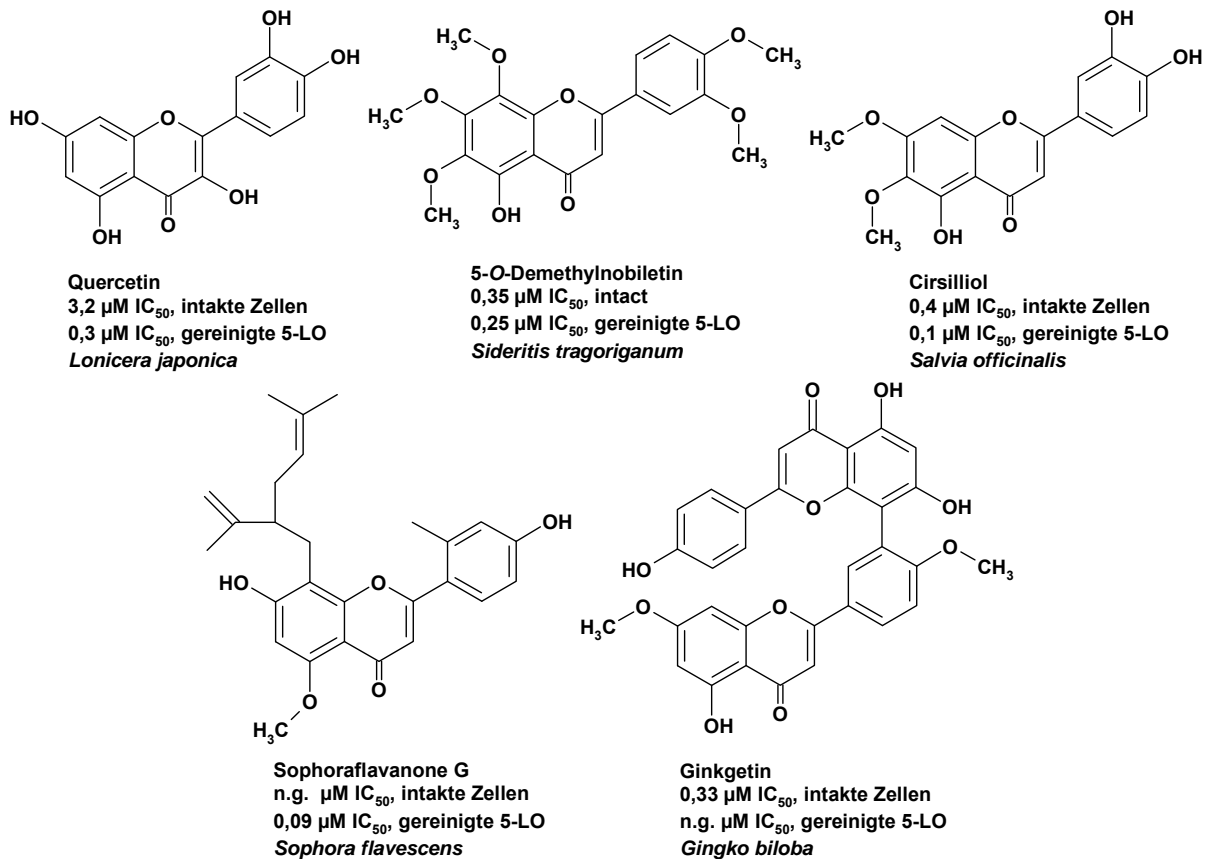


Abb. 2.20 Beispiele für Flavonoide mit Potential für eine 5-LO-Hemmung: Quercetin (165); 5-O-Demethylnobiletin (200); Cirsiliol (201); Sophoraflavanone G (202); Ginkgetin (203).

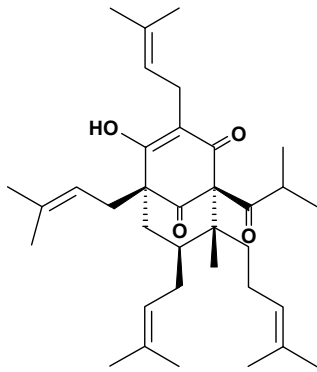
Polyphenole

Diese Verbindungen sind strukturell erheblich heterogener als die vorgenannten Flavonoide. Polyphenole wirken als Antioxidantien, wodurch das inaktive Eisen(II) im aktiven Zentrum der 5-LO nicht in seine aktive Form überführt werden kann.

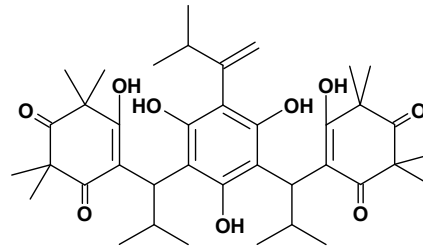
Polyphenole weisen neben den phenolischen OH-Gruppen auch lipophile Eigenschaften auf, wodurch, abhängig vom Grad der Lipophilie (Anzahl der Alkyl- bzw. Alkylketten), eine gute Zellpermeabilität gewährleistet werden kann.

Viele Polyphenole imitieren Fettsäure-ähnliche Strukturen und besitzen oftmals vinyloge Carbonsäure-Reste (Kaffeensäure, Hyperforin, Myrtucommulon) oder eine saure Phenolgruppe (NDGA, Curcumin, Gingerol).

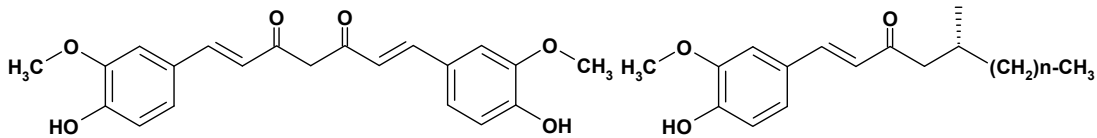
Einleitung



Hyperforin
 1,2 μM IC_{50} , intact
 0,09 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Hypericum perforatum



Myrtucommulon
 1,8 μM IC_{50} , intact
 5 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Myrtus communis

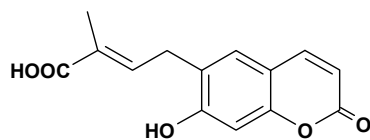


Curcumin
 2,7 μM IC_{50} , intakte Zellen
 0,7 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Curcuma longa

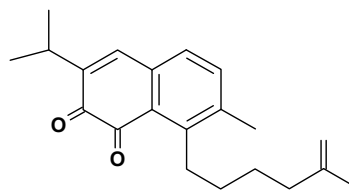
Gingerol
 0,004 - 3 μM IC_{50} , intakte Zellen
 n.g. μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Zingiber officinalis

Abb. 2.21 Beispiele für Polyphenole mit 5-LO-Hemmung: Hyperforin (204); Myrtucommulon (205); Curcumin (206); Gingerol (207).

Weitere pflanzliche Strukturen, von denen bekannt ist, dass sie die 5-LO-Aktivität in intakten Zellen und am gereinigten Enzym hemmen können, sind unter anderem Cumarine, Quinone, pentacyclische Triterpene, Sesquiterpene und Alkaloide. In Abbildung 2.22 sind einige Beispiele dargestellt.



6-(3-Carboxybut-2-enyl)-7-Hydroxycoumarin
 0,25 μM IC_{50} , intakte Zellen
 n.g. μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Peucedanum ostruthium



Acethiopinon
 0,2 μM IC_{50} , intakte Zellen
 0,11 μM IC_{50} , gereinigte 5-LO
Salvia aethiopsis

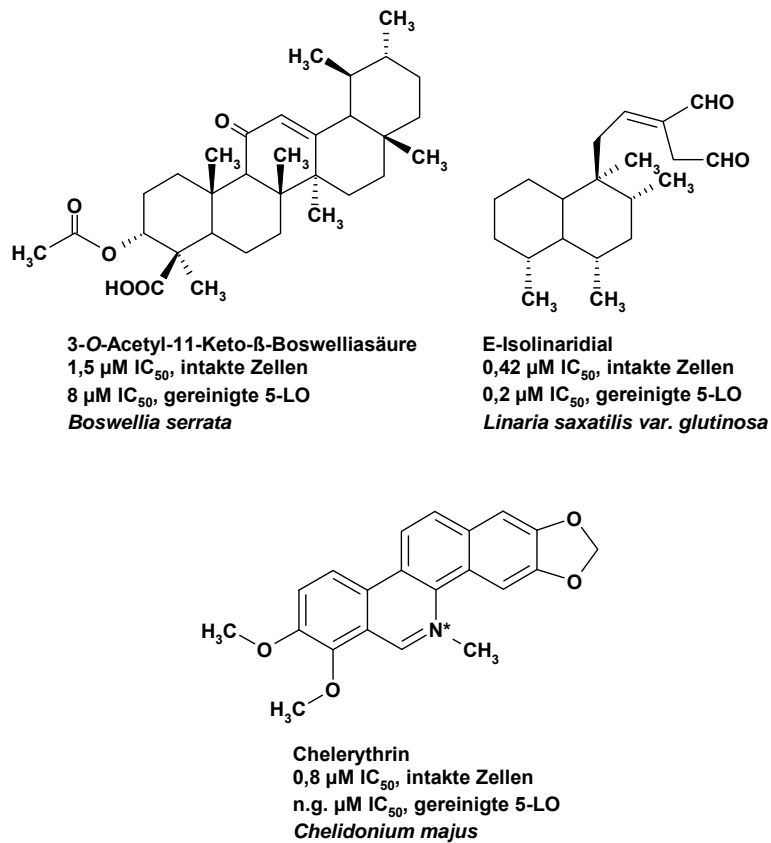


Abb. 2.22 Beispiele für pflanzliche Verbindungen mit 5-LO-Hemmung: Cumarine: 6-(3-Carboxybut-2-enyl)-7-Hydroxycoumarin (208), Quinone: Acethiopinon (209), pentacyclische Triterpene: 3-O-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure (210), Sesquiterpene: E-Isolaridial (211) und Alkaloide: Chelerythrin (212).

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Alle allgemeinen Reagenzien und Chemikalien werden in der benötigten Qualität von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Ampicillin	Applichem, A0839
Arachidonsäure	Sigma, A9673
ATP	Serva, 10920
ATP-Agarose	Sigma, A2767
β-Mercaptoethanol	Sigma, M3148
BWA4C	Sigma-Aldrich, B7559
Celecoxib	Dr. Maier, Universität Frankfurt
Diamid	Sigma, D3648
DMSO	Sigma, D8418
DTT	Sigma, D9779
FCS	Sigma, F7524
γ-Globulin	Sigma
Glycin	Serva, 23390
Glycerol, 87%	Serva, 39788
GSH, reduzierte Form	Sigma, G4251
GSSG, oxidierte Form	Sigma, G9027
Ionophor	Sigma, C7522
IPTG	Serva, 26600
Luria Broth-Medium	Sigma, L3022
Methanol	Merck
MK-886	Sigma, M2692
ML-3000	Prof. Werz, Universität Tübingen
Nitrocellulose Hybond C-Extra	GE Healthcare Amersham, RPN203E
Nonidet P40	Sigma, I8896
Nyco-prep	Invitrogen Gibco
PD-10	GE Healthcare Amersham, 17-0851-01
Penicillin/Streptomycin (100x)	Sigma, P0781
PMSF	Sigma, P7626
Prostaglandin B₁	Sigma, P5265
RPMI 1640 Medium	Invitrogen Gibco
SDS	Applichem, A2572
U-73122	Sigma, U6756
U-73343	Sigma, U6881

3.2. Methoden

Zellkultur und Zelllinien

Alle Zelllinien werden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden aus eingefrorenen Zellkulturen wieder in Kultur gebracht. Dafür taut man eine eingefrorene Probe bei 37°C auf und überführt schnell in 10 ml vorgewärmtes Medium. Nach sofortiger Zentrifugation (1200 rpm, 10 Minuten, RT) nimmt man die Zellen in Medium auf und kultiviert die Zellen, wie vom Hersteller oder von ATCC angegeben, weiter.

HeLa (ATCC: CCL-2)

Die Zellen wurden uns von Prof. Walter Müller, Frankfurt, später von Dr. Thorsten Meier, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden in D-MEM, das mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin versetzt wird, kultiviert. Dabei werden die Zellen, die adhärent wachsen, alle drei bis vier Tage geerntet, gezählt und 1:10 in neues Medium mit einer Zelldichte von $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ umgesetzt. Für kontinuierliche Zellerhaltung werden 250 ml/75 cm² – Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, #658170) verwendet, für Versuchsansätze 145 cm² – Gewebekulturschalen (Greiner bio-one, #639160). Die Zellen werden mit Hilfe von Trypsin/PBS geerntet. Das alte Zellmedium wird entfernt, 5 ml vorgewärmtes Trypsin/PBS hinzufügen, schütteln, das Trypsin/PBS wieder entfernen, 5 ml Trypsin/PBS hinzufügen und 5 Minuten bei 37°C im Inkubator inkubieren. Anschließend schabt man die restlichen, nicht abgelösten Zellen mit einem Zellschaber ab, zählt die Zellen und überführt die berechnete Menge in neues Medium.

RBL-1 (ATCC: CRL-1378)

Die Zellen wurden von Prof. Habenicht, Jena bezogen. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, das mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin, 10 mM Hepes, 1 mM Natriumpyruvat und essentielle Aminosäuren (1×) versetzt wird, kultiviert. Dabei werden die Zellen, die als Suspensionskulturen wachsen, alle drei bis vier Tage gezählt und 1:5 in neues Medium mit einer Zelldichte von $2 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml umgesetzt. Für kontinuierliche Zellerhaltung wird ein Volumen von 50 ml verwendet. Es werden 250 ml/75 cm² Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, #658170) verwendet, für Versuchsansätze 650 ml/175 cm² Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, #661160). RBL-1 Zellen zeichnen sich durch eine hohe 5-LO-Expressionsrate aus (213,214). Eine Besonderheit wird diesen Zellen zuteil, da die 5-LO in unstimulierten RBL-1 Zellen

vornehmlich im Nukleus lokalisiert ist (215). Da die 5-LO-Produktbildung in Ionophor-stimulierten RBL-1-Zellen nicht vermindert ist, kann man davon ausgehen, dass die 5-LO durch Aktivierung mit Ionophor in das Cytoplasma übergeht. Verschiedene Western Blot-Analysen bestätigen diese Behauptung, da 5-LO nicht detektierbar ist, wenn unstimulierte RBL-1 Zellen eingesetzt wurden.

RAW 264.7 (ATCC: TIB-71)

Die Zellen wurden uns von Prof. Werz, Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden in D-MEM, das mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin versetzt wird, kultiviert. Dabei werden die Zellen, die semi-adhären wachsen, alle drei bis vier Tage geerntet, gezählt und 1:8 in neues Medium mit einer Zelldichte von $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ umgesetzt. Für kontinuierliche Zellerhaltung werden 250 ml/75 cm² – Gewebekulturflaschen (Greiner bio-one, #658170) verwendet, für Versuchsansätze 650 ml/145 cm² – Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, #661160). Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellen werden vereinigt, gezählt und die berechnete Menge wird in neues Medium überführt.

An RAW 264.7 Zellen konnte gezeigt werden, dass spezifische 5-LO Inhibitoren die Zellproliferation hemmen können, dies konnte durch die externe Zugabe von LTB₄ oder LTD₄ wieder aufgehoben werden (216). RAW 264.7 Zellen exprimieren 5- und 15-LO, wobei nur 5-LO nach Zell-Stimulation zur nukleären Membran transloziert (217).

Isolierung von PMNL aus Lymphozyten-Konzentraten

Humane PMNL werden aus vereinigten Leukozyten-Konzentraten frisch isoliert. Die Konzentrate (Buffy Coats) werden am Markus-Krankenhaus in Frankfurt oder an den Kliniken in Frankfurt-Höchst gewonnen und zur Verfügung gestellt.

Im ersten Schritt werden die Blutbeutel vereinigt und mit PBS 1:1 verdünnt, anschließend werden jeweils 40 ml der verdünnten Konzentrate mit 10 ml einer 10%igen Dextran / PBS-Lösung gemischt, 30 Minuten sedimentiert und von den restlichen Erythrozyten getrennt. Die Überstände werden einer Dichtezentrifugation unterworfen. 10 ml Nycoprep-Dichtegradientenmedium werden mit den Überständen überschichtet. Nun wird bei einer Drehzahl von 800 rpm 10 Minuten bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Dabei werden Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten charakteristisch aufgetrennt. Diese Zellen können weiter verwendet oder entfernt werden. Man saugt den Überstand über dem Pellet ab und resuspendiert das Pellet, das Granulozyten und restliche Erythrozyten enthält, in 50

ml eiskaltem PBS. Nach erneuter Zentrifugation bei einer Drehzahl von 300 rpm für 10 Minuten bei RT (mit Bremse) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem MilliQ-Wasser aufgenommen. Es kommt zur hypotonen Lyse der Erythrozyten, die exakt nach 45 Sekunden durch Zugabe von 40 ml PBS (RT) gestoppt wird. Nun zentrifugieren (200 rpm, 10 Minuten, RT), das Pellet mit PBS waschen und nochmals lysieren. Nach erneuter Zentrifugation (200 rpm, 10 Minuten, RT) wird das Pellet in PBS/Glucose (1 mg/ml) resuspendiert und die erhaltenen PMNL werden nach der Trypanblau-Methode gezählt.

Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblau-Methode

Intakte, lebende Zellen lassen sich in einer Zellsuspension mittels einer Bürker Zählkammer unter dem Mikroskop durch Auszählen bestimmen. Dazu verdünnt man die Zellsuspension mit einer 0,2%-igen Trypanblau-Lösung, je nach zu erwartender Zellzahl, 1:10 bis 1:100. Intakte Zellen können Trypanblau ausschließen, tote Zellen dagegen färben sich blau.

Site-directed mutagenesis und DNA-Präparation

5-LO Mutanten wurden nach dem Protokoll des QuickChange™ Kit von Stratagene in einem *site-directed mutagenesis*-Verfahren generiert. Die gewünschte Mutation wird mit Hilfe von gereinigtem Plasmid, Sequenzierprimern und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Nach *dpnI*-Verdau werden die mutierten Plasmide in SURE-E.colis transformiert, auf Ampicillin(+)-LB-Platten ausplattiert und gewachsene Klone mittels Plasmid-Preparation (Machenery-Nagel) angereichert und gereinigt. Die Punktmutation wird mit Hilfe eines *PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) und anschließender Analyse durch ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) überprüft. Die erhaltenen Daten werden mittels *multi alignment* Software „multalin“ unter http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html mit der Originalsequenz verglichen und auf eine positive Mutation überprüft. Die positiven Klone werden in SURE-E.coli retransformiert, auf ^{Amp⁺}-LB-Platten ausplattiert, vereinzelte Klone „gepickt“ und 8 Stunden in 5 ml LB-Medium, versetzt mit 10 µl Ampicillin (50 mg/ml), kultiviert (220 rpm, 37°C). Die E.coli-Kultur wird zu 500 ml eines sterilen LB-Mediums, versetzt mit 1 ml Ampicillin (50 mg/ml), gegeben und über Nacht kultiviert (37°C, 220 rpm). Die E.coli-Suspension wird

nach dem Herstellerprotokoll eines DNA-Präparations-Kits (Sigma) weiterverarbeitet. Das erhaltene Plasmid wird bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Für die Herstellung von transformierten E.colis für die 5-LO-Protein-Gewinnung werden die positiven Klone in MV1190- oder BL21-E.Coli transformiert, ausplattiert, ein einzelner Klon gepickt und dieser über Nacht in 5 ml LB-Medium, versetzt mit 10 µl Ampicillin (50 mg/ml), kultiviert (220 rpm, 37°C). Die E.coli-Suspension wird mit Glycerol gemischt, aliquotiert und bei -70°C eingefroren und gelagert.

Transiente Transfektion

Die Transfektion wird mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode durchgeführt. Dazu werden 1×10^4 HeLa-Zellen/cm² pro 145 cm² Gewebekulturschale ausgesät und in DMEM, das mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Units/ml Penicillin versetzt wird, kultiviert (37°C, 5% CO₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit). Nach 72 Stunden wird das Medium erneuert, 5 Stunden später wird pro Gewebekulturschale 25 µg pcDNA3.1-5-LO bzw. pcDNA3.1-5-LO-Mutante und 10 µg pSG5-FLAP bzw. pSG5-Plasmid zugegeben. Die berechnete DNA-Menge wird mit sterilem MilliQ-H₂O gemischt (Gesamtvolumen 450 µl), 50 µl CaCl₂ werden zugegeben, 15 Sekunden gevortext und unter Luftzugabe zu 500 µl HeBS (50 mM HEPES, 28 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,05) tropfenweise zugegeben. Nach 1 Minute wird die Mischung zu den Zellen gegeben und weiter kultiviert (37°C, 5% CO₂, gesättigte Luftfeuchtigkeit). Nach 16 Stunden wird das Medium gewechselt und nach weiteren 24 Stunden die Zellen geerntet.

Man entfernt das alte Zellmedium, fügt 5 ml vorgewärmtes Trypsin/PBS hinzu, entfernt das Trypsin/PBS, fügt 10 ml Trypsin/PBS hinzu und inkubiert 10 Minuten bei 37°C im Inkubator. Anschließend schabt man die restlichen, nicht abgelösten Zellen mit einem Zellschaber ab, überführt die Zellsuspension in 50 ml-Falcons und zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT). Der Überstand wird entfernt, die Zellen in jeweils 2,5 ml PBS (RT) resuspendiert, vereinigt und abermals zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT). Die Zellen werden in 5 ml PBS (RT) resuspendiert, gezählt und wie unter *Abschnitt 5-LO-Aktivitätsassay* weiterverwendet.

Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

Es werden 5×10^6 PMNL, RBL-1, RAW264.7 oder HeLa abzentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl MilliQ-H₂O aufgenommen bzw. 100 µl einer Proteinlösung einer anderen Quelle, wie z.B. E.coli

verwendet und mit 100 µl SDS-Ladepuffer (20 mM Tris pH 8.0 / 2 mM EDTA pH 8.0 / 5% SDS / 10 % β-Mercaptoethanol) gemischt und 6 Minuten bei 95°C gekocht, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten, RT, Labofuge 200). Die Proben werden bei -20°C gelagert oder direkt verwendet.

SDS-Gelelektrophorese

20 µl der vorbereiteten Proben ($0,5 \times 10^6$ Zellen oder die entsprechende Menge aus E.coli) werden gegebenenfalls aufgetaut und mit 5 µl einer Mischung aus 50 % Glycerol und 0,1% Bromphenolblau (1:1 V/V) versetzt. Anschließend werden die Proben 3×8 Sekunden mit dem Ultraschallstab homogenisiert, zentrifugiert (5000 rpm, 10 Minuten, RT, Labofuge 200) und der klare Überstand mittels Pipette oder Hamilton-Spritze in die Geltasche eines SDS-Polyacrylamidgels transferiert.

Dafür bereitet man die Gele entsprechend der gewünschten Polyacrylamid-Konzentration (7-15%) und Taschenanzahl vor. Die Gelelektrophorese wird mit Hilfe eines Mini Protean 3 Systems von Biorad (170-200V, 120 mA, 50 Minuten) durchgeführt. Als Laufpuffer wird eine Lösung aus 192 mM Glycin, 20 mM Tris/HCl, 0,1 % SDS verwendet.

Coomassie-Färbung

Das Gel wird mit MilliQ-H₂O kurz gewaschen und in eine Mischung aus 0,2 % Coomassie R-250 in Methanol und 20 % Essigsäure in MilliQ-H₂O (1:1 V/V) überführt und 15-60 Minuten gefärbt. Die Färbelösung wird entfernt, das Gel mehrmals mit MilliQ-H₂O gewaschen und der Gel-Hintergrund mit einer Lösung aus 20 % Methanol, 10 % Essigsäure in MilliQ-H₂O, unter mehrmaligen Wechseln, entfärbt. Anschließend kann das gefärbte Gel gescannt werden und gegebenenfalls mit Cellophane verschweißt, archiviert werden.

Silber-Färbung

Das Gel wird mit MilliQ-H₂O kurz gewaschen, in ein Becherglas überführt und mit 200 ml Fixierlösung (120 ml Ethanol (96%) + 40 ml Eisessig in 240 ml MilliQ-H₂O) 5 Minuten bei 60°C fixiert. Die Lösung entfernen und weitere 200 ml Fixierlösung zugeben und 5 Minuten bei 60°C schütteln. Die Lösung abgießen und 200 ml Imprägnierlösung (8,16 g Na-Acetat in 140 ml MilliQ-H₂O lösen und mit Eisessig auf pH 6 einstellen + 60 ml Ethanol (96%) + 0,2 g Na-thiosulfat + 4 ml Glutaraldehyd (25%) hinzufügen und 8

Minuten bei 50°C inkubieren. Die Lösung abgießen und 5 Mal mit MilliQ-H₂O bei 60°C waschen. 200 ml Färbelösung (0,2 g AgNO₃ in 200 ml MilliQ-H₂O + 50 µl Formaldehyd) zugeben und das Gel 10 Minuten bei 50°C färben. Die Färbelösung abgießen und 1× kurz mit MilliQ-H₂O bei RT waschen und abgießen. 200 ml Reduktionslösung (12,5 g Na₂CO₃ in 500 ml MilliQ-H₂O + 250 µl Formaldehyd (37%) + 5 µl Na-thiosulfat (43%)) zugeben und 1 Minute bei RT schwenken, Lösung rasch abgießen und weitere 200 ml Reduktionslösung zugeben und das Gel 5-15 Minuten bei RT entwickeln. Lösung abgießen und mit 200 ml MilliQ-H₂O spülen. Das Gel wird mit 200 ml 7%iger Essigsäure bei 60°C inkubiert. Die Lösung abgießen und 200 ml MilliQ-H₂O zugeben und 5 Minuten bei 60°C schütteln. Anschließend das Gel einscannen und gegebenenfalls mit Cellophane verschweißen.

Natriumacetat-Färbung

Durch die Verwendung einer Natriumacetatlösung können Proteine in einem Polyacrylamidgel reversibel gefärbt werden (218). Dazu wird das Tris/HCl-Gel zunächst mehrmals mit Wasser gewaschen und im Anschluss 30 – 90 Minuten unter leichtem Schwenken in 4 M Natriumacetat inkubiert bis die Proteine als weiße Banden sichtbar werden. Bei präparativen Gelen wird die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Entfernung des überschüssigen Natriumacetats mehrmals in Elektroelutionspuffer gewaschen. Anschließend wird das Protein durch Elektroelution oder Auslösen in SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer aus dem Gel isoliert.

Elektroelution

Elektroelutionspuffer:	Tris (pH 7,4) 200 mM
	DTT 100 mM
	SDS 0,1 % (m/v)
	pH mit Essigsäure einstellen
Laufpuffer:	Tris (pH 7,4) 50 mM
	DTT 1 mM
	SDS 0,1 % (m/v)
	pH mit Essigsäure einstellen

Hochreine, denaturierte 5-LO lässt sich durch elektrophoretische Auftrennung und anschließende Elektroelution isolieren. 5-LO wird vollständig aufgereinigt und mit Hilfe

der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wird mit 4 M Natriumacetat-Lösung gefärbt. Die entsprechende Proteinbande wird ausgeschnitten und mit ca. 15 ml Elutionspuffer in einen Dialyseschlauch gegeben. Der Dialyseschlauch wird in eine mit Laufpuffer gefüllte Horizontal-Gelkammer (Bio-Rad) gelegt und das Protein durch Anlegen eines Stroms von 100 mA über einen Zeitraum von 2 Stunden aus dem Gel eluiert. Ist eine Verwendung des Proteins zur Immunisierung von Mäusen beabsichtigt, wird das Eluat über Nacht bei 4 °C gegen 5 mM Tris dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Western Blot

Nach SDS-PAGE werden die Proteine mit Hilfe einer *tank blot* Apparatur (Mini Trans-Blot cell, Biorad) bei 95 V, 230 mA für 80 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, Amersham) oder PVDF-Membran (Hybond P, Amersham) geblottet und anschließend immunochemisch identifiziert. Als Transferpuffer wird eine Lösung aus 20 % Methanol, 48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,13 mM SDS in MilliQ-H₂O verwendet. Die Membranen werden in TBS (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4) 10 Minuten gewaschen, 1 Stunde in 5 % Milchpulver / TBS geblockt, 3× 30 Sekunden und 2× 5 Minuten in TBS gewaschen und im primären Antikörper (Tab. 8.3) (9,55 ml TBS, 50 µl Tween 20 (10 %), 200 µl FCS, 200 µl Na-azid (5 %), 10 µl Antikörper) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es wird 3× 10 Minuten in TBS gewaschen, 3 Stunden mit einem sekundären Antikörper (Tab. 8.3) (10 ml TBS, 0,5 ml FCS, 10 µl sekundärer Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase) inkubiert, 2× 10 Minuten mit TBS, 1× 10 Minuten mit 0,1 % Nonidet P40 / TBS und 1× 10 Minuten mit Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgSO₄ × 6 H₂O) gewaschen. Mit Substratpuffer (25ml Detektionspuffer, 85 µl Bcip, 175 µl NBT) 1-10 Minuten inkubieren und nach 5 Minuten wird die Membran in Stop-Puffer (25ml TBS, 250 µl 0,2 M EDTA) gewaschen und in MilliQ-H₂O aufbewahrt.

Expression von 5-LO in MV1190- oder BL21-E.coli und partielle Reinigung des 5-LO Enzyms

Für 500 ml einer 5-LO-transformierten MV1190-E.coli-Kultur werden zu einer sterilen Kulturlösung (430 ml MilliQ- H₂O, 20 ml 50 % Glycerol, 50 ml 10× M9 (68 g Na₂HPO₄, 30 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, 10 g NH₄Cl, 2,5 g NaOH ad 1000 ml MilliQ-H₂O, pH 7,2-7,4), 1 g Caseinhydrolysat oder N-Z-Amin in 1000 bis 2000 ml Erlenmeyerkolben) 1 ml Ampicillin (50 mg/ml), 0,5 ml 5 mM FeSO₄ × 7 H₂O, 1 ml 1 M MgSO₄ × 7 H₂O und 2,5 ml einer „Übernachtkultur“ (am Vorabend werden zu 10 ml LB-Medium, 20 µl Ampicillin-Lösung (50 mg/ml) und wenig Glycerolkultur an 5-LO-transformierte MV1190-E.coli gegeben und bei 220 rpm und 37°C über Nacht geschüttelt) gegeben und bei 185 rpm und 28°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD von 0,2 bis 0,4 werden 500 µl IPTG-Lösung (47,6 mg/ml) zugegeben. Es wird über Nacht bei 185 rpm und 28°C weitergeschüttelt, anschließend zentrifugiert (7500 rpm, 10 Minuten, RT). Die Aufarbeitung des E.coli-Pellets sollte unmittelbar erfolgen. Die Aufarbeitung wird weiter unten im Text erläutert.

Das Volumen des Mediums, das Volumen der Übernachtkultur und die Konzentration an IPTG können variiert werden. Alle anderen Angaben müssen konstant bleiben.

Für 500 ml einer 5-LO-transformierten BL21-E.coli-Kultur werden zu einer sterilen Kulturlösung (12,5 g LB-Medium, 500 ml MilliQ-H₂O in 1000 bis 2000 ml Erlenmeyerkolben), 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) und 2,5 ml einer „Übernachtkultur“ (am Vorabend werden zu 10 ml LB-Medium, 20 µl Ampicillin (50 mg/ml) und wenig eingefrorene Glycerolkultur an 5-LO-transformierte BL21-E.coli gegeben und bei 220 rpm und 37°C über Nacht im Inkubator geschüttelt) gegeben und bei 185 rpm und 37°C im Inkubator geschüttelt. Nach 3 Stunden bzw. bei einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,4 werden 500 µl IPTG-Lösung zugegeben (47,6 mg/ml: 200 mmol → Endkonzentration 200 µmol) und weitere 4 Stunden bei 185 rpm und 37°C im Inkubator geschüttelt.

Die Kulturlösung wird 10 Minuten bei 7500 rpm und RT (Rotor, Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

Das Pellet kann mehrere Tage bei -20°C gelagert werden, sodass die Aufarbeitung nicht sofort erfolgen muß.

Bei der Aufarbeitung werden pro E.coli-Pellet, das aus 500 ml Kultur gewonnen wurde, 25 ml kalter Lysepuffer (25 ml Homogenisierungspuffer (50 ml 1 M Triethanolamin/HCl pH

Materialien und Methoden

8,0, 25 ml 0,2 M EDTA, 925 ml MilliQ-H₂O), 25 mg Lysozym, 250 µl 0,1 M PMSF, 50 µl 2 M DTT, 75 µl (60 mg/ml) STI, 250 µl (1 mg/ml) RNase A, 125 µl (1 mg/ml) DNase I) eingesetzt. Die Pellets werden gegebenenfalls aufgetaut und auf Eis gestellt. Die gesamte Menge Lysepuffer wird auf das Pellet gegeben und das Pellet wird umgehend mit einer Vollpipette gelöst bzw. homogenisiert. Sollten mehrere Pellets vorhanden sein, wird das erste Pellet gelöst und die gesamte Menge auf das nächste Pellet überführt. Nachdem alle Pellets vereinigt sind, wird 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall (Bandelin, Sonoplus HD 200, Einstellung) 3-5× 20 Sekunden homogenisiert. Es kann nötig sein, die E.coli-Lösung vorab mit einem Douncé-Homogenisator in kleinere Partikel zu zerkleinern. Dieser Schritt erhöht die 5-LO Ausbeute enorm. Ab dem Homogenisieren müssen alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden. Das Homogenat wird bei 4°C für 70 Minuten und 38000 rpm (100 000×g) in der Ultrazentrifuge (Rotor Ti70, Beckmann Optima Le-80 K) zentrifugiert.

Nachdem der 100 000×g-Überstand mit 1 mM ATP versetzt wurde kann die 5-LO Aktivität bestimmt werden.

Um den Einfluß von Fremdproteinen auf die 5-LO Aktivität zu minimieren, kann die 5-LO durch eine Affinitätschromatographie an ATP-Agarose und Elution mit ATP gereinigt und konzentriert werden.

Die Regeneration erfolgt durch das Auftragen von folgenden Lösungen bei 4°C:

Regeneration 1× 10 ml PBS / 1 mM EDTA

1× 10 ml 2 M Harnstoff / 1 M NaCl in PB / 1 mM EDTA pH 7,4

1× 10 ml PB / 1 mM EDTA pH 7,4

1× 10 ml 2 M NaCl in PB / 1 mM EDTA pH 7,4

1× 10 ml 550 mg ATP in PB / 1 mM EDTA pH 7,4 + 75 µl 10 N NaOH

3× 10 ml PBS / 1 mM EDTA

Anschließend wird der 100 000×g-Überstand in 10 ml-Portionen auf die ATP-Agarose aufgegeben. Die Tropfgeschwindigkeit sollte 1 Tropfen pro 3 Sekunden betragen. Alle 20 ml wird die ATP-Agarose mit 10 ml kaltem PBS / 1 mM EDTA gewaschen. Die Elution der 5-LO erfolgt nach folgendem Schema:

Materialien und Methoden

Elution 1-2× 10 ml 100 000×g-Überstand
 1× 10 ml PBS / 1 mM EDTA
 → weiterer 100 000×g-Überstand
 1× 10 ml PB / 1 mM EDTA pH 7,4 / 0,5 M NaCl
 1× 10 ml PB / 1 mM EDTA pH 7,4
 1× 10 ml 110 mg ATP in PB / 1 mM EDTA pH 7,4 + 15 µl 10 N NaOH
 1× 10 ml PB / 1 mM EDTA pH 7,4
Regeneration

Die einzelnen Fraktionen werden aufgefangen und für eine spätere Verwendung bei 4°C gelagert. Bei der Elution wird der erste Milliliter Eluat verworfen. Die nächsten 2,5 bis 5 ml Eluat enthalten die gesamte 5-LO Menge. Das ATP-(5-LO)-Eluat kann nun direkt für 5-LO Aktivitätstest oder für eine vollständige Aufreinigung eingesetzt werden.

Für 5-LO-Aktivitätstests mit partiell gereinigtem Enzym wird oftmals eine 5-LO Konzentration entsprechend 5 bis 20 ml E.coli-Kultur eingesetzt. Dabei kann das ATP-Eluat-Volumen so gewählt werden, dass nach Verdünnung des Eluats eine Endkonzentration von 1 mM ATP entsteht.

Herstellung eines vollständig gereinigten 5-LO-Enzyms

Die Kultivierung der MV1190-Kultur und die Aufreinigung des 5-LO Enzyms wird analog zu der Methode unter *Expression von 5-LO in MV1190- oder BL21-E.coli und partielle Reinigung des 5-LO Enzyms* beschrieben, durchgeführt, mit dem Unterschied, dass der Kultivierungsansatz 6× 750 ml Kultur umfasst, ausschließlich MV1190-E.coli verwendet, 90 ml Lysepuffer benutzt und die Partikel der E.coli-Suspension in jedem Fall mit dem Douncé-Homogenisierer zerkleinert werden. Die Ultrazentrifugation wird mit 12 Ultrazentrifugenröhrchen à 7,5 ml durchgeführt. Verwendet werden zwei ATP-Agarose-Säulen, die jeweils ein Säulenvolumen von ca. 4 ml aufweisen. Es wird mit 5 ml 20 mM ATP-Lösung eluiert, und das Eluat beider Säulen vereinigt. Zusätzlich zu der beschriebenen Methode wird eine Anionen-Austauscherchromatographie durchgeführt. Als Chromatographie-System wird eine ÄKTA Explorer von GE Healthcare mit Fraktionssammler, *super loop*-Injektionssystem, Computer-gestützter Steuerung und Aufzeichnung verwendet.

Materialien und Methoden

Folgende Parameter werden benutzt:

Fließmittel A	50 mM PB / 1 mM EDTA pH 7,4 alternativ: 50 mM Tris / 1 mM EDTA pH 7,4
Fließmittel B	50 mM PB / 1 mM EDTA / 0,5 M NaCl pH 7,4 alternativ: 50 mM Tris / 1 mM EDTA / 0,5 M NaCl pH 7,4
Flußgeschwindigkeit:	1 ml / Minute
Detektor-Wellenlängen:	211, 254, 280 nm
Säule:	Resource Q, 1 ml von GE Healthcare Amersham (Pharmacia)
Injektionssystem:	<i>super loop</i> von GE Healthcare Amersham
Fraktionsvolumen:	1 ml

Gradient:	0. - 10. Minute	Equilibrierung, 100 % Fließmittel A
	11. – 20. Minute	Probenauftrag, 100 % Fließmittel A
	21. – 30. Minute	Waschen, 100 % Fließmittel A
	31. – 45. Minute	Elution, 40% Fließmittel A / 60% Fließmittel B
	46. – 50. Minute	Elution, 100 % Fließmittel B
	51. – 60. Minute	Waschen, 100 % Fließmittel B
	61. – 70. Minute	Equilibrierung, 100 % Fließmittel A

Regeneration der Resource Q:	5 ml 1 M NaCl
	5 ml 1 M NaOH
	5 ml 1 M HCl
	5 ml 1 M NaCl

Vor dem Auftragen der ATP-Agarose-Eluats auf die ResourceQ-Säule und nach der Fraktionierung des ResourceQ-Eluats kann ein Puffertausch bzw. eine ATP-Entfernung mit Hilfe von PD10-Säulen (GE Healthcare, Amersham) durchgeführt werden.

Mit Hilfe von *spinning columns* (Millipore, 50 kDa cut off) oder *dialysis cassettes* (Thermo Pierce, Dialyse gegen PVP) kann das fraktionierte Eluat konzentriert werden.

5-LO-Aktivitätsassay

Je nach eingesetzter 5-LO-Quelle, wird die Zusammensetzung der Inkubationsbedingungen angepasst. Optimale Versuchsbedingungen sind gegeben, wenn gereinigtes Enzym eingesetzt wird und nach Zugabe von 1 mM ATP, 25 µg/ml Phosphatidylcholin und 25 µg/ml γ -Globulin mit 20 µM AA und 1 mM Calcium stimuliert wird.

Vor der eigentlichen Inkubation werden die zu untersuchenden Test- und Kontrollsubstanzen zugegeben und entweder bei RT (intakte Zellen) oder auf Eis vorinkubiert. Die Vorinkubationszeit muß jeweils empirisch ermittelt werden. Nach Zusatz von AA / Ca^{2+} / Ionophor werden die präparierten Inkubationsansätze bei 37°C für 10 Minuten inkubiert.

Diese Parameter sind, je nach Ausrichtung der Experimente, austauschbar oder sehr variabel einsetzbar. Die Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen ist unbedingt notwendig.

Intakte Zellen

PMNL (5×10^6), RBL-1 (5×10^6), RAW 264.7 (2×10^7) oder HeLa (5×10^6) werden, wie unter *Zellkultur und Zelllinien* beschrieben, geerntet und in 50 ml-Falcons überführt, zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT), in 5 ml PBS (RT) resuspendiert und vereinigt. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und in 5 ml PBS (RT) aufgenommen und gezählt (*Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblau-Methode*). Die Zellen werden in der entsprechenden Menge PGC-Puffer bei RT resuspendiert. Die Zellen werden mit den Kontroll- und Testsubstanzen bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von AA und Calcium-Ionophor wird 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird 1 ml eiskalter 100%-iger Methanol zugegeben. Die Proben können bei -20°C vorübergehend gelagert werden.

Anschließend werden die entstandenen 5-LO Produkte (LTB₄, Epi-Trans- / Trans-Isomere des LTB₄, 5-H_pETE und 5-HETE) wie unter *Festphasenextraktion und HPLC-Analyse der 5-LO-Metabolite* beschrieben analysiert. Die Vorinkubations- und Stimulationsbedingungen sind, je nach experimentellem Vorhaben, variabel und werden bei den einzelnen Experimenten angegeben.

Homogenat

PMNL, RBL-1 oder RAW 264.7 (5×10^6 Zellen pro Inkubation) werden in PBS-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Den Proben wird 1 mM EDTA zugefügt und 3 x 8 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Bandelin, Sonoplus HD 200) homogenisiert, 1 mM ATP zugefügt und mit Kontroll- oder Testsubstanzen auf Eis vorinkubiert. Die Proben werden 30 Sekunden bei 37°C erwärmt und mit AA und 2 mM CaCl_2 stimuliert. Nach 10 Minuten bei 37°C werden die Proben mit 1 ml eiskaltem 100%-igen Methanol versetzt, gevortext und auf Eis gestellt. Die Proben können bei -20°C vorübergehend gelagert werden.

Anschließend werden die entstandenen 5-LO Produkte (LTB_4 , Epi-Trans- / Trans-Isomere des LTB_4 , 5-HPETE und 5-HETE) wie unter *Festphasenextraktion und HPLC-Analyse der 5-LO-Metabolite* beschrieben analysiert. Die Vorinkubations- und Stimulationsbedingungen sind, je nach experimentellem Vorhaben, variabel und werden bei den einzelnen Experimenten angegeben.

100 000×g Überstände (S100)

Das Homogenat wird wie oben beschrieben hergestellt und bei 4°C für 70 Minuten und 38000 rpm (100 000×g) zentrifugiert (Rotor Ti70, Beckman Optima Le-80 K). Nach Zugabe von 1 mM ATP werden die Proben mit Kontroll- oder Testsubstanzen auf Eis vorinkubiert. Die Inkubationen werden wie unter Homogenate beschrieben durchgeführt und die entstandenen 5-LO Produkte werden wie unter *Festphasenextraktion und HPLC-Analyse der 5-LO-Metabolite* beschrieben analysiert.

Partiell gereinigte 5-LO

Die 5-LO kann mittels Affinitätschromatographie gebunden werden und mit ATP eluiert werden. Die Isolierung wird mit Hilfe von ATP-Agarose bei 4°C durchgeführt. Die ATP-Agarose wird wie unter *Expression von 5-LO in MV1190- oder BL21-E.coli* beschrieben vorbereitet. Der 100 000×g-Überstand wird auf die ATP-Agarose aufgegeben. Das erhaltene Eluat wird mit PBS / 1 mM EDTA – Puffer auf eine entsprechende 5-LO-Menge von 5×10^6 bis $2,5 \times 10^7$ -Zellen eingestellt. Es wird nun mit Kontroll- und Testsubstanzen auf Eis vorinkubiert. Die Inkubationen werden wie unter Homogenate beschrieben durchgeführt und die entstandenen 5-LO Produkte werden wie unter *Festphasenextraktion und HPLC-Analyse der 5-LO-Metabolite* beschrieben analysiert.

Festphasenextraktion und HPLC-Analyse der 5-LO-Metabolite

Nach der Inkubation und dem Abstoppen der Proben mit 1 ml 100 % Methanol, werden die Proben mit 500 µl PBS, 30 µl HCl und 10 µl PGB₁ (ca. 200 ng) versetzt, gemischt und bei 4°C, 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend werden aus dem Überstand mittels Festphasenextraktion die 5-LO Metabolite extrahiert.

Dazu konditioniert, belädt und regeneriert man die Festphasenkartuschen (UCB, RP-18) nach folgendem Schema:

Konditionierung	1 ml 100 % Methanol 1 ml MilliQ-H ₂ O
Probenbeladung	ca. 2,54 ml
Waschen	1 ml MilliQ-H ₂ O 1 ml 25 % Methanol
Elution	300 µl 100 % Methanol

Den eluierten Proben wird 120 µl MilliQ-H₂O zugegeben. 100 µl des Eluats werden mittels HPLC analysiert.

Folgende 5-LO-Metabolite können durch die HPLC-Analyse qualitativ und quantitativ bestimmt werden: Epi-Trans-/Trans-LTB₄, LTB₄, 5-HpETE und 5-HETE. Zur Quantifizierung wird der Probe als interner Standard PGB₁ zugegeben. Die absolute Menge an PGB₁ wird vorab quantitativ bestimmt.

Die HPLC-Analyse wird mit folgenden Parametern durchgeführt:

Probenvolumen	100 µl Eluat der Festphasenextraktion
Stationäre Phase	Novapak C-18 Radial-Pak Säule von Waters (100 mm × 5 mm I.D., 4 µm Partikelgröße)
Mobile Phase	Methanol / MilliQ-H ₂ O / TFA (74/26/0,007 V/V/V)
Fluß	1,2 ml / Minute
Detektion	UV: 0. bis 8. Minute 280 nm, danach 235 nm
Auswertungssoftware	Millenium 3.0 von Waters

Die Dauer des HPLC-Laufs beträgt 22 Minuten, anschließend wird für 3 Minuten mit 100 % Methanol / 0,007 % TFA gespült und 5 Minuten mit der mobilen Phase equilibriert. Danach ist das HPLC-System für eine neue Analyse vorbereitet.

Die Berechnung der Menge der 5-LO-Metabolite wird in ng pro 10^6 Zellen ausgegeben. Wird die 5-LO Aktivität von rekombinantem Protein bestimmt wird die Menge in ng pro entsprechende Menge E.coli-Kulturvolumen angegeben.

Angleichung (Alignment) von 3D-Molekülstrukturen

Das flexible Angleichen von Molekülstrukturen wird mit MOE 2005.06 (The Chemical Computing Group, Montreal, Canada, www.chemcomp.org) durchgeführt. Es werden die Standard-Einstellungen des Programms benutzt, inklusive des *standard force field* MMFF.94x. Für die Darstellung der Eigenschaften eines gemeinsamen Pharmacophors beim Angleichen von unterschiedlichen 3D-Molekülstrukturen wird eine erweiterte Version von SQUID (219) verwendet. *Potential-Pharmacophore-Points* (PPPs) werden als Ellipsoide dargestellt. Die Eigenschaften des gemeinsamen Pharmacophors werden mit folgenden Clusterradien in PPPs gebündelt: Lipophile PPPs: 1,6 Å, Wasserstoffbrückenbindung Donor PPPs: 1,9 Å, Wasserstoffbrückenbindung Akzeptor PPPs: 2,3 Å. Die Visualisierung wird mit PyMOL (DeLano Scientific) durchgeführt.

Statistik

Die vorgestellten Daten der Reihenuntersuchungen wurden statistisch ausgewertet. Um einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Mittelwerten zu beweisen wurden diese Wertepaare mittels Student's *t*-test ausgewertet. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p = 0,05$) vorausgesetzt und Werte kleiner $p < 0,05$ für signifikant befunden. Die einzelnen Mittelwerte setzen sich aus unabhängigen Mehrfachbestimmungen zusammen ($n =$ mindestens 3). In den Abbildungen stellen die Fehlerbalken die positiven Standardfehler (S.E.) dar.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Niedermolekulare Modifikationen der 5-LO

4.1.1. U-73122 hemmt potent die 5-LO-Produktbildung

Feisst et al. konnte zeigen, dass U-73122 potent die 5-LO-Produktbildung am gereinigten 5-LO-Enzym aus *E.coli* (IC_{50} -Wert: 30 nM, Abb. 4.1.1 A) und im PMNL-Homogenat hemmt. Dieser Effekt ist selektiv für die Hemmung am 5-LO-Enzym, nicht aber für 12- oder 15-LO (Abb. 4.1.1 B (1,220)).

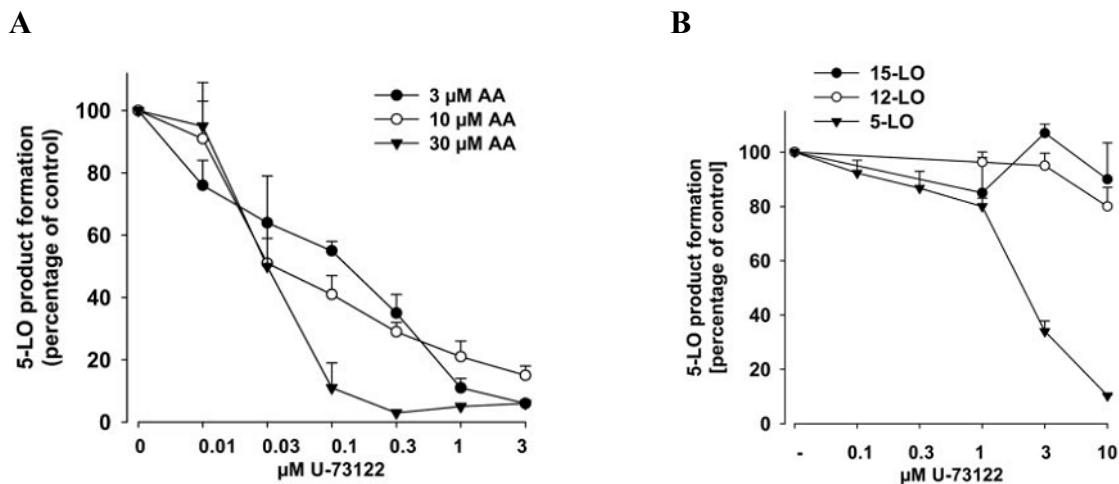


Abb. 4.1.1 5-LO Produkthemmung von U-73122 (A) Gereinigte 5-LO aus *E.coli* wurde mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122 vorinkubiert und nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} und 3, 10, 30 μ M AA 10 Minuten bei 37°C inkubiert. (B) Homogenate von $7,5 \times 10^6$ PMNL bzw. 1×10^8 Thrombozyten wurden mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122 vorinkubiert, nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} und 40 μ M AA 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt. Durchgeführt von C. Feisst (1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von U-73122 auf die 5-LO-Aktivität untersucht, mögliche molekulare Mechanismen sollten identifiziert werden.

Ursprünglich wurde U-73122 als PLC-Inhibitor eingesetzt, der selektiv die PLC-abhängigen Prozesse nach Rezeptor-Aktivierung hemmt (221). Es konnte gezeigt werden, dass U-73122 direkt die PLC-Aktivität *in vitro* und die Rezeptor-abhängige Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und 1,2-Diacylglycerol in PMNL hemmt (222-224). Strukturell besitzt U-73122 eine elektrophile Maleinimidgruppe (Abb. 4.1.2 A) die Thiol-Reaktivität zeigt und mit SH-Gruppen von z.B. Cysteinen in Proteinen reagieren kann (225).

Ergebnisse und Diskussion

Verschiedene Bestandteile in Zellmedien können die Stabilität von U-73122 beeinflussen und die Aktivität der Substanz durch Bindung von Glutamat oder Glutathion herabsetzen (226). Der strukturell ähnliche Substanz U-73343 (Abb. 4.1.2 B) fehlt die Doppelbindung der Maleinimidgruppe und daher eignet sich die Substanz als Negativkontrolle für weitere Studien (222,223). NEM (N-Ethylmaleinimid, Abb. 4.1.2 C) besteht nur aus einer Maleinimid-Gruppe und kann als „Thiol-Fänger“ eingesetzt werden (225). Abbildung 4.1.2 D zeigt die Reaktion zwischen U-73122 bzw. NEM und einem freien Thiol (z.B. Cystein, Glutathion).

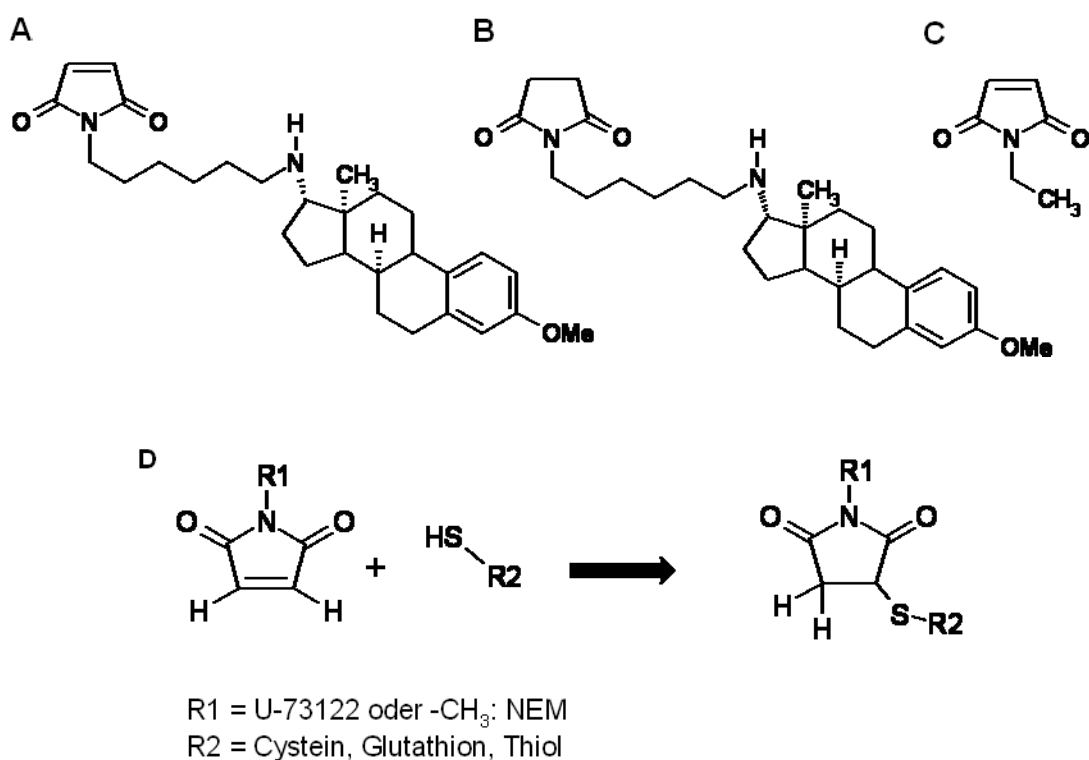


Abb. 4.1.2 Strukturen von (A) U-73122, (B) U-73343 und (C) NEM (N-Ethylmaleinimid), (D) Chemische Reaktion zwischen elektrophiler Maleinimid-Gruppe und Thiol.

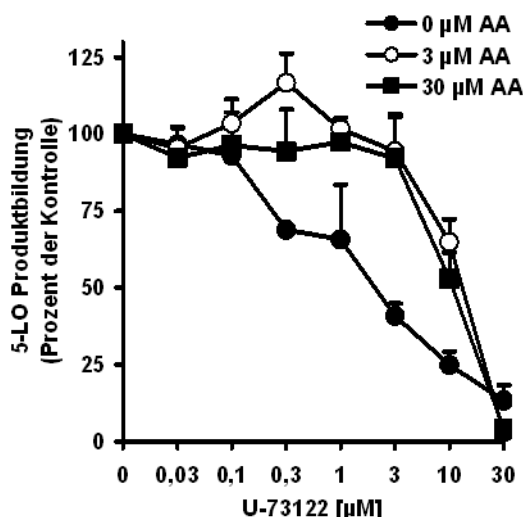


Abb. 4.1.3 5-LO Produkthemmung von U-73122 in intakten PMNL in Abhängigkeit von der AA-Konzentration 5×10^6 intakte PMNL wurden mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122 15 Minuten bei RT vorinkubiert. Stimuliert wurde durch Zugabe von 1 mM Ca^{2+} , den angegebenen AA-Konzentrationen und $2,5 \text{ µM}$ Ionophor. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Wie aus Abb. 4.1.3 ersichtlich, hemmt U-73122 die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL mit einem IC_{50} -Wert von ca. 10 µM , ohne exogenes Substrat liegt der IC_{50} -Wert bei $1 - 3 \text{ µM}$.

Bindet man GSH durch NEM ist die inhibitorische Potenz von U-73122 in intakten Zellen deutlich gesteigert, da weniger freies Glutathion zur Verfügung steht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die 5-LO-Hemmung durch U-73122 am gereinigten Enzym durch die Zugabe von 1 mM Glutathion herabgesetzt wird (1). Diese Daten weisen auf eine kovalente Bindung von U-73122 an Thiole hin. Die Bindung von U-73122 an Cysteine reicht aber nicht aus, um den starken Hemmeffekt von U-73122 zu klären, da NEM alleine keine Hemmung der 5-LO-Aktivität am gereinigten Enzym zeigt. Der Aminosteroid-Grundkörper von U-73122 und die Bindung an Cysteine könnten gemeinsam für die sehr potente 5-LO-Hemmung verantwortlich sein.

4.1.2. Cystein-Verteilung innerhalb der Lipoxygenasen und der 5-LO

Humane 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren, wovon 13 Aminosäuren Cysteine sind (Abb. 4.1.4). Neun dieser Cysteine sind teilweise bzw. direkt an der Oberfläche positioniert (Abb. 4.1.5). Vier Cysteine sind innerhalb des Proteins lokalisiert, zwei dieser Cysteine (Cys240 und Cys561) könnten möglicherweise eine Disulfidbrücke ausbilden, da sich die

Ergebnisse und Diskussion

SH-Gruppen im Computer-Modell der 5-LO sehr nahe kommen. Der gemessene Abstand zwischen den Schwefel-Atomen beträgt 3,75 Å (Abb. 4.1.6).

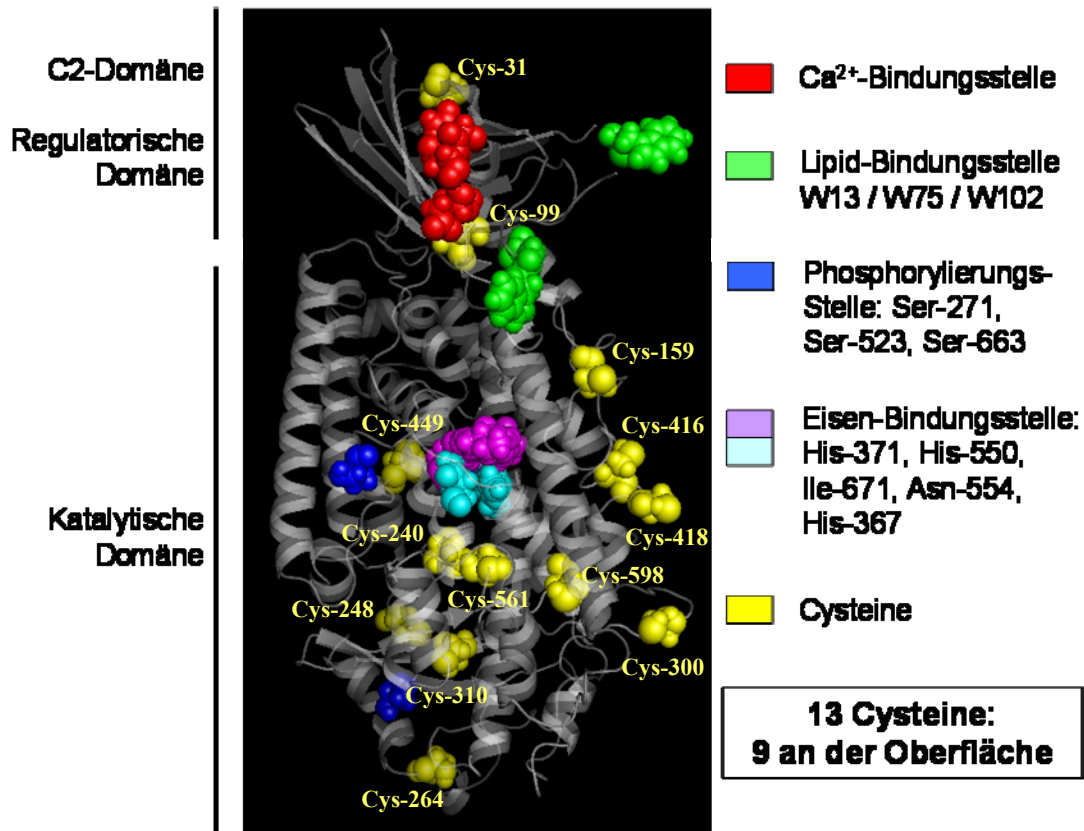
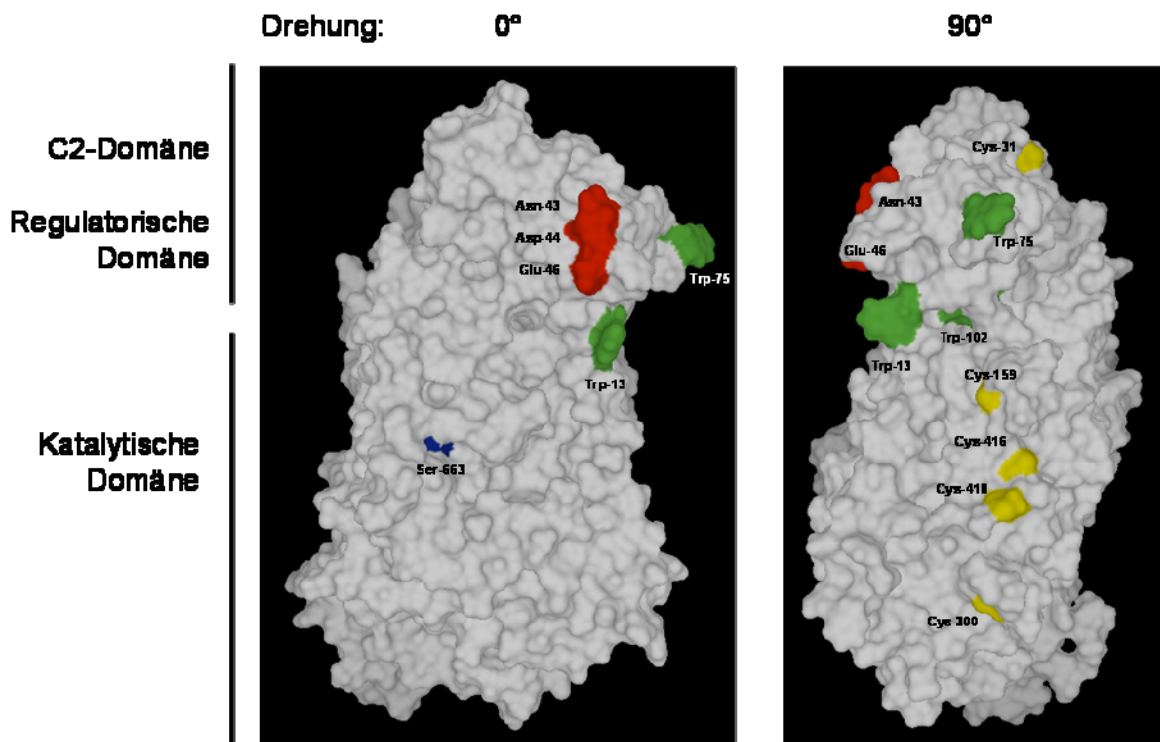


Abbildung 4.1.4 Computer-basierendes Modell der humanen 5-LO Gelb: Cysteine, Blau: Phosphorylierung, Rot: Ca²⁺-Bindungsstelle, Grün: Lipid-Bindungsstelle, Cyan/Magenta: Eisen-Bindungsstelle.



Ergebnisse und Diskussion

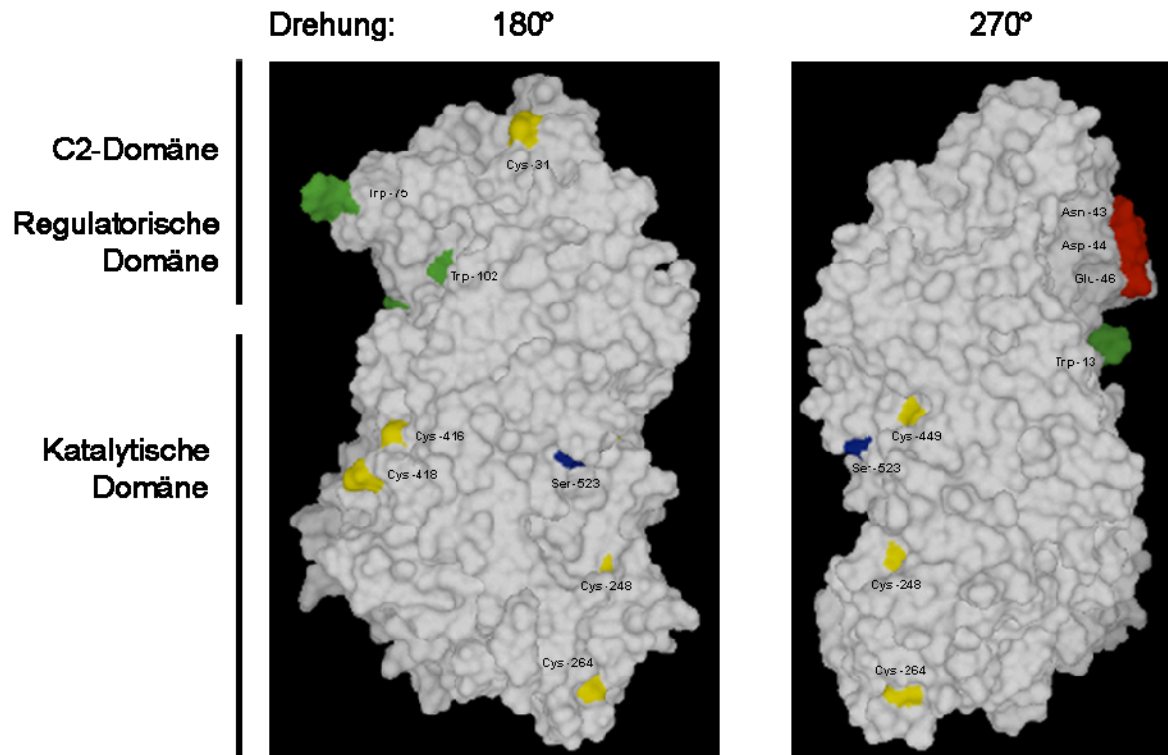


Abbildung 4.1.5 Oberfläche der 5-LO Gelb: Cysteine, Blau: Phosphorylierung, Rot: Ca^{2+} -Bindungsstelle, Grün: Lipid-Bindungsstelle.

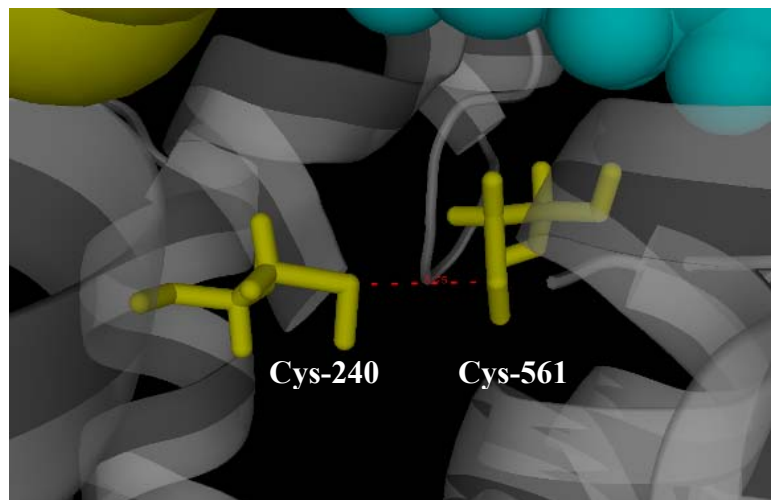
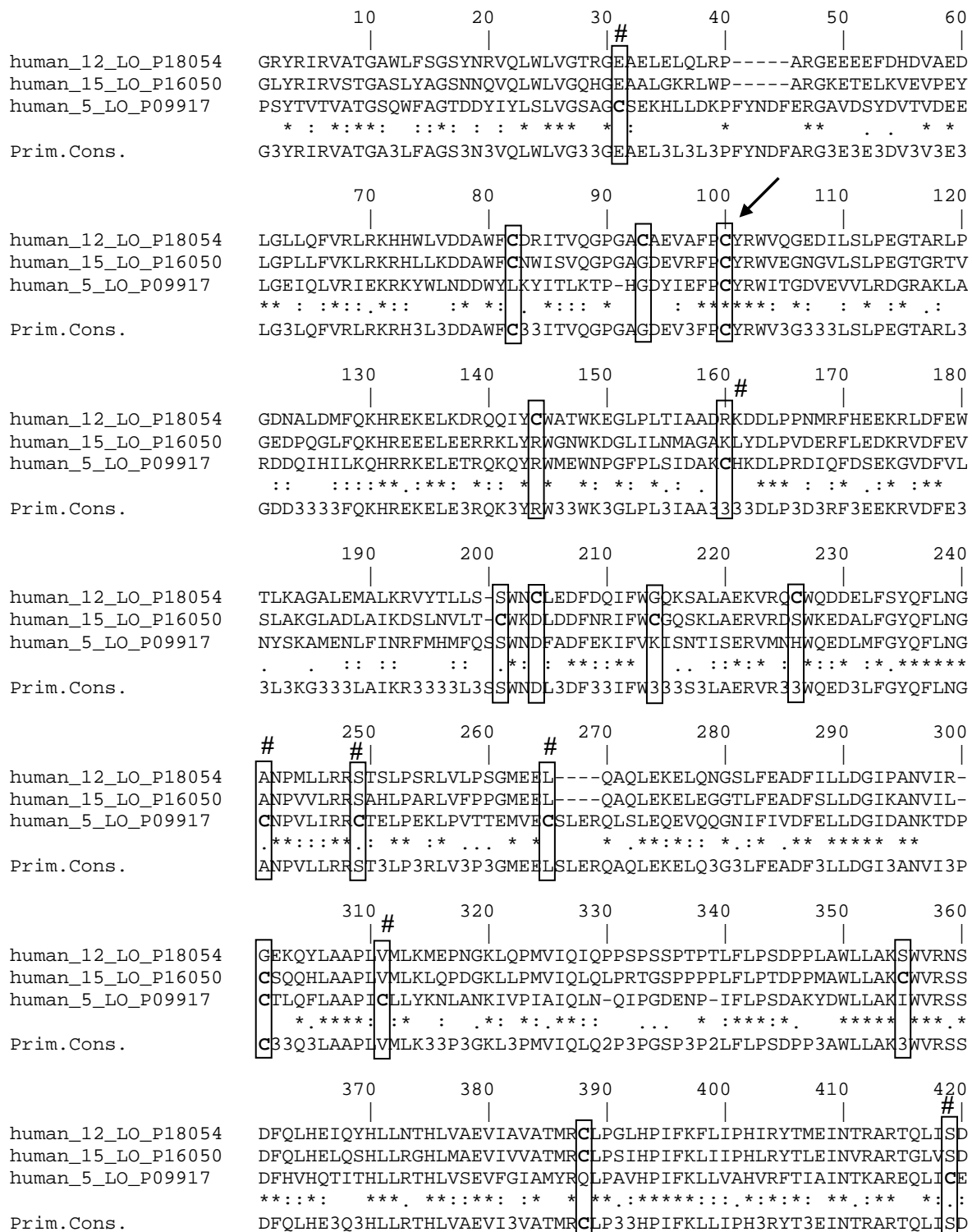


Abbildung 4.1.6 Annäherung von Cys240 und Cys561 Der Abstand zwischen den beiden Schwefel-Atomen der Cysteine (gelb) beträgt 3,75 Å (rot).

Da U-73122 keinen Einfluss auf die humane 12- und 15-LO-Aktivität besitzt (1), ermöglicht ein Vergleich der Proteinsequenzen der humanen Lipoxygenasen die Identifizierung von Cysteinen innerhalb der humanen 5-LO, die den hemmenden Effekt des U-73122 vermitteln.

Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abb. 4.1.7 ersichtlich wird, sind Cystein-99 und Cystein-449 (Position bezogen auf 5-LO) in allen LO-Typen identisch. Die restliche Verteilung der Cysteine folgt keiner Regelmäßigkeit und ist nicht sehr stark konserviert. Vielmehr ist auffällig, dass die Anordnung der 5-LO-Cysteine von den anderen LO-Typen abweicht. Daher erscheint ein selektiver Hemmeffekt von U-73122 auf die humane 5-LO möglich (Abb. 4.1.1 B).



Ergebnisse und Diskussion

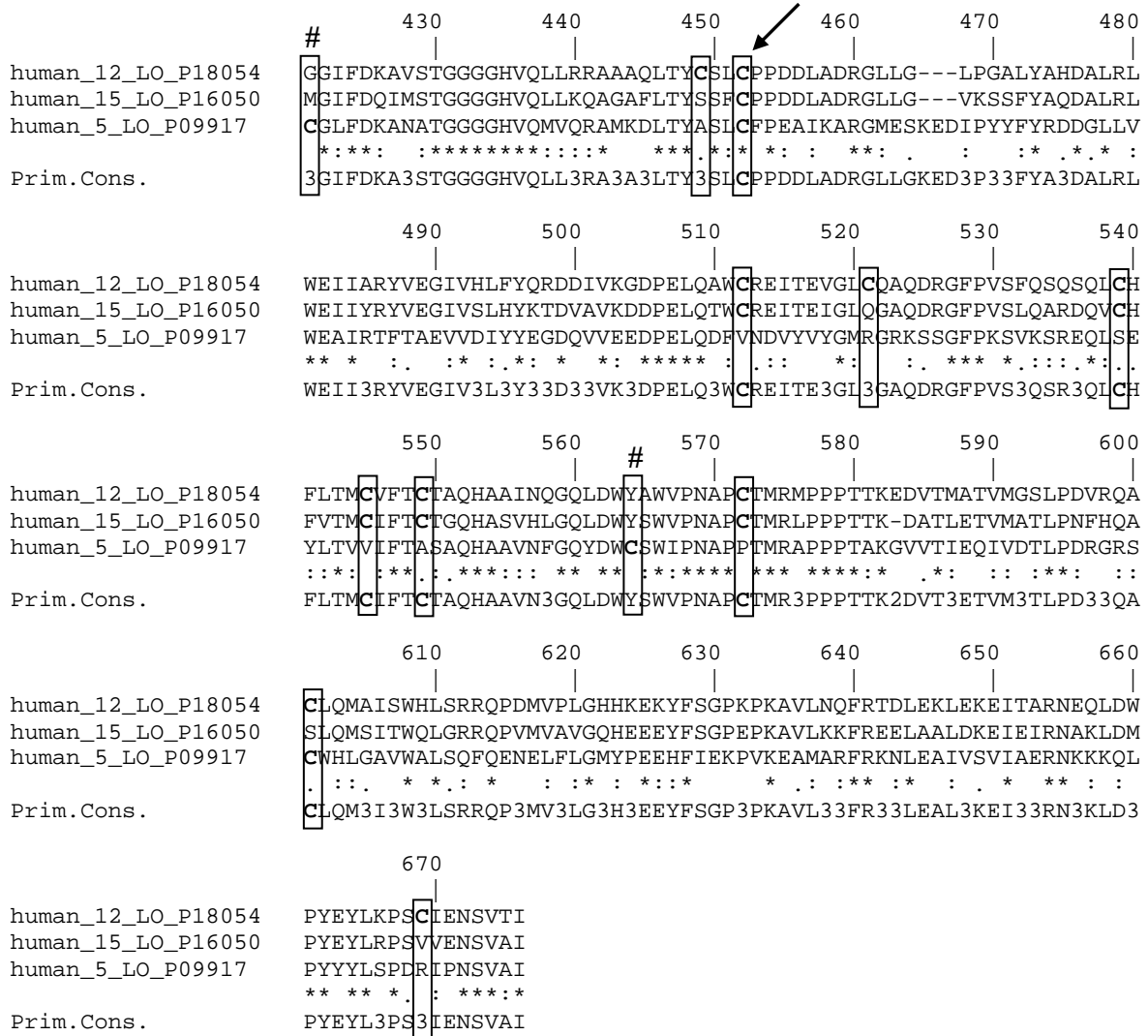


Abb. 4.1.7 Sequenzvergleich von 5-, 12- und 15-LO mit clustalW

Die Proteinsequenzen von humaner 5-LO (P09917), 12-LO (P18054) und 15-LO (P16050) wurden mit der Software clustalW gegenübergestellt. Innerhalb der Konsensussequenz sind identische Aminosäuren durch „*“, ähnliche durch „:“ und schwach ähnliche durch „.“ gekennzeichnet. Cysteine sind durch Boxen hervorgehoben. Cysteine die in allen drei LO-Typen vorhanden sind, sind mit einem Pfeil markiert. Cysteine die nur innerhalb der 5-LO vorkommen, sind mit „#“ gekennzeichnet.

Nach dem oben beschriebenen Sequenzvergleich (Abb. 4.1.7) können Cystein-99 und -449 der 5-LO mit hoher Wahrscheinlichkeit als die für den Effekt vermittelnden Aminosäuren ausgeschlossen werden, da sie auch in 12- und 15-LO vorhanden sind, aber nur 5-LO durch U-73122 hemmbar ist.

Für die Hemmung könnten Cystein-31, -159, -248, -264, -300, -416 und/oder -418 verantwortlich sein, da diese Cysteine an der Oberfläche des Proteins sitzen und für eine Bindung zugänglich wären.

Die Cysteine 240, 310 und 561 sind ebenfalls nur in der 5-LO enthalten (im Vergleich zu 12- und 15-LO), sie sind allerdings innerhalb des Proteins angesiedelt und somit nicht zugänglich.

4.1.3. 5-LO-Hemmung durch U-73122 in RAW 264.1-Zellen

Vergleicht man die Verteilung der Cysteine der unterschiedlichen 5-LO-Spezies (Human, Maus, Ratte) mit Hilfe der clustalW-Software (Proteinsequenzvergleich im Anhang unter 8.5) untereinander, fällt auf, dass nur Cystein-418 unterschiedlich ist. Der Vergleich des Effekts von U-73122 auf die 5-LO-Produktbildung in RAW264.1- und RBL1-Zellen soll zeigen, ob Cystein-418 für die Bindung von U-73122 in Frage kommt.

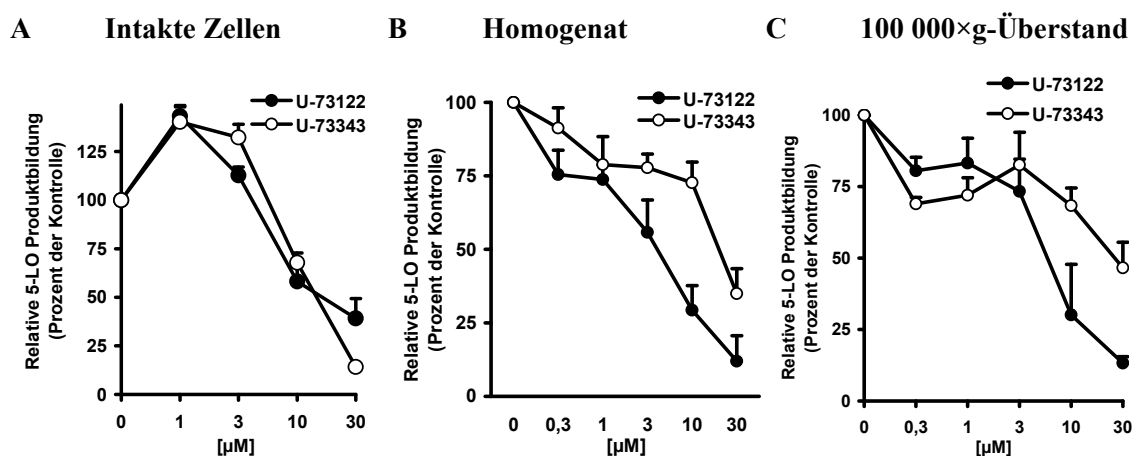


Abb. 4.1.8 Effekte von U-73122 und U-73343 auf die 5-LO-Aktivität in RAW 264.1-Zellen 2×10^7 intakte RAW264.7-Zellen oder 5×10^6 RAW264.1-Zellen wurden als Homogenat und 100 000xg-Überstand verwendet. Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122, U-73343 oder DMSO bei RT (intakte Zellen) oder auf Eis 5 - 10 Minuten vorinkubiert. (A) Nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} und 2,5 µM Ionophor wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. (B+C) Die Proben wurden 30 Sekunden bei 37°C vorgewärmt und nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} und 20 µM AA wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Wie aus Abb. 4.1.8 ersichtlich, hemmt U-73122 in intakten RAW 264.7-Zellen, im Homogenat und im 100 000xg-Überstand die 5-LO-Produktbildung mit einem IC_{50} -Wert von ca. 10 µM, 3 - 10 µM bzw. 3 - 10 µM. Interessanterweise zeigt das als Negativkontrolle gedachte U-73343 ebenfalls eine potente Hemmung der 5-LO-Produktbildung, vergleichbar mit U-73122. Im Homogenat und im 100 000xg-Überstand ist die Hemmwirkung von U-73343 etwas schwächer als von U-73122. Der IC_{50} -Wert für die 5-LO-Hemmung durch U-73343 liegt für das Homogenat und den 100 000xg-Überstand bei 30 µM.

4.1.4. 5-LO-Hemmung durch U-73122 in RBL-1-Zellen

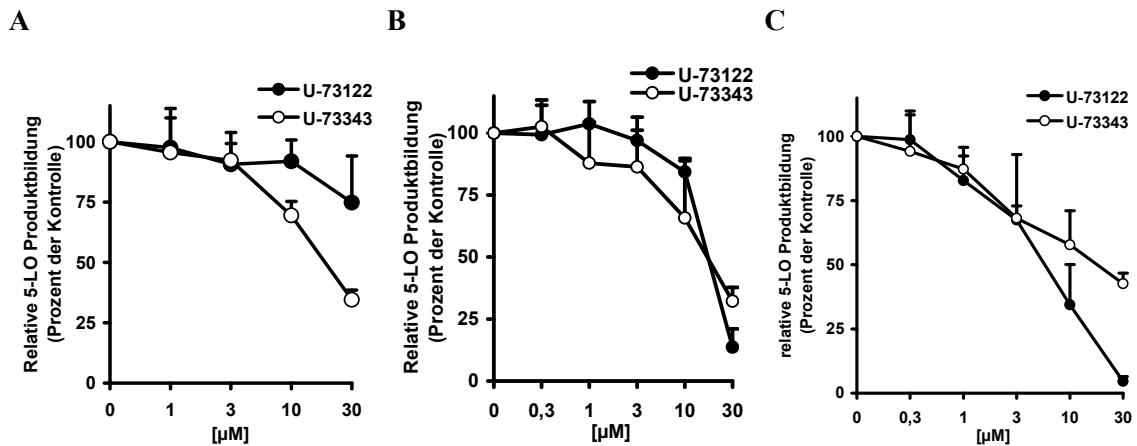


Abb. 4.1.9 Effekte von U-73122 und U-73343 auf die 5-LO-Aktivität in RBL-1-Zellen Für Inkubationen an intakten Zellen, im Homogenat und 100 000×g-Überständen wurden jeweils 5×10^6 RBL-1/ml verwendet. Beim Homogenat und 100 000×g-Überstand wurde 1 mM ATP zugesetzt. Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122, U-73343 oder DMSO bei RT (intakte Zellen) oder bei 4°C 5 – 10 Minuten vorinkubiert. (A) Stimulation mit 1 mM Ca^{2+} und 2,5 μM Ionophor. (B+C) Stimulation mit 1 mM Ca^{2+} und 20 μM AA. Daten stammen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

U-73122 hemmt in intakten RBL-1-Zellen (Abb. 4.1.9) nicht. Die Negativkontrolle U-73343, hemmt in intakten RBL-1-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von ca. 10-30 μM. In Homogenaten und im 100 000×g-Überstand ist die Hemmwirkung von U-73122 und U-73343 bei 10-30 μM.

Da beide Substanzen die 5-LO-Aktivität hemmen, kann für Cystein-418 der 5-LO, die die einzige Abweichung eines Cysteins innerhalb der Proteinsequenz von Maus- und Ratten-5-LO im Vergleich zur humanen 5-LO darstellt (Sequenzvergleich 5-LO Spezies, Anhang 8.5), keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Position eine Bindungsstelle für U-73122 darstellt.

Somit kommen für eine U-73122-Bindung mit gleichzeitiger 5-LO-Hemmung die Cysteine 31, 159, 248, 264, 300, 416 und 418 in Frage.

4.1.5. Kovalente Bindung von U-73122 an 5-LO

Der Hemmeffekt von U-73122 wird möglicherweise über eine direkte kovalente Bindung der Substanz an die humane 5-LO vermittelt.

Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde mittels MALDI-MS versucht, kovalent gebundenes U-73122 an der 5-LO nachzuweisen. Hierfür wird das Protein in optimaler Reinheitsqualität benötigt. Die Rahmenbedingungen für die MS-Analyse stellen hohe Anforderungen an die Proben- und Proteinqualität (227). Es dürfen nur Spuren von Fremdprotein enthalten sein und die Salz- und Detergenz-Konzentration sollte so niedrig wie möglich sein. Zur Kontrolle der korrekten Expression und Faltung, sollte die 5-LO nach Durchführung des Aufreinigungsprotokolls in einem aktiven Zustand sein, d.h. die 5-LO-Aktivität sollte unter Standardbedingungen gewährleistet sein.

Die vollständige Aufreinigung der 5-LO wird unter *Methoden - Herstellung eines vollständig gereinigtem 5-LO-Enzyms* beschrieben.

Es wurden jeweils Ansätze von 8×750 ml E.coli-Kultur, transformiert mit wt-5-LO-pT3-Plasmid, angefertigt und die überexprimierte 5-LO nach Protokoll aufgearbeitet und mit Hilfe einer MonoQ-Anionen-Austauscher-Säule zu ca. 99% gereinigt. Wie in Abb. 4.1.4 exemplarisch dargestellt, ist die Ausbeute und Reinheit der 5-LO sehr hoch. Die 5-LO-enthaltenden Fraktionen wurden mit Glycerol gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die 5-LO-Aktivität ist nach der Aufreinigung noch vorhanden und nach mehreren Tagen im eingefrorenen Zustand vollständig gewährleistet. Es konnte beobachtet werden, dass tiefgefrorene 5-LO-Proben nach dem Auftauen teils sehr viel höhere Aktivität besitzen als direkt nach der Aufreinigung (Daten sind nicht gezeigt). Für eine ausreichende 5-LO-Produktbildung muss $25 \mu\text{g/ml}$ γ -Globulin und $25 \mu\text{g/ml}$ Phosphatidylcholin hinzu gegeben werden.

Sind an die Probenqualität noch weitere Anforderungen gestellt, können die Proben nach MonoQ-Aufreinigung noch mit Hilfe einer PD10-Säule (GE Healthcare Pharmacia) umgepuffert bzw. entsalzt werden. Eine weitere Möglichkeit der Entsalzung und Aufkonzentration ohne große Verluste ist die Dialyse in Dialysekassetten der Firma Thermo Pierce. Die 5-LO-Lösung kann auch mit Microspin-Säulen von Millipore aufkonzentriert werden.

Ergebnisse und Diskussion

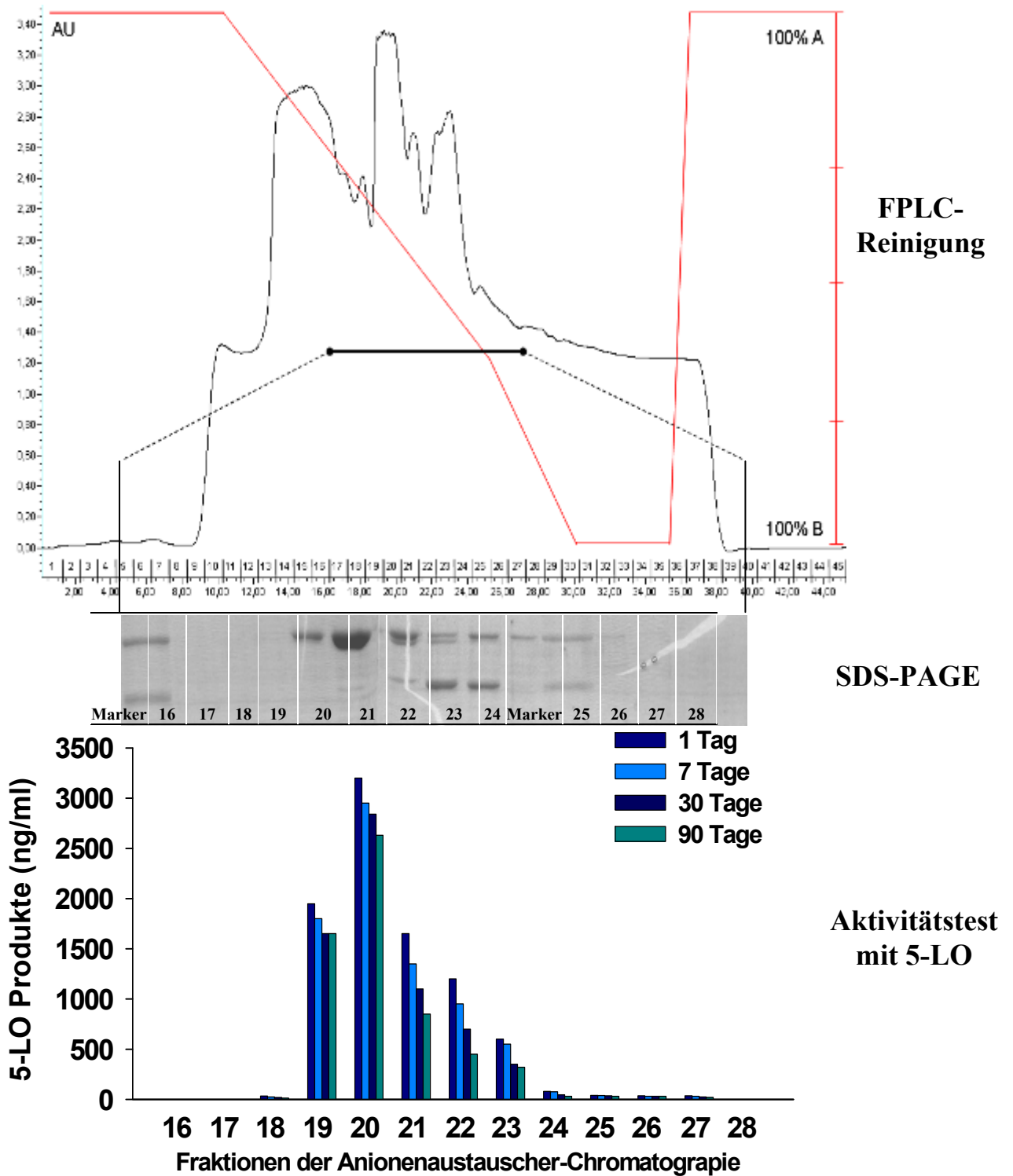


Abb. 4.1.10 Aufreinigung des 5-LO-Enzyms FPLC-Aufreinigung: Lösung A, PB/1 mM EDTA pH 7,4; Lösung B, PB / 1 mM EDTA / 0,5 M NaCl pH 7,4; Detektion bei 211 nm, 1 ml Fraktionierung, Fluss 1 ml pro Minute, 1 ml MonoQ-Säule (ResourceQ, GE Healthcare, Amersham). Die Fraktionen wurden mit 300 μ l 50 % Glycerol gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. SDS-PAGE: 10 μ l der angegebenen Fraktionen + 10 μ l Loading-Puffer pro Tasche, 10% Tris/HCl-Gel, All-Blue Marker, Coomassie-Färbung. 5-LO-Aktivitätstest: 10 μ l der angegebenen Fraktion (direkt nach Aufreinigung bzw. nach Einlagerung der angegebenen Dauer bei -70°C), 25 μ g γ -Globulin, 25 μ g Phosphatidylcholin, 1 mM ATP ad 1 ml PBS / 1 mM EDTA, inkubiert mit 1 mM Ca^{2+} und 20 μ M AA bei 37°C für 10 Minuten.

Ergebnisse und Diskussion

Zum Nachweis der kovalenten Bindung von U-73122 an 5-LO muss im MALDI-MS-Experiment ein entsprechender Massenshift zu beobachten sein. Die Kontrollinkubationen mit U-73343 sollten im Vergleich mit U-73122 keine Massenshifts bewirken. NEM, das nur über eine Maleinimid-Gruppe verfügt, könnte ebenfalls zu Massenshifts der Thiol-haltigen Peptide führen. Glutathion verfügt über eine freie Thiol-Gruppe, daher sollte U-73122, in einem Kontrollexperiment mit Glutathion vollständig gebunden werden und nicht mehr für die Bindung an 5-LO zur Verfügung stehen.

Um Massenshifts von kovalent gebundenen Molekülen an Peptide erkennen zu können, muss eine vordefinierte Massenliste erstellt werden (Tab. 8.6). Diese Massenliste generiert sich aus dem Verdauemuster von 5-LO mit Trypsin (*sequencing grade*, Roche). Da Trypsin nicht immer jede potentielle Schnittstelle erkennt oder erreicht, kann es zu größeren Peptiden kommen. Diese Peptide werden als Peptidmassen aufgelistet, die einmal nicht geschnitten wurden (*number of miscleavages*, #MC), aber eine potentielle Sequenz enthalten, die durch Trypsin geschnitten werden könnte. Die fiktiven Massen, die durch die kovalente Bindung von U-73122 oder von Glutathion entstehen können, sind in den beiden rechten Spalten der Tab. 8.6 aufgelistet. Anhand dieser Massenvorhersage können gemessene MS-Spektren und die daraus resultierenden Massenlisten abgeglichen werden und mögliche Massenshifts erkannt werden.

Die direkte Detektion eines Massenpeaks ist eine Möglichkeit Massenshifts und somit eine Bindung eines Moleküls an ein Peptid nachzuweisen. Das Verschwinden einer Primärmasse (ungebundenen Peptid), die ohne die Zugabe des bindenden Moleküls detektierbar war, ist eine zweite (indirekte) Möglichkeit das Vorhandensein einer kovalenten Bindung zu identifizieren.

Für die MALDI-MS-Untersuchung wurden ca. 1 µg gereinigtes 5-LO-Protein mit U-73122, U-73343, NEM und/oder Glutathion bei 37°C inkubiert und anschließend mit Trypsin verdaut (Tab. 4.1.1.). Die Peptide wurden als Rohlösung oder als ZipTip®-gereinigte Proben für die MALDI-MS-Analyse eingesetzt. Als Träger diente α-Cyano-Zimtsäure-Lösung im Verhältnis 1:1, die beste Laserintensität wurde empirisch ermittelt. Die erhaltenen Spektren wurden mit den bekannten Peaks des Trypsins mit Hilfe der Software Data Explorer von Applied Biosystems nachkalibriert. Nachfolgend sind beispielhaft einige der wichtigsten Massenspektren aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Inkubation	Endoproteinase	Matrix, Aufarbeitung	Massenliste	Abbildung
5-LO	Trypsin	α -Cyano, ZipTip	8.6	4.1.12
5-LO + 10 μ M U-73122	Trypsin	α -Cyano, ZipTip	8.7	4.1.11
5-LO + 1 mM GSH	Trypsin	α -Cyano, ZipTip	8.8	4.1.13

Tab. 4.1.1 Übersicht über die Inkubationsbedingungen mit Thiol-sensitiven Substanzen, Verdau mit Trypsin und nachfolgender MALDI-MS-Analyse.

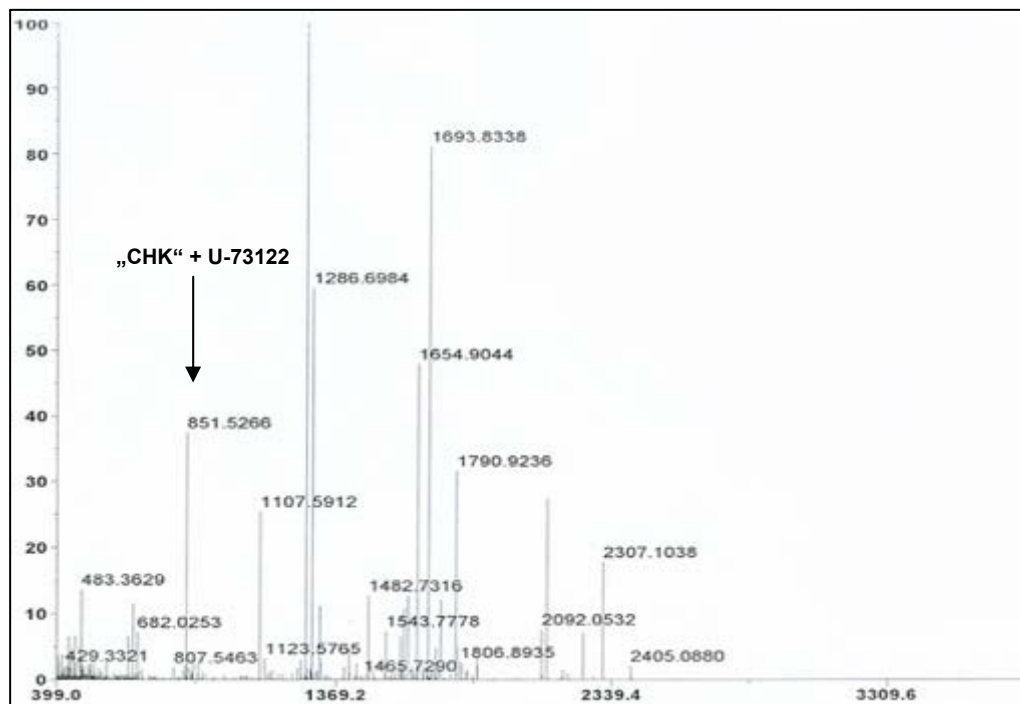


Abb. 4.1.11 5-LO inkubiert mit U-73122, verdaut mit Trypsin.

1 μ g vollständig gereinigte 5-LO und 10 μ M U-73122 wurden für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Trypsin wurde in einem Verhältnis von 1:50 (Trypsin:5-LO) zugegeben und es wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Die dazugehörige Massenliste ist im Anhang (Tab. 8.8) angefügt und das ausgewählte MS-Spektrum wurde mit einer Voyager DE-PRO aufgezeichnet. Die verdauten Peptide wurden mit ZipTip® gereinigt und konzentriert. Als Matrix wurde α -Cyano-Zimtsäure im Verhältnis 1:1 verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

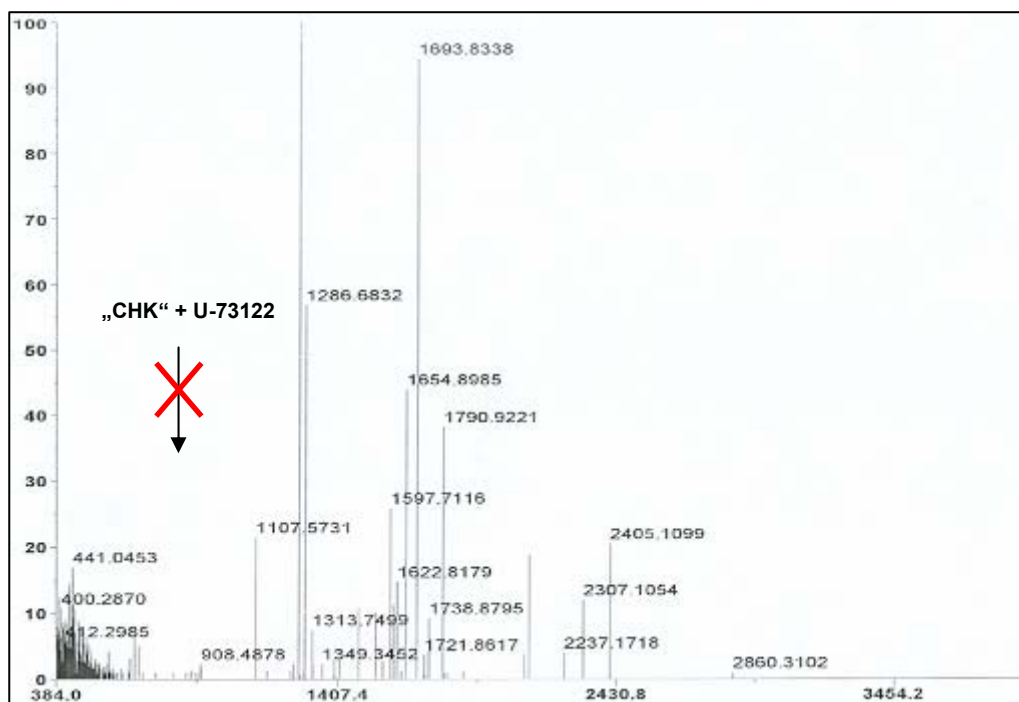


Abb. 4.1.12 5-LO verdaut mit Trypsin.

1 µg vollständig gereinigte 5-LO wurde in einem Verhältnis von 1:50 (Trypsin:5-LO) mit Trypsin gemischt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die verdauten Peptide wurden mit ZipTips® gereinigt und konzentriert. Als Matrix wurde α-Cyano-Zimtsäure im Verhältnis 1:1 verwendet. Die dazugehörige Massenliste ist im Anhang (Tab. 8.7) angefügt und das ausgewählte MS-Spektrum wurde mit einer Voyager DE-PRO aufgezeichnet.

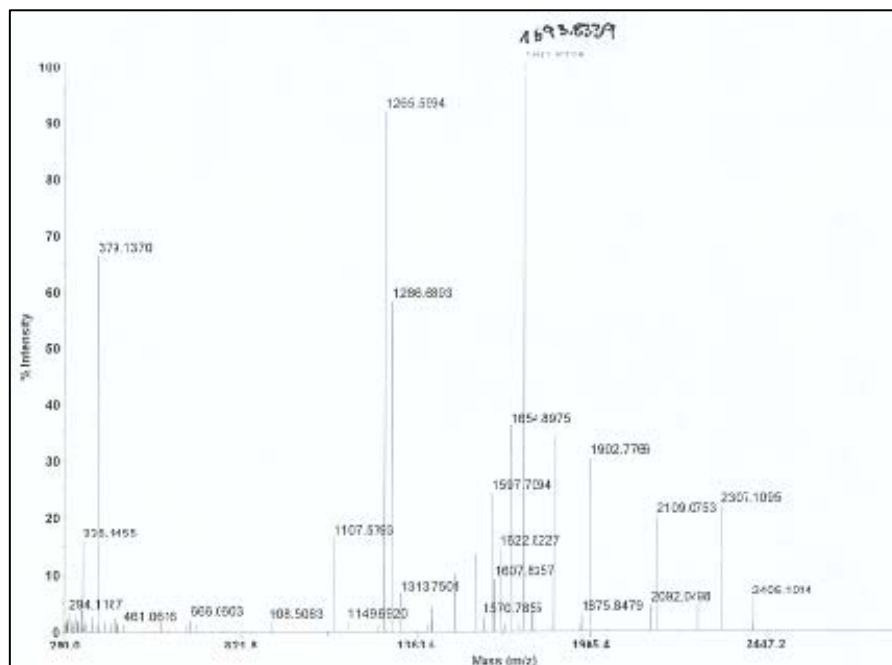


Abb. 4.1.13 5-LO inkubiert mit GSH, verdaut mit Trypsin.

1 µg vollständig gereinigte 5-LO und 1 mM GSH wurden für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, Trypsin wurde in einem Verhältnis von 1:50 (Trypsin:5-LO) zugegeben und es wurde bei 37°C über Nacht inkubiert. Die verdauten Peptide wurden mit ZipTips® gereinigt und konzentriert. Als Matrix wurde α-Cyano-Zimtsäure im Verhältnis 1:1 verwendet. Die dazugehörige Massenliste ist im Anhang (Tab. 8.9) angefügt und das ausgewählte MS-Spektrum wurde mit einer Voyager DE-PRO aufgezeichnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die weiteren MALDI-MS-Experimente wurden unter wechselnden experimentellen Bedingungen durchgeführt. Getestet wurden andere Matrices, wie z.B. DHB, mit unterschiedlichen Mengen 5-LO, unterschiedlichen Konzentrationen an U-73122, mit anderen Endoproteinasen, wie z.B. Chymotrypsin, ohne ZipTip-Aufreinigung, mit unterschiedlichen ZipTip-Fabrikaten und mit veränderten Inkubationsbedingungen. Diese Veränderungen führten nicht zu aussagekräftigeren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Tabelle 4.1.2 zeigt eine Zusammenfassung aller MALDI-MS-Experimente. Die Sequenzabdeckung beträgt maximal 30 bis 35%.

Cystein	Oberfläche	nur in 5-LO	Peptid # nach Trypsin	M+1	Masse gefunden	M+1+U-73122	Masse gefunden	M+1+GSH-2	Masse gefunden
300 / 310	✓ / -	- / ✓	297 – 314	2010,0438	-	2474,3478 / 2938,6518	-	2315,1278 / 2622,2118	-
416 / 418	✓ / ✓	✓ / ✓	412 - 423	1397,6439	✓	1861,9479 / 2326,2519	-	1702,7279 / 2009,8119	-
31	✓	✓	1 – 34	3573,6729	-	4037,9769	-	3878,7569	-
99	✓	-	89 – 101	1597,7104	✓	2062,0144	✓	1902,7944	✓
159	✓	✓	159 – 161	387,1809	-	851,4849	✓	692,2649	-
240	-	✓	222 – 246	3024,4317	-	3488,7357	-	3329,5157	-
248	✓	✓	248 – 254	819,3917	-	1283,6957	(✓)	1124,4757	-
264	✓	✓	255 – 268	1606,7815	-	2071,0855	(✓)	1911,8655	✓
449	✓	-	442 – 455	1570,7821	(✓)	2035,0861	(✓)	1875,8661	✓
561	-	✓	533 – 572	4541,1692	-	5005,4732	-	4846,2532	-
598	(✓)	-	597 – 631	4163,0193	-	4627,3233	-	4468,1033	-

Tab. 4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der MALDI-MS-Analysen von Trypsin-verdauter 5-LO, 5-LO/U-73122 und 5-LO/GSH.

Es sind alle Peptide aufgeführt, die ein oder mehrere Cystein(e) enthalten. Die Masse der trypsin-verdauten Peptide der 5-LO [M+1] ist in Spalte 5. Die Peptidmassen der Peptide, die U-73122 [M+1+U-73122] oder GSH [M+1+GSH-2] gebunden haben können, werden in Spalte 7 bzw. 9 angegeben. Ob eine entsprechende Masse gefunden wurde, wird in den jeweiligen nachfolgenden Spalten angegeben. Die Ergebnisse sind eine Zusammenstellung aller gemessenen MALDI-MS-Experimente, die in unterschiedlichen Versuchsanordnungen durchgeführt wurden.

Es konnte mit Hilfe der MALDI-MS-Untersuchungen für die Positionen Cystein-99 und -159 gezeigt werden, dass U-73122 *in vitro* an die humane 5-LO binden kann. Für die Positionen Cystein-248, -264 und -449 konnten nur sehr geringe Intensitäten des Massenpeaks im MALDI-MS-Experiment registriert werden. Daher sind diese Ergebnisse nur als Hinweis zu sehen und bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

Es konnte für Cystein-99, -264 und -449 gezeigt werden, dass Glutathion *in vitro* an humane 5-LO binden kann.

Nicht alle 5-LO-Peptide, die theoretisch nach einem Trypsin-Verdau entstehen, können wiedergefunden werden. Daher kann nicht beantwortet werden, ob noch weitere U-73122- oder GSH-Bindungen an potentiellen Cysteinresten stattgefunden haben und diese durch die limitierte Analysentechnik nicht gefunden werden konnten.

4.1.6. Effekte von U-73122 an 5-LO-Mutanten aus BL21-E.coli

Die Mutanten C99A- und C159A-5-LO, die aufgrund der Ergebnisse der MALDI-MS-Untersuchung hergestellt wurden, konnten keine Hinweise auf die Vermittlung der U-73122-Hemmung geben. Beide Mutanten waren weiterhin sehr potent durch U-73122 hemmbar (Daten nicht gezeigt). Gleiches gilt für die Mutanten C248A-, C264A- und C449A-5-LO, die nur ein sehr schwaches Signal bei der MALDI-MS-Analyse zeigten. Es konnte keine direkte Beziehung zwischen MALDI-MS-Massenshift-Wiederfindung und 5-LO-Aktivitätsmessung von betreffenden 5-LO-Mutanten (C99A, C159A, C248A, C264A, C449A) hergestellt werden.

Somit kommen für eine potentielle U-73122-Bindung und 5-LO-Hemmung nur die Cysteine-31, -30, -416 und -418 der 5-LO in Frage.

Es wurden umfangreiche Untersuchungen mit Cystein/Serin-5-LO-Mutanten durchgeführt, um die Beteiligung von Cysteinresten am U-73122-Effekt weiter zu untersuchen. Die Herstellung von Cystein/Serin-5-LO-Mutanten anstatt von Cystein/Alanin-5-LO-Mutanten, soll die Vergleichbarkeit mit der natürlichen 5-LO verbessern, da Serin durch die Hydroxygruppe dem Thiol des Cystein ähnlich ist.

Möglicherweise lässt sich der Hemmeffekt von U-73122 durch eine Bindung der Maleinimid-Gruppe an eine SH-Gruppe eines Cysteins und der gleichzeitigen „Abdeckung“ des Eingangs zum aktiven Zentrums erklären, da in der Umgebung des möglichen Eingangs Cysteine als potentielle Bindungspartner vorhanden sind (siehe Abb. 4.1.14). Die Überprüfung dieser These erfolgt durch eine kombinierte Mutation der betreffenden vier Cysteine zu Serinen (C159S-, C300S-, C416S- und C418S-5-LO). Diese Vierfach-Mutante wird als 2D-5-LO bezeichnet.

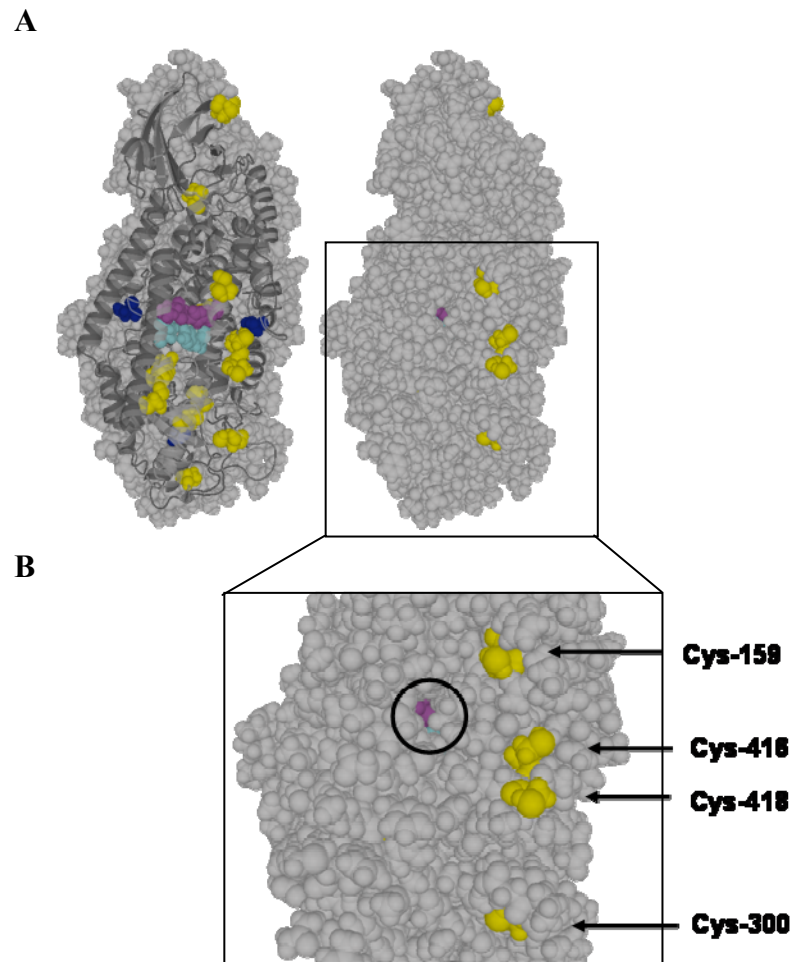


Abb. 4.1.14 C159S-C300S-C416S-C418S-5-LO-Mutante.

(A) Links: Überlagerte Darstellung des 5-LO-Modells als Cartoon- und als Sphere-Modell. Rechts: 5-LO nur als Sphere-Modell; Gelb = Cysteine; Blau = Phosphorylierungen; Magenta, Cyan = Eisen-Koordinierung (B) Vergrößerte Darstellung der vier ausgewählten Cysteine (gelb), der „Eingang“ zum aktiven Zentrum ist eingekreist.

Die nachfolgenden Expressionsdaten (mit Hilfe von Western Blotting-Untersuchungen) dienen als Kontrolle für die in Abb. 4.1.16 dargestellten 5-LO-Aktivitätsuntersuchungen.

Ergebnisse und Diskussion

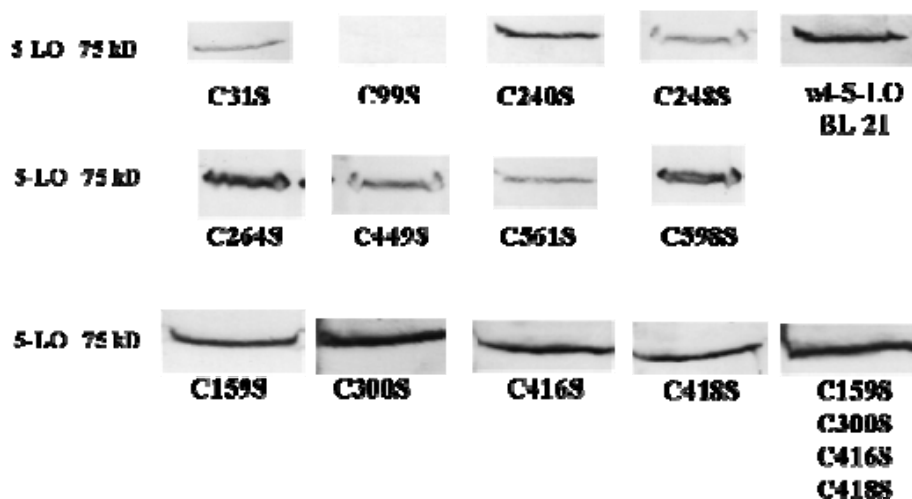
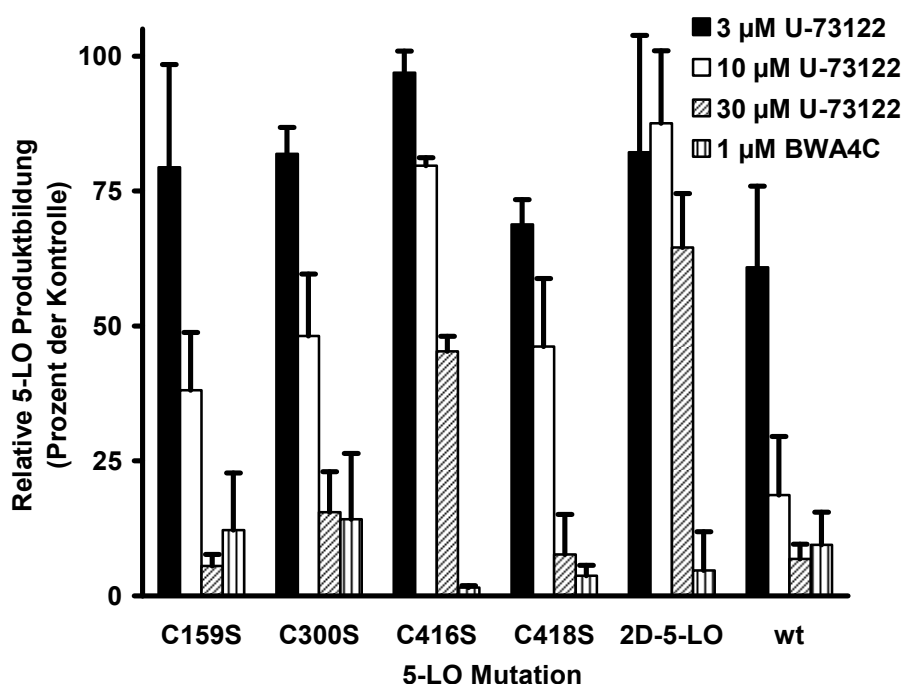


Abb. 4.1.15 Western Blots von Cys/Ser-5-LO Mutanten in *E.coli*.

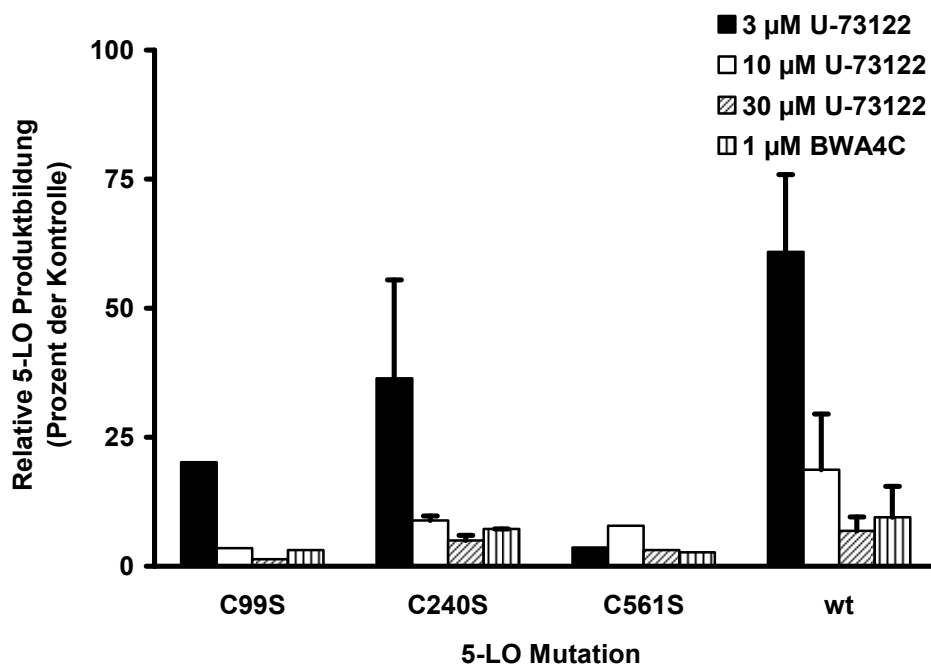
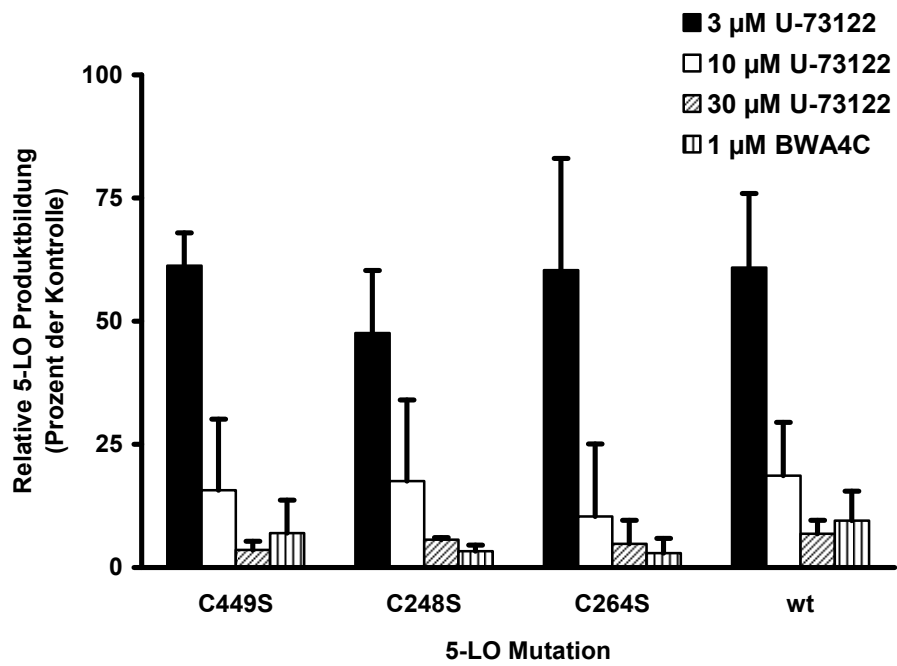
Die Mutanten wurden in BL21-*E.coli* transformiert und wie unter Methoden beschrieben in 250 ml Volumen exprimiert. Probenvolumen: 50 μ l *E.coli* Homogenat, 6A12-5-LO-Antikörper, Bcip/NBT-Methode.

Anhand der Expressionsdaten lässt sich erkennen, dass die C99S-Mutante in BL21 nicht exprimierbar ist. Bei früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die C99A-Mutante in MV1190-*E.coli* reproduzierbar und mit hoher 5-LO-Aktivität hergestellt werden konnte. Möglicherweise lassen sich daher auch die 5-LO Mutanten C99S, C248S, C449S und C561S, die in BL21 nicht exprimierbar sind, in anderen *E.coli*-Stämmen exprimieren. Dies wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

A



Ergebnisse und Diskussion



B

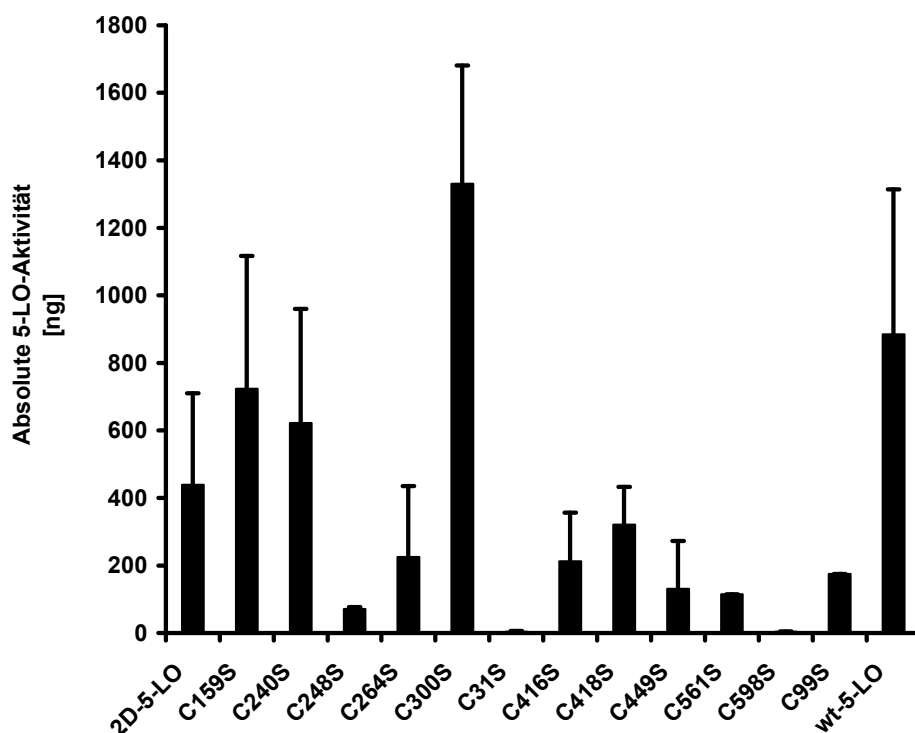


Abb. 4.1.16 Effekte von U-73122 auf Cys/Ser-5-LO-Mutanten.

Die angegebenen Cys/Ser-5-LO-Mutanten wurden in BL21-E.coli exprimiert. Es wurde ein $100\ 000\times$ -g-Überstand angefertigt, entsprechend 5 ml E.coli-Kultur mit den angegebenen Konzentrationen an U-73122 oder BWA4C für 10 Minuten bei 4°C vorinkubiert und nach Zugabe von $20\ \mu\text{M}$ AA und $1\ \text{mM}$ Ca^{2+} bei 37°C inkubiert. (A) Relative Darstellung bezogen auf den w/o-Wert ohne U-73122. (B) Absolute Aktivität der jeweiligen 5-LO-Mutante (w/o-Wert ohne Zugabe von U-73122). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Interessanterweise zeigen einige 5-LO-Mutanten trotz ausreichend hoher Expression nur sehr niedrige Aktivitäten. Dies könnte durch die Mutation selbst, aber auch durch inkorrekte Faltung begründet sein. Wie aus Abb. 4.1.16 B ersichtlich wird, zeigen die Mutanten C31S-5-LO und C598S-5-LO trotz ausreichender Expression (Abb. 4.1.15) kaum 5-LO-Aktivität. Die Mutante C300S-5-LO zeigt bei vergleichbarer Expression eine sehr hohe absolute 5-LO-Aktivität (4.1.16 B).

Betrachtet man das Verhalten der 4fach-5-LO-Mutante (2D-5-LO = C159S/C300S/C416S/C418S-5-LO) bei Zugabe von steigenden Mengen U-73122 so fällt auf, dass die 2D-5-LO-Mutante nicht mehr effektiv gehemmt wird (Abb. 4.1.16 A; IC_{50} -Wert: $>30\ \mu\text{M}$). Die Kontrollexperimente zeigen, dass die Mutante korrekt auf BWA4C reagiert und in BL21-E.coli exprimiert wird. Der IC_{50} -Wert für U-73122 bei wt-5-LO beträgt ca. $3\text{-}5\ \mu\text{M}$.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Einzelmutanten C159S-, C300S-, C416S- und C418S-5-LO erkennt man, dass C416S-5-LO nur noch mit einem IC_{50} -Wert von ca. 30 μ M und C418S-5-LO mit einem IC_{50} -Wert von ca. 10 μ M von U-73122 gehemmt werden. Somit kann die These, dass die vier ausgewählten Cysteine, die um einen potentiellen Eingang zum aktiven Zentrum der 5-LO gruppiert sind, eine entscheidende Bedeutung bei der Bindung von U-73122 und dessen Hemmmechanismus haben, bestätigt werden.

C416S-5-LO und zum Teil C418S-5-LO binden anscheinend U-73122 und verschaffen dem Molekül die Möglichkeit das aktive Zentrum so zu beeinflussen, dass die 5-LO-Aktivität sehr effektiv gehemmt werden kann.

Dieses Ergebnis konnte mit der Vierfach-Mutante 2D-5-LO eindrucksvoll bestätigt werden, da die 2D-5-LO-Mutante von allen getesteten 5-LO-Mutanten am schlechtesten durch U-73122 gehemmt wird.

Die U-73122-Hemmung ist von der kovalenten Bindung an ein 5-LO-Cystein abhängig, das zeigt das Verhalten von U-73343 gegenüber 5-LO. U-73343 besitzt keine thiolreaktive Maleinimid-Struktur und ist nicht in der Lage die 5-LO zu hemmen. Somit ist es gelungen, die potentielle Bindungsstelle des U-73122 an der 5-LO (Cystein-416) zu identifizieren. Betrachtet man die Versuche, die zu einer Selektionierung der 5-LO-Cysteine führten, fällt auf, dass alle bisherigen Ergebnisse die Erkenntnis stützen, dass Cystein-416 die potentielle Bindungsstelle für U-73122 ist.

Das Ergebnis konnte bisher nicht mit MALDI-MS-Experimenten unterstützt werden, da der vorausberechnete U-73122-5-LO-Peptid-Massenshift (Tab. 8.6, im Anhang) nicht detektiert werden konnte. Möglicherweise ist das betreffende U-73122-5-LO-Peptid mit MALDI-MS nicht messbar.

4.1.7. Glutathion bindet an 5-LO

Wie aus den vorangegangenen MALDI-MS-Ergebnissen bekannt ist, bindet Glutathion *in vitro* an Cystein-99, -264 und -449 der 5-LO.

Die Bindung an Cystein-99 der 5-LO konnte reproduzierbar hergestellt und nachgewiesen werden. Daher wurde nur der Einfluss von Glutathion auf die C99A-5-LO-Mutante sowie wt-5-LO getestet. Es wurde für einen Aktivitätstest gereinigte wt- und C99A-5-LO aus E.coli mit steigenden Mengen Glutathion sowie oxidiertem Glutathion (GSSG) inkubiert bzw. mit unterschiedlichen Zeiten vorinkubiert.

C99A-5-LO zeigte ein identisches Verhalten zu wt-5-LO im Aktivitätstest, sodass die gewählte Vorgehensweise nicht zielführend ist. Die Versuche wurden nicht weitergeführt und die Ergebnisse sind an dieser Stelle nicht aufgeführt.

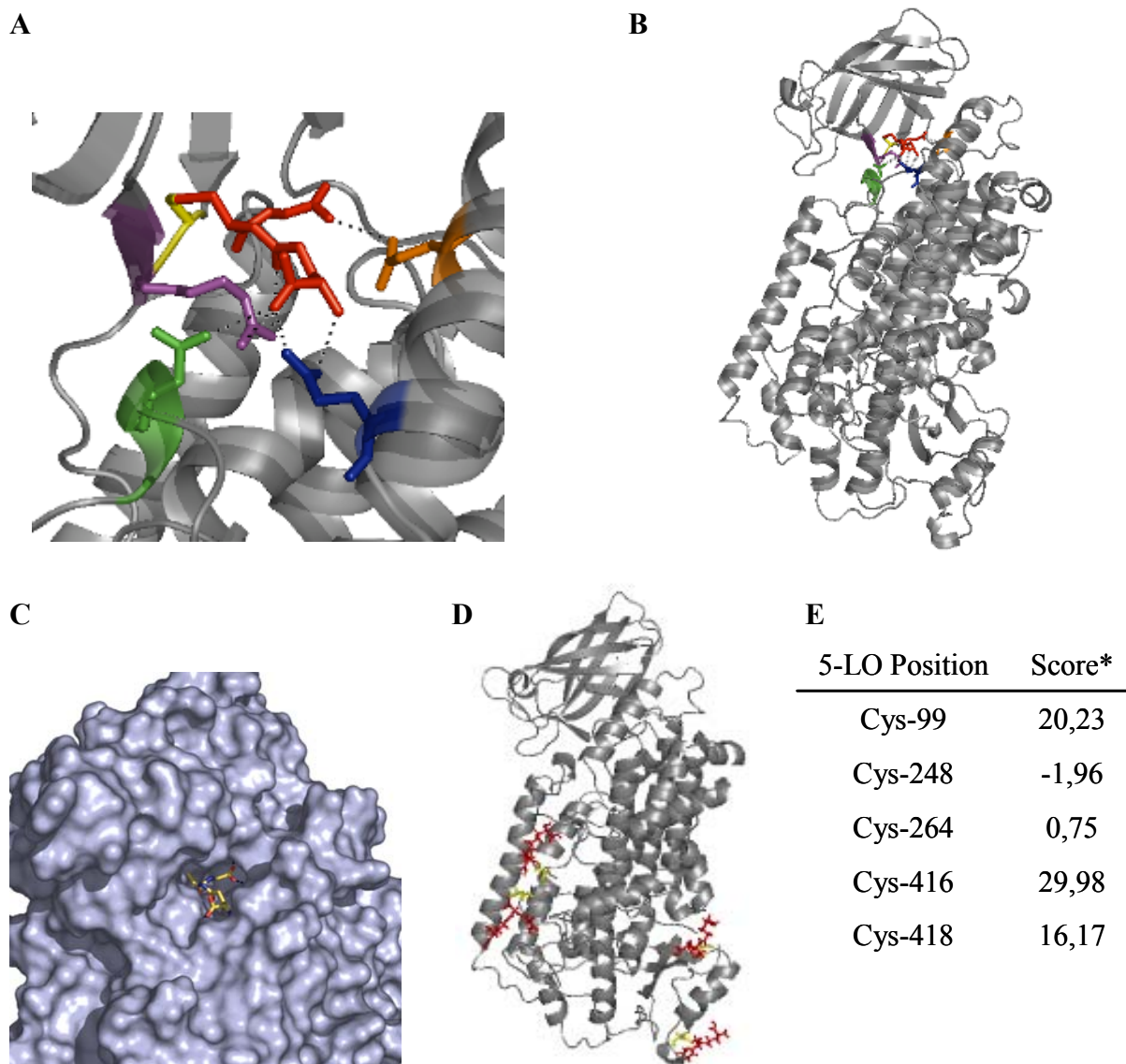


Abb. 4.1.16a Kovalente Bindung von GSH und GSH-Docking an 5-LO (Modell).

(A) Darstellung der kovalenten Bindung von GSH an Cystein-99 kombiniert mit den Ergebnissen der Docking-Berechnung. Gelb: Cys-99; Rot: gebundenes GSH an Cys-99; Orange: Glutaminsäure-135; Blau: Glutamin-142; Grün: Asparaginsäure-167; Magenta: Arginin-102. (B) Gesamtansicht der 5-LO mit kovalent gebundenem GSH an Cystein-99. (C) Oberflächenansicht der 5-LO mit gedocktem Glutathion. (D) Gesamtansicht der 5-LO mit kovalent gebundenem GSH an Cys-248, -264, -416 und -418. (E) Ergebnisse der Docking-Experimente mit entsprechendem Score-(Bewertungs)system. Der Score (*) setzt sich additiv aus den hydrophoben Wechselwirkungen, den Wasserstoffbrückenbindungen, den Konformationsänderungen des Liganden während der Bindung und den Van-der-Waals-Kräften am Protein zusammen. Die Docking-Versuche wurden von B. Hoffmann (Universität Frankfurt) mit dem Programm Gold (Version 3.2, Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK, <http://www.ccdc.am.uk>) durchgeführt.

Für ausgewählte Cysteine wurden sogenannte *in silico* Docking-Experimente durchgeführt. Durch den Abgleich von Berührungspunkten zwischen Molekül und Protein erhält man einen Zahlenwert, der über Bindungsstärke oder -affinität eine Aussage treffen soll. Da es sich um computer-basierende Daten handelt, ist zu hinterfragen, ob das Ergebnis den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht.

Negative Werte deuten auf schlechte Bindungseigenschaften hin; Werte von 20 und mehr deuten auf sehr gute Bedingungen für den Liganden hin, um am Protein zu binden. Die Werte der Docking-Versuche sind nicht direkt vergleichbar mit experimentell ermittelten Bindungsaffinitäten und nicht verwendbar für die Vorhersage eines IC_{50} - oder K_D -Wertes.

Betrachtet man Abb. 4.1.16a A-C, so kann man feststellen, dass gebundenes Glutathion sehr gut in das bisherige „Konformationsgefüge“ der 5-LO passt, da die Docking-Experimente mit kovalent gebundenem GSH an Cystein-99 und der bisher berechneten Konformation der 5-LO zu außergewöhnlich guten Ergebnissen führen. Möglicherweise liegt grundsätzlich eine Glutathionylierung an dieser Position vor, da die Position-99 über eine Art Tunnel zugänglich ist, obwohl diese Aminosäure an der Unterseite der C2-ähnlichen Domäne liegt (siehe Abb. 4.1.16a C). Die Glutathionylierung könnte zur Stabilisierungen der Proteinkonformation in diesem Bereich zwischen der C2-ähnlichen Domäne und der katalytischen Domäne beitragen, da die Docking-Experimente hohe Bindungsaffinität zwischen dem kovalent gebundenen GSH und der katalytischen Domäne zeigen, die sich in der hohen Zahl an potentiellen Wechselwirkungen widerspiegelt (Abb. 4.1.16a A). Die Glutathionylierung an Cystein-99 könnte eine grundsätzlich stattfindende posttranslationale Modifikation der humanen Lipoxygenasen darstellen, da die Position 99 in allen humanen Lipoxygenasen vorhanden ist (vgl. Abb. 4.1.7).

Die experimentelle (*in silico*) Bindung von Glutathion an die Positionen 416 und 418 der 5-LO liefert sehr hohe Bewertungen im Docking-Experiment. Ob eine hohe Wechselwirkung zwischen GSH und 5-LO eintreten könnte, ist bisher experimentell nicht gezeigt worden.

4.1.8. Einfluss von Diamid auf die FLAP- und Cys-5-LO-Mutanten-Aktivität in HeLa-Zellen

Um einen möglichen Einfluss einer Glutathionylierung der 5-LO untersuchen zu können, wurden wt-5-LO und Cys/Ser-5-LO-Mutanten mit und ohne FLAP in HeLa-Zellen transfiziert und mit steigenden Mengen Diamid inkubiert.

Diamid ist eine Substanz, die in der Zelle reduziertes Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) umsetzen kann (Abb. 4.1.16b, (228)). Diamid reagiert bevorzugt mit GSH, da Thiole in Proteinen aus sterischen Gründen stärker behindert sind und GSH freier zugänglich ist (229).

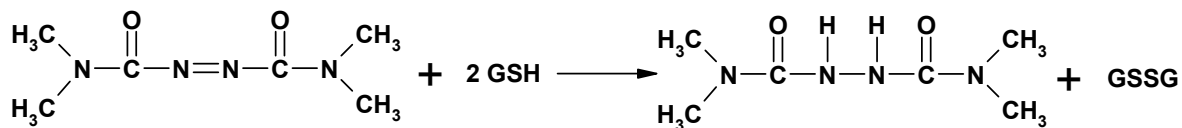


Abb. 4.1.16b Reaktion von Diamid mit Glutathion.

Die Oxidation von GSH läuft *in vitro* sowie *in vivo* ab. In intakten Zellen kann damit reduziertes Glutathion der Zelle entzogen werden, das Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG wird gestört, oxidative Prozesse werden in der Zelle begünstigt. Dieses physiologische Gleichgewicht zwischen GSH/GSSG ist unter anderem für die Redox-Homöostase der Zelle, für antioxidative Verteidigungsmechanismen, wie z.B. der Abwehr von ionisierender Strahlung, reaktiven Sauerstoff-Spezies oder freie Radikale verantwortlich (230).

Die Entfernung von GSH in der Zelle durch Diamid ist gut dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die 5-oxo-ETE-Bildung durch diesen oxidativen Stress in U937-Zellen stimuliert werden konnte (231). Hatzelmann und Ullrich konnten zeigen, dass die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL durch die Zugabe von steigenden Mengen Diamid oder Dnp-Cl gesteigert werden konnte (232). Intakte BL41-E95A-Zellen produzieren nach Stimulation mit 5 μM Ionophor und 40 μM Arachidonsäure sehr wenig LTB₄ bzw. 5-HETE (1,8 \pm 0,3 pmol/10⁶ Zellen bzw. 6,9 \pm 1,6 pmol/10⁶ Zellen). Stimuliert man das Homogenat dieser Zellen entstehen sehr hohe Mengen an LTB₄ bzw. 5-HETE (19 \pm 4,3 pmol/10⁶ Zellen bzw. 157 \pm 14 pmol/10⁶ Zellen). Nach Vorinkubation mit 0,5 mM Diamid oder 0,1 mM Dnp-Cl und anschließender Stimulation mit 5 μM Ionophor und 40 μM Arachidonsäure steigt die LTB₄ bzw. 5-HETE-Bildung stark an (24 \pm 3,3 pmol/10⁶ Zellen bzw. 42 \pm 18 pmol/10⁶ Zellen) (233).

Glutathion findet sich in allen Bereichen der Zelle und nimmt als Kosubstrat an wichtigen Mechanismen der Zelle teil, die oxidative Prozesse kontrollieren (234). Beispielsweise sorgen Glutathion-Peroxidasen (GPx) durch ihre Aktivität dafür, dass Hydroperoxide abgebaut werden, die u.a. ein Faktor für die 5-LO-Stimulation sein können (235).

Da das 5-LO-Enzym ein oxidierbares Eisenatom im aktiven Zentrum enthält und für seine Aktivierung unter anderem Hydroperoxide benötigt, sollte eine Erhöhung der oxidativen

Prozesse in der Zelle dazu führen, dass die 5-LO-Aktivität zunimmt. Andererseits konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 5-LO durch die Inkubation mit Glutathion glutathionyliert werden kann. Ob diese Bindung nur *in vitro* erzeugt werden kann oder auch *in vivo* vorhanden ist, ist bisher nicht geklärt. Durch die Inkubation transfizierter HeLa-Zellen mit Diamid erhöht sich die Konzentration von oxidiertem GSH (GSSG) in der Zelle, dies könnte zu einer verstärkten Glutathionylierung der Proteine führen. In einer Vielzahl von Publikationen, zur Glutathionylierung von Proteinen, wurde Diamid verwendet, um die Glutathionylierungs-Tendenz innerhalb der Zelle zu steigern (Review: (236)). Die cAMP-abhängige Proteinkinase-Aktivität wird durch Glutathionylierung reguliert. Dies kann durch Diamid-Einfluss gesteuert werden (237). Möglicherweise überträgt das Zwischenprodukt der Reaktion von GSH und Diamid das GSH als gemischtes Disulfid auf ein Protein-Thiol (Abb. 4.1.16c).

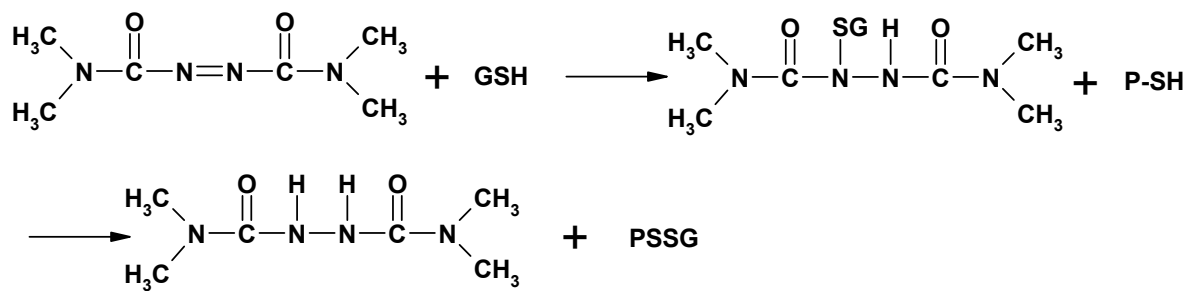


Abb. 4.1.16c Reaktion von Diamid mit Glutathion (GSH) und Protein-Thiol (P-SH) zu gemischtem Protein-Disulfid (PSSG).

4.1.8.1. wt-5-LO

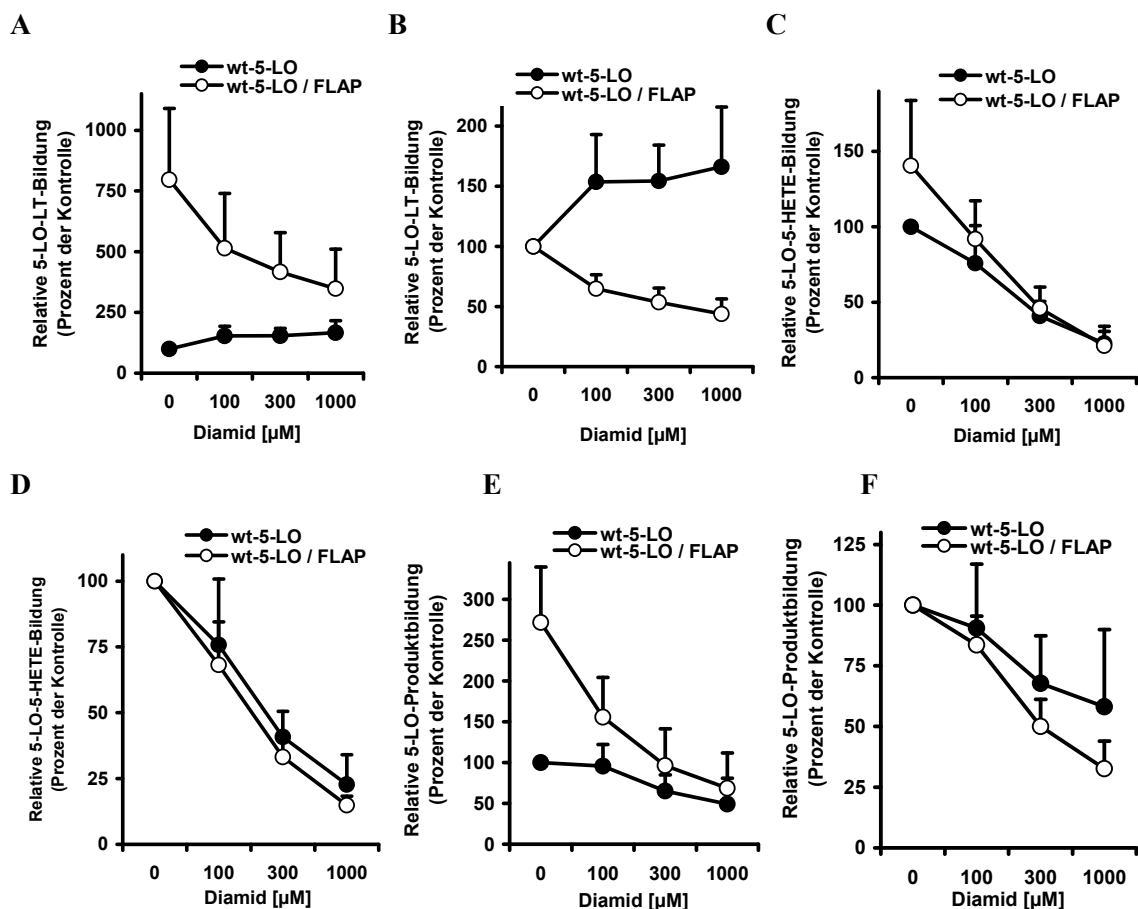


Abb. 4.1.17 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die wt-5-LO-Aktivität, transfiziert in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder wt-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A+B) Leukotrien-Bildung, (C+D) 5-HETE-Bildung und (E+F) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). (A, C und E) Relative Darstellung im Bezug auf wt-5-LO. (B, D und F) Relative Darstellung im Bezug auf die jeweilige Gruppe (wt-5-LO oder wt-5-LO/FLAP). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

FLAP zeigt in 5-LO/FLAP-transfizierten HeLa-Zellen den bekannten Effekt einer erhöhten Leukotrienbildung nach Ionophor-Stimulation und Zusatz von $3 \mu\text{M}$ AA im Vergleich zu 5-LO ohne FLAP (Abb. 4.1.17 A, w/o). Grundsätzlich kann in diesem Testsystem der Effekt von FLAP auf die 5-LO-Aktivität gezeigt werden. Interessant ist das 5-LO-Verhalten im Vergleich zur 5-LO/FLAP-Transfizierung unter dem Einfluss von steigenden Mengen Diamid im Bezug auf den jeweiligen w/o-Wert (Abb. 4.1.17 B). Die 5-LO/FLAP-Aktivität wird bei steigender Zugabe von Diamid gehemmt, die 5-LO-Aktivität ohne FLAP steigt dagegen. Möglicherweise reagiert 5-LO ohne FLAP gegenüber oxidativen Umgebungsbedingungen in der Zelle empfindlich und wird in Gegenwart von FLAP von

Ergebnisse und Diskussion

diesen Einflüssen abgeschirmt. Eine Cystein-Glutathionylierung der 5-LO, die durch die Diamid-induzierte Verschiebung des Glutathion-Gleichgewichts zu GSSG begünstigt wird, ist denkbar. Diese Glutathionylierung könnte zu einer Verhinderung der Interaktion zwischen FLAP und 5-LO und zu einer erniedrigten FLAP-unterstützten Leukotrienbildung führen.

Nachfolgende Untersuchungen zu Cys/Ser-5-LO-Mutanten können einen Hinweis geben, ob Cysteine im Zusammenspiel mit einer Glutathionylierung die 5-LO-Aktivität beeinflussen können.

Betrachtet man Abb. 4.1.17 C und D (5-HETE-Bildung), so kann nur noch eine geringe FLAP-unterstützte Steigerung der 5-HETE-Bildung beobachtet werden. Dies entspricht den bekannten Mechanismen. Die starke Hemmung bei Diamid-Zugabe sowohl bei 5-LO als auch bei 5-LO/FLAP ist hingegen erstaunlich, betrachtet man das Ergebnis in Abb. B. Die Hemmung durch Diamid ist in Bezug auf die 5-HETE-Aktivität gleich. Bei der Betrachtung der Gesamtproduktbildung (Abb. 4.1.17 E und F) ist ebenfalls ersichtlich, dass bei steigender Zugabe von Diamid eine Hemmung der 5-LO±FLAP-Aktivität einsetzt.

Vergleicht man diese Resultate mit den Ergebnissen aus Abb. 4.1.18, fällt der kontinuierliche Anstieg des Leukotrienanteils an der Gesamtproduktbildung bei Zugabe von steigenden Mengen Diamid auf, obwohl die Gesamtproduktbildung durch Diamid gehemmt wird. Die Hemmung von Diamid ist somit vornehmlich eine Hemmung der 5-HETE-Bildung, die Leukotrien-Bildung ist bis zu einem gewissen Grad begünstigt.

Um die Effekte von Diamid, MK-886 und U-73122 auf die 5-LO- und 5-LO/FLAP-Aktivität weiter zu beschreiben, wurden die Untersuchungsdaten nach dem jeweiligen Anteil der Leukotriene und/oder 5-HETE an der Gesamtproduktbildung ausgewertet. Zusätzlich sollen Untersuchungen an Cys/Ser-5-LO-Mutanten zeigen, ob sich die Mutationen auf den Leukotrienanteil auswirken.

Ergebnisse und Diskussion

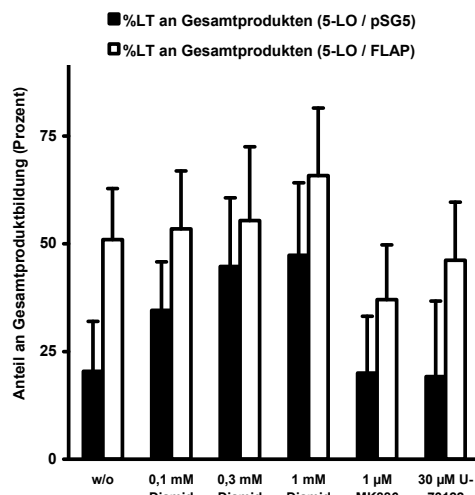


Abb. 4.1.18 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von 5-LO bzw. 5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder wt-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■) wt-5-LO, (□) wt-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der 5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Auffällig ist der unterschiedliche Anteil von Leukotrienen an der Gesamtproduktbildung bei 5-LO und 5-LO/FLAP. Der Leukotrienanteil verändert sich nach Zugabe von steigenden Mengen Diamid gegensätzlich. Bei Inkubationen mit 5-LO ohne Zugabe von Diamid ist das Verhältnis zugunsten von 5-HETE verschoben (4.1.18, ■, w/o), bei steigenden Mengen Diamid ändert sich das Verhältnis von LT/5-HETE zu einem annähernd 50:50-Gleichgewicht (4.1.18, ■, 1 mM Diamid).

Bei 5-LO/FLAP ist das LT/5-HETE-Verhältnis im Gleichgewicht (4.1.18, □, w/o) und auf dem gleichem Niveau wie bei 5-LO nach Zugabe von 1 mM Diamid. Gibt man zu 5-LO/FLAP steigende Mengen Diamid, verändert sich das Verhältnis von LT/5-HETE zugunsten der Leukotrien-Bildung (4.1.18, □, 0,1 bis 1 mM Diamid).

Verändert man durch Diamid das oxidative Level der Zelle bzw. erhöht man die Wahrscheinlichkeit einer 5-LO-Glutathionylierung, steigt der LT-Anteil. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von FLAP begünstigt.

Als Kontrollexperimente dienen Untersuchungen mit MK886, U-73122 und BWA4C, die die oben aufgeführten Experimente in Ihrer Aussagekraft unterstützen sollen.

Ergebnisse und Diskussion

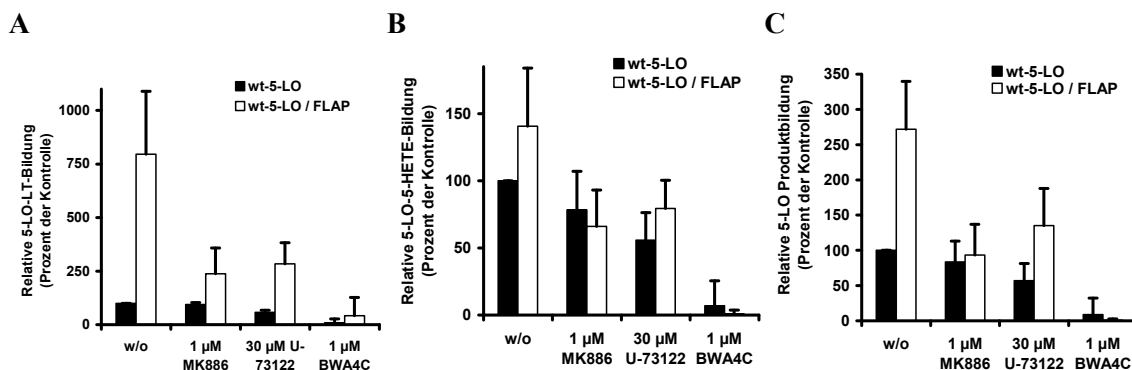


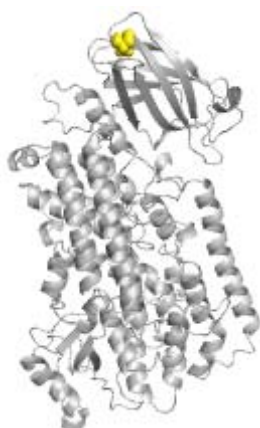
Abb. 4.1.19 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die wt-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder wt-5-LO/FLAP wurden mit 5 μ M Ionophor und 3 μ M AA für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 - 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtprodukt-bildung (LT + 5-HETE). Relative Darstellung bezogen auf den w/o-Wert.

Wie erwartet hemmt MK-886 potent und U-73122 moderat die 5-LO/FLAP-Leukotrienbildung (Abb. 4.1.20 A). BWA4C hemmt ebenfalls die 5-LO-Aktivität potent (FLAP-unabhängig).

4.1.8.2. C31S-5-LO

Der Austausch von bestimmten 5-LO-Cysteinen durch Serin könnte sich auf den FLAP-Effekt auswirken. Der Einfluss von Diamid wird ebenfalls untersucht.



P09917	LOX5_HUMAN	23	LSLVGSAGCSEKH	35
P18054	LOX12_HUMAN	23	LWLVGTRGAELE	35
P16050	LOX15_HUMAN	23	LWLVGQHGEAALG	35
			: : ** * :	

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Ja
Umgebung konserviert ² :	wenig
Position im Protein:	Oberfläche, Oberseite der C2-Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	schwach
Enzym aktiv in E.coli:	nein
U-73122-Bindung:	nicht nachweisbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nicht nachweisbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.20 Charakterisierung der Eigenschaften der C31S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

Ergebnisse und Diskussion

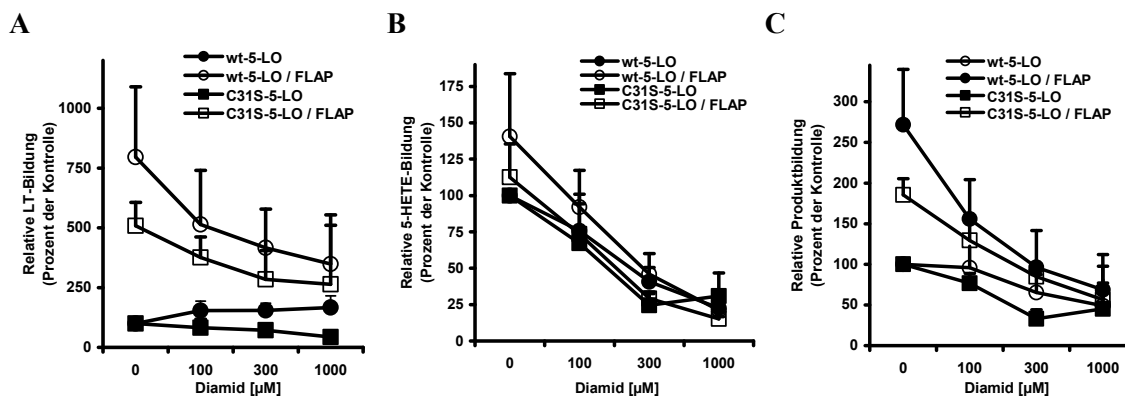


Abb. 4.1.21 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C31S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C31S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C31S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Im Vergleich zu wt-5-LO/FLAP ist die Leukotrienbildung von C31S-5-LO/FLAP niedriger (wt-5-LO/FLAP: ca. $780\% \pm 250$, bezogen auf wt-5-LO; C31S-5-LO/FLAP: ca. $500\% \pm 75$, bezogen auf C31S-5-LO). Die C31S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung und die 5-HETE-Bildung wird, ähnlich wt-5-LO/FLAP, durch die Zugabe von Diamid gehemmt (Abb.4.1.22. A). Betrachtet man die Gesamtaktivität, wird C31S-5-LO/FLAP durch Diamid ähnlich stark wie wt-5-LO/FLAP gehemmt, C31S-5-LO etwas stärker wie wt-5-LO. Im Vergleich zu wt-5-LO wird die C31S-5-LO-Leukotrienbildung durch Diamid gehemmt.

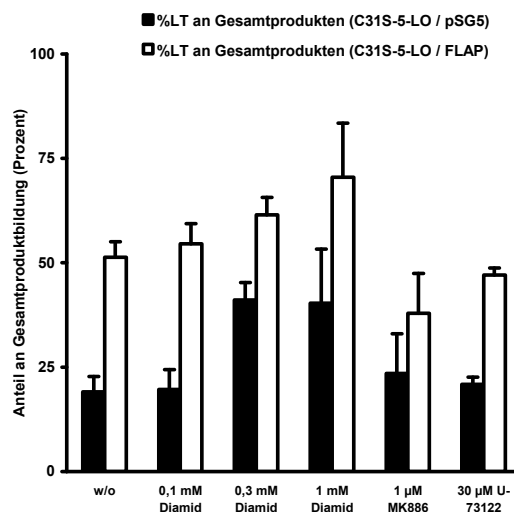


Abb. 4.1.22 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C31S-5-LO bzw. C31S-5-LO/FLAP.

Ergebnisse und Diskussion

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C31S-5-LO oder C31S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■) C31S-5-LO, (▣) C31S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C31S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung steigt bei Zugabe von Diamid bei C31S-5-LO und C31S-5-LO/FLAP an. Bei C31S-5-LO/FLAP und Zugabe von 1 mM Diamid steigt der Leukotrienanteil auf $70\% \pm 10$.

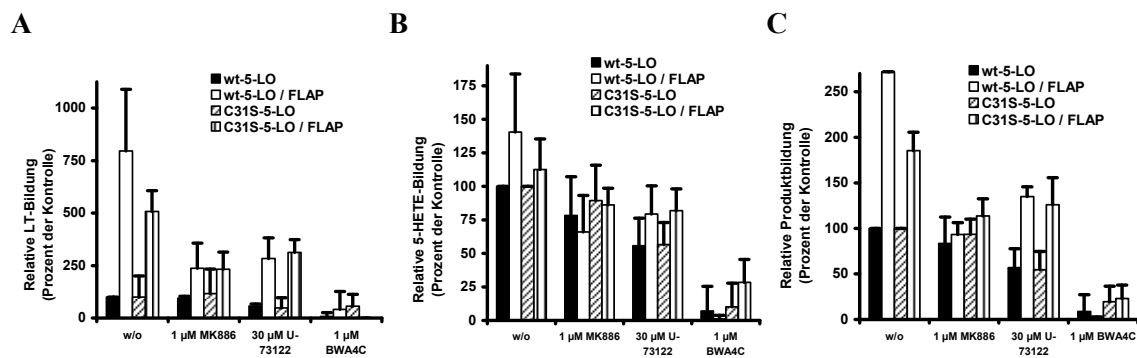


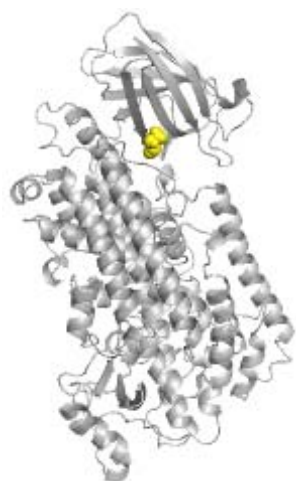
Abb. 4.1.23 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C31S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C31S-5-LO oder C31S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C31S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

In Kontrolllexperimenten hemmen MK886, U-73122 und BWA4C wie erwartet die C31S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung (Abb. 4.1.23).

4.1.8.3. C99S-5-LO

An der Position 99 der 5-LO konnte, durch Inkubation mit GSH *in vitro*, eine GSH-Bindung mit Hilfe der MALDI-MS-Technik nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte die Serinmutante nicht in E.coli exprimiert werden; die Alaninmutante hingegen schon.



P09917	LOX5_HUMAN	96	EFPCYRWITGD	106
P18054	LOX12_HUMAN	92	AFPCYRWVQGE	102
P16050	LOX15_HUMAN	92	RFP CYRWVEGN	102
***** : *				

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Nein
Umgebung konserviert ² :	Ja
Position im Protein:	Oberfläche, Unterseite der C2-Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Ja (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	nein (C99A: Ja)
Enzym aktiv in E.coli:	nein (C99A: Ja)
U-73122-Bindung:	nachweisbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nachweisbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.24 Charakterisierung der Eigenschaften der C99S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

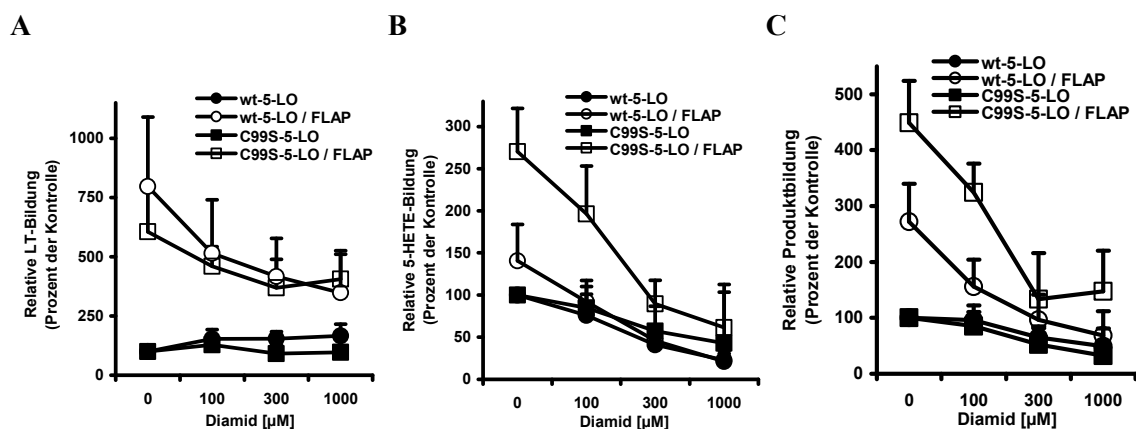


Abb. 4.1.25 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C99S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C99S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit 5 μM Ionophor und 3 μM AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C99S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Leukotrienbildung ist unter dem Einfluss von Diamid bei C99S-5-LO/FLAP vergleichbar mit wt-5-LO/FLAP. Der Anteil der LT-Bildung durch Diamid ist bei C99S-5-LO weniger stark ausgeprägt als bei wt-5-LO.

Bei der 5-HETE-Bildung ergeben sich deutliche Unterschiede zu wt-5-LO. Die C99S-5-LO/FLAP-5-HETE-Bildung ist auf 275% (im Bezug auf C99S-5-LO) gesteigert im Vergleich zu 145% bei wt-5-LO/FLAP (im Bezug auf wt-5-LO). Die Gesamtproduktbildung ist bei C99S-5-LO/FLAP deutlich gesteigert gegenüber wt-5-LO/FLAP. Maximale Hemmung durch Diamid wird bereits bei 0,3 mM erreicht.

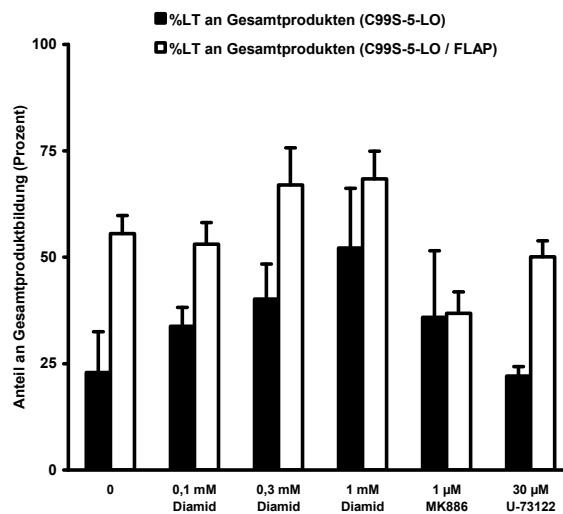


Abb. 4.1.26 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C99S-5-LO bzw. C99S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C99S-5-LO oder C99S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■) C99S-5-LO, (□) C99S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C99S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Der Anteil der Leukotriene steigt bei Zugabe von steigenden Mengen an Diamid für C99S-5-LO kontinuierlich an. Bei C99S-5-LO/FLAP ist dieser Anstieg deutlich geringer, gleichwohl ist der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung bei C99S-5-LO/FLAP insgesamt höher als bei C99S-5-LO.

Ergebnisse und Diskussion

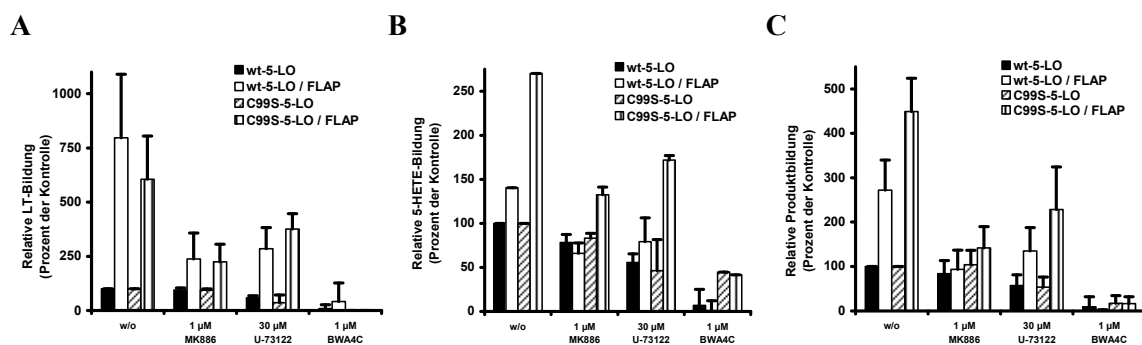


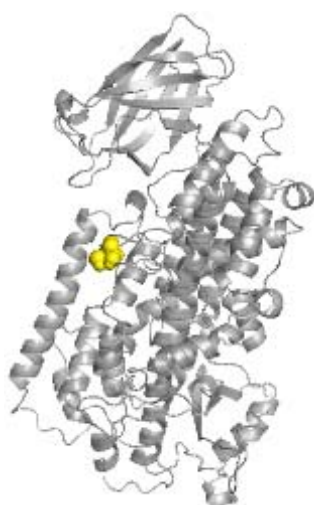
Abb. 4.1.27 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C99S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C99S-5-LO oder C99S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C99S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die Kontrollexperimente brachten die erwarteten Ergebnisse. MK-886 hemmt die FLAP-gesteigerte Leukotrienbildung effektiv. U-73122 hemmt die C99S-5-LO-Aktivität moderat, BWA4C FLAP-unabhängig.

4.1.8.4. C159S-5-LO

Für die Position 159 der 5-LO konnte eine reproduzierbare U-73122-Bindung gezeigt werden. Die Mutante C159S-5-LO ist aber weiterhin mit U-73122 hemmbar, daher kann diese Stelle nicht als alleinige Bindungsstelle angesehen werden. Da diese Aminosäure an prominenter Stelle auf der 5-LO-Oberfläche positioniert ist, wurde die C159S-5-LO-Mutante ebenfalls untersucht.



P09917	LOX5_HUMAN	155	IDAKCHKDL	163
P18054	LOX12_HUMAN	151	IAADRKDDL	159
P16050	LOX15_HUMAN	151	MAGAKLYDL	159
			:	**

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Ja
Umgebung konserviert ² :	Nein
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja (C159A: Ja)
Enzym aktiv in E.coli:	Ja (C159A: Ja)
U-73122-Bindung:	nachweisbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nicht nachweisbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.28 Charakterisierung der Eigenschaften der C159S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS

Ergebnisse und Diskussion

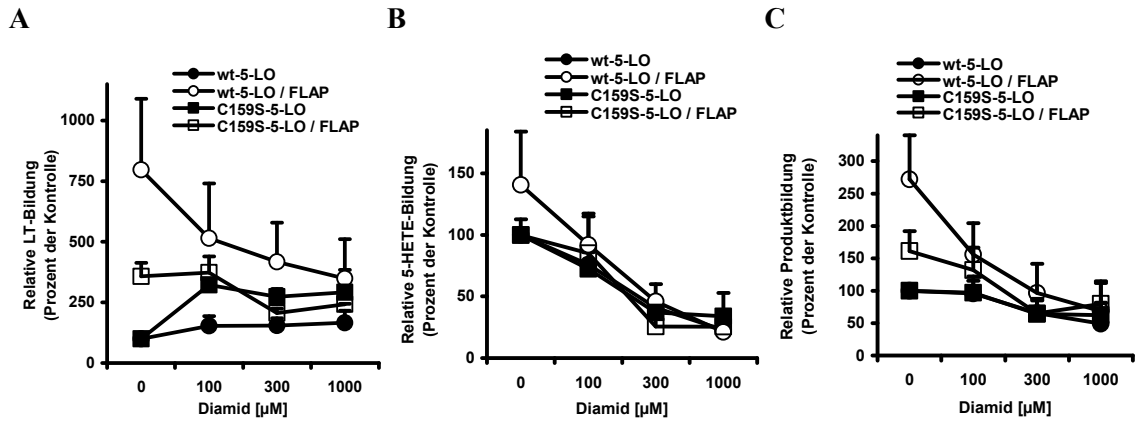


Abb. 4.1.29 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C159S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C159S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C159S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die C159S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung ist weniger ausgeprägt wie bei wt-5-LO/FLAP, aber ein FLAP-Effekt ist vorhanden. Diamid hemmt die Leukotrienbildung der C159S-5-LO/FLAP. Interessanterweise wird die C159S-5-LO-Leukotrienbildung in Abwesenheit von FLAP durch Diamid stark gesteigert. Dieser Effekt ist deutlich stärker als bei wt-5-LO. Die 5-HETE-Bildung wird wie bei wt-5-LO durch die Zugabe von Diamid dosisabhängig gehemmt (Abb. 4.1.32).

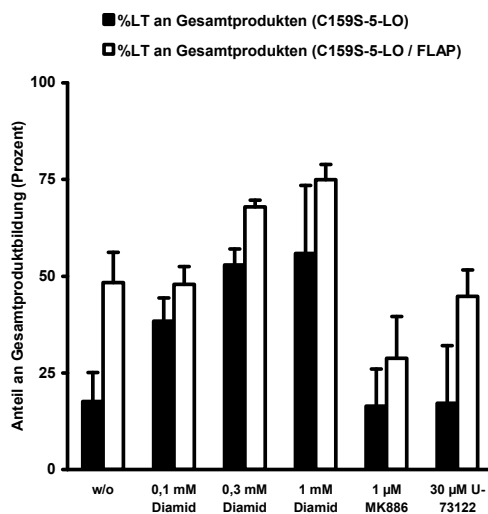


Abb. 4.1.30 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C159S-5-LO bzw. C159S-5-LO/FLAP.

Ergebnisse und Diskussion

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C159S-5-LO oder C159S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■) C159S-5-LO, (□) C159S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C159S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Bei steigenden Mengen Diamid gleichen sich die C159S-5-LO-Aktivität der C159S-5-LO/FLAP-Aktivität an, eine stetige Erhöhung des Leukotrienanteils ist zu beobachten (Abb. 4.1.31).

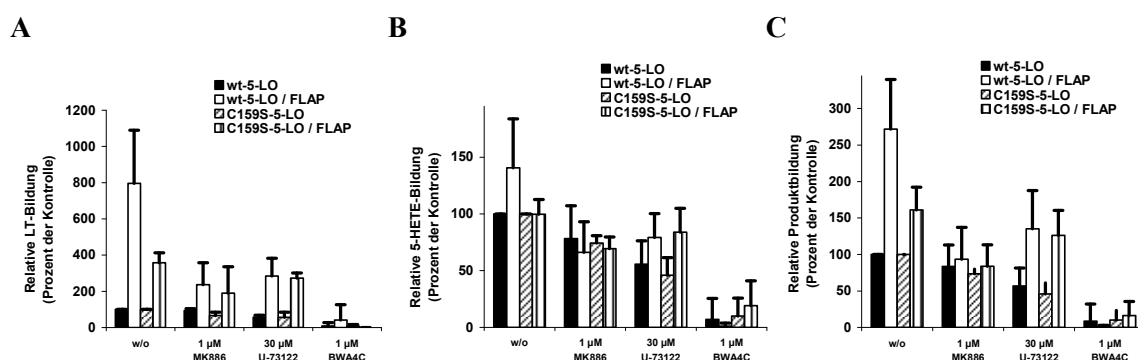


Abb. 4.1.31 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C159S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C159S-5-LO oder C159S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C159S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

In den entsprechenden Kontrollexperimenten hemmt MK-886 die FLAP-gesteigerte Leukotrienbildung effektiv, wobei die Erhöhung der FLAP-gesteigerten Leukotrienbildung im Vergleich zur wt-5-LO/FLAP-Aktivität geringer ist. U-73122 hemmt moderat, BWA4C FLAP-unabhängig effektiv die C159S-5-LO-Aktivität.

4.1.8.5. C264S-5-LO



P09917	LOX5_HUMAN	261	MVECSLE	267
P18054	LOX12_HUMAN	256	MEELQAQ	262
P16050	LOX15_HUMAN	256	MEELQAQ	262
			* *	

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Ja
Umgebung konserviert ² :	teilweise
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja
Enzym aktiv in E.coli:	Ja
U-73122-Bindung:	sehr schwach mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	schwach mit MALDI-MS

Abb. 4.1.32 Charakterisierung der Eigenschaften der C264S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

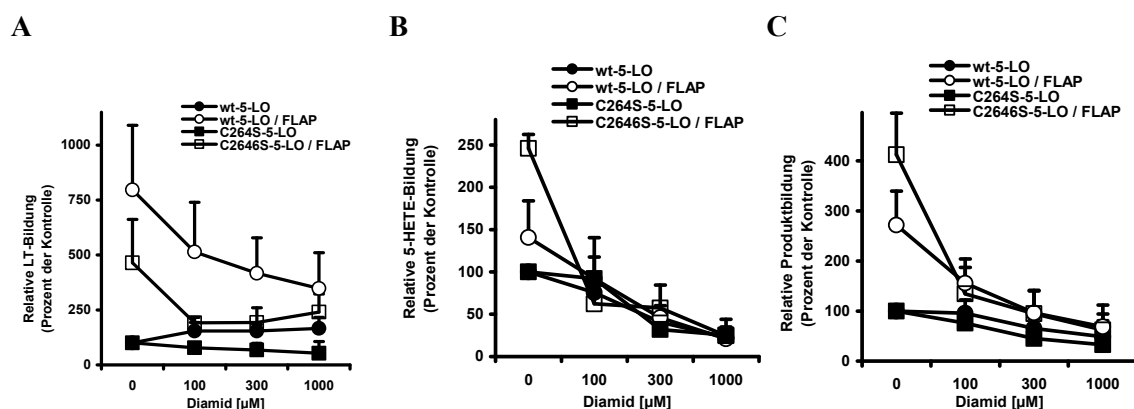


Abb. 4.1.33 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C264S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C264S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit 5 µM Ionophor und 3 µM AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C264S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

C264S-5-LO/FLAP wird sehr stark durch Diamid gehemmt (Abb. 4.1.33 A). Eine Erhöhung der C264S-5-LO-Leukotrienbildung ist nach Zugabe von Diamid nicht zu beobachten. Die 5-HETE-Produktion von C264S-5-LO/FLAP ist im Vergleich zum wt-5-LO um 100% gesteigert. Die Hemmung durch Diamid verläuft identisch zum wt-5-LO.

Ergebnisse und Diskussion

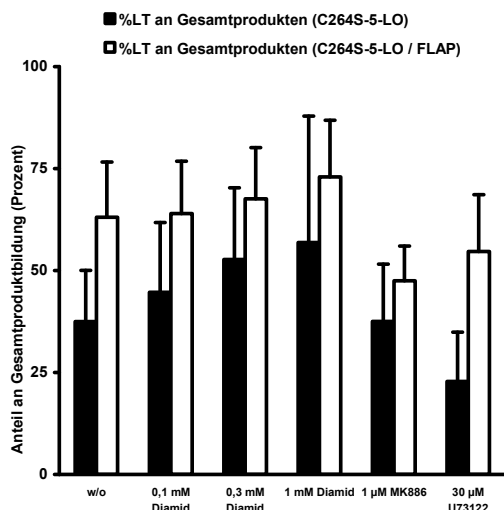


Abb. 4.1.34 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C264S-5-LO bzw. C264S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C264S-5-LO oder C264S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)C264S-5-LO, (□)C264S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C264S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT/5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Durch die Zugabe von Diamid lässt sich der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung für C264S-5-LO±FLAP stetig steigern. Dieses Verhalten deckt sich mit dem von wt-5-LO±FLAP (Abb. 4.1.34).

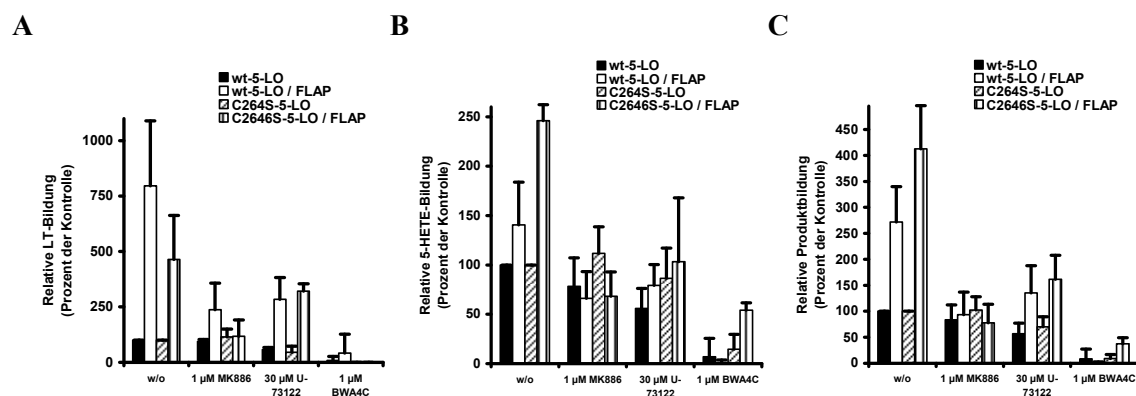


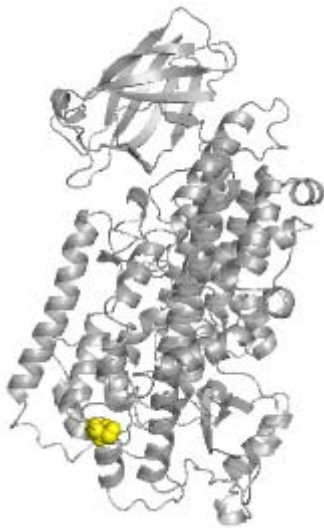
Abb. 4.1.35 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C264S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C264S-5-LO oder C264S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 mit dargestellt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C264S-5-LO.

Ergebnisse und Diskussion

MK-886 hemmt die FLAP-gesteigerte Leukotrienbildung effektiv. U-73122 hemmt sehr moderat und BWA4C hemmt die C264S-5-LO-Aktivität FLAP-unabhängig effektiv (Abb. 4.1.35). Diese Kontrollen bestätigen die Eignung des Enzyms und des Testsystems zur Überprüfung von Inhibitoren.

4.1.8.6. C300S-5-LO



P09917	LOX5_HUMAN	295	NKTDPC	TLQ	303
P18054	LOX12_HUMAN	286	NVIR-	GEKQ	293
P16050	LOX15_HUMAN	286	NVIL-	CSQQ	293
			*	*	

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Nein
Umgebung konserviert ² :	Nein
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja
Enzym aktiv in E.coli:	Ja
U-73122-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.36 Charakterisierung der Eigenschaften der C300S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

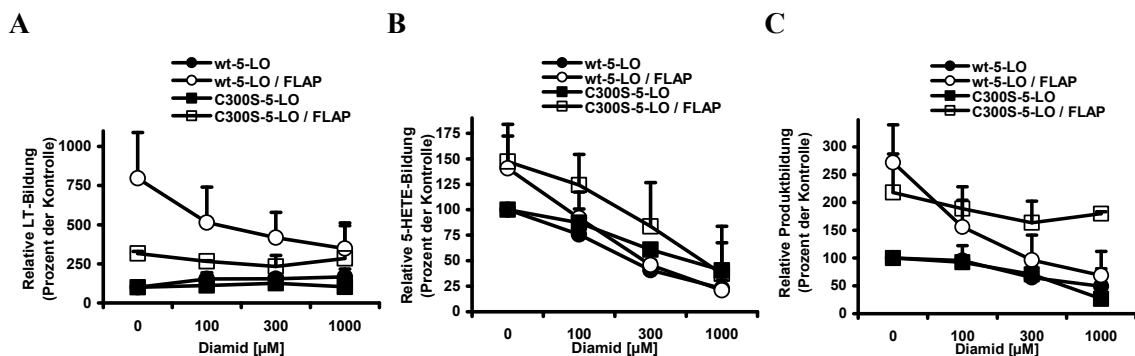


Abb. 4.1.37 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C300S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C300S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit 5 μM Ionophor und 3 μM AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C300S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die C300S-5-LO-Leukotrienbildung wird durch FLAP kaum gesteigert und Diamid vermag die C300S-5-LO±FLAP-Leukotrienbildung kaum zu beeinflussen (Abb. 4.1.37 A). Die 5-HETE-Bildung wird im Vergleich mit wt-5-LO ähnlich stark durch Diamid gehemmt, auf die Gesamtproduktbildung kann Diamid allerdings kaum Einfluss nehmen (Abb. 4.1.37 C).

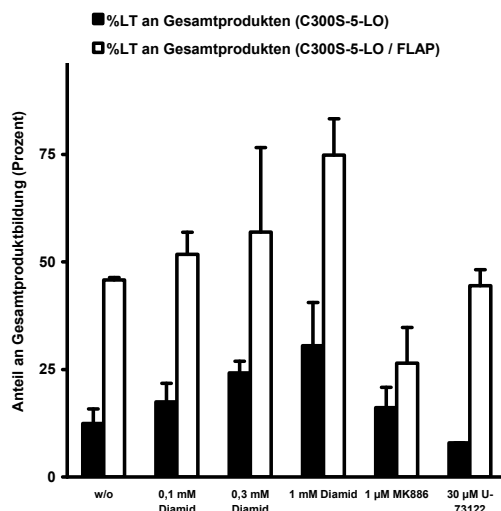


Abb. 4.1.38 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C300S-5-LO bzw. C300S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C300S-5-LO oder C300S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)C300S-5-LO, (□)C300S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C300S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT/5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Durch FLAP-Kotransfizierung kann die LT-Bildung bei C300S-5-LO nur wenig gesteigert werden (Abb. 4.1.37 A). Der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung von C300S-5-LO/FLAP ist dagegen sehr hoch (Abb. 4.1.38). Der Leukotrienanteil bei C300S-5-LO ohne FLAP ist sehr gering im Vergleich zu wt-5-LO. Diamid steigert den Leukotrienanteil der C300S-5-LO-Aktivität. Der C300S-5-LO/FLAP-generierte Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung lässt sich durch Zugabe von Diamid steigern (Abb. 4.1.38).

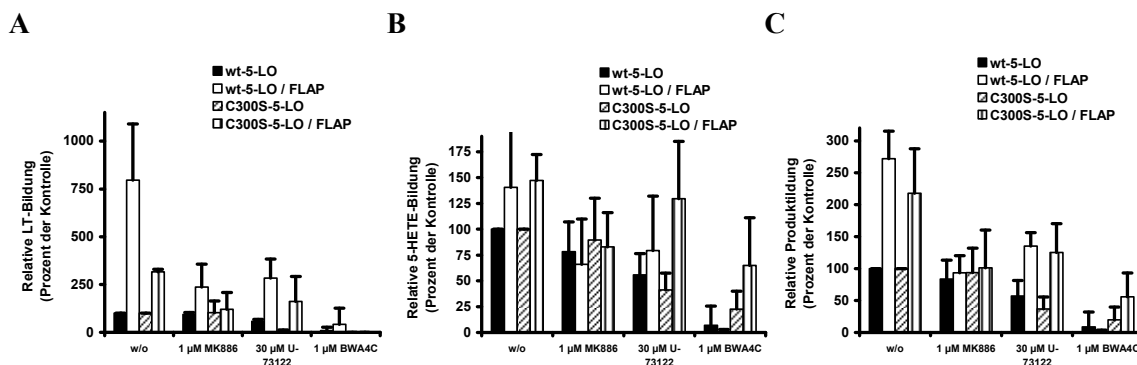


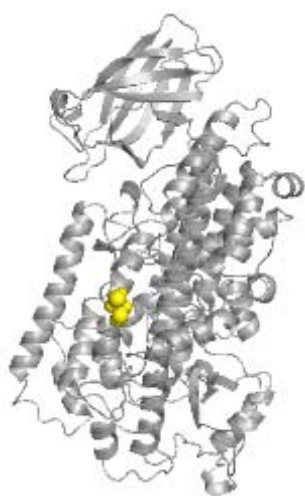
Abb. 4.1.39 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C300S-5-LO-Aktivität. 5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C300S-5-LO oder C300S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C300S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Wie erwartet, hemmt MK-886 die FLAP-unterstützte Leukotrienbildung effektiv. U-73122 hemmt moderat, BWA4C hemmt FLAP-unabhängig die C300S-5-LO-Aktivität sehr effektiv (Abb. 4.1.39).

4.1.8.7. C416S-5-LO

Die Position 416 der 5-LO stellt eine sehr interessante Aminosäure dar, da hier wahrscheinlich U-73122 binden kann. Die Mutante C416S-5-LO zeigt keinerlei Hemmung durch U-73122.

In direkter Nachbarschaft zu Cystein-416 existiert ein weiterer Cysteinrest an Position 418. Durch diese Konstellation ist ein Einfluss auf die Eigenschaften der 5-LO denkbar.



P09917	LOX5_HUMAN	410	AREQLICCGLFDK	423
P18054	LOX12_HUMAN	397	ARTQLISDGGIFDK	410
P16050	LOX15_HUMAN	397	ARTGLVSDMGIFDQ	410
			** * : * : * : * :	

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Ja
Umgebung konserviert ² :	teilweise
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja (C416A: Nein)
Enzym aktiv in E.coli:	Ja (C416A: Nein)
U-73122-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.40 Charakterisierung der Eigenschaften der C416S-5-LO-Mutante. ¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

Ergebnisse und Diskussion

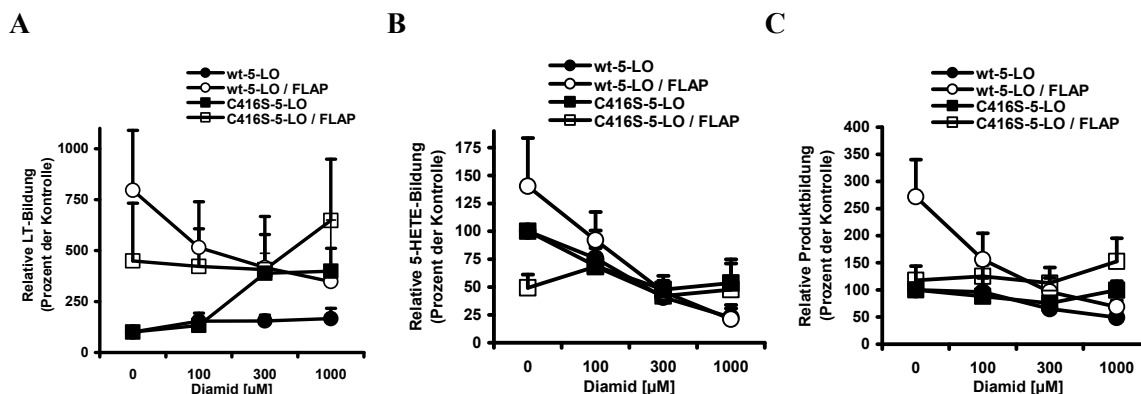


Abb. 4.1.41 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C416S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C416S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C416S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die C416S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung ist ähnlich wie bei wt-5-LO/FLAP. Nach Zugabe von steigenden Mengen Diamid wird die Leukotrienbildung moderat gesteigert. Die C416S-5-LO-Leukotrienbildung wird bei Zugabe von Diamid bis auf $450\% \pm 200$ im Vergleich zur w/o-Kontrolle ohne Diamid gesteigert. Im Vergleich zu wt-5-LO wird die C416S-5-LO-Mutante somit deutlich stärker aktiviert (Abb. 4.1.41 A).

Im Gegensatz zur Leukotrienbildung wird die 5-HETE-Aktivität durch Diamid mäßig gehemmt. Die Gesamtproduktbildung von C416S-5-LO und C416S-5-LO/FLAP wird durch Diamid kaum beeinflusst.

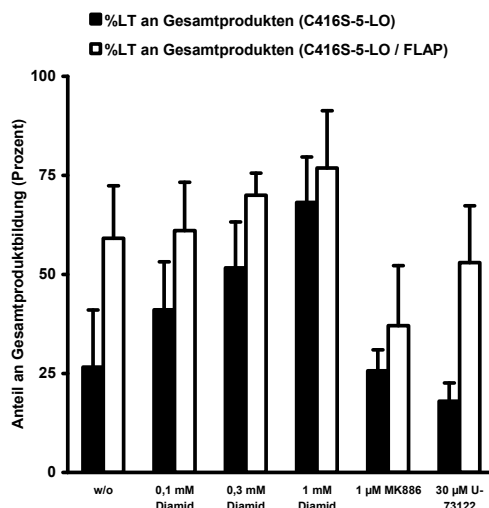


Abb. 4.1.42 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C416S-5-LO bzw. C416S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C416S-5-LO oder C416S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)C416S-5-LO, (▣)C416S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C416S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Der Anteil an Leukotrienen an der Gesamtproduktbildung der C416S-5-LO liegt bei der w/o-Kontrolle bei $25\% \pm 15$. Durch Zugabe Diamid wird der Leukotrienanteil auf bis zu $70\% \pm 10$ gesteigert und erreicht annähernd die Werte von C416S-5-LO/FLAP. Der Leukotrienanteil von C416S-5-LO/FLAP beträgt in der w/o-Kontrolle bei $60\% \pm 13$ der Gesamtprodukte. Durch Zugabe von Diamid wird der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung auf bis zu $75\% \pm 15$ gesteigert. Die C416S-5-LO-Mutante besitzt im Vergleich zu wt-5-LO einen generell höheren Anteil an Leukotrienen an der Gesamtproduktmenge (Abb. 4.1.42).

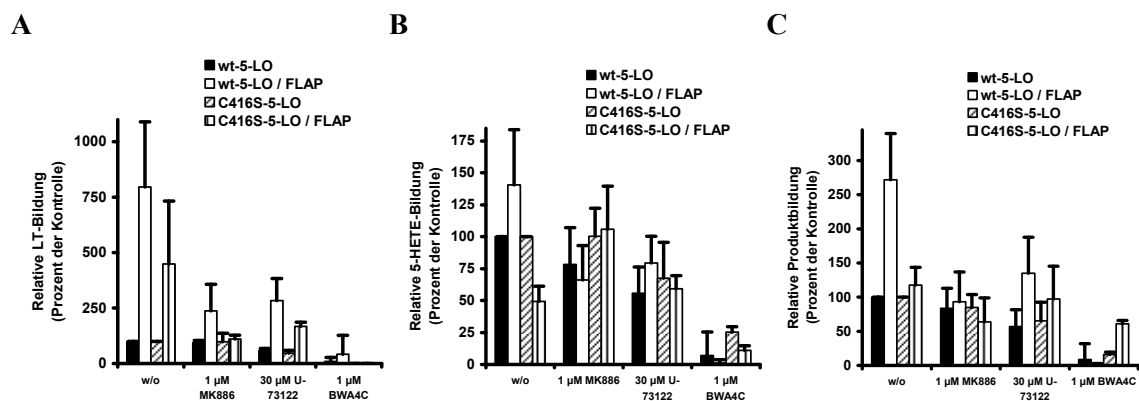


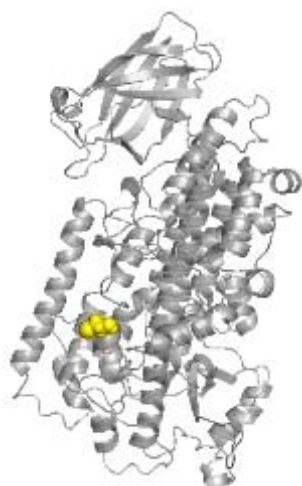
Abb. 4.1.43 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C416S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C416S-5-LO oder C416S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C416S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die Kontrollsubstanz MK-886 hemmt die FLAP-gesteigerte Leukotrienbildung effektiv. Interessanterweise hemmt U-73122 zwar moderat die Leukotrienbildung von C416S-5-LO±FLAP, aber kaum die 5-HETE-Bildung, insbesondere in Anwesenheit von FLAP hemmt U-73122 die C416S-5-LO-Mutante nicht. BWA4C hemmt die C416S-5-LO-Aktivität FLAP-unabhängig (Abb. 4.1.43).

4.1.8.8. C418S-5-LO

Die Position Cystein-418 der 5-LO stellt eine interessante Position dar, da sich Cystein-416 in direkter Nachbarschaft befindet.



P09917	LOX5_HUMAN	410	AREQLICE C GLFDK	423
P18054	LOX12_HUMAN	397	ARTQLISDGG I FDK	410
P16050	LOX15_HUMAN	397	ARTGLVSDMG I FDQ	410
			** * : * : * : * :	

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Ja
Umgebung konserviert ² :	teilweise
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Nein (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja (C418A: Nein)
Enzym aktiv in E.coli:	Ja (C418A: Nein)
U-73122-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	nicht detektierbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.44 Charakterisierung der Eigenschaften der C418S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

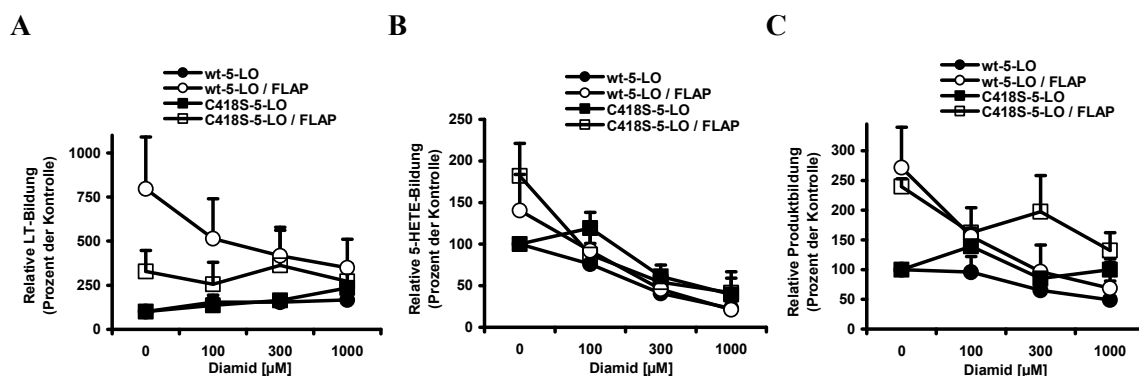


Abb. 4.1.45 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C418S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C418S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C418S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die C418S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung erreicht nicht das Niveau von wt-5-LO/FLAP, es wird die Leukotrienbildung bei C418S-5-LO/FLAP nach Zugabe von Diamid kaum beeinflusst (Abb. 4.1.45 A). Im Gegensatz zur Leukotrienbildung wird die 5-HETE-

Ergebnisse und Diskussion

Aktivität durch Diamid ähnlich der von wt-5-LO gehemmt. Die Gesamtproduktbildung von C418S-5-LO und C418S-5-LO/FLAP wird durch Diamid wenig beeinflusst.

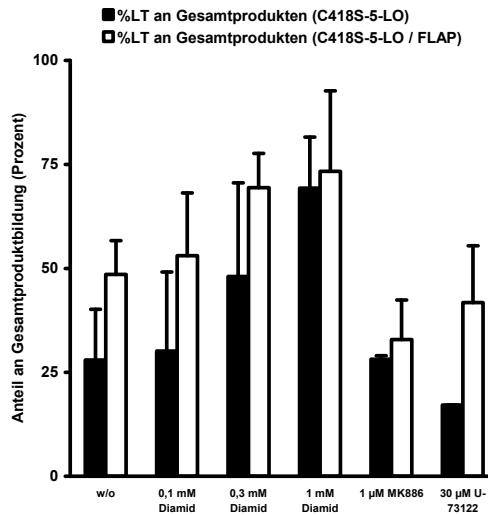


Abbildung 4.1.46 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C418S-5-LO bzw. C418S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C418S-5-LO oder C418S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)C418S-5-LO, (□)C418S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C418S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT+5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Der Anteil der Leukotriene an der Gesamtproduktbildung der C418S-5-LO-Mutante liegt bei der w/o-Kontrolle bei $27\% \pm 16$, durch Zugabe von Diamid kann der Leukotrienanteil auf bis zu $70\% \pm 10$ gesteigert werden und erreicht fast den Leukotrienanteil von C418S-5-LO/FLAP. Der Leukotrienanteil von C418S-5-LO/FLAP beträgt in der w/o-Kontrolle $49\% \pm 8$. Diamid steigert hier den Anteil der Leukotriene auf bis zu $73\% \pm 21$. Die Mutante C418S-5-LO besitzt eine höhere Leukotrienbildung als wt-5-LO (Abb. 4.1.46).

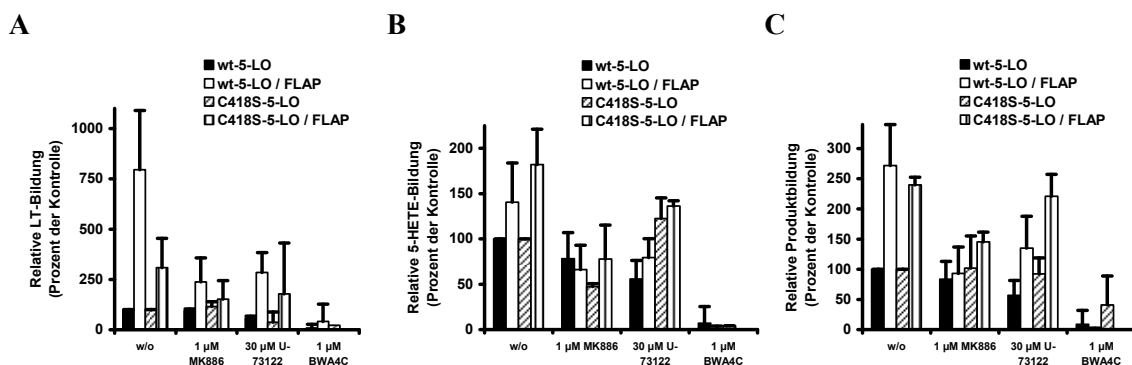


Abb. 4.1.47 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C418S-5-LO-Aktivität.

Ergebnisse und Diskussion

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C418S-5-LO oder C418S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C418S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

MK-886 hemmt die FLAP-gesteigerte Leukotrienbildung effektiv. Interessanterweise hemmt U-73122 nur die Leukotrienbildung von C418S-5-LO±FLAP moderat, aber kaum die 5-HETE-Bildung, ähnlich der C416-5-LO-Mutante. Anscheinend wirken sich beide Mutationen auf die U-73122-Bindung aus. BWA4C hemmt die C418S-5-LO-Aktivität FLAP-unabhängig (Abb.4.1.47).

4.1.8.9. C449S-5-LO



P09917	LOX5_HUMAN	DLTYASLCFPE
P18054	LOX12_HUMAN	QLTYCSLCPDP
P16050	LOX15_HUMAN	FLTYSSF CPPD
		* * * . * : * * :

Cystein nur in 5-LO präsent ¹ :	Nein
Umgebung konserviert ² :	teilweise
Position im Protein:	Oberfläche, katalytische Domäne
Peptid detektierbar ³ :	Ja (nach Trypsin-Verdau)
Expression in E.coli erfolgreich:	Ja
Enzym aktiv in E.coli:	Ja
U-73122-Bindung:	schwach detektierbar mit MALDI-MS
GSH-Bindung:	detektierbar mit MALDI-MS

Abb. 4.1.48 Charakterisierung der Eigenschaften der C449S-5-LO-Mutante.

¹ im Bezug auf 12- & 15-LO; ² im Bezug auf 5-LO; ³ mit MALDI-MS.

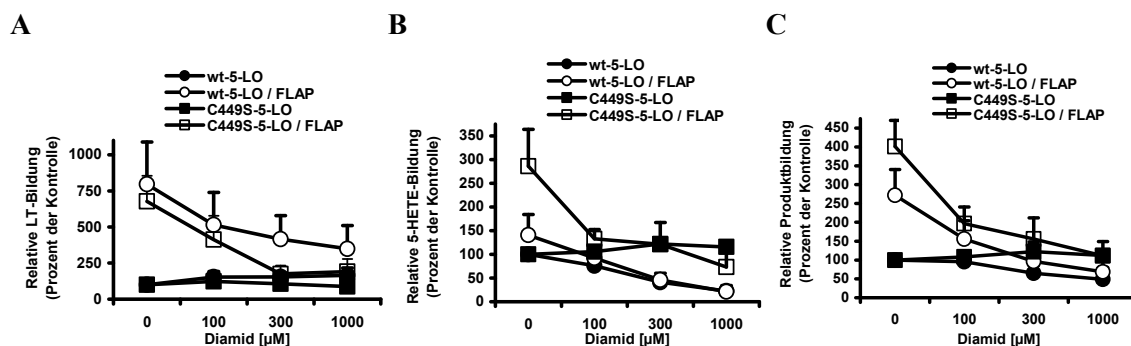


Abb. 4.1.49 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die C449S-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder C449S-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und 3

Ergebnisse und Diskussion

μM AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C449S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die C449S-5-LO/FLAP-Leukotrienbildung liegt auf einem ähnlichen Niveau wie die von wt-5-LO/FLAP. Durch die Zugabe von Diamid wird die Leukotrienbildung bei C449S-5-LO im Vergleich zu wt-5-LO gehemmt (Abb. 4.1.49 A). Interessanterweise ist die 5-HETE-Bildung für C449S-5-LO/FLAP auf ca. 300% im Vergleich zu C449S-5-LO gesteigert (wt-5-LO/FLAP ca. 150% im Vergleich zur wt-5-LO). Auch die 5-HETE-Bildung der C449S-5-LO/FLAP wird durch Zugabe von Diamid effektiv gehemmt. Bei C449-5-LO zeigt die Zugabe von Diamid keinen Einfluss auf die 5-HETE-Bildung, wt-5-LO wird dosis-abhängig gehemmt.

Die Gesamtproduktbildung von C449S-5-LO wird durch Diamid nicht beeinflusst, bei Anwesenheit von FLAP wird die Aktivität effektiv durch Diamid gehemmt.

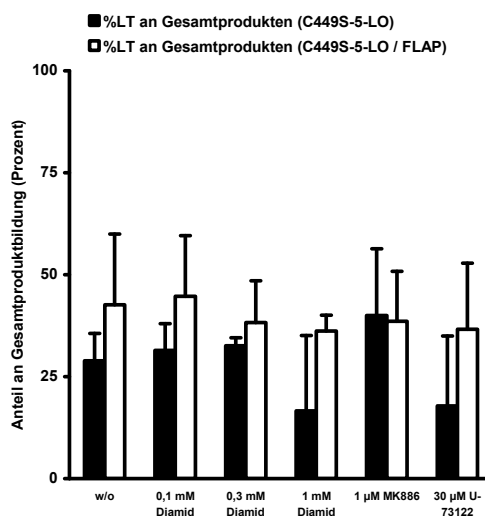


Abb. 4.1.50 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von C449S-5-LO bzw. C449S-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C449S-5-LO oder C449S-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)C449S-5-LO, (□)C449S-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der C449S-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT/5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Interessanterweise ist der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung von C449S-5-LO/FLAP sehr viel geringer verglichen mit wt-5-LO. Dieser Leukotrienanteil lässt sich

Ergebnisse und Diskussion

nicht durch Diamid beeinflussen. Auch C449S-5-LO ohne FLAP reagiert auf Diamid, der LT-Anteil ist aber vergleichbar mit dem von wt-5-LO (Abb. 4.1.50).

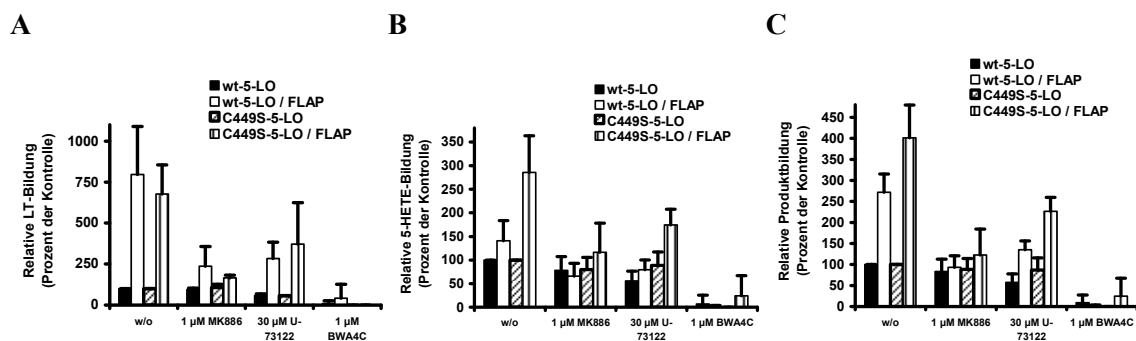


Abb. 4.1.51 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die C449S-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit C449S-5-LO oder C449S-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. C449S-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die Kontrollexperimente mit MK886, U-73122 und BWA4C zeigten die erwartete moderate bis effektive Hemmung von C449S-5-LO±FLAP (Abb. 4.1.51).

4.1.8.10. 2D-5-LO

Wie unter Kapitel 4.1.6. beschrieben wird die 2D-5-LO-Mutante nicht von U-73122 gehemmt. Für die Mutationen C416S- und C418S-5-LO konnte bereits eine mögliche Beteiligung an der U-73122-Bindung gezeigt werden.

Die Mutanten zeigen jeweils ein verändertes Verhalten gegenüber Diamid im Vergleich zu wt-5-LO (siehe auch 4.1.7.7. und 4.1.7.8.). Ein ähnliches Verhalten wird für die 2D-5-LO-Mutante erwartet.

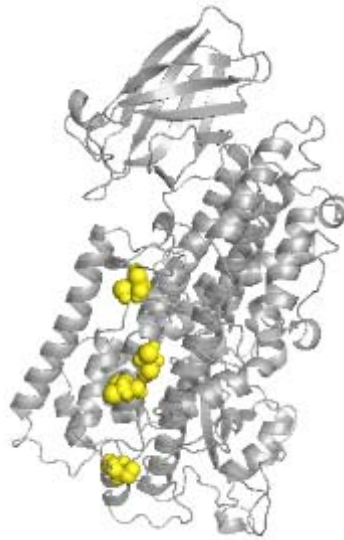


Abb. 4.1.52 Charakterisierung der 2D-5-LO-Mutante.

C159S-/C300S-/C416S-/C418S-5-LO wird als 2D-5-LO-Mutante bezeichnet.

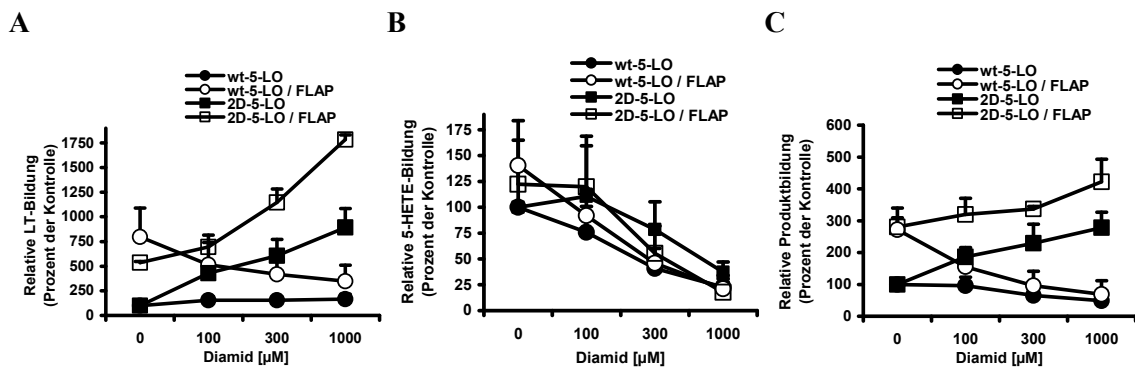


Abb. 4.1.53 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die 2D-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder 2D-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. 2D-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die 2D-5-LO/FLAP-Leukotrienmenge ist bei der w/o-Kontrolle bei ca. 500% im Bezug auf die 2D-5-LO (Abb. 4.1.53 A). Nach Zugabe von Diamid wird die Leukotrienbildung bei 2D-5-LO/FLAP auf bis zu 1500% bei 1 mM Diamid gesteigert (Abb. 4.1.53 A), wt-5-LO/FLAP wird im Vergleich bei Zugabe von Diamid gehemmt. Interessanterweise wird 2D-5-LO durch die Zugabe von Diamid ebenfalls auf ca. 700% im Bezug auf die w/o-Kontrolle ohne Diamid stimuliert.

Die Hemmung der 5-HETE-Bildung durch Diamid verläuft für 2D-5-LO±FLAP vergleichbar der wt-5-LO±FLAP.

Die Gesamtproduktbildung von 2D-5-LO±FLAP wird durch Diamid stark erhöht (Abb. 4.1.53 C).

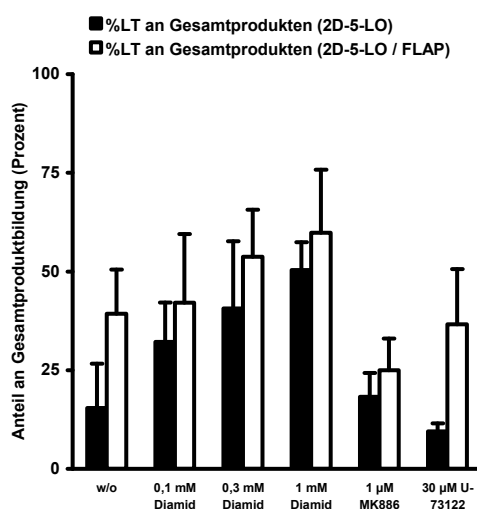


Abb. 4.1.54 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von 2D-5-LO bzw. 2D-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit 2D-5-LO oder 2D-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)2D-5-LO, (□)2D-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der 2D-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT/5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Bei 2D-5-LO liegt der Leukotrienanteil an den Gesamtprodukten bei $15\% \pm 11$. Durch Zugabe von Diamid kann dieser auf bis zu $48\% \pm 8$ gesteigert werden. Dieser Anteil ist vergleichbar der LT-Menge in Anwesenheit von FLAP, für 2D-5-LO/FLAP beträgt er $40\% \pm 11$ in der w/o-Kontrolle. Durch Zugabe von Diamid steigt der Leukotrienanteil an der Gesamtproduktbildung bei 2D-5-LO/FLAP auf bis zu $56\% \pm 17$ gesteigert werden. Die Leukotrienbildung von 2D-5-LO±FLAP entspricht etwa den Werten von wt-5-LO±FLAP (Abb. 4.1.54).

Ergebnisse und Diskussion

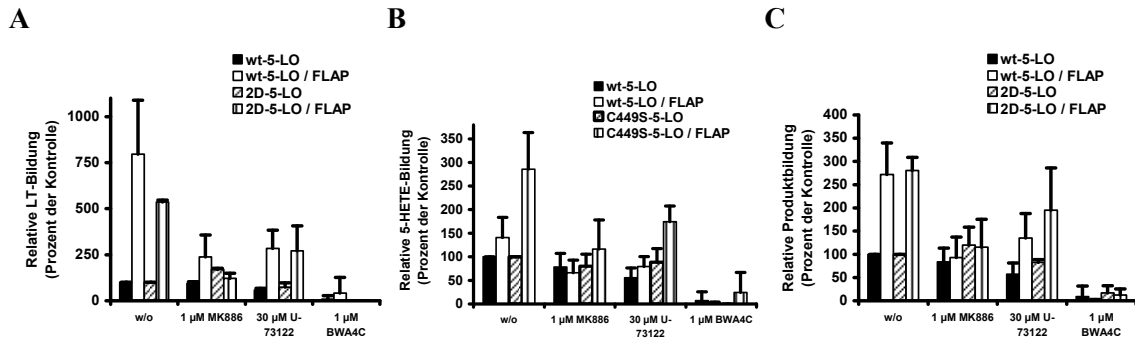


Abb. 4.1.55 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die 2D-5-LO-Aktivität.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit 2D-5-LO oder 2D-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. 2D-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

MK-886 hemmt potent die 2D-5-LO±FLAP-Leukotrienbildung. Das Ergebnis aus Kapitel 4.1.6. lässt sich auch hier bestätigen: U-73122 hemmt die 2D-5-LO±FLAP-Aktivität kaum, so dass das gefundene Ergebnis unter weiteren Untersuchungsbedingungen verifiziert werden konnte. BWA4C hemmt die 2D-5-LO-Aktivität FLAP-unabhängig (Abb. 4.1.55).

4.1.8.11. 3W-5-LO

3W-5-LO bezeichnet eine sogenannte Dreifach-Mutante, bei der drei Tryptophane (W13A-/W75A-/W102A-5-LO), die an der Membranbindung der 5-LO beteiligt sind, durch Alanine ersetzt wurden. Diese 5-LO-Mutante kann nicht mehr an Membranen binden. Folglich wird keine nennenswerte Steigerung der FLAP-induzierten Leukotrienbildung erwartet.

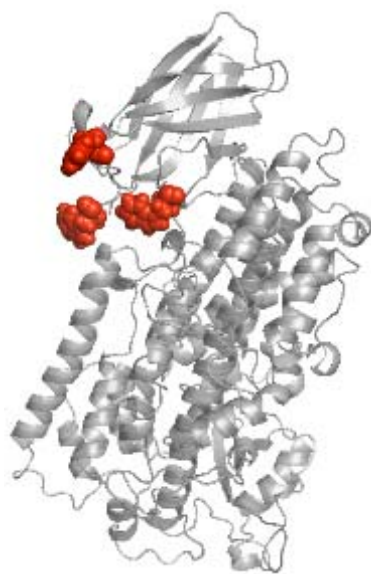


Abb. 4.1.56 Charakterisierung der 3W-5-LO-Mutante.

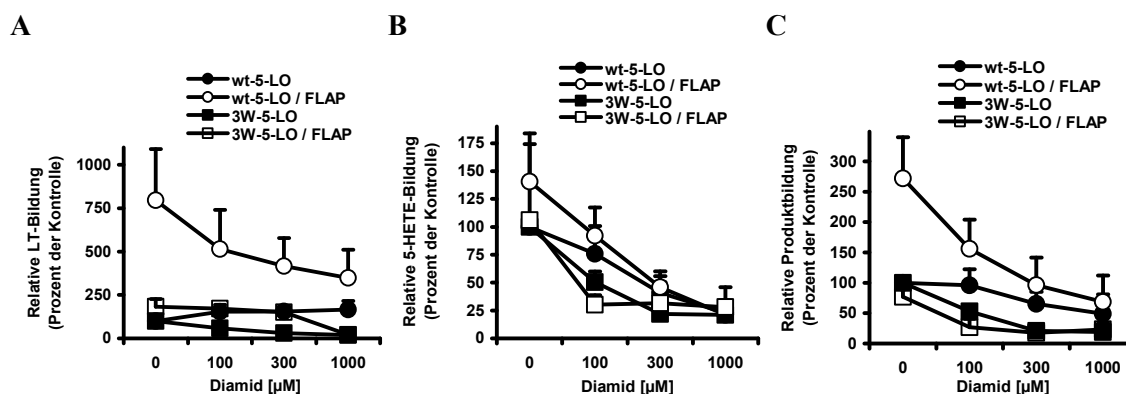


Abb. 4.1.57 Einfluss von steigenden Mengen Diamid auf die 3W-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen. 5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit wt-5-LO oder 3W-5-LO/FLAP wurden mit den angegebenen Mengen an Diamid für 10 Minuten bei RT vorinkubiert und mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA stimuliert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz aus Abb. 4.1.17 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. 3W-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Tatsächlich hat die Kotransfizierung mit FLAP keinen Einfluss auf die Leukotrien-Bildung, die 5-HETE-Menge und damit auf die Gesamtproduktbildung. Durch Diamid-Zugabe wird die 3W-5-LO±FLAP-Aktivität gehemmt (Abb. 4.1.57).

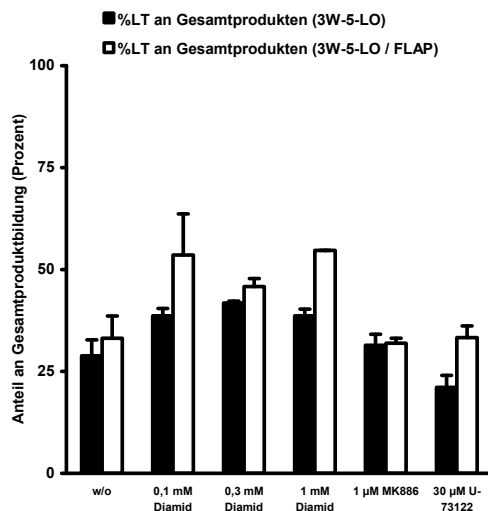


Abb. 4.1.58 Einfluss von Diamid, MK-886 und U-73122 auf das Leukotrien/5-HETE Produktverhältnis von 3W-5-LO bzw. 3W-5-LO/FLAP.

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit 3W-5-LO oder 3W-5-LO/FLAP wurden mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ stimuliert. Vorab wurden die Substanzen mit den angegebenen Konzentrationen 5 – 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (■)3W-5-LO, (□)3W-5-LO/FLAP. Dargestellt sind jeweils die Anteile an Leukotrienen an der 3W-5-LO-Gesamtproduktbildung (LT/5-HETE) in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Der Anteil der Leukotriene an der Gesamtproduktmenge ist für 3W-5-LO±FLAP ähnlich (25 – 35%). Nach Zugabe von Diamid wird der Anteil an Leukotrienen etwas gesteigert, das Verhältnis ist für 3W-5-LO±FLAP konstant. Die teilweise höheren Werte bei 3W-5-LO/FLAP sind nicht signifikant (Abb. 4.1.58).

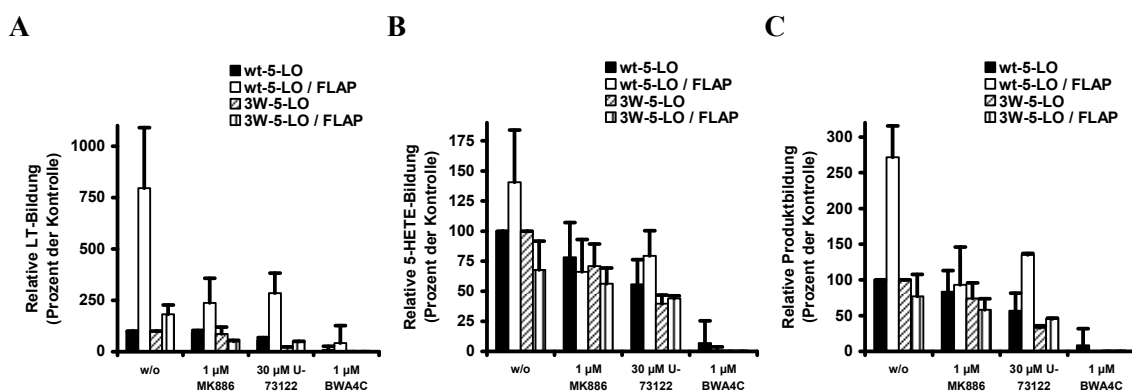


Abb. 4.1.59 Einfluss von MK-886, U-73122 und BWA4C auf die 3W-5-LO-Aktivität.

Ergebnisse und Diskussion

5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit 3W-5-LO oder 3W-5-LO/FLAP, stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA. Vorab wurde mit den angegebenen Substanzen 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Zum Vergleich wurde der Datensatz von Abb. 4.1.19 eingefügt. Relative Darstellung im Bezug auf wt- bzw. 3W-5-LO. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die Kontrollexperimente bestätigen nochmals die unter Abb. 4.1.57 gezeigten Effekte: 3W-5-LO/FLAP besitzt keine erhöhte FLAP-unterstützte Leukotrienbildung.

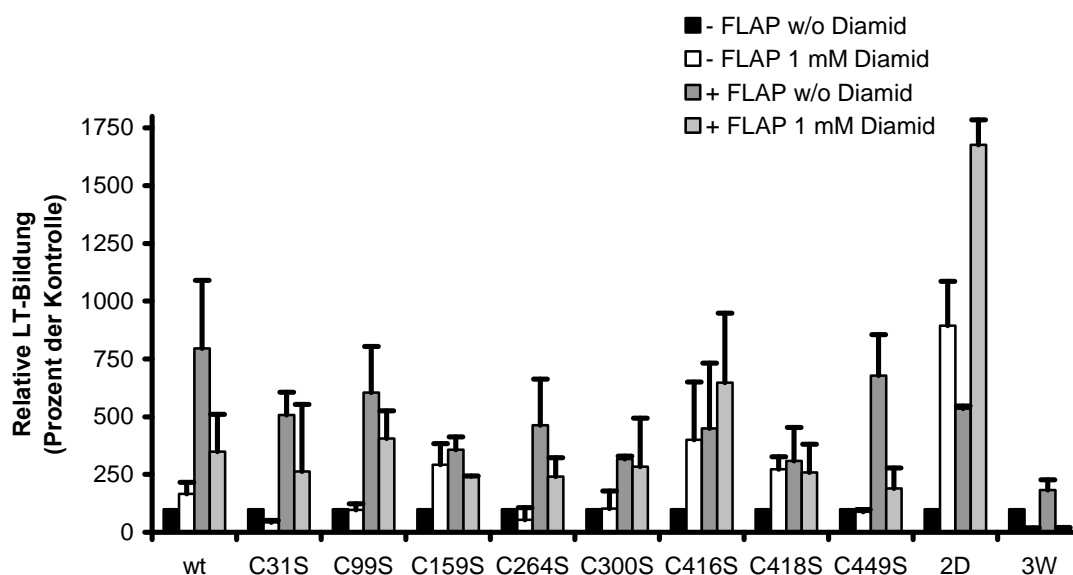
Interessanterweise wird 3W-5-LO/FLAP wenig durch U-73122 gehemmt, wohingegen 3W-5-LO sehr wohl durch U-73122 effektiv gehemmt wird.

Die Kontrolle mit BWA4C bestätigt die korrekte Durchführbarkeit der Transfizierung bzw. des Aktivitätstests (Abb. 4.1.59).

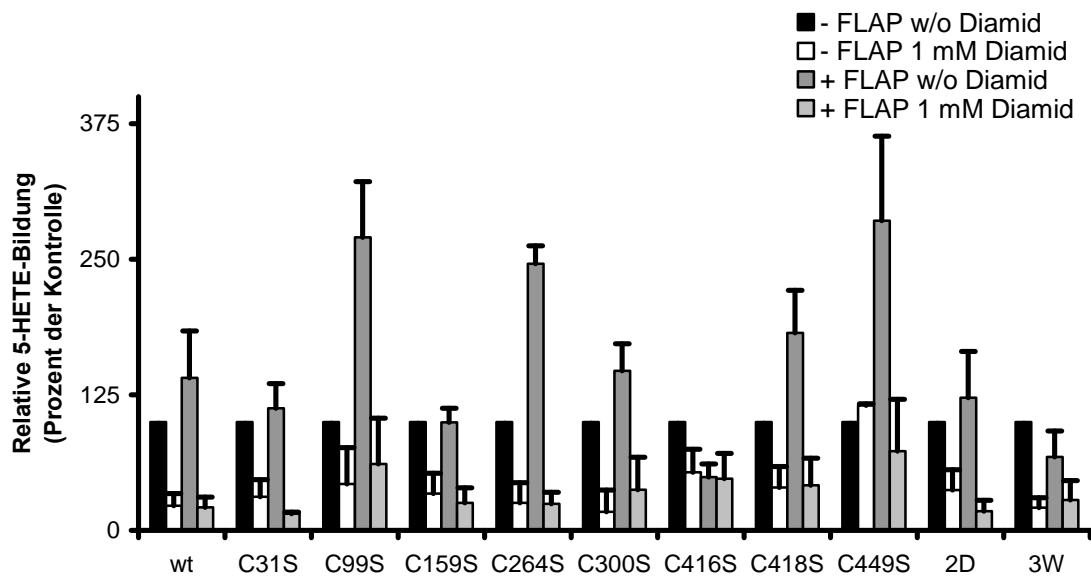
4.1.8.12. Zusammenfassung des Diamid-Effekts auf Cys/Ser-5-LO-Mutanten in HeLa-Zellen

Die Ergebnisse der Versuche aus Kapitel 4.1.8.1 bis 4.1.8.10 wurden in den nachfolgenden Abbildungen übersichtlich zusammengestellt. Dabei wurden die Leukotrien-, 5-HETE- und Gesamtproduktbildung getrennt dargestellt.

A Leukotrien-Bildung



B 5-HETE-Bildung



C Gesamtproduktbildung

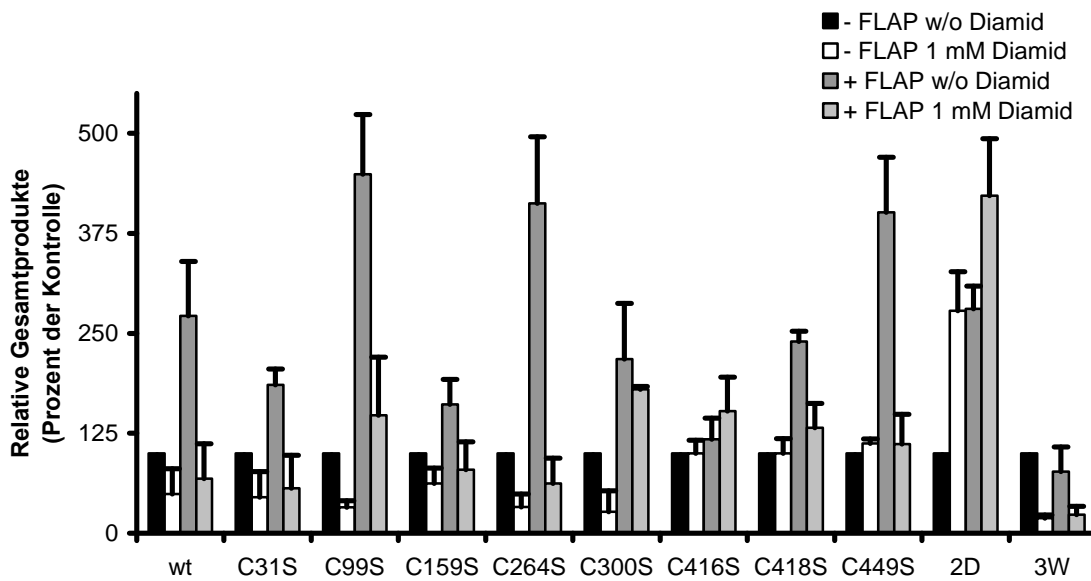


Abb. 4.1.60 Übersicht über die Beeinflussung der 5-LO-Mutanten±FLAP durch Diamid. 5×10^6 HeLa-Zellen, transfiziert mit der angegebenen 5-LO-Variante mit (■ / □) oder ohne FLAP (■ / □), stimuliert mit $5 \mu\text{M}$ Ionophor und $3 \mu\text{M}$ AA wurden vorab mit (□ / ■) oder ohne 1 mM Diamid (■ / ■) 5 bis 10 Minuten bei RT vorinkubiert. (A) Leukotrien-Bildung, (B) 5-HETE-Bildung und (C) Gesamtproduktbildung (LT + 5-HETE). Relative Darstellung im Bezug auf die jeweilige 5-LO-Variante (■ - FLAP w/o Diamid). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

4.1.9. Diskussion

Die als selektiver PLC-Inhibitor bekannte Substanz U-73122 hemmt potent die 5-LO-Aktivität im Homogenat und an gereinigter 5-Lipoxygenase (5-LO). In einem MALDI-MS-Experiment konnte gezeigt werden, dass U-73122 an Cystein-99 und -159 der 5-LO binden kann. Möglicherweise bindet U-73122 an weitere Cysteine, dies konnte aber wegen der technischen Limitierung der Messung nicht gezeigt werden. Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Glutathion ebenfalls an Cysteine der 5-LO binden kann (Cystein 99 und weitere, Tab. 4.1.2).

Bindung von U-73122 an 5-LO

Möglicherweise besteht zwischen dem Hemmeffekt von U-73122 und der kovalenten Bindung an ein Cystein der 5-LO ein direkter Zusammenhang. Da die C99A- und C159A-5-LO-Mutanten durch U-73122 weiterhin gehemmt werden können, konnte diese Hypothese nicht direkt bestätigt werden. Die MALDI-MS-Untersuchung kann höchst wahrscheinlich nicht alle kovalenten U-73122-5-LO-Cystein-Bindungen identifizieren. Durch Sequenzvergleiche mit anderen Lipoxygenase-Typen und anderen 5-LO-Quellen sowie Mutationen weiterer 5-LO-Cysteine wurde versucht, ein oder mehrere Cystein(e) zu identifizieren, die zum einen U-73122 kovalent binden können und für die Hemmwirkung verantwortlich sind.

So zeigt der Vergleich der Proteinsequenzen von humaner 5-, 12- und 15-LO, dass die Cysteine-99 und -449 in allen Lipoxygenasen vorhanden sind (Abb. 4.1.7). Da U-73122 nicht die 12- und 15-LO-Aktivität hemmen kann (Abb. 4.1.1.), kommen Cystein-99 und -449 nicht für eine 5-LO-Hemmung und -Bindung durch U-73122 in Frage.

Cysteine, die sich nicht an der 5-LO-Oberfläche befinden, können ebenfalls keine Bindung eingehen. Dies betrifft die Cysteine-240, -310 und -561.

RAW 264.1- und RBL1-Zellen sind 5-LO-positive Zelllinien. Die 5-LO-Proteinsequenzen unterscheiden sich hinsichtlich der Cysteine nur an der Position 418 (Tab. 8.5). Würde die 5-LO-Aktivität dieser Zelllinien durch U-73122 gehemmt werden, könnte dieses Cystein ebenfalls nicht für eine Beteiligung an der Hemmwirkung herangezogen werden. Tatsächlich wird die 5-LO-Aktivität beider Zelllinien durch U-73122 gehemmt. Es ist aber zu beobachten, dass U-73343 ebenfalls die 5-LO-Aktivität dieser Zelllinien hemmt. Dieser Effekt konnte in keiner anderen Versuchsanordnung beobachtet werden. Da U-73343 nicht über eine Maleinimid-Gruppe verfügt wie U-73122, können Cysteine nicht kovalent gebunden werden. Daher ist festzuhalten, dass die Hemmwirkung von U-73122 nicht

Ergebnisse und Diskussion

zwangsläufig an eine kovalente 5-LO-Bindung gekoppelt sein muß. Es kann durch dieses Experiment nicht ausgeschlossen werden, dass Cystein-418 an der U-73122-Hemmung beteiligt ist. Andere 5-LO-Testsysteme, wie die Inkubation mit PMNL-Homogenat, mit gereinigtem 5-LO-Enzym oder mit Homogenaten von transfizierten HeLa-Zellen konnten demgegenüber bestätigen, dass die Maleinimid-Gruppe des U-73122 wichtig für die 5-LO-Hemmung ist, da bei diesen Untersuchungen U-73343 keine 5-LO-Hemmung erreichen konnte.

Möglicherweise weisen Maus- und Ratten-5-LO etwas andere Eigenschaften auf wie humane 5-LO. Denkbar wäre, dass der lipophile Teil (Estratrien-Teil) von U-73343 besser mit den betreffenden Bereichen auf dieser 5-LO-Oberfläche interagieren kann, verglichen mit humaner 5-LO.

Weitere Untersuchungen mit den Mutanten C248A-, C264A- und C449A-5-LO konnten zeigen, dass diese potent durch U-73122 gehemmt werden können.

Daher können nur die Cysteine-31, -300, -416 und -418 für eine U73122-Bindung und 5-LO-Hemmung in Frage kommen.

Betrachtet man die 5-LO-Oberfläche, stehen die Cysteine-159, -300, -416 und -418 in direkter Nachbarschaft zu der Oberflächenstruktur, die als Zugang zum aktiven Zentrum der 5-LO angesehen wird (Abb. 4.1.14 und 4.1.62). Kuhn et al. konnte für 12/15-Lipoxygenase zeigen, dass es auf der Oberfläche des Proteins einen Eingang für Arachidonsäure geben kann. Die Carboxylgruppe der Arachidonsäure tritt dabei mit Arginin-403 am „Eingang“ zum aktiven Zentrum in Wechselwirkung (238).

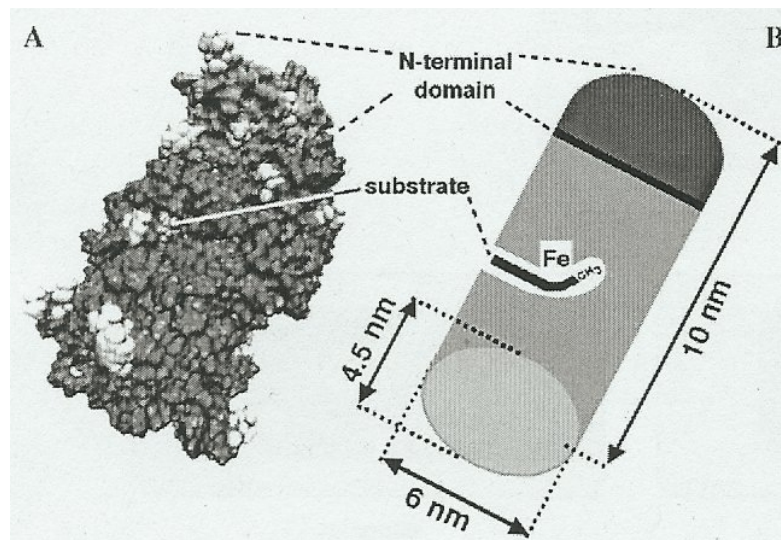


Abb. 4.1.61 (A) 3D-Struktur der Kaninchen-12/15-LO. Arachidonsäure interagiert mit Arg403 der 12/15-LO. (B) Schematische Darstellung des Enzyms. Eingezeichnet ist die Substrat-Bindungstasche mit dem Zugang zum aktiven Zentrum (238).

Ergebnisse und Diskussion

Eine ähnliche Beobachtung konnte die Gruppe um Charlier et al. machen, die am Modell der 5-LO ebenfalls einen Eingang zum aktiven Zentrum sowie eine Substrat-Bindungstasche zeigen konnte. Möglicherweise interagiert die Aminosäure Lysin-409 der 5-LO mit Arachidonsäure, ähnlich wie Arg-403 bei 12/15-LO (239).

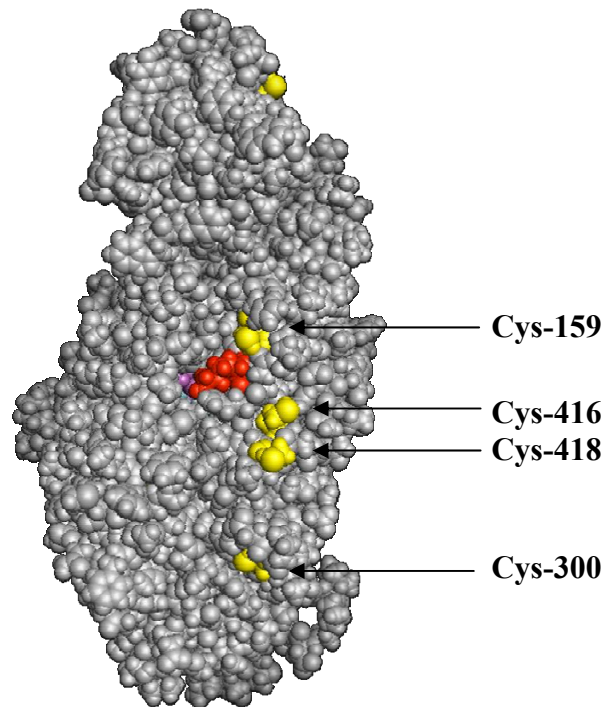


Abb. 4.1.62 3D-Ansicht der 5-LO, basieren auf Kaninchen 12/15-LO. Rot: Lys-409 und gelb: Cysteine.

Um diese Behauptung zu unterstützen, wurde eine Vierfach-5-LO-Mutante (C159S/C300S/C416S/C418S-5-LO = 2D-5-LO) und weitere Cystein/Serin-5-LO-Mutanten angefertigt und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass C416S- und 2D-5-LO im $E.coli$ -100.000 \times g-Überstand nicht mehr effektiv durch U-73122 gehemmt werden können (Abb. 4.1.16). Somit ist die Überlegung, dass auf der 5-LO-Oberfläche eine Bindungsstelle für U-73122 existiert, die zusätzlich einen Einfluss auf das aktive Zentrum haben könnte, bestätigt. Wird diese Aminosäure durch Mutation verändert, verliert U-73122 seine inhibitorische Potenz.

Ob es sich bei dieser Bindungsstelle tatsächlich um einen Zugang zum aktiven Zentrum handelt, kann durch diese Untersuchungen nicht vollständig geklärt werden.

Die Ergebnisse mit humanen Cystein/Serin-5-LO-Mutanten zeigen, dass die Hemmung der humanen 5-LO durch U-73122 anscheinend an eine 5-LO-Cystein-Bindung gekoppelt ist. Ob es durch die Mutationen zu Änderungen in der Proteinfaltung oder -konformation und damit zu einem veränderten Verhalten der 5-LO gegenüber U-73122 kommt, kann nicht

hinreichend beantwortet werden. Die Mutanten C416S- und 2D-5-LO werden gut in *E. coli* exprimiert (Abb. 4.1.15) und zeigen etwas schwächere, wenn auch vergleichbare absolute Aktivitäten (Abb. 4.1.17).

Die Ergebnisse in HeLa-Zellen und den Mutanten C416S- und 2D-5-LO mit U-73122 konnten bestätigen, dass die Mutation von Cystein-416 zu einer geringeren Hemmwirkung von U-73122 führt (Abb. 4.1.43 und 4.1.55).

Es kann davon ausgegangen werden, dass Cystein-416 der 5-LO für die U-73122-Bindung und der daraus folgenden Hemmung der 5-LO verantwortlich ist. Einschränkend ist zu erwähnen, dass der direkte Nachweis der U-73122-Bindung an Cystein-416 mit Hilfe der MALDI-MS-Analyse nicht gelungen ist.

Glutathion-Bindung an 5-LO

Es konnte gezeigt werden, dass Glutathion an 5-LO-Cysteine binden kann. Dabei entsteht ein gemischtes Disulfid zwischen GSH und einem Cysteinrest (Abb. 4.1.2). Die Bindung von Glutathion an 5-LO konnte bei moderaten Verhältnissen (Raumtemperatur, wässriger Puffer) durchgeführt werden. Versuche, die 5-LO-Glutathionierung zu steigern, schlugen fehl. So konnte der Zusatz von H₂O₂, erhöhte Temperatur, verlängerte Reaktionsdauer, Konzentrationserhöhung, Diamid-Zugabe oder der Einsatz von oxidiertem Glutathion (GSSG) keine zusätzlichen detektierbaren Glutathionierungen, erzeugen. Für Cystein-99 konnte reproduzierbar eine GSH-Bindung gezeigt werden. Für die Cysteine-264 und -449 konnte das Untersuchungsergebnis nicht reproduzierbar wiederholt werden.

Es wurde versucht, mit 5-LO-Aktivitätstest ein unterschiedliches Verhalten von wt- und C99A-5-LO-Aktivität gegenüber Glutathion zu zeigen. Diese Versuche führten zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Die denkbare Beeinflussung durch die GSH-Bindung an Cystein-99, kann nicht durch 5-LO-Aktivitätstests gezeigt werden, möglicherweise gelingt dies in anderen Testsystemen.

GSH-Docking an Cystein-99 der 5-LO

Es konnte mit Hilfe von *in silico* Docking-Experimenten gezeigt werden, dass die Bindung von GSH an Cystein-99 eine sehr hohe Bindungsaffinität besitzt. Die Docking-Scores für gebundenes Glutathion an Cystein-99, -416 und -418 weisen sehr hohe positive Werte auf. Auf eine Glutathion-Bindung auf der katalytischen Domäne deuten mehrere Faktoren hin, die für die Ausbildung einer entsprechenden Bindungstasche nötig sind (Abb. 4.1.16a A). Glutathion tritt mit verschiedenen Aminosäuren an der Kontaktfläche zwischen der

regulatorischen C2-ähnlichen und der katalytischen Domäne in Wechselwirkung. Dabei ist interessant, dass Cystein-99 ebenso wie das mit GSH in Wechselwirkung tretende Arginin-102 ein Bestandteil der sogenannten ionischen Brücke zwischen den beiden Domänen ist.

Da *in silico* Untersuchungen unter Vorbehalt gesehen werden müssen, muss noch weiter untersucht werden, ob die GSH-Bindung und die berechnete Wechselwirkung auch unter realen Bedingungen in der Zelle auftritt.

Interessanterweise konnte die *in silico*-Untersuchung zeigen, dass Cystein-99 von der 5-LO-Oberfläche aus zugänglich ist, obwohl es an der Unterseite der regulatorischen C2-ähnlichen Domäne lokalisiert ist (Abb. 4.1.16a C).

Diese Ergebnisse steigern die Wahrscheinlichkeit, dass die GSH-Bindung an Cystein-99 auch unter *in vivo*-Bedingungen auftreten und einen Effekt auf die Proteineigenschaften der 5-LO aufweisen könnte.

Beeinflussung des GSH-Gleichgewichts durch Diamid

Der Glutathion-Stoffwechsel in intakten Zellen kann durch Diamid-Zugabe verändert werden. Glutathion ist vorwiegend im reduzierten Zustand (GSH) in der Zelle vorhanden. Oxidiertes Glutathion ist in der Regel nur zu einem geringen Anteil vorhanden (GSH:GSSG-Verhältnis 30:1 bis 100:1).

Durch die Zugabe von Diamid wird reduziertes Glutathion zu oxidiertem Glutathion umgesetzt. In der Zelle geschieht diese Reaktion bevorzugt. Es kommt aber auch zur Ausbildung von gemischten GSH-Protein-Disulfiden (Abb. 4.1.16b). Diese Protein-Glutathionylierung ist die Grundlage für die Untersuchungen in Kapitel 4.1.8.

Es wurden wt-5-LO sowie Cys/Ser-5-LO-Mutanten mit und ohne FLAP in HeLa-Zellen transfiziert und deren Verhalten gegenüber Diamid untersucht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 4.1.60 dargestellt. Dabei wurden die Leukotrien- und 5-HETE-Bildung sowie die Gesamtproduktbildung getrennt dargestellt.

Die Leukotrienbildung von wt-5-LO wird durch Zugabe von FLAP in HeLa-Zellen gesteigert. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Testsystem mit transfizierten HeLa-Zellen unter den gegebenen Bedingungen geeignet ist.

Durch die Zugabe von 1 mM Diamid wird die Leukotrienbildung von wt-5-LO (ohne FLAP) moderat gesteigert. Bei gleichzeitiger Transfektion mit FLAP und Diamid-Zugabe wird die Leukotrienbildung, im Vergleich zu wt-5-LO/FLAP ohne Diamid-Zugabe, gehemmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die 5-HETE-Bildung von wt-5-LO wird durch FLAP-Transfektion (ohne Diamid-Zugabe) kaum gesteigert. Durch Diamid-Zugabe wird die 5-HETE-Bildung von wt-5-LO sowie wt-5-LO/FLAP potent gehemmt.

Die angegebene Gesamtproduktbildung ist die Summe aus Leukotrien- und 5-HETE-Bildung, weitere 5-LO-Produkte wurden nicht berücksichtigt. Die Diamid-Zugabe wirkt sich bei wt-5-LO mit und ohne FLAP-Transfektion hemmend aus, wobei die Gesamtproduktbildung durch die FLAP-Transfektion gesteigert ist (ohne Diamid-Zugabe). Bei Zugabe von Diamid kann dieser FLAP-Effekt nicht mehr beobachtet werden (4.1.60). Möglicherweise führt die Diamid-Zugabe zu einer Glutathionylierung der 5-LO-Oberfläche, die durch die GSH-Bindung hydrophiler wird. Es resultiert eine geringere Wechselwirkung mit Membranen, wodurch niedrigere 5-LO-Aktivitäten zu beobachten sind.

Die Triple-Mutante 3W-5-LO wurde ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. 3W-5-LO transloziert nicht mehr an die Kernmembran und der stimulierende Effekt durch Membranbestandteile ist nicht mehr gegeben, da durch die Mutation die an der Wechselwirkung beteiligten Tryptophane nicht mehr vorhanden sind. Aus diesem Grund ist der Einfluß von FLAP auf die 3W-5-LO-Leukotrienbildung gering (Abb. 4.1.60 A). Auf die 5-HETE- und Gesamtproduktbildung der 3W-5-LO hat FLAP keinen bzw. hemmenden Einfluß. Diamid wirkt bei 3W-5-LO±FLAP außnahmslos hemmend. Dieser Effekt könnte sich dadurch erklären, dass nach Diamid-Zugabe der Gluthionylierungsgrad des Proteins erhöht, die 5-LO-Oberfläche damit polarer und somit die Membranbindung bzw. FLAP-Bindung gehemmt wird.

Obwohl der oxidative Status der Zellen durch die Diamid-Zugabe verändert wird, wird in HeLa-Zellen wt-5-LO oder 3W-5-LO nicht stimuliert. Vorherige Untersuchungen zeigen, dass in anderen Zelllinien nach Diamid-Zugabe eine Stimulierung zu beobachten ist (232,233,235).

Betrachtet man die restlichen Cys/Ser-5-LO-Mutanten, ergibt sich ein heterogenes Bild.

So besitzen die Mutanten C159S-, C300S-, C416S- und C418S-5-LO gegenüber wt-5-LO einen schwächeren FLAP-Effekt bei der Leukotrienbildung sowie eine abgeschwächte Wirkung von Diamid auf die FLAP-unterstützte Leukotrienbildung, d.h. sie werden nicht gehemmt wie die anderen untersuchten Mutanten, sondern nur moderat beeinflusst.

Bei C416S- und 2D-5-LO ist die FLAP-unterstützte Leukotrienbildung, ohne Diamid-Zugabe, vergleichbar mit wt-5-LO/FLAP. Wird mit 1 mM Diamid vorinkubiert, ergibt sich aber ein völlig anderes Bild: Diamid steigert die Leukotrienbildung von C159S-,

Ergebnisse und Diskussion

C416S-, C418S- und 2D-5-LO ohne FLAP-Transfizierung sehr potent. Mit FLAP-Transfizierung wird die Hemmwirkung von Diamid auf die Stimulation der Leukotrienbiosynthese durch FLAP durch die Mutanten C159S-, C300S-, C416S- und C418S-5-LO reduziert. Bei 2D-5-LO stimuliert Diamid die Leukotrien-Biosynthese in Gegenwart von FLAP.

Die Leukotrienbildung von 2D-5-LO wird bei Diamid-Zugabe auf ca. 750 % und bei 2D-5-LO/FLAP und Diamid-Zugabe auf ca. 1600 % gesteigert (wt-5-LO: 100%; wt-5-LO + Diamid: 175%; wt-5-LO/FLAP: 750%; wt-5-LO/FLAP + Diamid: 300%).

Eine Gruppe von Mutanten (C99S-, C264S-, und C449S-5-LO) verhält sich bei der Leukotrienbildung wie wt-5-LO. Bei der 5-HETE-Bildung hingegen ist eine starke FLAP-unterstützte Induktion der 5-HETE-Bildung zu beobachten. Ohne FLAP kann bei allen drei Mutanten nach Diamid-Zugabe eine starke Hemmung beobachtet werden.

Die anderen Mutanten verhalten sich bei der 5-HETE-Bildung wie wt-5-LO.

Da die Gesamtproduktbildung die Summe aus Leukotrien- und 5-HETE-Bildung darstellt, ist die entsprechende Darstellung der Ergebnisse ein Mittelwert aus den oben beschriebenen Untersuchungen.

Interessanterweise können einige Mutanten den Cysteinen zugeordnet werden, die um den postulierten Eingang zum aktiven Zentrum angeordnet sind (Abb. 4.1.62). Es konnte gezeigt werden, dass die Cysteine 159, 300 und 418 für den Hemmeffekt des U-73122 ausgeschlossen werden konnten. Interessanterweise sind diese Cysteine alle auf der gleichen Seite der 5-LO-Oberfläche lokalisiert. Da es sich möglicherweise um den Eingang zum aktiven Zentrum handelt, wäre an diese Stelle auch eine Kontaktfläche zu Membranbestandteilen und/oder FLAP denkbar, da Arachidonsäure an dieser Stelle zum aktiven Zentrum der 5-LO transferiert werden könnte. Durch Mutation der betreffenden Cysteinreste wird an dieser Stelle eine polare bzw. Thiol-haltige Aminosäure entfernt, es kommt zu einem veränderten Verhalten gegenüber Membranbestandteilen und/oder FLAP. Bei dieser Gruppe äußert sich diese Veränderung in einer reduzierten FLAP-unterstützten Leukotrienbildung und einer geminderten Hemmung der Leukotrienbildung nach Diamid-Zugabe im Vergleich zu wt-5-LO.

Die Mutanten C416S- und 2D-5-LO sind wie die vorher beschriebenen Mutanten an einer ähnlichen Stelle der 5-LO-Oberfläche angeordnet, wobei Cystein-416 als der Cysteinrest identifiziert wurde, der nach Mutation die U-73122-5-LO-Hemmung unterbindet. Die 2D-5-LO-Mutante vereint alle vier Cysteine, die an dieser Stelle der 5-LO-Oberfläche angeordnet sind. Beide Mutanten haben ein deutlich verändertes Verhalten gegenüber

Ergebnisse und Diskussion

FLAP und einer Diamid-Zugabe. So kann bei beiden Mutanten eine FLAP-unterstützte Leukotrienbildung beobachtet werden, die ähnlich stark ausgeprägt ist wie bei wt-5-LO. Das Verhalten gegenüber Diamid ist aber grundsätzlich verschieden zu wt-5-LO. Es kommt bei C416S- und 2D-5-LO±FLAP nach Zugabe von Diamid zu einer sehr potenten Steigerung der Leukotrienbildung. Dieser Effekt ist nur bei der Leukotrienbildung zu beobachten und ist so stark ausgeprägt, dass auch bei der Gesamtproduktbildung eine Beeinflussung zu beobachten ist.

Denkbar wäre, das Cystein-416 eine Position auf der 5-LO-Oberfläche einnimmt, die bei wt-5-LO zu einem abgeschwächten Verhalten gegenüber FLAP und und gleichzeitiger Zugabe von Diamid führt. Nach Mutation wird die Oberfläche derart hydrophob, dass die Wechselwirkung mit FLAP und/oder Membranbestandteilen begünstigt ist. Diese Wechselwirkung könnte die Verstärkung der Leukotrienbildung erklären. Dieser Effekt ist bei der 2D-5-LO-Mutante verstärkt, da hier ein Defizit von vier sehr polaren Aminosäuren vorliegt. Dies begünstigt die Verstärkung der Wechselwirkung und führt zu einer Steigerung der Leukotrienbildung. Der Effekt könnte über zwei Wege erklärt werden. Zum einen könnte es nach Diamid-Zugabe bei wt-5-LO zu einer erhöhten Glutathionylierung der betreffenden Cysteine kommen, wodurch die 5-LO-Oberfläche an dieser Stelle hydrophiler und daher für hydrophobe Proteine unzugänglicher wird. Bei wt-5-LO kommt es nach Zugabe von Diamid daher zu einer Hemmung der 5-LO-Aktivität. Bei den Mutanten C416S- und insbesondere bei 2D-5-LO kommt es nicht zu einer Glutathionylierung an den betreffenden Cysteinen, somit kommt es nicht zu einer Abschwächung der Wechselwirkung, sondern zu einer Verstärkung.

Eine zweite Erklärung könnte die Dosis-abhängige Steigerung der Leukotrienbildung nach Diamid-Zugabe sein. Es könnte durch Diamid das GSH:GSSG-Gleichgewicht derart verschoben werden, dass verstärkt oxidative Prozesse ablaufen können. Da unter diesen Bedingungen auch die 5-LO-Aktivität gesteigert werden könnte, begünstigt eine Zugabe von Diamid möglicherweise die 2D-5-LO-Aktivität, die normalerweise bei wt-5-LO (in HeLa-Zellen) nicht zu beobachten wäre.

Es müsste untersucht werden, ob es 2D-5-LO bzw. C416S-5-LO möglich ist, an die Kernmembran translozieren zu können und eine verstärkte Wechselwirkung zwischen FLAP bzw. Membranbestandteilen zu finden ist.

Für eine Gruppe von Mutanten, C99S-, C264S-, und C449S-5-LO, konnte eine GSH-Bindung nachgewiesen werden (Tab. 4.1.2). Grundsätzlich gilt, dass die 5-HETE-Bildung bei allen Untersuchungen unter Diamid (ohne FLAP) gehemmt wird. Eine Ausnahme

bildet C449S-5-LO. Bei dieser Mutante wird die 5-HETE-Bildung, ohne FLAP-Transfizierung, durch Diamid stimuliert (Abb. 4.1.49 B und 4.1.60 B).

Zusätzlich konnte für die Bindung von GSH an Cystein-99 eine starke Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne der 5-LO gezeigt werden (Abb. 4.1.16a).

Die Mutationen der betreffenden Cysteine (C99S-, C264S- oder C449S-5-LO) führten zu einer verstärkten FLAP-unterstützten 5-HETE- bzw. Gesamtproduktbildung, die in diesem Maß bisher nicht beobachtet werden konnte. Unter dem Einfluß von Diamid verhalten sich die Mutanten dieser Gruppe wie wt-5-LO (mit FLAP-Transfizierung).

Zusätzlich ist interessant, dass Cystein-99 und -449 in allen Lipoxygenase-Typen vorhanden sind (Abb. 4.1.7).

GSH-Bindung *in vitro*: Nur ein methodisches Artefakt?

Der Nachweis der *in vitro* GSH-Bindung mit Hilfe der MALDI-MS-Untersuchung reicht alleine nicht aus, da es möglich sein könnte, dass die *in vitro* Glutathionylierung der 5-LO unspezifisch verläuft und die Ergebnisse *in vivo* nicht ablaufen. Klatt et al. konnte zeigen, dass die Inkubation von Proteinen mit GSH *in vitro* eine Protein-Glutathionylierung von 75% aller zugänglichen Cysteine erzeugt, d.h. die bisherigen MALDI-MS-Daten könnten möglicherweise nur ein Artefakt darstellen, das *in vivo* nicht darstellbar wäre.

Die Ergebnisse der Cys/Ser-5-LO±FLAP-transfizierten HeLa-Zellen sowie die Mutationsstudien zur U-73122-Bindung zeigen hingegen, dass die 5-LO-Cysteine eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der 5-LO-Aktivität bzw. bei der Bindung von thiolreaktiven Inhibitoren spielen.

Bei den Ergebnissen der Cystein/Serin-5-LO-Mutanten, die in HeLa-Zellen transfiziert wurden, ist nicht gesichert, ob der Einfluss auf die 5-LO-Aktivität durch eine fehlende Glutathionylierung der 5-LO (bei den jeweiligen Cys/Ser-5-LO-Mutanten) ausgelöst wurde oder ob es eine Veränderung der Proteinkonformation gegeben hat.

Möglicherweise könnten die Cysteine der wt-5-LO auch mit anderen Molekülen reagieren bzw. in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen. Für diese Arten der Beeinflussung lassen sich in der Literatur verschiedene Beispiele finden (NO/NOS-Bindung, Sulfhydryl-Oxidation). Dies könnte ebenso die veränderte 5-LO-Aktivität erklären.

Es ist unklar, welche dieser genannten Mechanismen für das veränderte Verhalten der 5-LO-Mutanten verantwortlich ist, gleichwohl sind die beobachteten Ergebnisse sehr interessant, da sie einen neuen Blick auf das 5-LO-Verhalten, auch im Zusammenspiel mit FLAP, zeigen.

Betrachtet man das 5-LO-Verhalten in transfizierten HeLa-Zellen bei Zugabe von Diamid, zeigt sich eine Hemmung der 5-LO-Aktivität. Veröffentlichte Daten (232,233,235) zeigen eine Stimulation der LTB₄- bzw. 5-HETE-Bildung bei Zugabe von Diamid zu BL41-95A bzw. PMNL. Dieser Effekt lässt sich auch bei der Gruppe B (Leukotrienbildung) und der Gruppe C (5-HETE-Bildung) zeigen.

Der Eingriff in das GSH-Gleichgewicht durch Diamid wirkt sich in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich aus.

Effekte der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO

Arbeiten von Angela Michel innerhalb der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die beiden Cysteine der C2-ähnlichen Domäne, Cystein-31 und -99, die Reduktion der gebildeten 5-HpETE zu 5-HETE in stöchiometrischen Mengenverhältnissen katalysieren. Mutiert man diese beiden Cysteine zu Alaninen, kann isolierte C2-ähnliche Domäne gebildete oder zugesetzte 5-HpETE nicht mehr zu 5-HETE reduzieren.

Diese Reaktion wird anscheinend von freien Cystein-Thiolen katalysiert. Ob eine Glutathionierung von Cystein-31 und/oder -99 diese Reaktion unterbinden kann, wurde bisher nicht untersucht.

Da die Reduktion von 5-HpETE zu 5-HETE dazu führt, dass kein LTA₄ und in weiterer Folge kein LTB₄ und Cysteinyl-Leukotriene gebildet werden können, ist das Verhalten der C2-ähnliche Domäne als eine Regulation der 5-LO-Aktivität zu verstehen.

Beispiele für Proteinregulationen durch Glutathionierung

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Caspase-3 durch Glutathionierung von Caspase-3 an Cys-45 und -135 gehemmt werden kann. Bei diesen Versuchen wurden HL60-Zellen mit GSSG vorinkubiert und mit Actinomycin D aktiviert. Mit biotinyliertem GSSG konnte der Umfang der Glutathionierung bestimmt werden. Der direkte Nachweis der Glutathionierung wurde mit MALDI-MS nachgewiesen (240). Sykes et al. konnte zeigen, dass Caspase-3 durch Glutaredoxin deglutathioniert werden kann (241).

Thioredoxin wird an Cys-72 glutathioniert, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird (242). Die Aktivität der cAMP-abhängige Proteinkinase (cAPK) wird durch Glutathionierung reguliert, wobei die Modifikation des Cystein-199 durch GSH zu einer Inaktivierung der Kinase führt. Es konnte glutathionierte Kinase aus Zellen isoliert werden, indem die Zellen vorab mit Biotin-GSH inkubiert wurden (237). Für Annexin A2 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Proteins durch Glutathionierung reversibel

Ergebnisse und Diskussion

reguliert werden kann. Durch Oxidation mit Diamid konnte die Aktivität von Annexin-2 zeit- und konzentrations-abhängig reduziert werden. Durch die Zugabe von DTT konnte die Hemmung wieder rückgängig gemacht werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Annexin A2 durch Glutaredoxin reaktiviert werden kann. Daher kann von einer reversiblen Glutathionylierung ausgegangen werden (243). β -Aktin wird in Gegenwart von GSH oder GSSG glutathionyliert. α -Aktin wird nicht beeinflusst. β -Aktin kann durch Glutaredoxin-1 (Grx-1) deglutathionyliert werden. Da die GSH-Bindung an das Protein unter moderaten Bedingungen abläuft, kann davon ausgegangen werden, dass β -Aktin in der Zelle glutathionyliert vorliegt, ohne dass oxidative Prozesse angeregt werden müssen (244). Ein weiteres Beispiel ist die Glutathionylierung von I κ B an Cys-189. Eine Diamid-Zugabe zu HeLa-Zellen führt zu einer Akkumulation von glutathionyliertem I κ B α . Die GSH-Bindung führt zu einer erniedrigten Phosphorylierung durch I κ B-Kinase und Casein Kinase II sowie zu einer schlechteren *in vitro*-Ubiquitinierung (245). Bei der Augenerkrankung Katarakt (Grauer Star) bestimmen einige beteiligte Proteine wie α - und β -Crystallin durch Ausbildung von gemischten Disulfiden und Disulfid-Aggregaten den Schweregrad der Erkrankung. Es wird diskutiert, ob eine mangelnde Ausschleusung von oxidiertem GSH (GSSG) dazu führt, dass das GSH:GSSG-Verhältnis nicht mehr zurückgeführt werden kann und hierdurch der Schutz vor oxidativen Streß fehlt (246).

Unter nicht-gestressten Bedingungen liegen in der Zelle in der Regel reduktive Bedingungen vor. Alle oxidierbaren Gruppen wie Cystein-Thiole liegen in ihrer niedrigsten Oxidationsstufen vor. Unter diesen Bedingungen ist das GSH:GSSG-Verhältnis zwischen 30:1 und 100:1. Weniger als 1% der gesamten Proteine sind glutathionyliert (247). Unter dem Einfluß von oxidativem Streß steigt der Anteil der Protein-gebundenen Thiole stark an. 17% des zellulären Glutathions wird durch Proteine gebunden (248). Da dieser Vorgang reversibel ist, wird die Vermutung unterstützt, dass dieser Vorgang gut reguliert ist. Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass die S-Glutathionylierung ein Verteidigungsmechanismus bei oxidativem Streß ist, der zum Stabilisieren der oxidierbaren Protein-Thiolgruppen genutzt wird, um diese vor irreversiblen Oxidierungen zu schützen (247).

Es konnte gezeigt werden, dass U-73122 und Glutathion an 5-LO kovalent binden. Der molekulare Mechanismus für die Hemmwirkung von U-73122 konnte dahingehend aufgeklärt werden, dass U-73122 an Cystein-416 binden kann und diese Bindung mit

Ergebnisse und Diskussion

hoher Wahrscheinlichkeit für die Hemmwirkung des U-73122 verantwortlich ist. Mutiert man Cystein-416 zu C416S verliert sich die Hemmwirkung von U-73122.

Neben diesem Befund konnte die Behauptung von Kuhn et al. (238) und Charlier et al. (239) unterstützt werden, dass an dieser Stelle der 5-LO-Oberfläche ein möglicher Zugang zum aktiven Zentrum der 5-LO existiert.

Die Untersuchungen mit Diamid und Cystein/Serin-5-LO-Mutanten in HeLa-Zellen lieferten interessante Ergebnisse über eine neuartige Regulierung der 5-LO-Aktivität in Abhängigkeit von Glutathion.

4.2. Celecoxib

Nichtsteroidale antientzündliche Arzneimittel (NSAIDs) werden vornehmlich für die Bekämpfung von Schmerzen und Entzündung eingesetzt. Traditionelle NSAIDs hemmen beide Isoformen der Cyclooxygenase (COX-1 & -2), die eine Schlüsselstellung einnehmen, da sie Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysieren können. COX-1 nimmt vielfältige Aufgaben im Körper unter physiologischen Bedingungen wahr. COX-2 ist durch Wachstumsfaktoren und verschiedenen Zytokinen induzierbar und vornehmlich bei pathophysiologischen Vorgängen, wie entzündlichen Prozessen oder dem Tumorwachstum anzutreffen (249). Die selektive Hemmung der COX-2 durch Inhibitoren war ein vordringliches Target der pharmazeutischen Arzneistoff-Entwicklung. Verschiedene Verbindungen, wie z.B. die Coxibe konnten eine hohe COX-2-Selektivität zeigen und das Nebenwirkungsprofil der traditionellen NSAIDs senken, dass sich durch dyspeptische Beschwerden, Ulzera und schweren gastrointestinalen Komplikationen kennzeichnete (250). Mit der fortschreitenden Sammlung umfassender Pharmakovigilanzdaten konnte gezeigt werden, dass diese eingesetzten Verbindungen, wie Celecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib und Rofecoxib ein anderes, nicht minderschwerer zu beurteilendes Nebenwirkungspotential besitzen, nämlich dem der kardiovaskulären Nebenwirkungen. Diese schweren Nebenwirkungen führten bei den zugelassenen Fertigarzneimitteln zu einer umfassenden Marktrücknahme bzw. zur drastischen Einschränkung der Indikation. Zurzeit wird z.B. Celebrex[®] (Celecoxib) noch bei arthritischen Beschwerden eingesetzt.

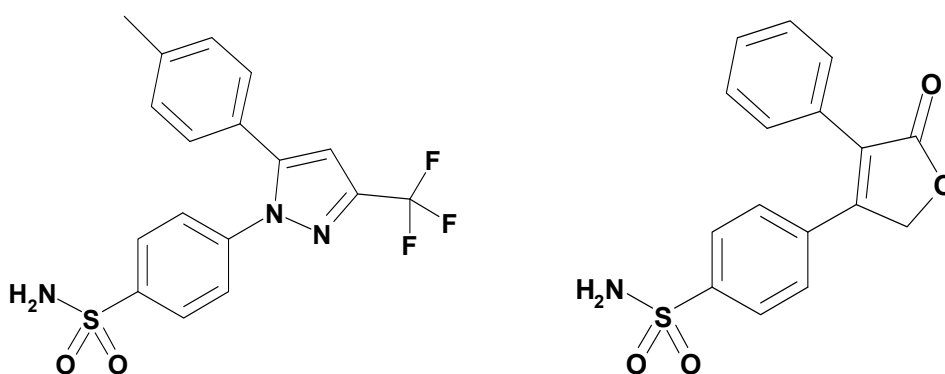


Abb. 4.2.1 Strukturen von Celecoxib (links) und Rofecoxib (rechts).

Celecoxib reduziert bei der Gabe hoher Dosen signifikant die Polypenbildung und deren Größe bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (251). Weitere Untersuchungen

konnten diese antikarzinogenen Effekte bei humanen Kolonkarzinom-Zellen zeigen (252,253).

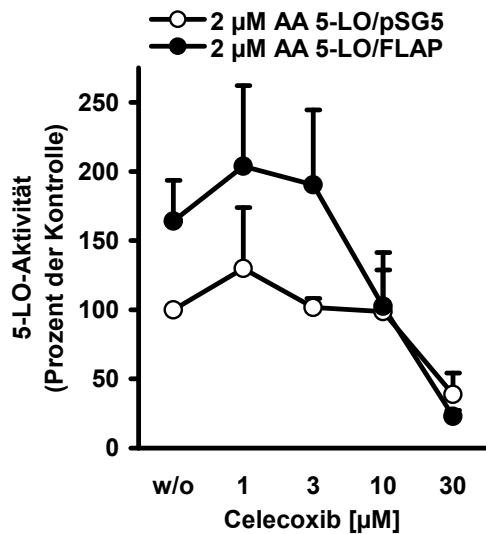
5-Lipoxygenase ist bei entzündlichen und allergischen Vorgängen und auch bei der Entwicklung von Krebs und Atherosklerose beteiligt (254). Diese Erkenntnis ist die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen, ob Coxibe die 5-LO-Aktivität hemmen können.

4.2.1. Effekte von Celecoxib und Rofecoxib auf die 5-LO-Aktivität in transfizierten HeLa-Zellen

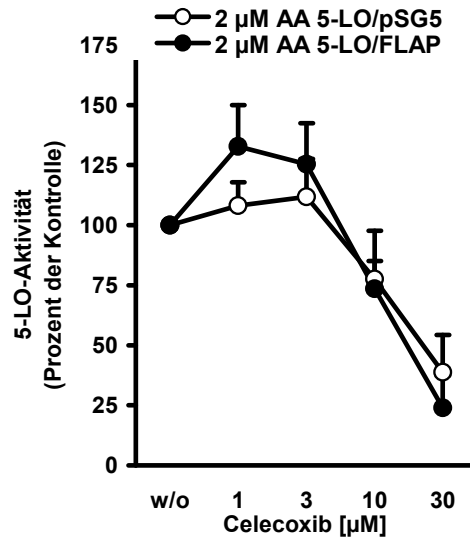
HeLa-Zellen wurden mit 5-LO/pSG5 oder 5-LO/FLAP transfiziert, um feststellen zu können, ob Celecoxib die 5-LO oder FLAP hemmt.

Die Kultivierung und Transfektion der Zellen wird wie unter *Methoden* beschrieben durchgeführt. Zwei Tage nach der Transfizierung wurden die Zellen mit Trypsin geerntet.

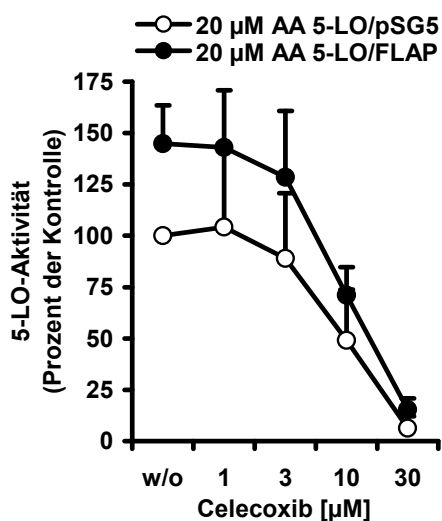
A



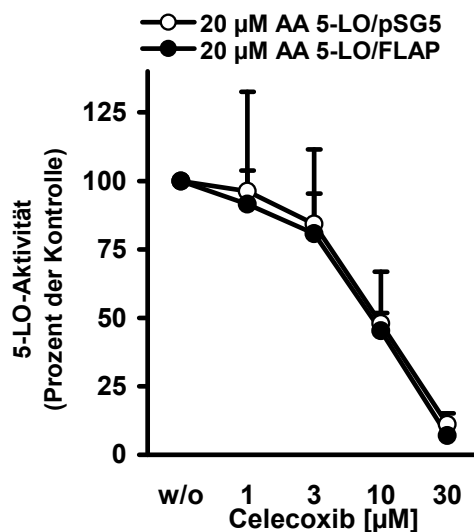
B



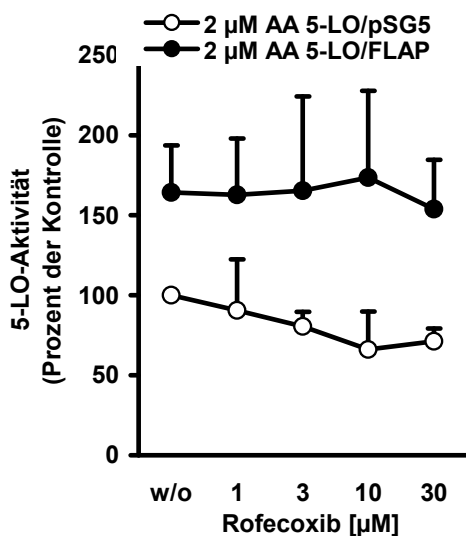
C



D



E



F

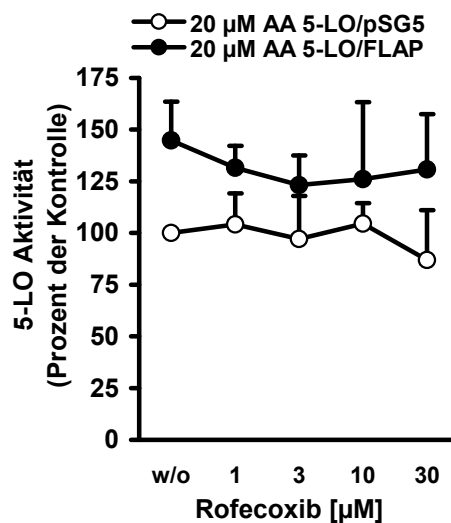


Abb. 4.2.2 Effekt von Celecoxib und Rofecoxib auf die 5-LO Produktbildung in transfizierten HeLa-Zellen mit 5-LO/pSG5 oder 5-LO/FLAP.

5×10^6 intakte HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib oder Rofecoxib 5 Minuten bei RT vorinkubiert. Es wurde mit 2 µM oder 20 µM AA und 5 µM Ionophor stimuliert. Die HeLa-Zellen wurden mit 5-LO/pSG5 (○) oder 5-LO/FLAP (●) transfiziert. Alle Werte sind auf den w/o-Wert 5-LO/pSG5 bezogen (A, C, E und F). Die relativen Werte einer Gruppe sind auf den w/o-Wert von 5-LO/pSG5 oder 5-LO/FLAP bezogen (B und D). Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Um sicherzustellen, dass die Transfektionen von HeLa-Zellen mit 5-LO/pSG5 und 5-LO/FLAP funktioniert haben, wurden nachfolgende Western Blot-Experimente durchgeführt.

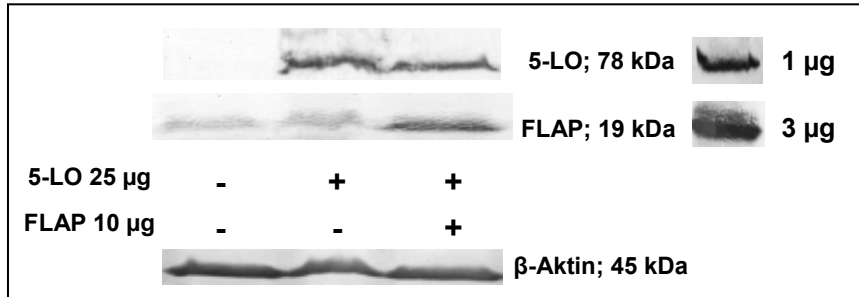


Abb. 4.2.3 Western-Blot-Kontrolle von HeLa-Transfektionen mit 5-LO ± FLAP.

0,5 × 10⁶ HeLa-Zellen pro Tasche, transfiziert wie angegeben mit 25 µg pcDNA3.1-5-LO und/oder 10 µg pSG5-FLAP pro 1,45 × 10⁷ Zellen bzw. 1 × 10⁵ Zellen / cm². Der leere FLAP-Vektor psg5 wurde als Kontrolle verwendet, wenn FLAP nicht eingesetzt wurde. SDS-PAGE mit 12%igen Tris-HCl Gelen geblottet auf Nitrocellulose-Membranen. Die β-Aktin-Banden wurden nach dem „Strippen“ der Membranen detektiert. Detektion von 5-LO mit monoklonalen Maus-Antikörper, Klon 6A12, 1:2500. Detektion von FLAP mit polyklonalen Ziege-Antikörper von abcam (ab39535), gewonnen durch Immunisierung mit einem C-KTISTTISPLLLIP-Peptid. Detektion von β-Aktin mit polyklonalen Kaninchen-Antikörper von abcam (ab8227).

Bei Zugabe von 2 µM AA und 5 µM Ionophor zur Stimulation von 5-LO/pSG5-transfizierten HeLa-Zellen hemmt Celecoxib mit einem IC₅₀-Wert von 20 µM (Abb. 4.2.2 A+B), bei Zugabe von 20 µM AA mit einem IC₅₀-Wert von 15 µM (Abb. 4.2.2 C+D).

Bei gleichzeitiger Transfektion von HeLa-Zellen mit 5-LO/FLAP und Stimulation mit 2 µM AA/5 µM Ionophor steigt die 5-LO-Produktbildung auf 160%, bei Zugabe von 20 µM AA/5 µM Ionophor auf 150% (Abb. 4.2.2 A+C), im Bezug auf die Kontrolle ohne FLAP.

Die gleichzeitige Transfektion von 5-LO/FLAP beeinflusst die Hemmwirkung von Celecoxib nicht (Abb. 4.2.2 A bis D).

Rofecoxib, das strukturell dem Celecoxib ähnlich ist (Abb. 4.2.1), zeigt keine Beeinflussung der 5-LO-Produktbildung in 5-LO±FLAP-transfizierten HeLa-Zellen (Abb. 4.2.2 E+F).

4.2.2. Einfluss von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in RBL-1-Zellen

Wie aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt ist, hemmt Celecoxib die Bildung von Ionophor-induzierter LTB₄- und 5-HETE-Bildung im Vollblut-Assay von Ratten und Menschen *in vitro* (255). Um den Effekt näher zu beschreiben, wurde das inhibitorische Potential von Celecoxib auf die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen, Homogenaten und 100 000×g-Überständen von RBL-1-Zellen untersucht. Es soll untersucht werden, ob Ratten-5-LO im Vergleich zu Human-5-LO unterschiedlich gehemmt wird. Sollte dies der Fall sein, könnte man heterologe Sequenzbereiche auswählen, um den Ort der Hemmung näher zu identifizieren und eine Erkenntnis über die Art und Weise der Hemmung durch Celecoxib zu erhalten.

Die Kultivierung der Zellen, die Herstellung der einzelnen Zellfraktionen und die Durchführung des 5-LO Aktivitätsassays werden unter *Methoden* beschrieben.

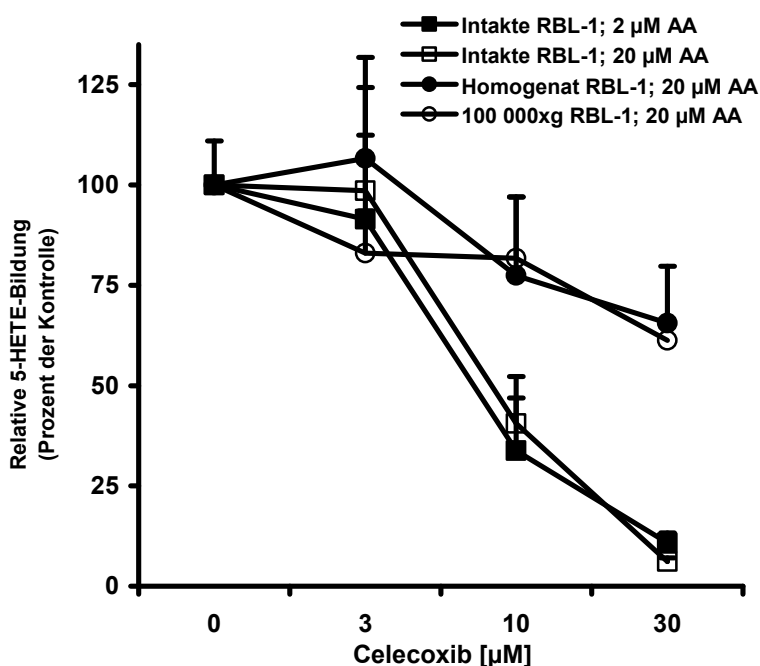


Abb. 4.2.4 Effekt von Celecoxib auf die 5-LO-Produktbildung in intakten RBL-1 Zellen bei 2 μM AA und 20 μM AA; bei Homogenaten von RBL-1 Zellen mit 20 μM AA und mit 100 000×g-Überständen von RBL-1 Zellen mit 20 μM AA. 5×10^6 intakte RBL-1-Zellen wurden mit 3, 10 oder 30 μM Celecoxib 5 Minuten bei RT vorinkubiert. 10 μM Ionophor und 2 (■) oder 20 μM (□) AA wurden als Stimulus eingesetzt. Entsprechend 5×10^6 RBL-1 Zellen wurden als Homogenat (●) oder als 100 000×g-Überstand (○) eingesetzt. Es wurde mit 3, 10 oder 30 μM Celecoxib bei 4°C vorinkubiert und mit 1 mM CaCl₂ und 20 μM AA stimuliert. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Celecoxib zeigt in intakten RBL-1 Zellen bei Stimulierung mit 2 μ M AA/10 μ M Ionophor oder 20 μ M AA/10 μ M Ionophor für die 5-LO-Produktbildung einen IC₅₀-Wert von ca. 6 - 8 μ M (nur 5-HETE). Der hemmende Effekt von Celecoxib ist in RBL-1 Zellen nicht AA-abhängig und der IC₅₀-Wert ist mit Daten anderer Zellen, wie z.B. PMNL, vergleichbar (255).

Im Homogenat von RBL-1 Zellen beträgt die Restaktivität der 5-LO-Produktbildung für 30 μ M Celecoxib noch 63% \pm 11 (LT: 54% \pm 11; 5-HETE: 76% \pm 25) bei 20 μ M AA.

Im 100 000 \times g-Überstand von RBL-1 Zellen beträgt die Restaktivität der 5-LO Produktbildung für 30 μ M Celecoxib noch 50% \pm 11 (LT: 46% \pm 9; 5-HETE: 51% \pm 12) bei 20 μ M AA.

4.2.3. Einfluss von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in RAW 264.7-Zellen

Um weitere Informationen über die 5-LO-Hemmung durch Celecoxib zu erhalten, wurden 5-LO-positive Maus-Zellen untersucht.

Die Experimente mit Vollblut von Mäusen zeigten, dass Celecoxib die Ionophor-induzierte LTB₄ und 5-HETE Bildung im Vollblut von Mäusen nicht hemmen konnte. Dieser Effekt sollte in RAW 264.7-Zellen verifiziert werden (256). Da es sich vermutlich um einen Spezies-abhängigen Effekt handelt, wurden die Versuche analog zu den RBL-1-Experimenten durchgeführt. Als optimale Konzentration an Ionophor/AA wurde 5 μ M Ionophor und 20 μ M AA ermittelt. Anhand dieser Werte wurde die 5-LO-Produktbildung in intakten RAW 264.7-Zellen, aber auch an Homogenaten und 100 000 \times g-Überständen dieser Zellen untersucht.

Die Kultivierung der Zellen, die Herstellung der einzelnen Zellfraktionen, die Durchführung des 5-LO Aktivitätsassays und die Analyse der 5-LO Produkte (Epi-Trans- und Trans-LTB₄, LTB₄, 5-HETE) werden unter *Methoden* beschrieben.

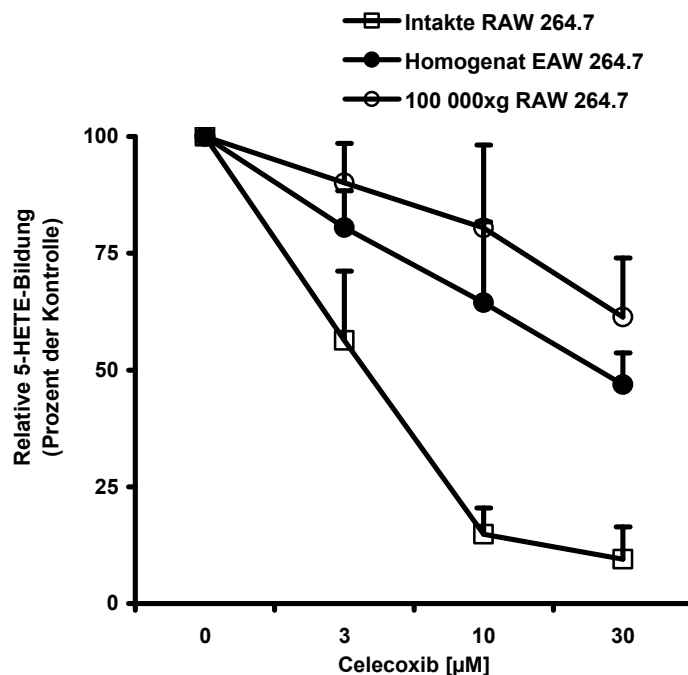


Abb. 4.2.5 Effekt von Celecoxib auf die 5-LO Produktbildung.

2×10^7 intakte Zellen (\square), Homogenat (\bullet) oder $100\,000 \times g$ -Überstand (\circ) von RAW 264.7-Zellen wurden mit $20\ \mu\text{M}$ AA und $5\ \mu\text{M}$ Ionophor resp. $1\ \text{mM}$ Ca^{2+} stimuliert. Es wurde mit 3, 10 oder $30\ \mu\text{M}$ Celecoxib 5 Minuten bei RT vorinkubiert. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Bei Ionophor-stimulierten RAW 264.7-Zellen und exogener Zugabe von $20\ \mu\text{M}$ AA liegt der IC_{50} -Wert für die 5-LO Produkte bei ca. $4\ \mu\text{M}$ für Celecoxib.

Im Homogenat von RAW 264.7-Zellen liegt der IC_{50} -Wert für die 5-LO-Produktbildung bei ca. $10 - 30\ \mu\text{M}$ Celecoxib (Restaktivität bei $30\ \mu\text{M}$ für LT: $73\% \pm 26$, 5-HETE: $41\% \pm 7$, Gesamt: $44\% \pm 3$).

Im $100\,000 \times g$ -Überstand von RAW 264.7-Zellen beträgt die Restaktivität der 5-LO-Produktbildung bei $30\ \mu\text{M}$ Celecoxib noch $68\% \pm 8$ (LT: $77\% \pm 22$; 5-HETE: $66\% \pm 5$).

Das Muster der Celecoxib-Hemmung entspricht der Hemmung in RBL-1-Zellen und PMNL.

4.2.4. Effekt von Celecoxib auf die 5-LO-Aktivität in PMNL bei Zugabe von steigenden Mengen an Substrat

Es konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die Ionophor-stimulierte 5-LO Produktbildung in PMNL dosisabhängig hemmen kann (255). Um weitere Erkenntnisse über den Hemmmechanismus zu erhalten, wurden PMNL mit steigenden Mengen Celecoxib vorinkubiert und mit steigender Menge an Substrat bei gleichbleibender Ionophor-Konzentration stimuliert. Bei zunehmender AA-Konzentration kann ein Hemmeffekt auf

Ergebnisse und Diskussion

die cPLA₂ und auf andere Ca²⁺-abhängigen Effekte, wie z.B. Aktivierung der 5-LO durch Phosphorylierung, als Angriffspunkt für Celecoxib ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann eine Beteiligung von FLAP ausgeschlossen werden, da die 5-LO-Produktbildung bei steigenden AA-Konzentrationen zunehmend FLAP-unabhängig wird.

Die Isolierung und Vorbereitung der PMNL-Zellen ist unter *Methoden* beschrieben.

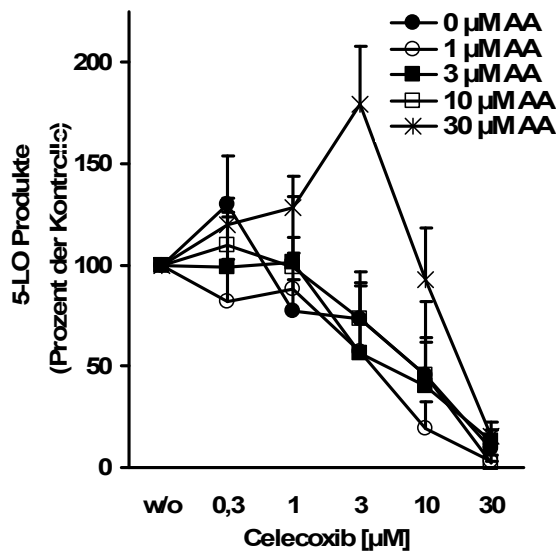


Abb. 4.2.6 Effekt von Celecoxib auf die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL-Zellen bei Zugabe von steigenden Mengen an exogener AA.

5×10^6 PMNL-Zellen wurden in 1 ml kaltem PGC-Puffer aufgenommen. Es wurde 5 Minuten bei 4°C mit den angegebenen Konzentrationen an Celecoxib vorinkubiert. Stimuliert wurde mit der angegebenen Mengen an AA (0 µM ●, 1 µM ○, 3 µM ■, 10 µM □, 30 µM *) und 2,5 µM Ionophor. Es sind die relativen Werte bezogen auf den jeweiligen w/o-Wert an Celecoxib dargestellt. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

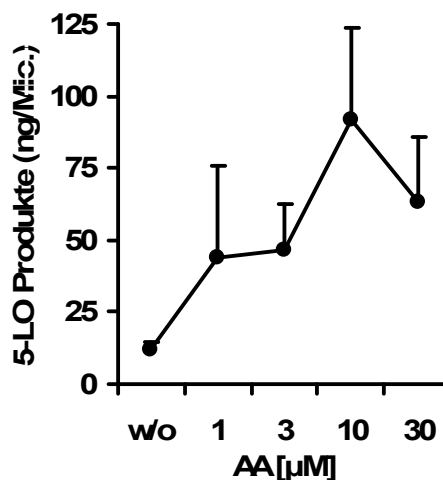


Abb. 4.2.7 Effekt von steigenden Mengen an exogener AA auf die 5-LO Produktbildung in intakten PMNL-Zellen.

Ergebnisse und Diskussion

5×10⁶ PMNL-Zellen wurden in 1 ml kaltem PGC-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe der angegebenen Mengen an AA (0-30 µM) und 2,5 µM Ionophor wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es sind absolute Werte in ng 5-LO-Produkte / Mio. Zellen angegeben. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Bei Ionophor-stimulierten PMNL-Zellen und exogener Zugabe von steigenden Mengen an Substrat (0-10 µM) liegt der IC₅₀-Wert zwischen 3 - 10 µM Celecoxib. Bei 30 µM AA liegt der IC₅₀ bei 10 – 30 µM. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei AA-Konzentrationen von >30 µM die Celecoxib-Hemmung beeinflusst werden kann (Abb.4.2.5). Bei steigender Zugabe von AA setzt ab 30 µM AA die Substrathemmung der AA ein (Abb. 4.2.6).

4.2.5. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass Celecoxib, ein selektiver COX-2-Inhibitor, die 5-Lipoxygenase in verschiedenen Testsystemen effektiv hemmen kann. In intakten PMNL hemmt Celecoxib die 5-LO-Produktbildung bis zu einer AA-Konzentration von 10 µM AA-unabhängig (IC₅₀ = 3-10 µM). Erst ab 30 µM AA kann eine etwas schlechtere Hemmung durch Celecoxib beobachtet werden (IC₅₀ = ca. 30 µM). Dies könnte darauf hindeuten, dass Celecoxib bei höheren AA-Konzentrationen mit AA um seine Fettsäure-Bindungsstelle konkurriert.

Die Aktivität von Maus- und Ratten-5-LO lässt sich in intakten RAW 264.7- bzw. RBL-1-Zellen effektiv durch Celecoxib hemmen (IC₅₀: 4 bzw. 6-8 µM). Bei beiden Zelllinien ist die Hemmung der 5-LO-Aktivität durch Celecoxib in aufgeschlossenen Zellen (Homogenat bzw. 100 000×g-Präparation) deutlich schlechter als in intakten Zellen.

Vergleicht man die Proteinsequenzen von Maus- und Ratten-5-LO mit der humanen 5-LO fällt die sehr hohe Homologie der Sequenzen untereinander auf (~94%; siehe *Anhang, Tab. 8.5*), so dass es theoretisch möglich scheint, durch Mutation einzelner Aminosäure festzustellen, ob eine oder mehrere Aminosäuren der 5-LO an der Hemmung durch Celecoxib beteiligt sind.

An gereinigter rekombinanter 5-LO aus E.coli konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die 5-LO-Aktivität effektiv hemmen kann (255), daher ist von einem direkten 5-LO-Hemmmechanismus auszugehen. Um diesen Effekt gegenüber FLAP abzugrenzen, wurden HeLa-Zellen mit 5-LO und/oder FLAP transfiziert und die Hemmung mit Celecoxib untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Celecoxib die 5-LO-Aktivität ohne FLAP und die FLAP-gesteigerte-5-LO-Aktivität, bei Zugabe von exogener AA (ohne AA konnte

keine ausreichende 5-LO-Aktivität hergestellt werden), gleichermaßen effektiv hemmen kann (IC_{50} : $\sim 10 \mu M$). 5-LO wird im zellulären Kontext auch ohne die Anwesenheit von FLAP effektiv gehemmt.

Rofecoxib zeigte bei diesen Versuchen keine Hemmung (Abb.4.2.2 E+F). Rofecoxib unterscheidet sich von Celecoxib durch Austausch des zentralen Pyrazols durch einen Furanring und das Fehlen einer Trifluormethylgruppe (Abb. 4.2.1).

5-LO-Inhibitoren hemmen zumeist durch eine direkte Beeinflussung des zentralen Eisenatoms (Eisenligand-Inhibitoren), durch Veränderung des Redox-Status (Redox-Inhibitoren) oder durch Wechselwirkungen mit einer Fettsäure-Bindungsstelle (Nicht-Redox-Inhibitoren) (257). Die Struktur von Celecoxib zeigt für die ersten beiden Fälle keine strukturelle Voraussetzung. So besitzt Celecoxib weder Eisen-chelatisierende Eigenschaften noch die chemische Funktionalität, um einen Einfluss auf Redox-Mechanismen zu haben. Möglicherweise könnte eine Wechselwirkung mit einer Fettsäure-Bindungsstelle ein Mechanismus sein, vergleicht man die Daten in intakten PMNL bei steigender AA-Konzentration (Abb. 4.2.6). So hemmt Celecoxib in intakten PMNL über $10 \mu M$ AA etwas schlechter als bei niedrigen AA-Konzentrationen.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, könnte der molekulare Hemmmechanismus von Celecoxib zum Teil auf einer direkten Beeinflussung der 5-LO beruhen, da Celecoxib die isolierte, gereinigte 5-LO und die 5-LO-Aktivität in 5-LO/pSG5-transfizierten, Ionophor-aktivierten-HeLa-Zellen hemmen kann. Ein weiterer Bestandteil des Hemmmechanismus könnte die Beeinflussung der Membran-Bindungsstelle sein, da Celecoxib bei Homogenaten und $100\,000\times g$ -Überständen von RBL-1- und RAW 264.7-Zellen sehr schlecht, im Vergleich zu intakten Zellen, hemmt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Translokation der 5-LO in intakten Zellen gehemmt werden kann, wodurch der Verlust des Hemmpotentials im Homogenat bzw. in $100\,000\times g$ -Überständen erklärbar wird, da hier die Effekte durch Translokation vernachlässigbar sind. Die Beeinflussung der 5-LO-Verteilung durch Celecoxib nach Stimulierung von intakten Zellen müsste experimentell nachgeprüft werden.

Diese Ergebnisse und die Ergebnisse innerhalb der Arbeitsgruppe zeigen, dass die 5-LO durch den COX-2-Inhibitor Celecoxib gehemmt werden kann, sowohl am gereinigten 5-LO-Enzym, als auch *in vitro* (HeLa, PMNL, RAW 264.7, RBL-1) sowie *ex vivo* (*whole blood assay*). Die erhaltenen IC_{50} -Werte korrelieren mit den gemessenen Plasmaspiegeln ($5-8 \mu M$) nach einer täglichen Hochdosis-Einnahme von $1-2\times 800$ mg (258,259).

Celecoxib wurde als ein COX-2-selektiver Inhibitor für den Einsatz bei chronischer Entzündung entwickelt. Weitere pharmakologische COX-2-unabhängige Effekte wie chemo-protective oder rückläufige Tumoraktivität konnten beobachtet werden, ohne dass das nicht-COX-2-Target des Celecoxib bekannt war. Es konnte nun gezeigt werden, dass eines dieser Targets die 5-Lipoxygenase darstellt, die auch in verschiedenen Krebsarten vorkommt. Zusätzlich stellt Celecoxib ein wirksames Arzneimittel bei der Bekämpfung 5-LO-abhängiger Erkrankungen dar, wobei gezeigt werden konnte, dass Celecoxib z.B. bei Atherosklerose bei ApoE^{-/-}-Mäusen in der 16-Wochen-Therapie keinen positiven Einfluss hat (260).

4.3. ML-3000 (Licofelon)

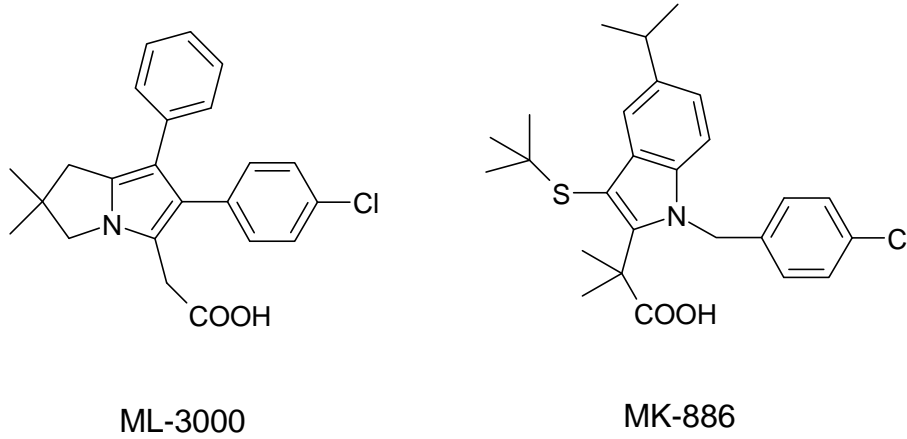
Viele Inhibitoren sind selektiv erhältlich für den COX- oder 5-LO-Signalweg, es zeichnet sich jedoch ein erheblicher Nutzen ab, duale COX/5-LO-Inhibitoren zu entwickeln und einzusetzen, die eine höhere gastrointestinale Sicherheit bieten als die einzelnen Inhibitoren alleine (261). ML-3000 wurde als dualer COX/5-LO-Inhibitor entwickelt (262), basierend auf der Fähigkeit die COX 1/2- und 5-LO Aktivität in intakten Zellen zu hemmen (263). Die Molekülstrukturen von MK-886 und ML-3000 sind vergleichbar, wodurch ein ähnlicher Hemmmechanismus zugrunde gelegt werden kann. Durch die nachfolgend aufgeführten Experimente und die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte der Hemmmechanismus von ML-3000 (Licofelon) weitgehend aufgeklärt werden (264).

4.3.1. ML-3000 und MK-886 teilen sich strukturelle Eigenschaften

Die Strukturen von ML-3000 und MK-886 (Abb. 4.3.1 A) wurden mit Hilfe der Software MOE 2005.06 (The Chemical Computing Group, Montreal, Canada, www.chemcomp.org) miteinander verglichen und die gemeinsamen strukturellen Eigenschaften farblich dargestellt. Das flexible Angleichen (*Alignment*) der zwei Moleküle resultiert in einer Überlagerung mit einer Spannungsenergie (U) von 83, einem Gesamtwert für die beiderseitige Gleichheit *total mutual similarity score* (F) von 99 und einem objektiven Funktionswert (S) *objective function value* von 182 (Abb. 4.3.1 B). Gleiche Eigenschaften des gemeinsamen Pharmakophors können an dem aromatischen Ringsystem identifiziert werden und an der identischen Position der Carboxylgruppen. Aliphatische Reste sind in

zwei lipophilen Clustern angeordnet. Die erhaltenen Daten deuten daraufhin, dass ML-3000 und MK-886 essentielle Eigenschaften eines gemeinsamen Pharmakophors teilen.

A



B

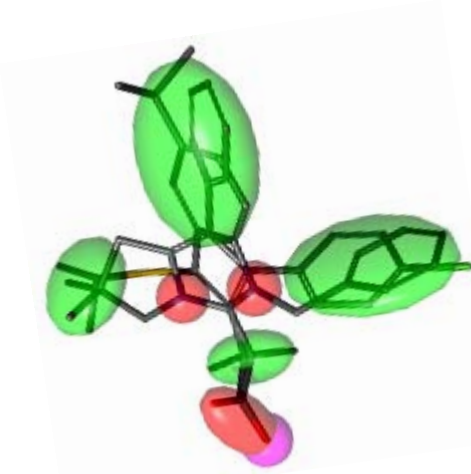


Abb. 4.3.1 Vergleich der Strukturen von ML-3000 und MK-886 (entnommen aus (264)).

(A) Strukturen von ML-3000 und MK-886.

(B) Flexibles Angleichen (Alignment) von ML-3000 und MK-886.

Grün zeigt lipophile Bereiche, rot Wasserstoffbrücken-Bindungen und polare Gruppen (Carboxylgruppen) werden in Magenta dargestellt.

4.3.2. ML-3000 hemmt potent die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen
MK-886 ist ein potenter FLAP-Inhibitor, der in intakten Zellen die 5-LO-Produktbildung hemmt, in Homogenaten aber keine Hemmung der 5-LO Aktivität zeigt (134). Es kann davon ausgegangen werden, dass MK-886 kein direkter 5-LO-Inhibitor ist. Um zu zeigen, dass ML-3000 den gleichen Wirkungsmechanismus wie MK-886 aufweist, wurden intakte

PMNL, Homogenate von PMNL und gereinigte 5-LO aus E.coli mit 10 μM ML-3000, 1 μM MK-886 und 1 μM BWA4C als Positivkontrolle inkubiert (Abb. 4.3.2). BWA4C ist ein direkter Eisen-Ligand-5-LO-Inhibitor (181), der in intakten Zellen, Homogenaten und an gereinigter 5-LO sehr potent die 5-LO-Produktbildung hemmt.

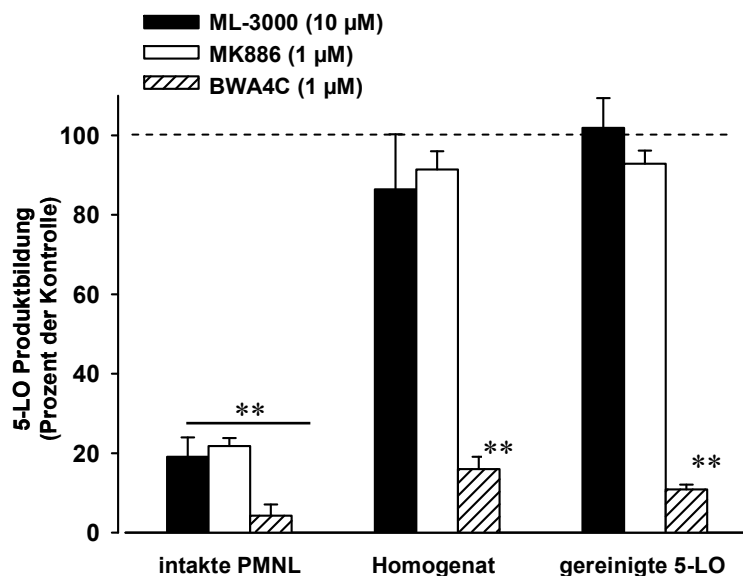


Abb. 4.3.2 Effekte von MK-886 und ML-3000 auf die 5-LO Produktbildung in intakten Zellen, Homogenat und gereinigter 5-LO aus PMNL (entnommen aus (264)).

5×10^6 intakte PMNL, Homogenat (5×10^6 PMNL) oder ATP-Agarose-gereinigte 5-LO (2×10^7 PMNL) wurden 15 Minuten mit (■) 10 μM ML-3000, (□) 1 μM MK-886 oder (▨) 1 μM BWA4C vorinkubiert. Bei intakten Zellen wurde nach Zugabe von 40 μM AA und 2,5 μM Ionophor 10 Minuten bei 37°C inkubiert, bei Homogenaten und gereinigtem Enzym wurde nach Zugabe von 1 mM Ca^{2+} und 40 μM AA 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen 5-LO Produkte wurden mittels RP18-HPLC analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt. Student's t-test, ** $P > 0,01$.

Wie aus Abb. 4.3.2 ersichtlich wird, hemmt ML-3000 in intakten Zellen die 5-LO-Produktbildung (Restaktivität ca. 20 %), aber kaum in Homogenaten von PMNL und an gereinigter 5-LO (aus E.coli). Man kann aus diesen Daten erkennen, dass ML-3000 ein ähnliches Verhalten zeigt wie MK-886. Die Positiv-Kontrolle BWA4C hemmt in intakten Zellen, im Homogenat und am gereinigten Enzym.

4.3.3. Effekte von ML-3000/MK-886 auf die 5-LO Aktivität in PMNL

Wie in Abb. 4.3.2 dargestellt, hemmen MK-886 und ML-3000 die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen. Um diesen Effekt näher zu beschreiben, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve bei unterschiedlichen AA-Konzentrationen angefertigt. Frisch isoliert PMNL wurden mit den angegebenen Konzentrationen MK-886 oder ML-3000 15 Minuten bei RT vorinkubiert. Anschließend wurden steigende Mengen AA und 2,5 μM Ionophor zugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Durchführung des 5-LO-Aktivitätsassays wird unter *Methoden* beschrieben.

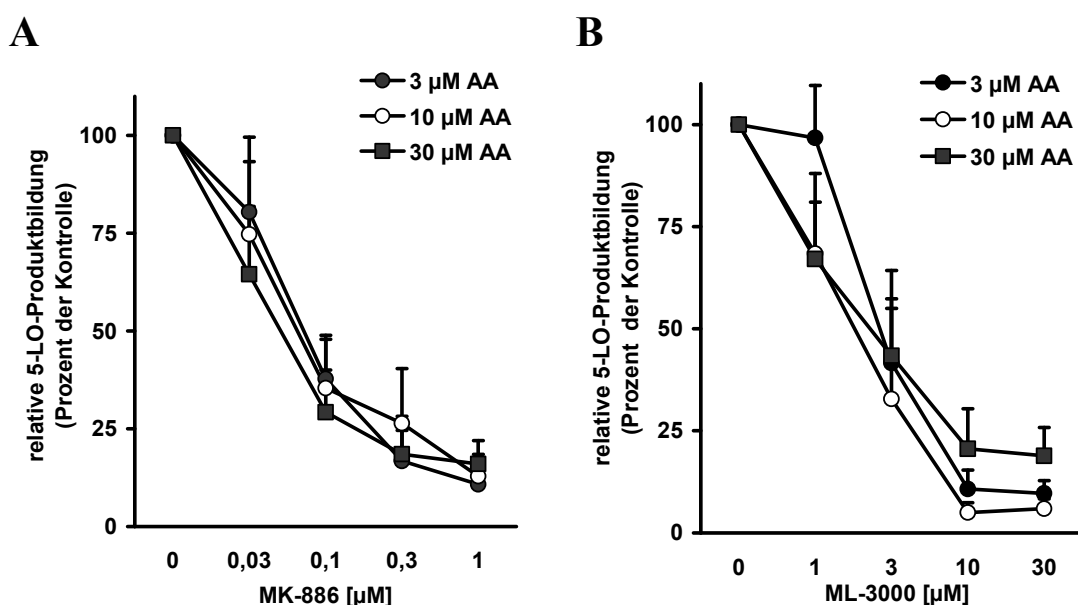


Abb. 4.3.3 Einfluss von (A) MK-886 und (B) ML-3000 bei unterschiedlichen AA-Konzentration auf die 5-LO Produktbildung in intakten PMNL.

Relative Darstellung bezogen auf w/o MK-886 oder ML-3000 und für jede AA-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

MK-886 zeigt in intakten PMNL unabhängig von steigenden AA-Konzentrationen (3, 10, 30 μM) eine 5-LO-Hemmung mit einem IC_{50} -Wert von 0,03 - 0,1 μM . ML-3000 zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf und die Hemmung verläuft mit einem IC_{50} -Wert von 1 - 3 μM , wobei eine geringfügige AA-Abhängigkeit beobachtet werden kann.

4.3.4. Diamid hemmt moderat die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL

Um den Einfluss von erhöhten oxidativen Bedingungen (gesteigerter Peroxidtonus) auf die 5-LO-Aktivität zu testen, wurde der Glutathion-Stoffwechsel von intakten PMNL durch

die Zugabe von steigenden Mengen an Diamid dahingehend beeinflusst, dass vermehrt reduziertes GSH der Zelle entzogen wird und hierdurch oxidative Prozesse begünstigt werden. Diese Veränderung sollte sich direkt auf die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL auswirken. Eine gleichbleibend hohe inhibitorische Leistungsfähigkeit durch Celecoxib würde eine Unabhängigkeit der Hemmung von Redox-sensitiven Bedingungen bedeuten. Es wurden frisch isolierte PMNL mit steigenden Mengen an Diamid vorinkubiert und anschließend stimuliert. Wird mit Diamid vorinkubiert, verändert sich das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG zugunsten von GSSG.

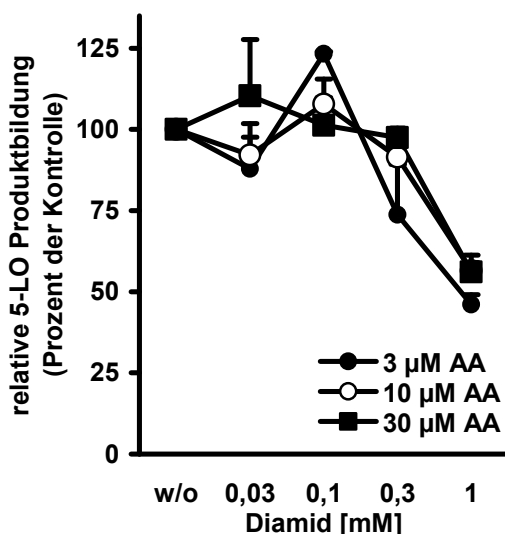


Abb. 4.3.4 Einfluss von Diamid bei unterschiedlichen AA-Konzentration auf die 5-LO-Gesamt-Produktbildung in Ionophor-stimulierten, intakten PMNL.

5×10^6 intakte PMNL wurden mit der angegebenen Menge Diamid 15 Minuten bei RT vorinkubiert. Es wurde mit 3, 10 oder 30 μM AA und 2,5 μM Ionophor stimuliert. Relative Darstellung bezogen auf w/o Diamid und für jede AA-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Diamid zeigt Dosis-abhängig Diamid (0,03 bis 1 mM) eine moderate Hemmung der 5-LO-Gesamt-Produktbildung in intakten PMNL bei Stimulierung mit 2,5 μM Ionophor. Dabei ist keine AA-Abhängigkeit (3, 10 und 30 μM) erkennbar (Abb. 4.3.4).

Bis 0,1 μM Diamid kann keine Veränderung der 5-LO-Aktivität festgestellt werden, ab 0,3 μM stellt sich bei niedrigen AA-Konzentrationen (<3 μM AA) eine verminderte 5-LO-Aktivität ein, die aber bei höheren AA-Konzentrationen gesteigert ist. Bei 1 mM Diamid ist die 5-LO Aktivität bei 3 μM AA deutlich gemindert, es folgt bei steigenden AA-Konzentrationen eine stetige Steigerung der 5-LO Aktivität.

4.3.5. Effekte von ML-3000/MK-886 auf die 5-LO Aktivität in PMNL nach Zugabe von Diamid

Wie in (264) beschrieben, ist die 5-LO-Hemmung in intakten Zellen abhängig von der Art des Stimulus. Verwendet man Stimuli, die nicht den Ca^{2+} -abhängigen Signalweg benutzen um die 5-LO-Produktbildung zu aktivieren, sondern Zellstress-auslösende Substanzen, wie Natriumarsenit ($10 \mu\text{M}$) oder NaCl ($300 \mu\text{M}$; 5-LO-Aktivierung durch hyperosmotischen Stress), besitzen ML-3000 oder MK-886 kein inhibitorisches Potential. Einzig bei der Stimulierung der Zellen mit Ionophor und Ca^{2+} hemmen ML-3000 und MK-886 sehr potent, AA- und Dosis-abhängig.

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss von Diamid auf den zellulären Peroxidtonus. Die 5-LO-Aktivität wird bei Zugabe von steigenden Mengen an Diamid dosisabhängig gehemmt (Abb.4.3.4).

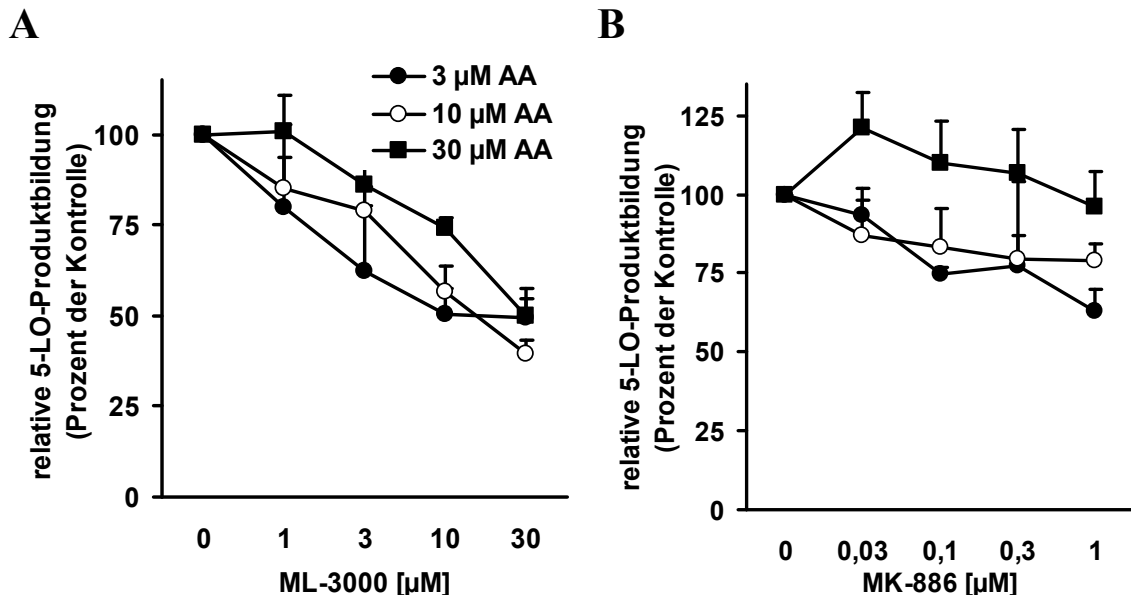


Abb. 4.3.5 Einfluss von MK-886 und ML-3000 bei unterschiedlichen AA-Konzentration auf die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL in Abhängigkeit von Diamid.

5×10^6 intakte PMNL wurden in 1 ml PGC-Puffer aufgenommen, 15 Minuten mit $300 \mu\text{M}$ Diamid und 5 Minuten bei RT mit den angegebenen Konzentrationen (A) MK-886 oder (B) ML-3000 oder DMSO vorinkubiert. Stimuliert wurde mit 3 (●), 10 (○) oder 30 (■) μM AA und $2,5 \mu\text{M}$ Ionophor. Relative Darstellung bezogen auf w/o ML-3000/MK-886 und für jede AA-Konzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Die Kurvenverläufe in Abb. 4.3.5 zeigen, dass bei Zugabe von $300 \mu\text{M}$ Diamid die 5-LO-Hemmung für ML-3000 und MK-886, im Vergleich zu Abb. 4.3.2, stark vermindert ist.

Für ML-3000 ist die Abschwächung der Hemmung der 5-LO-Produktbildung etwas weniger stark als bei MK-886. Es zeigt sich, dass bei einer höheren AA-Konzentration (30 μM) die Hemmung durch ML-3000/MK-886 schlechter ist als bei niedrigen AA-Konzentrationen (3 und 10 μM) unter dem Einfluß von Diamid. Vergleicht man diese Daten mit Abb. 4.3.3 so fällt auf, dass (i) die Hemmwirkung von MK-886 und ML-3000 durch die Zugabe von 300 μM Diamid sehr stark gemindert ist und (ii) zusätzlich MK-886 und ML-3000 eine AA-Abhängigkeit zeigen.

4.3.6. Diskussion

Einige der angefertigten Daten und Überlegungen resultierten in der Publikation **The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products**; Fischer L, Hörnig M, Pergola C, Meindl N, Franke L, Tanrikulu Y, Dodt G, Schneider G, Steinhilber D, Werz O.; *British Journal of Pharmacology*, 2007 Oct;152(4); 471 - 480.

Verschiedene Berichte zeigen, dass ML-3000 potent die zelluläre 5-LO-Aktivität in verschiedenen Zellen hemmen kann. So ist der IC_{50} -Wert für die Hemmung in humanen Granulozyten mit 0,23 μM bestimmt worden (263), für RBL-1-Zellen mit 3,6 μM (265) und 3,8 μM in PMNL/Thrombozyten-Suspensionen (266). In diesen Untersuchungen wurden Ionophor-stimulierte, FLAP-exprimierende Leukozyten als Testsystem verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass ML-3000 ein funktionierendes zelluläres Umfeld mit 5-LO und FLAP benötigt, um eine Hemmwirkung zu erzielen. Diese Erkenntnis beruht auf den folgenden Ergebnissen: (a) Es konnte gezeigt werden, dass ML-3000 (Licofelon) die 5-LO-Aktivität nur in intakten Ionophor-induzierten FLAP-exprimierenden Zellen hemmen kann. In zellfreien Testsystemen, wie in Homogenaten von PMNL und am gereinigten 5-LO-Protein konnte ML-3000 keine Hemmwirkung aufweisen (Abb.4.3.2 und (264)), wodurch die Vermutung nahe liegt, dass die Hemmung durch ML-3000 nicht durch eine direkte Beeinflussung mit dem 5-LO-Protein zustande kommt.

(b) Das inhibitorische Potential von ML-3000 kann in PMNL durch die Anwesenheit von exogener AA (ab 30 μM AA) minimal gemindert werden. Mancini et al. konnte zeigen, dass MK-886 mit Arachidonsäure um eine Bindungsstelle am FLAP-Protein konkurrieren kann (144). Die Ergebnisse in Abb. 4.3.3 zeigen hingegen, dass die Hemmwirkung von MK-886 durch die Zugabe steigender Mengen Arachidonsäure kaum beeinflusst wird.

(c) ML-3000 sowie MK-886 hemmen nicht die Zellstress-induzierte 5-LO-Produktbildung in PMNL (Daten nicht gezeigt, vgl. (264)). (d) ML-3000 blockiert die Ionophor-induzierte Translokation der 5-LO zum Kern (Daten nicht gezeigt, vgl. (264)), eine charakteristische Eigenschaft von FLAP-Inhibitoren (131,267,268). (e) ML-3000 und MK-886 haben keine Effekte auf die 5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen, denen kein FLAP zugefügt wurde. Im Gegensatz dazu hemmen ML-3000/MK-886 die erhöhte FLAP-unterstützte-5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen sehr potent (Daten nicht gezeigt, siehe (264)). Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, dass ML-3000 kein direkter 5-LO-Inhibitor ist, sondern ein FLAP-Inhibitor. (f) Der strukturelle Vergleich von ML-3000 mit dem bekannten FLAP-Inhibitor MK-886 zeigt eine sehr hohe Übereinstimmung der räumlichen Anordnung der Molekülstrukturen (Abb. 4.3.1). Dieses Ergebnis zeigt, dass ML-3000 einen ähnlichen Wirkmechanismus wie MK-886 aufweisen könnte.

Verschiedene Publikationen beschreiben eine Bindungsstelle für Leukotrien-Synthese-Inhibitoren. Durch verschiedene FLAP-Mutationsstudien konnte eine Bindungsstelle in der ersten hydrophilen Schleife (Aminosäure 42 bis 61) von FLAP lokalisiert werden (269-271). Es wird berichtet, dass diese Inhibitor-Bindungsstelle mit der AA-Bindungsstelle überlappt, da AA mit Leukotrien-Synthese-Inhibitoren um die Bindungsstelle konkurriert. Charleson et al. geben für die Verdrängung des spezifischen LT-Synthese-Inhibitors ¹²⁵I-L-691,831 durch AA einen IC₅₀-Wert von 45 µM an (146). Anhand dieses IC₅₀-Werts kann von einer niedrig-affinen AA-Bindungsstelle ausgegangen werden.

Weitere Versuche mit ML-3000 wurden durchgeführt, um den Hemmmechanismus weiter zu charakterisieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Hemmwirkung von ML-3000 sowie MK-886 bis zu einer AA-Konzentration von 10 µM AA-unabhängig ist (Abb. 4.3.3) und durch den Zusatz von 300 µM Diamid abgeschwächt werden konnte (Abb. 4.3.5). Dies deutet darauf hin, dass ML-3000 sowie MK-886 nicht direkt an einer Fettsäurebindungs- oder Präsentationsstelle des FLAP-Proteins binden, sondern an einer anderen Bindungsstelle, da sich bei Zugabe steigender Mengen AA kaum Veränderungen an der Hemmwirkung einstellen, die bei einer konkurrierenden Fettsäurebindungsstelle zu beobachten sein sollten. Erst ab höheren AA-Konzentrationen schwächt sich die Hemmwirkung ab (Daten nicht gezeigt, vgl. (264)).

Anders verhält es sich nach Zugabe von Diamid. Diamid katalysiert die Umsetzung von reduziertem Glutathion zu oxidierten Glutathion. Durch den Verlust von reduziertem Glutathion wird der intakten Zelle eine Möglichkeit genommen oxidative Einflüsse zu kompensieren, da reduziertes Glutathion als sog. Redox-Puffer angesehen wird. In Abb.

4.3.4 kann eine dosisabhängige Hemmung der 5-LO-Aktivität nach Vorinkubation mit steigenden Mengen an Diamid beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass eine Reduzierung des Glutathionanteils und folglich einer Erhöhung von oxidativen Prozessen innerhalb der Zelle nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der Aktivität des redoxsensitiven 5-LO-Proteins führen muss. Diese Versuche wurden vornehmlich unter der Annahme durchgeführt, dass die Vorinkubation mit Diamid eine Erhöhung der 5-LO-Aktivität zur Folge haben müsste.

Inkubiert man intakte PMNL mit Diamid und ML-3000 oder MK-886 vor, ergibt sich eine schlechtere Hemmung durch ML-3000 oder MK-886 (Abb. 4.3.5). Geht man von der Annahme aus, dass Diamid die 5-LO-Aktivität erhöht, erscheint dieses Ergebnis plausibel. Tatsächlich wird aber durch Zugabe von Diamid die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL gehemmt (Abb. 4.3.4). Möglicherweise trifft hier ebenfalls die schon in Kapitel 4.1. diskutierte Annahme zu, dass nach Diamid-Zugabe die Bereitschaft für Glutathionierungsprozesse stark erhöht ist. Durch diesen Prozeß kommt es zur Glutathionierung der zugänglichen 5-LO-Cysteine, wodurch das Protein an der ansonsten lipophilen Oberfläche durch die gebundenen Glutathione stark hydrophilisiert wird. Durch diesen Vorgang ist die Annäherung der 5-LO an die Membranen sowie an das membranständige FLAP gestört und es kommt zu einer deutlichen Verringerung der 5-LO-Aktivität. Daher sinkt das inhibitorische Potential der Verbindungen bei gleichzeitiger Zugabe von Diamid.

Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass zusätzlich zur verringerten Hemmleistung der beiden FLAP-Inhibitoren eine AA-Abhängigkeit zu beobachten ist, die diese These zusätzlich untermauert. Bei niedrigen AA-Konzentrationen (3 und 10 μM) ist die Hemmung von ML-3000/MK-886 stärker als bei einer höheren AA-Konzentration (30 μM). Ohne die Zugabe von Diamid verläuft die Hemmung AA-unabhängig bis zu einer AA-Konzentration von 10 bis 30 μM AA.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass ML-3000 effizient die 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen reduziert, bei gleichzeitiger sehr schwacher Hemmung der 5-LO-Aktivität bei aufgeschlossenen Zellen bzw. bei gereinigtem Protein (Abb. 4.3.2). ML-3000 ist nicht nur der duale Inhibitor der COX und 5-LO, vielmehr ist ML-3000 ein Inhibitor mehrerer Proteine: COX-1 (IC_{50} : 0,8 μM), COX-2 (IC_{50} : >30 μM), 5-LO/FLAP-Produktbildung (IC_{50} : 0,2 – 3,8 μM) sowie mPGES-1 (IC_{50} : 6 μM) (196). Allen diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie der AA-Kaskade angehören und über eine Fettsäure-

bzw. AA-Bindungsstelle verfügen. Die Strukturen von ML-3000 und MK-886 besitzen ebenfalls Fettsäure-ähnliche Strukturmerkmale.

4.4. Garsubellin A

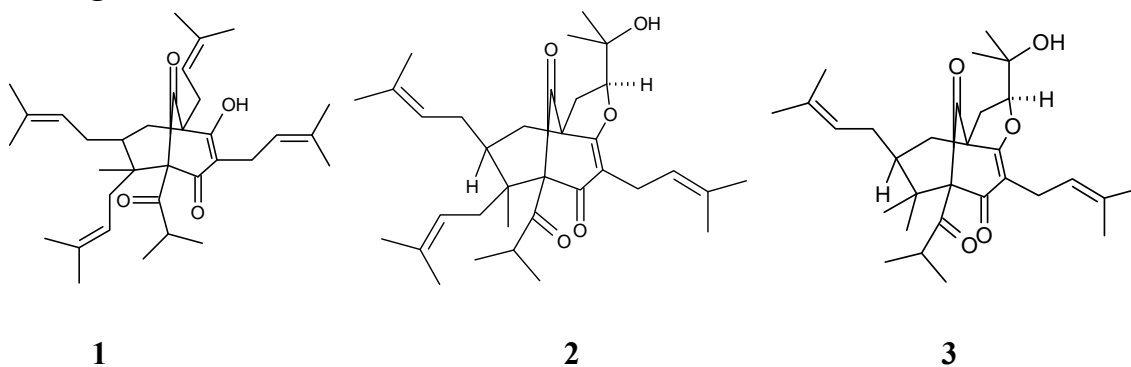
Es konnte gezeigt werden, dass Extrakte von *Hypericum perforatum* die 5-LO-Produktbildung in Ionophor-stimulierten PMNL und die Aktivität gereinigter 5-LO hemmen können und dass Hyperforin ein potenter Inhibitor der COX-1 ist (204). Die IC₅₀-Werte von Hyperforin für die 5-LO-Hemmung liegen im Bereich von 0,9 - 1,2 µM. Diese Werte korrelieren relativ gut mit den gemessenen Plasmaspiegeln (0,2 - 0,38 µM) nach oraler Einnahme der Standarddosierung von *H. perforatum*-Extrakten (272). Hyperforin ist ein instabiles Molekül, das sehr schnell durch Oxidation degradiert werden kann. Verschiedene oxidierte Variationen des Hyperforins konnten aus *H. perforatum* isoliert werden bzw. synthetisch hergestellt werden (273-277). Verändert man das Enol-β-Carbonyl-System des Hyperforins künstlich, erhält man eine Serie von oxidierten Hyperforin-Analogen, die zum Teil eine höhere inhibitorische Potenz zeigen als Hyperforin selbst (205).

Anhand einer Struktur-Vergleichssuche mit Hyperforin als Ausgangsstruktur konnte Garsubellin A als strukturverwandtes Molekül identifiziert werden (Abb. 4.4.1, Substanz 2). Garsubellin A enthält einen charakteristischen Bicyclo[3.3.1]nonan-Grundkörper (Abb. 4.4.1 Struktur 8) und enthält, ähnlich wie Hyperforin, mehrere Prenylreste. Die enolische Carbonsäurefunktion ist dabei aufgelöst, da die virtuell vorhandene 2-Methyl-But-2-en-Seitengruppe mit der Hydroxyfunktion an Position 3 oxidiert wurde und so eine Tetrahydrofuran-Gruppe bildet, die sich auch in oxidierten Hyperforin-Analogen wiederfindet (Struktur 2, Fig.1 aus (205)). Garsubellin A wurde erstmals 1997 aus dem Holz von *Garcinia subelliptica* isoliert und zeigt eine Erhöhung der *in vitro* Cholin-Acetyltransferase (ChAT)-Aktivität um 154% in Neuronen von Ratten bei einer Konzentration von 10 µM (278). Die Vermutung liegt nahe, dass Garsubellin A ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie Hyperforin aufweisen könnte.

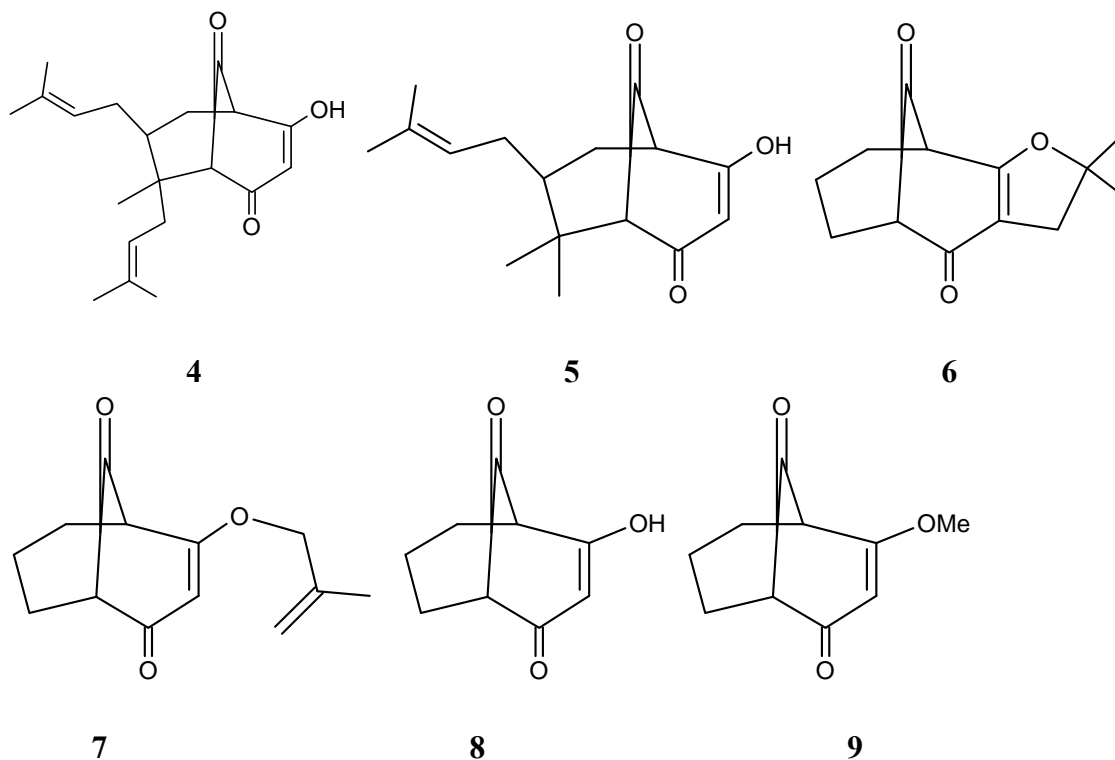
4.4.1. Strukturelle Eigenschaften von Garsubellin A und seinen Partialstrukturen

Durch eine Struktur-Vergleichssuche mit Hyperforin als Ausgangsstruktur konnte mit Hilfe der Software SciFinder2000 Garsubellin A (Abb. 4.4.1, Struktur 3) als strukturverwandtes Molekül identifiziert werden. Die Gruppe von Prof. Stoltz, Pasadena (USA) beschäftigte sich mit der Entwicklung einer Syntheseroute für die Totalsynthese von Garsubellin A. Die Strukturen 4 bis 15 wurden während dieser Entwicklung als Synthese-Zwischenprodukte hergestellt.

Phloroglucinole



Bicyclo[3.3.1]nonan



Ergebnisse und Diskussion

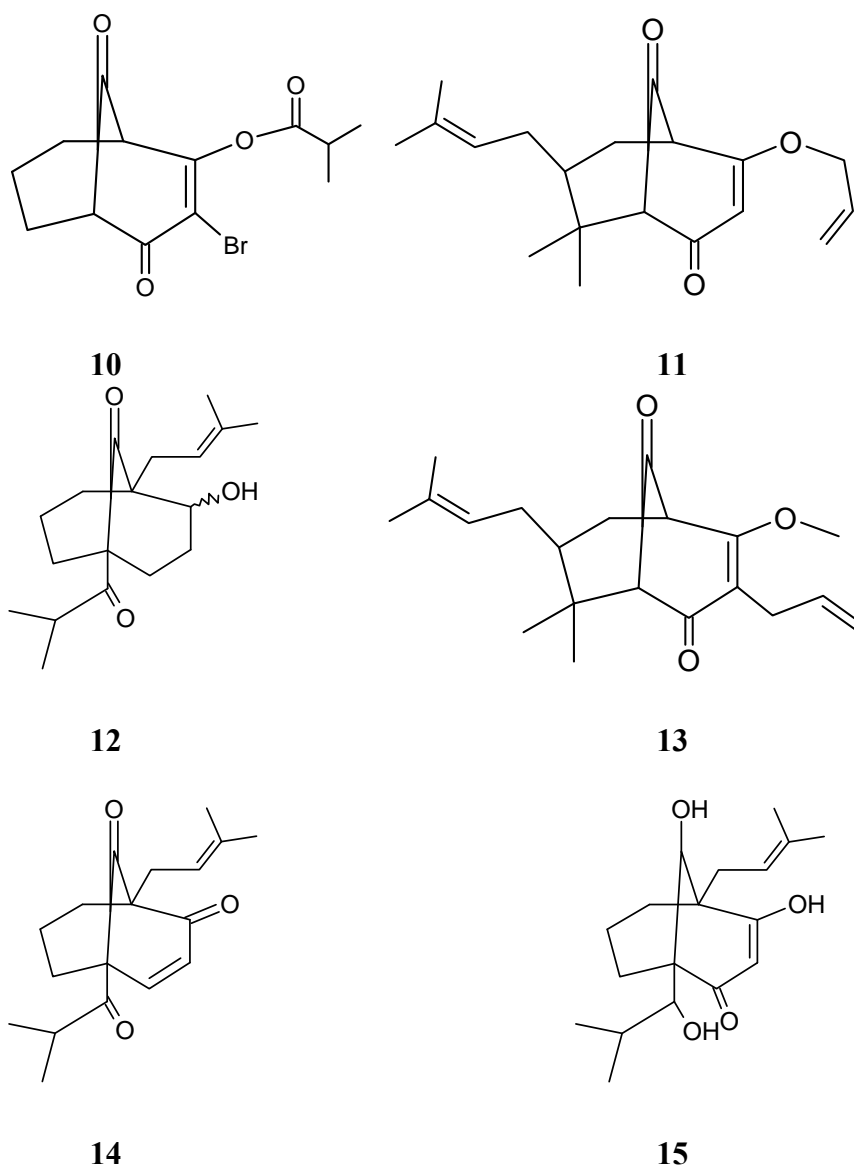


Abb. 4.4.1 Partialstrukturen des Hyperforin bzw. Garsubellin.

(1) Hyperforin, (2) oxidiertes Hyperforin, (3) Garsubellin A, (4) gs2-251, (5) gs6-119, (6) gs6-145, (7) gs6-149, (8) gs6-173, (9) gs6-207, (10) gs6-297, (11) SJSIV-231b, (12) SJSIX-123, (13) SJSVIII-099, (14) SJSVIII-175, (15) SJSX-071.

Hyperforin besitzt einen Bicyclo[3.3.1]nonan-Grundkörper, eine freie vinyloge Carbonsäurefunktion und vier Prenylreste (Abb. 4.4.1, Substanz 1). Garsubellin A fehlt die Prenylierung an Position 8, die Carbonsäure ist mit einer Prenylrest cyclisch kondensiert.

Substanz 8 gilt als Grundkörper von Garsubellin A und Hyperforin und aller anderen Strukturverwandten. Die Säurefunktion von Substanz 8 ist intakt.

Substanz 4 unterscheidet sich strukturell von Substanz 8 durch eine zweifache Prenylierung an Position 7 und 8 und einer zusätzlichen Methylierung an Position 7. Dadurch erhält Substanz 4 eine deutlich gesteigerte Lipophilie. Das Prenylierungsmuster entspricht eher dem des Hyperforins als dem des Garsubellin A, da bei Garsubellin A an

Position 7 eine Dimethylierung vorliegt und die Prenylierung an dieser Stelle fehlt. Die Carbonsäurefunktion ist bei Substanz 4 wie bei Hyperforin frei.

Substanz 5 unterscheidet sich strukturell von Substanz 8 durch eine einfache Prenylierung an Position 8 und eine doppelte Methylierung an Position 7. Dadurch erhält die Substanz eine gesteigerte Lipophilie. Das Prenylierungsmuster entspricht wie bei Substanz 4 eher dem Garsubellin A als Hyperforin, die Säurefunktion ist auch hier frei zugänglich.

Substanz 6 gleicht in ihrer Struktur Substanz 8, mit Ausnahme der Säurefunktion, die durch eine Überbrückung von Position 2 an die Hydroxygruppe in Position 3 vollständig blockiert ist.

Substanz 7 gleicht Substanz 6 und 8, allerdings liegt keine vollständige Überbrückung vor.

Substanz 9 gleicht Substanz 8, die Säurefunktion ist jedoch verestert.

Substanz 10 unterscheidet sich strukturell von Substanz 8 durch eine Bromierung an Position 2 und eine Veresterung an Position 3. Die β -Carbonyl-Säurefunktion ist durch die Bromierung blockiert. Zusätzlich ist die Hydroxygruppe verestert.

Substanz 11 entspricht in ihrer Struktur Substanz 5, mit Ausnahme der Säurefunktion, da die Hydroxygruppe an Position 3 durch eine Etherbildung blockiert ist.

Substanz 12 ähnelt in ihrer Struktur Substanz 14, wobei an Position 1 keine Doppelbindung und an Position 3 eine Hydroxygruppe anstatt einer Ketogruppe vorliegt.

Substanz 13 unterscheidet sich strukturell von Substanz 8 durch eine Prenylierung an Position 8, eine Dimethylierung an Position 7 und eine Alkylierung an Position 2, wodurch die enolische Säurefunktion blockiert ist. Zusätzlich ist die Hydroxygruppe zu einem Methoxyether verändert.

Substanz 14 besitzt im Vergleich zu Substanz 8 keine Säurefunktion und keine Hydroxygruppe an Position 3. An Position 4 ist Substanz 14 ähnlich dem Hyperforin prenyliert und an Position 6 acetyliert. Ansonsten fehlen weitere lipophile Modifikationen.

Substanz 15 ähnelt Substanz 12 und 14, wobei eine Säurefunktion ab Position 1-3 vorliegt, aber nur eine Hydroxygruppe an Position 5, anstatt einer Ketogruppe.

4.4.2. Garsubellin A hemmt die 5-LO-Aktivität

Um Effekte von Garsubellin A auf die 5-LO-Produktbildung zeigen zu können, wurden Experimente mit intakten PMNL, mit entsprechendem Homogenat, 100.000×g-Überständen und am gereinigten 5-LO-Enzym durchgeführt. Garsubellin A wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Chun-Nan Lin, School of Pharmacy, Kaohsiung Medical University, Taiwan zur Verfügung gestellt.

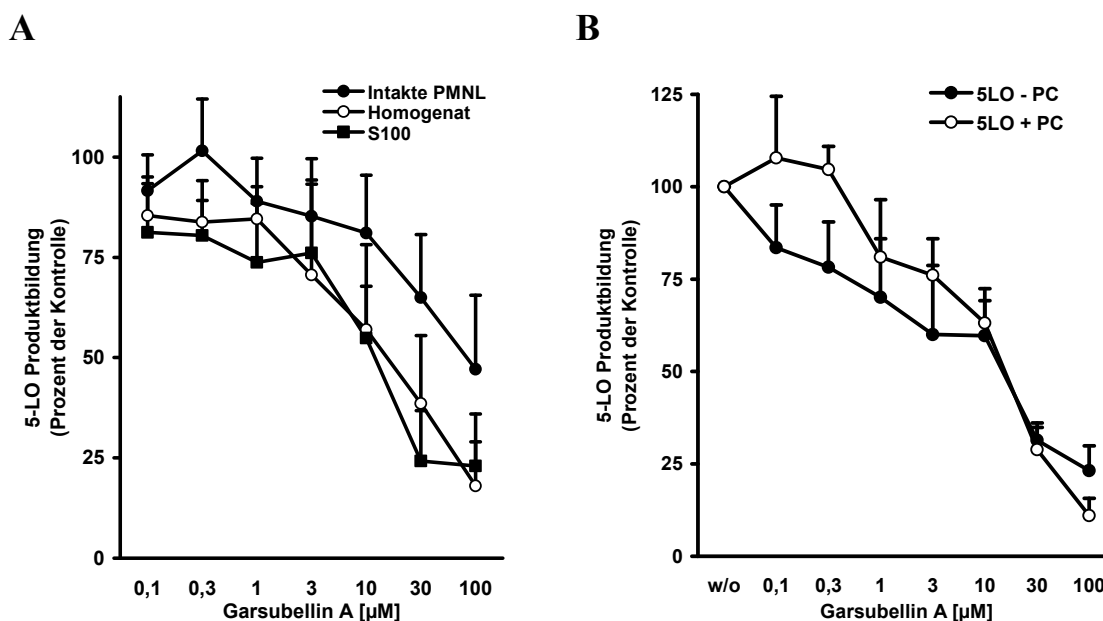


Abb. 4.4.2 Effekte von Garsubellin A auf die 5-LO-Produktbildung.

(A) 5×10^6 frisch isolierte PMNL (●) wurden mit $20 \mu\text{M}$ AA und $2,5 \mu\text{M}$ Ionophor stimuliert. Entsprechend 5×10^6 PMNL wurden als Homogenat (○) bzw. als $100.000 \times \text{g}$ -Überstand (■) eingesetzt, stimuliert wurde jeweils mit $20 \mu\text{M}$ AA. (B) Entsprechend 2×10^7 PMNL wurden als gereinigtes 5-LO-Enzym ohne (●) und mit (○) Zugabe von $25 \mu\text{g/ml}$ Phosphatidylcholin mit $20 \mu\text{M}$ AA stimuliert. Es wurde jeweils mit den angegebenen Konzentrationen an Garsubellin für 5 Minuten vorinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Fehler sind als positive Standardfehler dargestellt.

Testsystem	Stimulation	IC ₅₀ -Wert
Intakte PMNL	$2,5 \mu\text{M}$ Ionophor, 1 mM Ca^{2+} , $20 \mu\text{M AA}$	$\sim 100 \mu\text{M}$
PMNL-Homogenat	1 mM Ca^{2+} , $20 \mu\text{M AA}$	$10\text{-}30 \mu\text{M}$
$100.000 \times \text{g}$ -PMNL-Überstand	1 mM Ca^{2+} , $20 \mu\text{M AA}$	$10\text{-}30 \mu\text{M}$
Gereinigte 5-LO aus PMNL	1 mM Ca^{2+} , $20 \mu\text{M AA}$	$10 \mu\text{M}$
Gereinigte 5-LO aus PMNL + $25 \mu\text{g/ml PC}$	1 mM Ca^{2+} , $20 \mu\text{M AA}$	$10 \mu\text{M}$

Tab. 4.4.1 IC₅₀-Werte für Garsubellin A

Wie aus Tabelle 4.4.1 ersichtlich ist hemmt Garsubellin A die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL kaum und im Homogenat, $100.000 \times \text{g}$ -Überstand und am gereinigten 5-LO-Enzym mit einem IC₅₀-Wert von ca. $10 \mu\text{M}$.

4.4.3. Effekte der Garsubellin A-Derivate auf das 5-LO-Enzym

Garsubellin A ist wie Hyperforin bislang nicht vollsynthetisch zugänglich. Die unter 4.4.1 beschriebenen Strukturanalogen wurden von Prof. Stoltz zur Verfügung gestellt. Entsprechende Experimente könnten Aufschluss über die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Substanzklasse der bicyclischen, prenylierten Phloroglucinole liefern. Ausgehend von Substanz 8, dem Grundkörper Bicyclo[3.3.1]nonan mit enolischer Carbonsäurefunktion, wurde der Einfluss der Substanzen auf die 5-LO-Produktbildung in intakten PMNL und am gereinigten 5-LO-Enzym untersucht.

Die Effekte der Garsubellin A-Derivate wurden an intakten PMNL und am gereinigten 5-LO-Enzym (isoliert aus PMNL) getestet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 4.4.2 zusammengestellt.

Substanz	5-LO-Restaktivität (% der Kontrolle) bei 10 μM der Substanz in 5×10^6 intakten PMNL	5-LO-Restaktivität (% der Kontrolle) bei 10 μM Substanz an gereinigter 5-LO
4	42,4 \pm 8,4	6,4 \pm 5,4
5	89,8 \pm 12,0	15,6 \pm 6,5
6	79,9 \pm 5,0	103,0 \pm 9
7	104,3 \pm 24,0	87,3 \pm 13,6
8	104,7 \pm 28,2	120,9 \pm 11,0
9	92,9 \pm 12,1	93,1 \pm 23,4
10	96,7 \pm 16,4	56,0 \pm 15,9
11	113,3 \pm 0,2	85,1 \pm 2,0
12	99,3 \pm 3,0	76,9 \pm 16,9
13	102,5 \pm 2,3	43,7 \pm 18,7
14	89,0 \pm 18,1	90,9 \pm 3,9
15	105,3 \pm 6,3	85,8 \pm 4,2

Tabelle 4.4.2 Restaktivitäten der Partialstrukturen des Garsubellin A.

Es zeigt sich, dass Substanz 4 sowohl in intakten Zellen und an gereinigter 5-LO eine Hemmwirkung zeigt. Die Substanzen 5 bis 15 zeigen in intakten Zellen eine moderate bzw. keine Hemmwirkung. Am gereinigten Enzym hemmen die Substanzen 5, 10 und 13 mit einer IC_{50} von 15,6 μM , 56,0 μM bzw. 43,7 μM . Dies deutet darauf hin, dass die strukturellen Eigenschaften der Substanzen einen Einfluss auf die 5-LO-Hemmung haben, insbesondere bei den Substanz 4, da diese Substanz auch in intakten Zellen hemmend wirkt.

Um genauere Kenntnis darüber zu erhalten, welche strukturellen Eigenschaften an der Hemmwirkung von Hyperforin und Garsubellin A maßgeblich beteiligt sind, wurden alle

Ergebnisse und Diskussion

vorhandenen Substanzen mit 1, 10 und 100 μM an intakten PMNL und gereinigter 5-LO getestet.

4.4.4. Substanz 4, 5, 10 und 13 hemmen potent die 5-LO-Aktivität

Durch die Ergebnisse der obigen Versuche (Tab. 4.4.1) konnten vier Strukturen identifiziert werden, die zu weiteren Untersuchungen herangezogen wurden. Um weitere Erkenntnisse über das inhibitorische Potential der Substanzen zu erhalten, wurden nachfolgende Konzentrations-Wirkungsstudien durchgeführt.

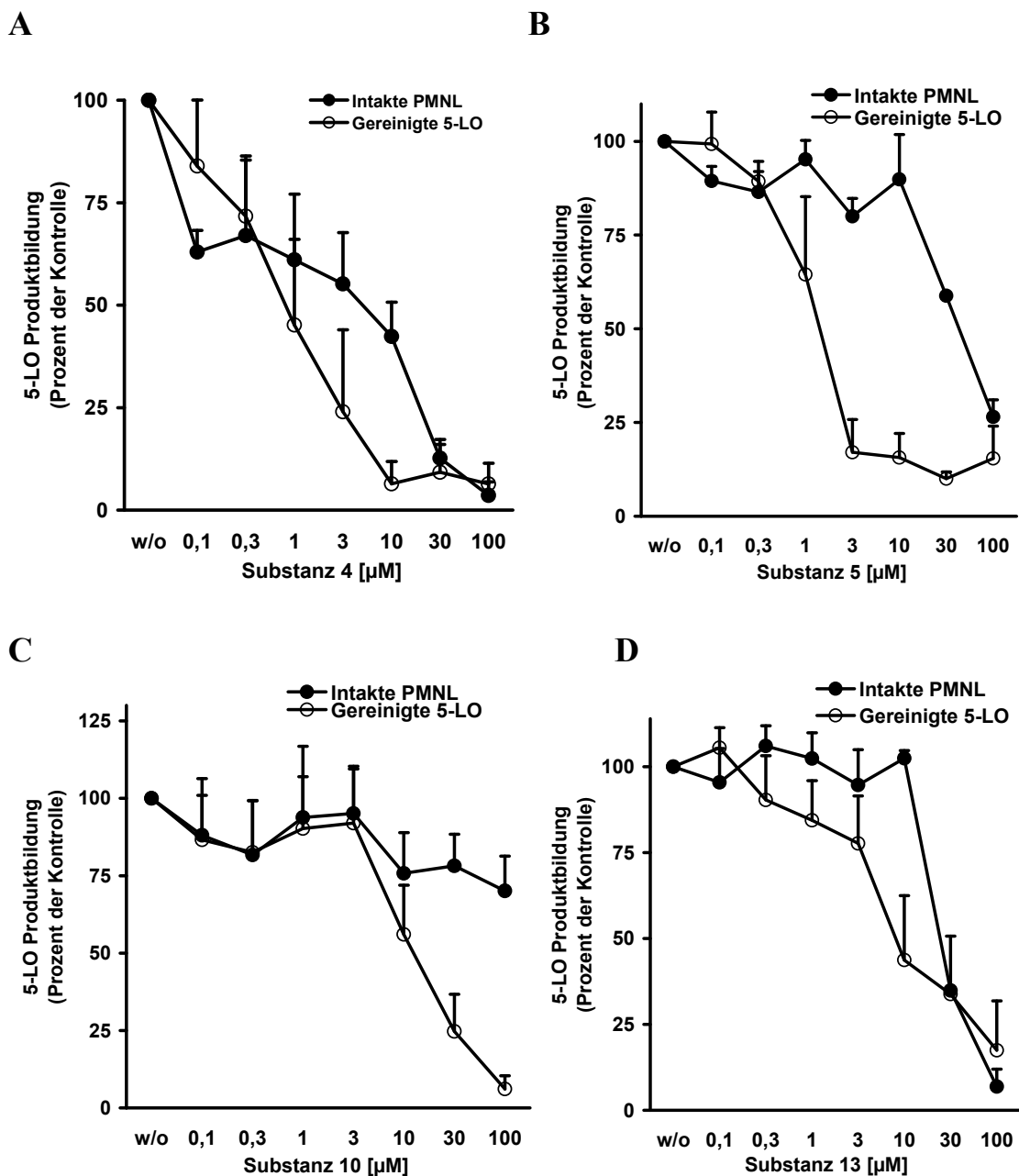


Abb. 4.4.3 Hemmung der 5-LO Produktbildung in intakten PMNL und gereinigter 5-LO aus PMNL.

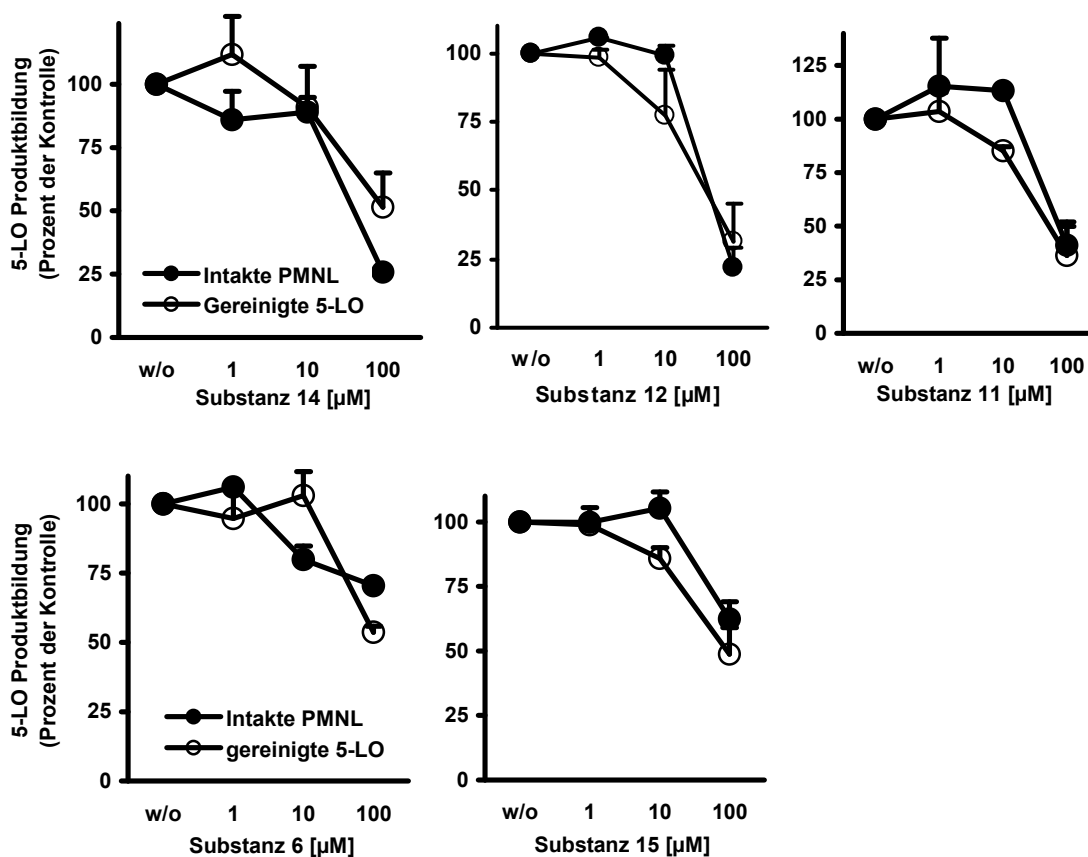
Ergebnisse und Diskussion

(A) Substanz 4, (B) 5, (C) 10 und (D) 13. (●) Intakte PMNL, stimuliert mit 2,5 μM Ionophor/20 μM AA (○) gereinigte 5-LO aus PMNL, stimuliert mit 20 μM AA/1mM Ca^{2+} . Relative Darstellung der Daten. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardfehler dargestellt.

Substanz	IC ₅₀ -Wert an 5×10 ⁶ intakten PMNL-Zellen	IC ₅₀ -Wert im Homogenat von 5×10 ⁶ PMNL-Zellen (nicht gezeigt)	IC ₅₀ -Wert im 100 000×g-Überstand von 5×10 ⁶ PMNL-Zellen (nicht gezeigt)	IC ₅₀ -Wert am gereinigten 5-LO-Enzym
4	5 μM	10 μM	10 μM	~0,8 μM
5	30-100 μM	~30 μM	10 μM	1-3 μM
10	10-30 μM	-	-	10 μM
13	30 μM	~100 μM	10 μM	10 μM

Tab. 4.4.3 Effekte von ausgewählten Partialstrukturen des Garsubellin A auf die 5-LO.

Wie aus der obigen Abbildung und Tabelle ersichtlich wird, hemmt Substanz 4 die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL mit einem IC₅₀-Wert von 5 μM und am gereinigten Enzym von 0,8 μM .



Ergebnisse und Diskussion

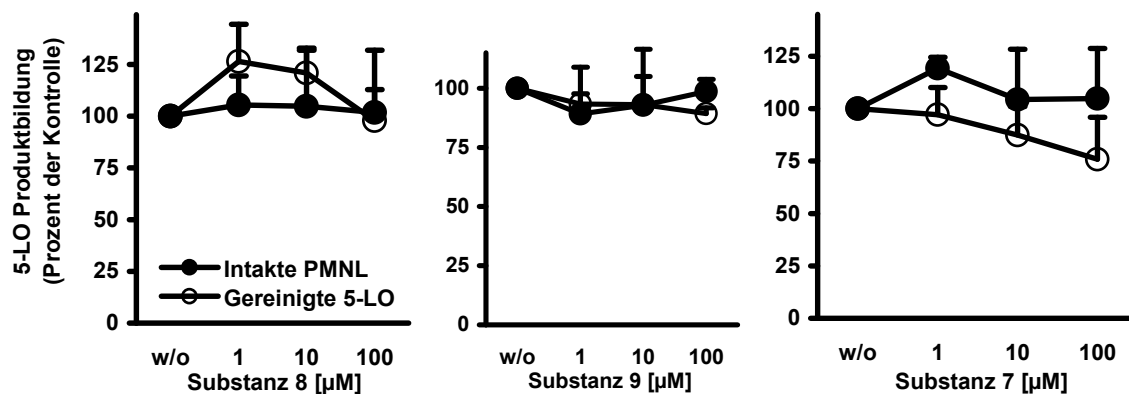


Abb. 4.4.4 Konzentrations-Wirkungs-Kurven der 5-LO-Hemmung der Partialstrukturen in intakten PMNL und bei gereinigter 5-LO aus PMNL.

(●) Jeweils 5×10^6 intakte PMNL, stimuliert mit $2,5 \mu\text{M}$ Ionophor und $20 \mu\text{M}$ AA; (○) gereinigtes 5-LO-Enzym aus entsprechend 2×10^7 PMNL, stimuliert mit $20 \mu\text{M}$ AA und 1 mM Ca^{2+} . Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardfehler dargestellt.

Substanz	IC ₅₀ -Wert an intakten PMNL	IC ₅₀ -Wert am gereinigten 5-LO-Enzym
6	>100 µM	>100 µM
7	>100 µM	>100 µM
8	>100 µM	>100 µM
9	>100 µM	>100 µM
11	100µM	100 µM
12	50-100 µM	50-100 µM
14	30-60 µM	100 µM
15	>100 µM	>100 µM

Tab. 4.4.4 Hemmung des 5-LO-Enzyms durch Derivate des Garsubellin A.

Wie aus Abb. 4.4.4 und Tab. 4.4.3 ersichtlich, hemmen einige Partialstrukturen des Garsubellin A die 5-LO-Aktivität.

4.4.5. Vergleich der Effekte von Substanz 3 und 4 auf 5-LO und 3W-5-LO in Anwesenheit von PC

Die Tryptophane 13, 75 und 102 sind in der C2-ähnlichen Domäne der 3W-5-LO mutiert. Diese Tryptophane sind maßgeblich an der Ca^{2+} -induzierten Translokation der 5-LO an Phosphatidylcholin-reiche Membranbereiche (z.B. die nukleäre Membran von PMNL) beteiligt (58).

Die Inkubation am gereinigten 5-LO-Enzym kann als Hinweis dienen, ob die 3W-5-LO-Mutation einen Einfluss auf die Effekte möglicher Inhibitoren besitzt. Bei abgeschwächter Hemmung der 3W-5-LO-Mutante im zellfreien Assay könnte möglicherweise das Tryptophan-Triplett eine Bindungsstelle für Inhibitoren darstellen.

Steigende Mengen Phosphatidylcholin (PC) stimulieren im zellfreien Assay die 5-LO Aktivität Ca^{2+} -unabhängig (54). In niedriger Konzentration imitiert PC die Kernmembran zur Bindung der 5-LO. Inhibitoren, die an die gleiche Stelle binden wie PC, können durch die Zugabe von PC verdrängt werden. Die 3W-5-LO-Mutante besitzt keine Membranbindung mehr, d.h. die Verdrängung eines Inhibitors durch PC, der an diese Stelle bei wt-5-LO bindet, sollte kaum vorhanden sein. Demzufolge sollte an der wt-5-LO ein PC-Effekt zu beobachten sein, indem die Zugabe von PC eine Verschlechterung des Hemmeffekts bewirkt. Ein PC-unabhängiger Unterschied zwischen der Hemmung der wt-5-LO und 3W-5-LO deutet darauf hin, dass die C2-ähnliche Domäne eine potentielle molekulare Zielstruktur der 5-LO für den Inhibitor darstellt.

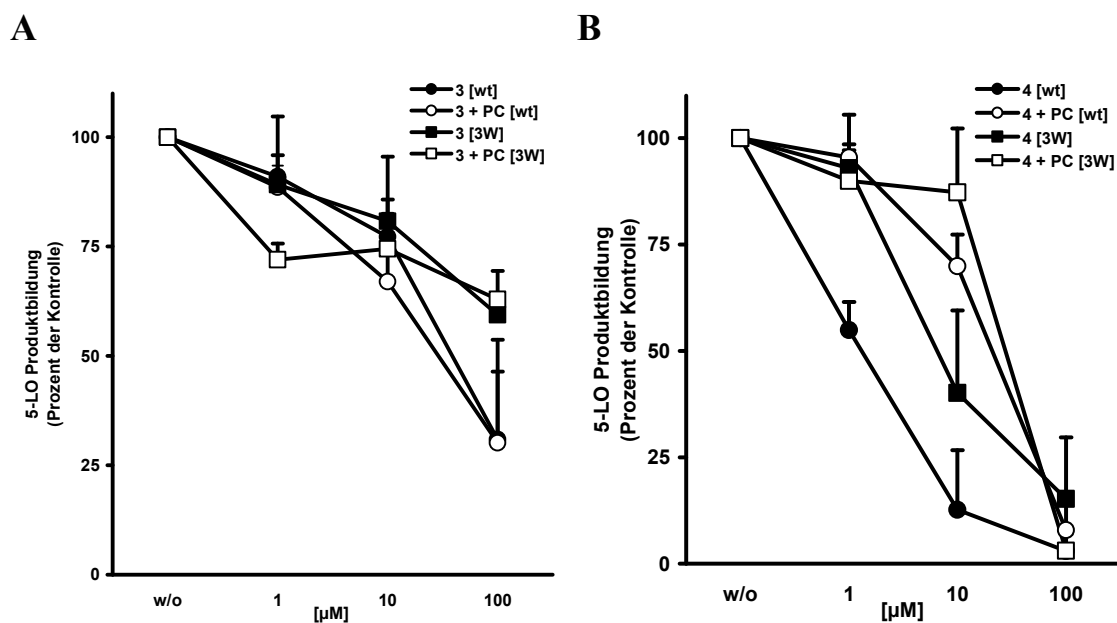


Abb. 4.4.5: Vergleich der 5-LO-Hemmung der Substanzen 3 und 4 an gereinigter 5-LO oder 3W-5-LO aus *E.coli* mit und ohne Zugabe von Phosphatidylcholin.

Substanz 3 (A) oder Substanz 4 (B) wurden in den angegebenen Konzentration für 5 Minuten vorinkubiert. ATP-Agarose-gereinigte 5-LO oder 3W-5-LO werden entsprechend 20 ml *E.coli*-Kultur eingesetzt. Es wurde jeweils mit 1 mM Ca^{2+} und 20 µM AA stimuliert. (●) wt-5-LO und (■) 3W-5-LO ohne Zugabe von Phosphatidylcholin, (○) wt-5-LO und (□) 3W-5-LO mit Zugabe von 25 µg/ml Phosphatidylcholin. Die Ergebnisse wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen gewonnen. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardfehler dargestellt.

Die Hemmung der 5-LO-Aktivität durch Substanz 3 (Garsubellin A) ist bei 3W-5-LO etwas schwächer als bei wt-5-LO (IC_{50} -Wert $>100 \mu\text{M}$, bzw. ca. $75\text{-}100 \mu\text{M}$) und ist bei beiden Enzymen (wt-5-LO und 3W-5-LO) PC-unabhängig (Abb. 4.4.7 A).

Der IC_{50} -Wert der 5-LO-Produktbildung durch Substanz 4 ist bei wt-5-LO $1,2 \mu\text{M}$. Durch die 3W-5-LO-Mutation verschiebt sich der IC_{50} -Wert nach rechts ($7\text{-}10 \mu\text{M}$). Gibt man zu wt-5-LO $25 \mu\text{g/ml}$ PC verschiebt sich der IC_{50} -Wert zu $10\text{-}30 \mu\text{M}$. In Gegenwart von $25 \mu\text{g/ml}$ PC ändert sich der IC_{50} -Wert der 3W-5-LO zu $30\text{-}50 \mu\text{M}$. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Substanz 4 möglicherweise an die PC-Bindungsstelle (Trp13, 75, 102) binden kann und bei Zugabe von PC verdrängt wird.

4.4.6. Diskussion

Hyperforin-haltige Johanniskrautextrakte (*Hypericum perforatum*) werden häufig gegen mittelschwere Depressionen und Angstzustände verwendet. Hyperforin wurde als Hauptkomponente für die antidepressive Wirkung identifiziert (279). Johanniskrautextrakte oder Hyperforin haben eine wundheilungsfördernde Wirkung bei Verbrennungen sowie Dermatitis (280,281). In pharmakologischen *in vitro* Studien konnten weitere anti-inflammatorische Effekte gezeigt werden, wie z.B. Hemmung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Spezies und Elastase (204,220). Hyperforin konnte 2003 als dualer Inhibitor von COX-1/2 und 5-LO identifiziert werden (204).

Hyperforin (Abb. 4.4.1 Struktur 1) und strukturell ähnliche Verbindungen waren bis zu diesem Zeitpunkt nicht als Inhibitoren für die 5-LO in Betracht gezogen worden. Da Hyperforin zwei Enzyme der AA-Kaskade beeinflussen kann, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem molekularen Wirkmechanismus um eine Bindungsstelle handeln könnte, die mit einer Fettsäurebindungsstelle in Verbindung steht bzw. es könnte sich um eine Bindungsstelle im aktiven Zentrum der 5-LO handeln.

Um ähnliche Verbindungen wie Hyperforin zu identifizieren, wurde mit Hilfe der Datenbankabfrage-Software SciFinder2000 und der Strukturerkennungssoftware Beilstein CrossFire auf Basis der Struktur von Hyperforin eine Verbindung identifiziert, die eine sehr hohe strukturelle Übereinstimmung besitzt: Garsubellin A (Abb. 4.4.1 Struktur 3). Vergleicht man die beiden Verbindungen miteinander zeigt sich, dass Garsubellin A zwei Prenylierungen weniger aufweist als Hyperforin, desweiteren ist eine Prenylierung mit der OH-Gruppe der vinylogenen Carbonsäure, die bei Hyperforin frei zugänglich ist, zu einer intracyclischen Struktur kondensiert. Dieses Strukturelement findet sich auch bei einem sehr wirksamen oxidierten Hyperforin-Analogen (Abb. 4.4.1 Struktur 2), wobei hier eine

Ergebnisse und Diskussion

Prenylierung mehr vorhanden ist als bei Garsubellin A (anstelle der Prenylierung befindet sich eine Methylierung).

Dieser Unterschied wirkt sich bei der Hemmung der 5-LO sehr deutlich aus: Garsubellin A erreicht in intakten PMNL keine Hemmung, im Homogenat, im 100 000×g-Überstand von PMNL sowie am gereinigten 5-LO-Enzym jeweils einen IC_{50} -Wert von 10-30 μ M, die Zugabe von 25 μ g/ml Phosphatidylcholin hatte keinen Einfluß auf die Hemmung am gereinigten Enzym. Demgegenüber weist das oxidierte Hyperforinderivat einen IC_{50} -Wert bei intakten PMNL-Zellen von 8,1 μ M und am gereinigten Enzym von 900 nM auf. Strukturell unterscheiden sich die beiden Verbindungen nur durch das Vorhandensein einer Prenylierung an Position 7 anstatt einer Dimethylierung bei Garsubellin A. Diese Prenylierung scheint für die Effizienz der 5-LO-Hemmung bedeutsam zu sein.

Eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Brian Stoltz brachte die Möglichkeit verschiedene Synthesewegstufen, die bei der Vollsynthese des Garsubellin A (282) angefallen waren, auf deren inhibitorisches Potential zu testen. Die strukturminimierten Garsubellin A- bzw. Hyperforin-Derivate sind in Abb. 4.4.1 (Struktur 4 bis 15) dargestellt. Durch diese Modifikation wird ebenfalls die Hemmung der 5-LO in intakten PMNL-Zellen ermöglicht. Verringert man die Anzahl an Prenylierungen und ersetzt diese an Position 7 durch eine Methylierung, verringert sich das inhibitorische Potential (Substanz 5). Blockiert man die Säurefunktion durch Alkylierung an Position 2 verschlechtert sich der IC_{50} -Wert am gereinigten 5-LO-Enzym und in intakten Zellen weiter. Wird an Position 2 ein Bromid eingefügt, hemmt diese Substanz nicht mehr in intakten Zellen, aber weiterhin am gereinigten Enzym (Substanz 10).

Substanz 8 und 9 stellen die Grundkörper von Hyperforin und Garsubellin A dar, beide besitzen aber kein inhibitorisches Potential bezüglich der 5-LO.

Im Vergleich zu Substanz 4 und 5 zeigt die Blockierung der Säurefunktion durch Etherbildung eine Verringerung der 5-LO-Hemmung um den Faktor 3 bei intaktem Enzym (Vgl. Substanz 11 zu Substanz 5) und um den Faktor 30 bei gereinigter 5-LO (Vgl. Substanz 11 zu Substanz 5).

Vergleicht man Substanz 6 und 7 mit Substanz 11 zeigt sich, dass eine Hemmung der 5-LO nur stattfindet, wenn an Position 4, 7 und 8 Prenylierungen vorliegen. Wird die Säurefunktion blockiert, kommt es wiederum zu einer Verminderung der 5-LO-Hemmung.

Aus diesen Experimenten, mit allen zur Verfügung stehenden Partialstrukturen, kann man die grundlegenden strukturellen Voraussetzungen erkennen, die für eine 5-LO-Hemmung mit dieser Substanzklasse notwendig sind.

Zum einen erweist sich die Kombination eines Bicyclo[3.3.1]nonan-Grundkörpers mit einer vinylogenen Carbonsäure (Substanz 8) nicht als ausreichend für eine 5-LO-Hemmwirkung. Zusätzlich benötigt man weitere lipophile Strukturelemente. Erhöht man die Lipophilie durch Einführung von Prenylierungen, erhöht sich schrittweise das inhibitorische Potential der Verbindungen, auch an 5-LO aus intakten PMNL-Zellen (Hyperforin < Substanz 4 < 5 < 13). Eindrucksvoll zeigt sich dieser Effekt bei Vergleich des inhibitorischen Potentials von Garsubellin A zu oxidiertem Hyperforin. Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen ist einzig der Austausch einer Prenylierung am oxidierten Hyperforin durch eine Methylgruppe an Position 7 des Garsubellin A.

Nimmt man diese Erkenntnisse zusammen, würde der nächste Schritt einer Weiterentwicklung des Potentials der Substanz 4 sicherlich zu einer weiteren Prenylierung an Position 2 und 4 führen. Diese Verbindung mit insgesamt vier Prenylierungen könnte sehr vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Der unterschiedliche Prenylierungsgrad der Substanzen 4, 5 und 13 und die Beeinflussung der Carbonsäurefunktion von Substanz 13 hat einen Einfluss auf das inhibitorische Potential der Substanzen, die 5-LO aus unterschiedlichen Quellen (intakte Zellen, Homogenat, 100 000×g-Überstand und gereinigtes 5-LO-Enzym) zu hemmen. So ist eine Prenylierung an Position 8 essentiell für die Hemmung in intakten Zellen (Vergleich zu Substanz 8 in Abb. 4.4.4). Eine doppelte Prenylierung an Position 7 und 8 erhöht dieses Potential deutlich (Substanz 4 vs. Substanz 5 und 13). Vergleicht man Substanz 5 und 13, so fällt auf, dass die Blockierung der Säurefunktion durch Alkylierung und Methoxylierung keine Verbesserung der Hemmung in intakten Zellen bewirkt. Die Hemmung am gereinigten Enzym verschlechtert sich sogar etwas im Vergleich zu Substanz 5 (Abb. 4.4.5, B + C). Die doppelte Prenylierung an Position 7 und 8 sowie die freie Säurefunktion bei Substanz 4 ist bei dieser Serie von Substanzen das Optimum, um den niedrigsten IC₅₀-Wert aller Partialstrukturen am gereinigten 5-LO-Enzym und in intakten PMNL-Zellen zu erhalten.

Für Hyperforin ist der molekulare Wirkmechanismus weitestgehend geklärt. So konnte gezeigt werden, dass Hyperforin die 5-LO-Translokation nach Aktivierung hemmen kann.

Ergebnisse und Diskussion

Nach Zugabe von Phosphatidylcholin zum Inkubationsansatz mit gereinigter 5-LO konnte die Hemmwirkung des Hyperforins blockiert werden. Das deutet darauf hin, dass Hyperforin die Membranbindungsstelle der 5-LO als Bindungsstelle für die Hemmung nutzt, da auch die 3W-5-LO-Mutante nicht durch Hyperforin beeinflusst werden konnte (283). Da die Hemmung von Garsubellin A durch die Zugabe von PC nicht beeinflusst wird (Abb. 4.4.2 B), aber die 5-LO-Inhibition durch Substanz 4 sehr wohl durch PC beeinflusst werden kann, scheint der Prenylierung an Position 7 von Substanz 4 entscheidende Bedeutung zuzukommen, da dies der markanteste Unterschied der Substanz 4 zum Garsubellin A ist und als das Bindeglied zur Hyperforin-Struktur gesehen werden kann.

Mittlerweile ist es gelungen, Garsubellin A vollsynthetisch herzustellen (284,285), so dass die Möglichkeit bestehen würde, die gefundenen Werte zu verifizieren.

Eine sinnvolle Erweiterung wäre die Testung des inhibitorischen Potentials der vorgestellten Substanzen auf die COX-1/2-Enzyme sowie auf mPGES-1. Die Hemmung der 5-LO-Translokation sollte untersucht werden sowie die Beeinflussung des 5-LO/FLAP und cPLA₂-Systems.

4.5. Herstellung eines monoklonalen 5-LO Antikörpers

Um 5-Lipoxygenase einwandfrei mit Hilfe der Western Blot-Methode detektieren zu können, ist es unerlässlich einen selektiven und sensitiven Antikörper einsetzen zu können. Unsere Arbeitsgruppe verwendet zwei Antikörper, die von Dr. Olof Rådmark, Karolinska Institut, Stockholm zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelt es sich um polyklonale Antikörper mit der Bezeichnung AK 6 und 7. Beide Antikörper wurden durch Immunisierung eines Kaninchens mit 5-LO-Protein generiert und der Antikörper wurde kontinuierlich aus dem Blut des Kaninchens gewonnen.

Um eine höhere Selektivität zu erreichen und genügend Antikörper für substanzintensive Versuche, wie z.B. Immunopräzipitationen einsetzen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ilse Zündorf und Prof. Theo Dingermann, beide Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Frankfurt, ein monoklonaler 5-LO-Antikörper hergestellt. Dafür wurden Mäuse mit gereinigter, rekombinanter 5-LO aus E.coli immunisiert.

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper ist es wichtig, aus der Vielzahl der Hybridomzell-Klone den Klon zu isolieren, der Antikörper mit extrem hoher Spezifität sowie Affinität gegenüber dem Antigen produziert. Aus diesem Grund werden die Hybridomzell-Klone nach erfolgreicher Fusionierung einem ELISA-basierten Screening unterzogen (286,287).

Die Immunisierung der Mäuse, die Herstellung von Hybridomzellen, das ELISA-Screening und die kontinuierliche Kultivierung der positiven Hybridomzell-Klone wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dingermann durchgeführt.

4.5.1. Vorbereitung der 5-LO für die Immunisierung von Mäusen

Auf Basis der Methode für die vollständige Aufreinigung von 5-LO-Protein wurde aus mehreren 5-LO-E.coli-Ansätze die 5-LO gereinigt, vereinigt und mit Hilfe der SDS-PAGE nochmals aufgetrennt, um einen noch höheren Reinheitsgrad zu erhalten. Dafür wurde ein präparatives 10%iges Gel (15 x 15 cm) hergestellt. Nach Elektrophorese wurde das Gel mit Hilfe der Natriumacetat-Methode gefärbt und die reversibel gefärbte Proteinbande der 5-LO ausgeschnitten und mit 15 ml Elektroelutionspuffer in einen Dialyseschlauch überführt. Der gefüllte Dialyseschlauch wird in eine horizontale Gellaufkammer, die mit Laufpuffer gefüllt ist, eingespannt und für zwei Stunden bei 100 mA einer Elektrophorese unterzogen. Nachdem das ausgeschnittene Gelstück aus dem Dialyseschlauch entfernt wurde, wird das eluierte Protein gegen 5 mM Tris über Nacht bei 4°C dialysiert. Die

Proteinkonzentration wird mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt und die Proteinlösung zu 100 µg aliquotiert und lyophilisiert.

4.5.2. Immunisierung und Herstellung von Hybridomzellen

Die gelöste 5-LO wurde mit Freund'schem Adjuvans versetzt und die Mäuse wurden mit 5 Dosen à ca. 100 µg Protein mit einem Intervall von 15 – 21 Tagen immunisiert. Dabei wurde das Protein zu 200 µl gelöst und i. p. in zwei weibliche Balb/C Mäuse injiziert. Nach der dritten Applikation wurde aus den Schwanzvenen der Mäuse eine geringe Menge Blut entnommen und der Antikörpertiter durch ein ELISA-Screening kontrolliert. Im Anschluss an die fünfte Immunisierung wurde die Maus unter Narkose getötet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Lymphozyten aus der Milz wurden ausgespült, gewaschen und gezählt. Die aus der Milz gewonnenen Lymphozyten wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:5 mit NS1-Myelomzellen gemischt, bevor die Fusion zu Hybridomzellen durch die Inkubation mit einer Polyethylenglykollösung (PEG 4000) induziert wurde. Die Zellen wurden auf eine 96-well Microtiterplatte ausgeteilt und die Überstände der gewachsenen Klone wurde mit Hilfe der ELISA-Methode nach Antikörper-produzierenden Hybridomzell-Klonen untersucht (288,289).

4.5.3. 5-LO-Detektion mit Maus-Serum

Nach dem Abtöten der Mäuse wurde neben der Milz das Blut-Serum der Mäuse isoliert. Dieses Mausserum wurde mit Hilfe der Western Blot – Methode gegen 5-LO in verschiedenen Verdünnungen getestet. Abbildung 4.5.1 zeigt die Ergebnisse mit gereinigter, rekombinanten 5-LO.

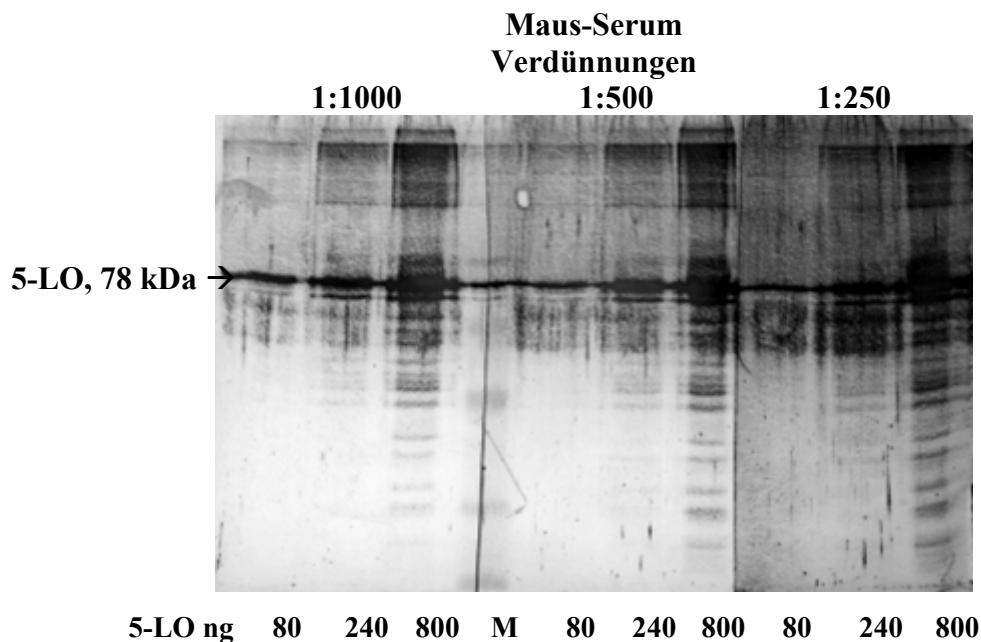


Abb. 4.5.1 Detektion von 5-LO mit verschiedenen Verdünnungen des Maus-Serums.

Pro Taschen wurden 80, 240 und 800 ng gereinigte 5-LO eingesetzt. Nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot wurden verschiedene Maus-Serum-Verdünnungen 1:250 / 1:500 / 1:1000 als primärer Antikörper eingesetzt und mit Hilfe der NBT/Bcip-Methode visualisiert.

Es kann festgestellt werden, dass das Mausserum die 5-LO detektieren kann. Bei einer hohen Konzentration an eingesetztem Mausserum wird die Detektion unspezifisch. Es muss für eine selektive 5-LO-Detektion eine sehr hohe Mausserum-Verdünnung verwendet werden (1:5000 bis 1:10000, Daten nicht gezeigt).

4.5.4. Screening von positiven Klonen auf 5-LO-Selektivität

Nachdem einzelne Hybridomzell-Klone im ELISA-Screening einen positiven Befund geliefert haben, wurden diese Klone kultiviert. Anschließend wurden die Zellüberstände mit Hilfe der Western Blot - Methode gegen gereinigte 5-LO als Kontrolle getestet. Dabei wurden die Zellüberstände zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, RT) und 1:1 mit PBS verdünnt.

Es wurden insgesamt 19 verschiedene Überstände von ELISA-positiven Hybridomzell-Klonen getestet. Klon 6A12 konnte die 5-LO sensitiv und selektiv im Western Blot detektieren. Alle übrigen Klone zeigten keine befriedigenden Resultate und wurden nicht weiter verwendet.

4.5.5. Zelltyp-abhängige Detektion mit dem 6A12-Antikörper

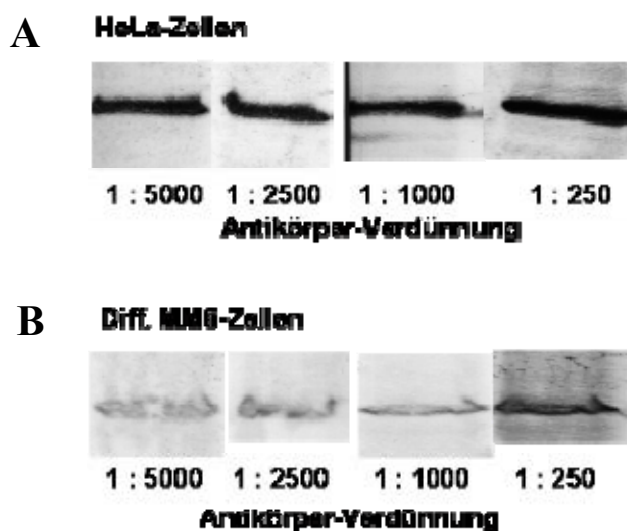


Abb. 4.5.2 Detektion von 5-LO in verschiedenen Zelltypen mit 6A12-Antikörper.

(A) 1×10^5 HeLa-Zellen pro Tasche, (B) $2,5 \times 10^5$ MM6-Zellen, differenziert mit TGF β /VD $_3$, pro Tasche. Mehrere identische Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Western Blot-Methode auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurde mit verschiedenen Antikörper-Verdünnungen inkubiert.

Wie aus den obigen Ergebnissen ersichtlich ist, ist die 5-LO-Konzentration in transfizierten HeLa-Zellen sehr hoch, daher wird für eine 5-LO-Detektion in HeLa-Zellen sehr wenig Antikörper benötigt. Für die 5-LO-Detektion in differenzierten MonoMac6-Zellen wird hingegen eine höhere Konzentration der Antikörper-Verdünnung benötigt, um die 5-LO zu detektieren, da die Menge an exprimierter 5-LO sehr niedrig ist.

4.5.6. Reinigung des 6A12-5-LO-Antikörpers

Die Reinigung des 6A12-Antikörpers vom Typ IgG $_1$ erfolgte durch Bindung an Protein G-Sepharose (Sigma). Der Serum-freie Überstand der kultivierten Zelllinie 6A12 wurde mit 10fach Bindungspuffer auf 20 mM NaH $_2$ PO $_4$ pH 7,0 eingestellt, zentrifugiert (1200 rpm, 10 Minuten, 4°C) und auf eine Säule gegeben, die mit Protein G-Sepharose gefüllt war und mit Bindungspuffer (20 mM NaH $_2$ PO $_4$ pH 7,0) equilibriert wurde. Der Überstand wurde zweimal über die Säule gegeben und anschließend mit Bindungspuffer gewaschen. Der gebundene Antikörper wurde in 1 ml Fraktionen mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert und das Eluat wurde umgehend mit 10 % 1 M Tris/HCl pH 9,0 neutralisiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung kontrolliert.

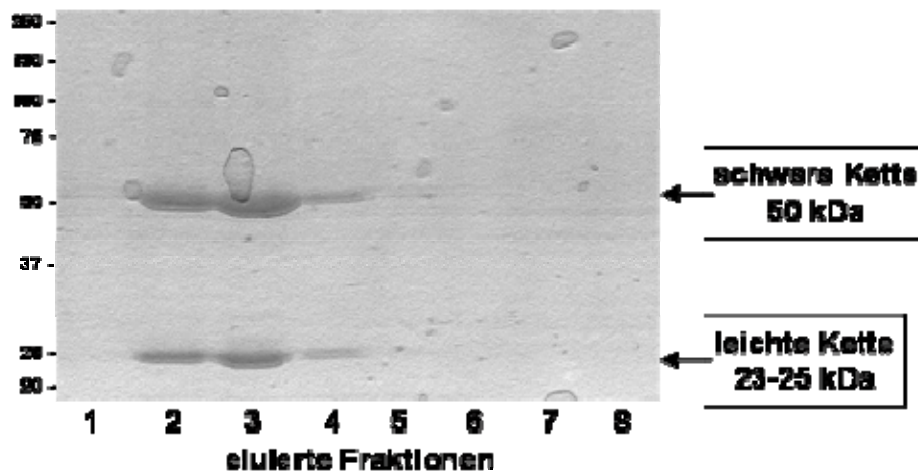


Abb. 4.5.3 Antikörper-Aufreinigung über Protein G-Sepharose.

Die einzelnen Fraktionen der Antikörper Aufreinigung wurden zu je 1 ml Eluaten aufgefangen und über ein 10%iges Tris/HCl-Gel mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei denaturiert der Antikörper und es entstehen charakteristische schwere und leichte Ketten. Die Antikörperbanden wurden mittels Coomassie-Färbung detektiert. Pro Aufreinigung wurden 150 - 200 ml Serum-freier Zellüberstand verwendet.

Wie zu erkennen ist, eluiert der Antikörper in definierten Fraktion, ohne Verschleppungen in weitere Fraktionen. Durch dieses relativ scharfe Eluieren, lassen sich die Antikörper-Fraktionen sehr gut weiterverarbeiten.

Die Antikörper-enthaltenen Fraktionen wurden gepoolt und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die Konzentration der Antikörper-Lösung wurde mit einem Bradford-Assay bestimmt. Anschließend wurden die einzelnen Tages-Chargen lyophilisiert, auf eine gemeinsame Konzentration mit Wasser eingestellt und vereinigt. Die Antikörper-Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

4.5.7. Ausbeute der Antikörper-Aufreinigungen

Charge	I	II	III	IV	V	VI	VII
Ausbeute in µg	3065	2414	4238	5209	4035	5911	2528

Tabelle 4.5.1 Ausbeute der einzelnen Aufreinigungen.

Bei Charge I, II und VII wurde 150 – 200 ml Zellüberstand verwendet, bei Charge III-VI jeweils 300 – 400 ml Zellüberstand verteilt auf zwei Protein G-Sepharose-Säulen. Die eluierten Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert und lyophilisiert. Anschließend wurde die individuelle Menge an sterilem Wasser zugegeben und auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ausbeute der einzelnen Aufreinigungen bewegt sich in einem Menge von 2,4 mg bis 5,9 mg pro 300 bis 400 ml Zellüberstand. Diese einzelnen Tages-Chargen wurden zu 1 mg/ml mit Wasser gelöst und vereinigt und es wurde nochmals die Antikörper-Konzentration gemessen. Es resultierte eine 0,75 mg/ml Lösung, die mit Na-Azid versetzt wurde und bei 4°C gelagert wird. Durch eine fortlaufende Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Antikörpers über mehrere Monate hinweg, kann eine Aussage über die Haltbarkeit und Verwendbarkeitsfrist gemacht werden.

4.5.8. 5-LO-Detektion in unterschiedlichen 5-LO-Proben mit dem 6A12-Antikörper

Der Antikörper wurde gegen einige in der Arbeitsgruppe häufig verwendete 5-LO-positive Proben getestet. Die gefundenen Ergebnisse sind in nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

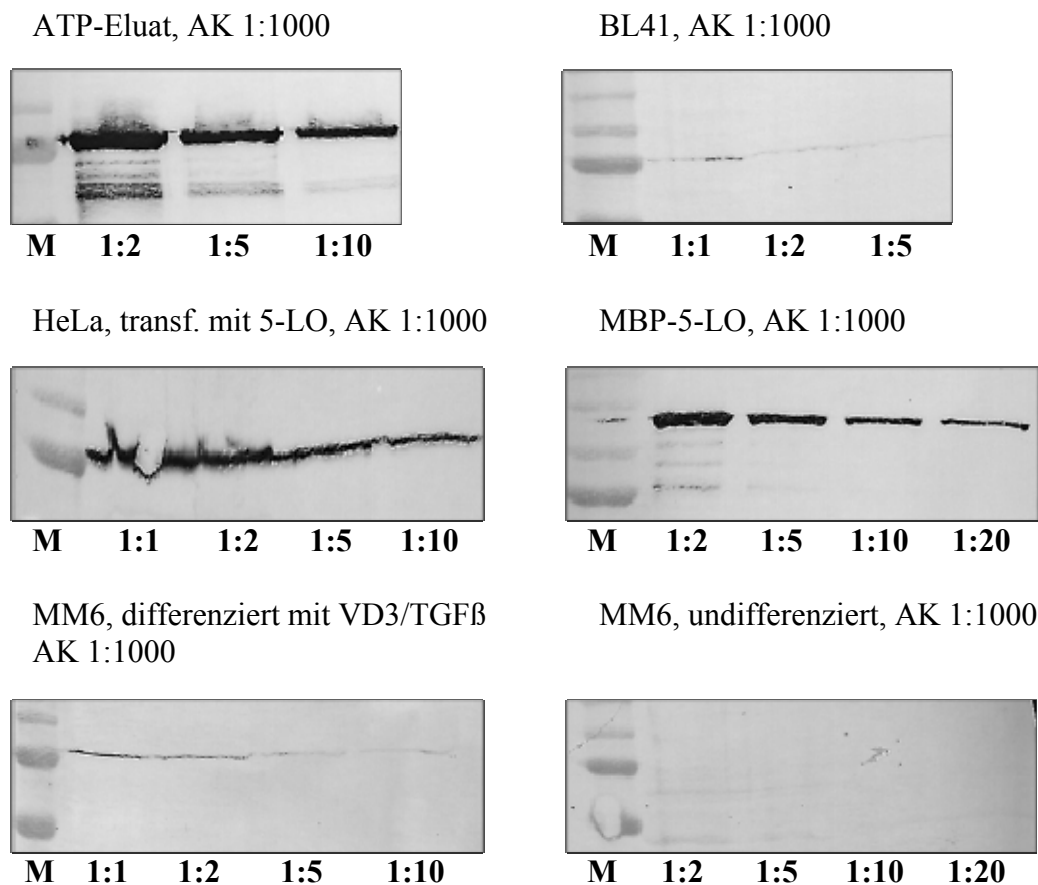


Abb. 4.5.4 Detektionsmöglichkeiten des 6A12-5-LO-Antikörpers.

5-LO konnte in Präparationen von MBP und MBP-C2-Domäne nicht detektiert werden (Daten nicht abgebildet).

4.5.9. Vergleich der Detektionsmöglichkeiten von verschiedenen 5-LO-Antikörpern

Um einen Eindruck davon zu erhalten, wie der Antikörper zu bestehenden, käuflichen Antikörpern funktioniert, wurden verschiedene Antikörper gegen die gleiche Probe getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in nachfolgender Abbildung zusammengefasst.

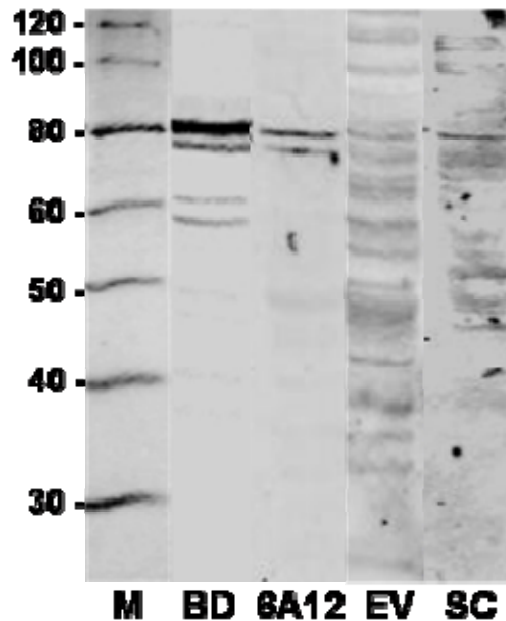


Abb. 4.5.5 Vergleich verschiedener 5-LO-Antikörper gegen BL41-E95A-Zell-Homogenat.

Pro Tasche wurden 50 µg eines Zelllysats von BL41-E95A Zellen verwendet. Nach Transferieren auf Nitrocellulose-Membranen wurden die identischen Proben mit unterschiedlichen primären Antikörpern inkubiert. (BD) Firma BD Biosciences, monoklonal, Maus, Katalog-Nr.: 610694, 1:400, (6A12) monoklonal, Maus, 1:250, (EV) Firma Everest Biotech, polyklonal, Katalog-Nr.: EB07389, 1:500, (SC) Firma Santa Cruz, polyklonal, Katalog-Nr.: SC-8886, 1:200. Sekundärer Antikörper: IRDye 680, 1:5000. Bilderfassung mit LICOR Odyssey Infrarot Scanner. Marker: MagicMarc, Firma Invitrogen.

Der Antikörper von BD zeigt eine etwas höhere Sensitivität gegenüber dem 6A12-Antikörper. 6A12 ist etwas selektiver als die anderen getesteten Antikörper. Die Antikörper der Firmen Everest und Santa Cruz zeigen unbefriedigende Ergebnisse.

5. Zusammenfassung

Die 5-Lipoxygenase (5-LO) ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese proinflammatorischer Leukotriene, die maßgeblich an der Entstehung allergischer und entzündlicher Erkrankungen wie Arthritis, Asthma und kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind (23). Humane 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 77,8 kDa (24). Das Protein besteht aus einer größeren katalytischen Domäne, die ein zentrales Eisen(II)-Atom enthält, das für die zweistufige LTA₄-Bildung aus Arachidonsäure benötigt wird, und einer kleineren C2-ähnlichen Domäne, die Bereiche für die Membran- sowie Ca²⁺-Bindung enthält. Durch Stimulation von intakten Zellen kommt es zu einer Translokation der 5-LO an die Kernmembran. Die Wechselwirkung mit dem membranständigen FLAP fördert die 5-LO-Leukotrienbildung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit niedermolekularen Modifikationen der 5-LO durch U-73122 und Glutathion sowie mit der Charakterisierung von 5-LO-Inhibitoren.

U-73122 ist ein Inhibitor, der *in vitro* und *in vivo* mit einem IC₅₀-Wert von 30 nM bzw. 2,4 µM die 5-LO-Aktivität hemmt (2). U-73122 verfügt über eine thiol-reaktive Maleinimid-Gruppe, wodurch die Substanz kovalent an einige 5-LO-Cysteine (Cys-99, -159 und weitere) binden kann. Entsprechende U-73122-5-LO-Peptide konnten nach Trypsin-Verdau der 5-LO mit MALDI-MS-Messungen nachgewiesen werden. Für diesen Zweck musste eine effiziente Aufreinigung für native 5-LO (Reinheit > 95%) entwickelt werden. Um die Veränderung der 5-LO-Aktivität nach U-73122-Zugabe zu untersuchen, wurden Cystein/Serin-5-LO-Mutanten hergestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die Mutante C416S-5-LO nicht mehr effektiv durch U-73122 gehemmt werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass U-73122 an Cystein-416 der 5-LO bindet und die 5-LO-Produktbildung hemmt. Auf der 5-LO-Oberfläche konnte ein Bereich lokalisiert werden, der einen Zugang für das Substrat zum aktiven Zentrum der 5-LO bilden könnte (238,239). Dieser Bereich liegt in unmittelbarer Nähe zu Cystein-416. Daher besteht die Möglichkeit, dass U-73122, nachdem es an Cystein-416 gebunden hat, diesen Bereich hemmend beeinflussen kann.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Glutathion an mehrere Cysteine der 5-LO (Cystein-99, -264 und -449) kovalent binden kann. Um Veränderungen der 5-LO-Aktivität durch *in vivo* Glutathionylierungen zu zeigen, wurden HeLa-Zellen mit 5-LO, Cystein-/Serin-5-LO-Mutanten sowie FLAP transfiziert und mit Diamid inkubiert. Es konnte festgestellt werden, dass die native sowie FLAP-gesteigerte 5-LO-Produktbildung durch Diamid gehemmt wird. Dies konnte ebenfalls für die Mutante 3W-5-LO beobachtet werden.

Zusammenfassung

Zusätzlich wurden verschiedene Cystein-/Serin-5-LO-Punktmutanten sowie eine 4fach Mutante (C159S/C300S/C416S/C418S-5-LO = 2D-5-LO) untersucht. C159S-, C300S-, C416S- und C418S-5-LO wurde durch Diamid nicht beeinflusst. C416S- und 2D-5-LO zeigten eine sehr starke Stimulation der 5-LO±FLAP-Leukotrienbildung nach Zugabe von Diamid. Bei C99S-, C264S- und C449S-5-LO konnte eine FLAP-gesteigerte 5-HETE-Bildung beobachtet werden. Durch Diamid kommt es zu Glutathionylierungen von zellulären Proteinen, da reduziertes Glutathion (GSH) zu reaktiveren oxidierten Glutathion (GSSG) umgesetzt wird. An der 5-LO-Oberfläche können in Folge an verschiedenen Cysteinen Glutathione binden. Durch die Glutathion-Bindung wird eine stark polare Struktur auf der 5-LO-Oberfläche eingebracht. Dadurch kommt es zu einer verminderten Membranbindung und Produktbildung der nativen 5-LO. Die 5-LO-Oberfläche der 2D-5-LO-Mutante kann an verschiedenen Positionen keine Glutathione mehr binden, es kommt zu einer stärkeren Wechselwirkung mit Membranbestandteilen und zu einer erhöhten 5-LO-Leukotrienbildung.

Für Celecoxib konnte gezeigt werden, dass neben der COX2-Hemmung auch die 5-LO-Aktivität mit einer IC_{50} von 3 bis 10 μM gehemmt werden kann (255). Im Rahmen dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen mit 5-LO±FLAP transfiziert, um den Einfluss von Celecoxib auf FLAP zu untersuchen. Celecoxib führt zu einer direkten Hemmung der 5-LO.

ML-3000 (Licofelon) wurde als dualer COX/5-LO-Inhibitor entwickelt und hemmt die 5-LO-Aktivität in intakten Zellen, aber nicht im Homogenat. Daher wurden Versuche mit 5-LO±FLAP-transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt, um den Einfluss von ML3000 auf die FLAP-gesteigerte 5-LO-Leukotrienbildung zu zeigen. Aus diesen und weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnte gefolgert werden, dass ML-3000 ein FLAP-Inhibitor ist (264).

Garsubellin A ist strukturverwandt zu Hyperforin, einem dualen COX/5-LO-Inhibitor (204). Garsubellin A hemmt die 5-LO-Aktivität im Homogenat von PMNL und am gereinigten Enzym mit einer IC_{50} von 10-30 μM . Verbindungen, die den Bicyclo[3.3.1]nonan-Grundkörper des Garsubellin A und Hyperforin enthalten, wurden auf ihr inhibitorisches Potential getestet. Es konnte gezeigt werden, dass der Bicyclo[3.3.1]nonan-Grundkörper alleine nicht für eine 5-LO-Hemmung ausreicht, sondern eine freie Carbonsäure sowie eine bis zwei Prenylierungen vorliegen müssen, um eine 5-LO-Hemmung zu erzielen. Sind diese Voraussetzungen vorhanden, wird die 5-LO-Aktivität in intakten PMNL mit einer IC_{50} von 5 μM und an gereinigter 5-LO mit 0,8 μM gehemmt.

6. Abkürzungen

A	Alanin
AA	arachidonic acid - Arachidonsäure
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcip	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	base pairs – Basenpaare
BSA	bovine serum albumin – Albumin aus Rinderserum
C	Cystein
cds	coding sequence – kodierende Sequenz
COX	Cyclooxygenase
cPLA₂	cytosolische Phospholipase A ₂
Cys	Cystein
D-MEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DNase I	Desoxyribonuklease I
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum – fötales Kälberserum
FLAP	Five-lipoxygenase activating protein - 5-LO aktivierendes Enzym
GSH	Reduziertes Glutathion (GS-H)
GSSG	Oxidiertes Glutathion (GS-SG)
HeLa	Epithelzellen eines Cervixkarzinoms
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria Browth-Medium
LO	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
PC	Phospatidylcholin
PG	Prostaglandin
PGC	PBS-Puffer versetzt mit 1 mg/ml Glucose und 1 mM CaCl ₂
PBS	phosphate buffered saline - Phosphat-Puffer versetzt mit NaCl
PB	phosphate buffer - Phosphat-Puffer
PMNL	polymorphonuclear leukocytes – Polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase A	Ribonuklease A
rpm	rounds per minute - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	sodium dodecylsulfate – Natrium Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serin
STI	soybean trypsin inhibitor – Sojabohnen Trypsin Inhibitor
TFA	trifluoroacetic acid – Trifluoressigsäure
wt	wild typ – ursprünglicher, nicht veränderter Typ
w/o	with out – ohne Zugabe

7. Geräte

ÄKTA	GE Healthcare, Amersham
Bakterienschüttler	B Braun, Certomat U
ELISA-Reader	Dynatech MR 5000
FPLC	Waters HPLC Pumpe, 486 UV-Detektor, Millenium
Heizblock	Stuart Scientific, Block Heater
HPLC	Waters 510 HPLC Pumpe, 486 UV-Detektor, 717 plus Autosampler, Millenium 3.0
Laborschüttler	Edmund Bühler, KL-2
Labor-Zentrifuge	Heraeus, Labofuge 200
MALDI-MS I	4800 MALDI TOF/TOF™, Applied Biosystems
MALDI-MS II	Voyager-DE STR™, Applied Biosystems
pH-Meßgerät	WTW Modell 521
SDS-PAGE-Apparatur	Biorad Mini-Protean 3
Sterilbank	Herasafe
Ultraschall-Homogenisierer	Bandelin, Sonoplus HD 200
Ultrazentrifuge	Beckman Optima Le-80 K, Rotor Typ
Western Blot-Apparatur	Biorad, Mini Trans-Blot cell

8. Anhang

Punktmutation in 5-LO cds	Primersequenz
C31S 5-LO frw	CTCGGCGGGCAGCAGCGAGAAGC
C31S 5-LO rev	GCTTCTCGCTGCTGCCCGCCGAG
C99S 5-LO frw	CGAGTTCGCCAGCTACCGCTGGATCAC
C99S 5-LO rev	GTGATCCAGCGGTAGCTGGGGAACTCG
C159S 5-LO frw	CGATGCCAAAAGCCACAAGGATTTACCCCG
C159S 5-LO rev	CGGGGTAAATCCTTGTGGCTTTTGGCATCG
C240S 5-LO frw	CCAGTTCCTGAATGGCAGCAACCCTGTGTTG
C240S 5-LO rev	CAACACAGGGTTGCTGCCATTCAGGAACTGG
C248S 5-LO frw	GATCCGGCGCAGCACAGAGCTGCC
C248S 5-LO rev	GGCAGCTCTGTGCTGCGCCGGATC
C264S 5-LO frw	CGGAGATGGTAGAGAGCAGCCTGGAGC
C264S 5-LO rev	GCTCCAGGCTGCTCTCTACCATCTCCG
C300S 5-LO frw	CAAACAGACCCCAGCACACTCCAGTTCCTG
C300S 5-LO rev	CAGGAAGTGGAGTGTGCTGGGGTCTGTTTTG
C310S 5-LO frw (i)	CTGGCCGCTCCCATCAGCTTGCTGTATAAG
C310S 5-LO rev (i)	CTTATACAGCAAGCTGATGGGAGCGGCCAG
C310S 5-LO frw (ii)	GGCCGCTCCCATCAGCTTGCTGTATAAGAAC
C310S 5-LO rev (ii)	GTTCTTATACAGCAAGCTGATGGGAGCGGCC
C416S 5-LO frw	CGTGAGCAGCTCATCAGCGAGTGTGGC
C416S 5-LO rev	GCCACACTCGCTGATGAGCTGCTCACG
C418S 5-LO frw	GCTCATCTGCGAGAGTGGCCTCTTTGAC
C418S 5-LO rev	GTCAAAGAGGCCACTCTCGCAGATGAGC
C416S/C418S 5-LO frw	GCAGCTCATCAGCGAGAGTGGCCTCTTTGAC
C416S/C418S 5-LO rev	GTCAAAGAGGCCACTCTCGCTGATGAGCTGC
C449S 5-LO frw	GCCTCCCTGAGCTTTCCCGAGGCC
C449S 5-LO rev	GGCCTCGGGAAAGCTCAGGGAGGC
C561S 5-LO frw	CCAGTACGACTGGAGCTCCTGGATCCC
C561S 5-LO rev	GGGATCCAGGAGCTCCAGTCGTAAGTGG
C598S 5-LO frw	GCGGCCGCTCCAGCTGGCATCTG
C598S 5-LO rev	CAGATGCCAGCTGGAGCGGCCGC

Tabelle 8.1 Mutationsprimer für side-directed mutagenesis von Cystein/Serin-Mutationen der 5-Lipoxygenase.

Anhang

Bezeichnung	Start auf 5-LO cds (bp)	Primersequenz
1045_fwd	158 - 181	CATACGACGTGACTGTGGACGAGG
1085_rev	198 - 219	GCGCTTCTCGATTCTGACCAGC
1272_fwd	385 - 409	AAGCAACACCGACGTAAAGAACTGG
1295_rev	408 - 431	CGATATTGTTTTTGGCCGTGTTTCC
1451_fwd	564 - 586	CCTGTTCATCAACCGCTTCATGC
1486_rev	600 - 621	GTCGGCGAAGTCATTCCAAGAAG
1663_fwd	776 - 798	CCACGGAGATGGTAGAGTGCAGC
1698_rev	811 - 832	GGACCTCCTGCTCCAAGCTGAG
1851_fwd	964 - 984	GTCCCCATTGCCATCCAGCTC
1883_rev	996 - 1021	GGAGGAAAATAGGGTTCTCATCTCCC
2058_fwd	1171 - 1191	CACCCCATTTTCAAGCTGCTGG
2138_rev	1251 - 1273	CCTTGTCAAAGAGGCCACACTCG
2244_fwd	1357 - 1372	GAGGCCATCAAGGCC
2286_fwd	1376 - 1399	GCATGGAGAGCAAAGAAGACATCC
2288_rev	1401 - 1425	CCCGTCGTCCCGGTAGAAGTAGTAG
2448_fwd	1561 - 1581	CGCAAGTCCTCAGGCTTCCC
2497_rev	1610 - 1632	GATCACCACGGTCAGGTACTCCG
2636_fwd	1749 - 1772	GACCATTGAGCAGATCGTGGACAC
2684_rev	1797 - 1817	CACACTGCACCCAGATGCCAG
2859_rev	1972 - 1999	CTGCCATATTACTACTTGTCCCCAGACC

Tab. 8.2 Sequenzierprimer für die kodierende Sequenz der 5-LO.

Anhang

Target	Name	Typ	Ursprung	Immunisierung	Hersteller
anti-5-LO	AK7	polyklonal	Kaninchen	denaturierte 5-LO	Dr. Olof Rådmark, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
anti-5-LO	6A12	monoklonal	CHO/Maus	denaturierte 5-LO aus MV1190-E.coli	M. Hörnig / Dr.I. Zündorf, Institut für Pharm. Biologie, Universität Frankfurt
anti-Aktin		polyklonal	Ziege	Peptid des C-Terminus	Santa Cruz Biotechnology (sc-1616, lot# J2303)
anti-FLAP		polyklonal	Ziege	FLAP-Peptid 148-161: KTISTTISPLLLIP	Abcam (ab39535)
Anti-5-LO		monoklonal	Maus	Katalog-Nr.: 610694	BD Biosciences
anti-rabbit		IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Kaninchen		Sigma
anti-mouse		IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Maus		Sigma

Tab. 8.3 *Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen.*

Anhang

	10	20	30	40	50	60
P48999_5_LO_mouse	PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLIGSAGCSEKHL LDKAFY NDFERGAVDSYDVTVD EE					
P12527_5_LO_rat	PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLIGSAGCSEKHL LDKAFY NDFERGGRDSYDVTVD EE					
P51399_5_LO_mesau	PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLIGSAGCSEKHL LDKAFY NDFERGAVDSYDVTVD EE					
P09917_5_LO_human	PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLVGSAGCSEKHL LDKPFY NDFERGAVDSYDVTVD EE					
Prim.cons.	*****:*****.*****.*****					
Prim.cons.	PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLIGSAGCSEKHL LDKAFY NDFERGAVDSYDVTVD EE					
	70	80	90	100	110	120
P48999_5_LO_mouse	LGEIYLVKIEKRKYWLHDDWYLKYITLKT PHGDYIEFPCYRWITGEGEIVLRDGR AKLAR					
P12527_5_LO_rat	LGEIYLVKIEKRKYRLHDDWYLKYITLKT PH-DYIEFPCYRWITGEGEIVLRDGC AKLAR					
P51399_5_LO_mesau	LGEIQLVRIEKRKYWLHDDWYLKYITLKT PT-DYIEFPCYRWITGEGEIVLRDGR AKLAR					
P09917_5_LO_human	LGEIQLVRIEKRKYWLNDDWYLKYITLKT PHGDYIEFPCYRWITGDVEVLRDGR AKLAR					
Prim.cons.	**** *:***** *:***** *****:***** *****					
Prim.cons.	LGEI2LV2IEKRKYWLHDDWYLKYITLKT PHGDYIEFPCYRWITGEGEIVLRDGR AKLAR					
	130	140	150	160	170	180
P48999_5_LO_mouse	DDQIHILKQHRRKELE ARQKQYRWMEWNP GFPLSIDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLN					
P12527_5_LO_rat	DDQIHILKQHRRKELE TRQKQYRWMEWNP GFPLSIDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLN					
P51399_5_LO_mesau	DDQIHILKQHRRKELE ARQKQYRWMEWNP GFPLSIDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLN					
P09917_5_LO_human	DDQIHILKQHRRKELE TRQKQYRWMEWNP GFPLSIDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLN					
Prim.cons.	*****:*****					
Prim.cons.	DDQIHILKQHRRKELE 2RQKQYRWMEWNP GFPLSIDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLN					
	190	200	210	220	230	240
P48999_5_LO_mouse	YSKAMENLFINRFMHMFQSSW HDFADFEKIFVKISNTISERVKNHWQEDLMFGYQFL NGC					
P12527_5_LO_rat	YSKAMENLFINRFMHMFQSSW HDFADFEKIFVKISNTISERVKNHWQEDLMFGYQFL NGC					
P51399_5_LO_mesau	YSKAMENLFINRFMHMFQSSW NDFADFEKIFVKISNTISERVKNHWQEDLMFGYQFL NGC					
P09917_5_LO_human	YSKAMENLFINRFMHMFQSSW NDFADFEKIFVKISNTISERVKNHWQEDLMFGYQFL NGC					
Prim.cons.	*****:***** *****					
Prim.cons.	YSKAMENLFINRFMHMFQSSW 2DFADFEKIFVKISNTISERVKNHWQEDLMFGYQFL NGC					
	250	260	270	280	290	300
P48999_5_LO_mouse	NPVLIKRC TALPPKLPVT TEMVECSLERQLSLEQEVQEGNIFIVDYELLDGIDANKTDPC					
P12527_5_LO_rat	NPVLIKRC TELPKLPVT TEMVECSLERQLSLEQEVQEGNIFIVDYELLDGIDANKTDPC					
P51399_5_LO_mesau	NPVLIKRC RELPPKLPVT TEMVECSLERHLSLEQEVQEGNIFIVDYELLDGIDANKTDPC					
P09917_5_LO_human	NPVLI RCRELPEKLPVT TEMVECSLERQLSLEQEVQEGNIFIVDFELLDGIDANKTDPC					
Prim.cons.	*****:***** *****:***** *****:***** *****					
Prim.cons.	NPVLIKRC TELP4KLPVT TEMVECSLERQLSLEQEVQEGNIFIVDYELLDGIDANKTDPC					
	310	320	330	340	350	360
P48999_5_LO_mouse	THQFLAAPICLLYKNLANKIVPIAIQLNQT PGE SNPIFLP TD SKYDWLLAKIWRSSDFH					
P12527_5_LO_rat	THQFLAAPICLLYKNLANKIVPIAIQLNQT PGE KNPIFLP TD SKYDWLLAKIWRSSDFH					
P51399_5_LO_mesau	THQFLAAPICLLYKNLANKIVPIAIQLNQT APGE KNPIFLP SD AKYDWLLAKIWRSSDFH					
P09917_5_LO_human	TLQFLAAPICLLYKNLANKIVPIAIQLNQT IPGD ENPIFLP SD AKYDWLLAKIWRSSDFH					
Prim.cons.	* ***** ***** ** : ***** : ***** *****					
Prim.cons.	THQFLAAPICLLYKNLANKIVPIAIQLNQT PGE KNPIFLP 2D2 KYDWLLAKIWRSSDFH					
	370	380	390	400	410	420
P48999_5_LO_mouse	VHQTITHLLR THLVSEVFGIAMYRQLPAVHP LFKLLVAHVRF TIAINTKAREQLICEYGL					
P12527_5_LO_rat	IHQ TITHLLR THLVSEVFGIAMYRQLPAVHP LFKLLVAHVRF TIAINTKAREQLNCEYGL					
P51399_5_LO_mesau	VHQTITHLL C THLVSEVFGIAMYRQLPAVHP IFKLLVAHVRF TIAINTKAREQLICEYGL					
P09917_5_LO_human	VHQTITHLLR THLVSEVFGIAMYRQLPAVHP LFKLLVAHVRF TIAINTKAREQLICEYGL					
Prim.cons.	:***** *****:***** ***** ** *					
Prim.cons.	VHQTITHLLR THLVSEVFGIAMYRQLPAVHP 2FKLLVAHVRF TIAINTKAREQLICEYGL					
	430	440	450	460	470	480
P48999_5_LO_mouse	FDKANATGGGGHVQM VQRAVQDL TYS SLCFPEAIKARGMD STEDMPFYFRRDGLLVWEA					
P12527_5_LO_rat	FDKANATGGGGHVQM VQRAVQDL TYS SLCFPEAIKARGMD NTE DIPYFYR RDGLLVWEA					
P51399_5_LO_mesau	FDKANATGGGGHVQM VQRAVQDL TYS SLCFPEAIKARGMD STED IPYFYR RDGLLVWEA					
P09917_5_LO_human	FDKANATGGGGHVQM VQRAVQDL TYS SLCFPEAIKARGM ESKED IPYFYR RDGLLVWEA					
Prim.cons.	*****:*****:*****:*****:*****					

Anhang

Prim.cons.	FDKANATGGGGHVQMVQRAVQDLTYSSLCFPEAIKARGMDSTEDIPYYFYRDDGLLVWEA
	490 500 510 520 530 540
P48999_5_LO_mouse	IQSFTMEVVSIIYENDQVVEEDQELQDFVKDVYVYGMGRGKASGFPKSIKSREKLSEYLT
P12527_5_LO_rat	IQSFTTEVVSIIYEDDQVVEEDQELQDFVKDVYVYGMGRGKASGFPKSIKSREKLSEYLT
P51399_5_LO_mesau	IQSFTSEVVSIIYEDDQVVMEDQELQDFVKDVYVYGMGRGKASGFPKSIKSREKLSEYLT
P09917_5_LO_human	IRTFTEEVVDIYEGDQVVEEDPELQDFVNDVYVYGMGRGKSSGFPKSVKSREQLSEYLT
	::* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:* *:*:*
Prim.cons.	IQSFT4EVVVSIIYEDDQVVEEDQELQDFVKDVYVYGMGRGKASGFPKSIKSREKLSEYLT
	550 560 570 580 590 600
P48999_5_LO_mouse	VVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAPPTMRAPPPTAKGVVTIEQIVDTLPDRGRSCWH
P12527_5_LO_rat	VVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAPPTMRAPPPTAKGVVTIEQIVDTLPDRGRSCWH
P51399_5_LO_mesau	VVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAPPTMRAPPATAKGVVTIEQIVATLPDRGRSCWH
P09917_5_LO_human	VVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAPPTMRAPPPTAKGVVTIEQIVDTLPDRGRSCWH

Prim.cons.	VVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAPPTMRAPPPTAKGVVTIEQIVDTLPDRGRSCWH
	610 620 630 640 650 660
P48999_5_LO_mouse	LGAVWALSQFQENELFLGMYPEEHFIEKPVKEAMIRFRKNLEAIVSIVIAERNKKNKLPYY
P12527_5_LO_rat	LGAVWALSQFQENELFLGMYPEEHFIEKPVKEAMIRFRKNLEAIVSIVIAERNKKNKLPYY
P51399_5_LO_mesau	LGAVWALSQFQENELFLGMYPEEHFIEKPVKEAMTRFRKNLEAIVNVIAERNKKNKLPYY
P09917_5_LO_human	LGAVWALSQFQENELFLGMYPEEHFIEKPVKEAMARFRKNLEAIVSIVIAERNKKNKLPYY

Prim.cons.	LGAVWALSQFQENELFLGMYPEEHFIEKPVKEAMIRFRKNLEAIVSIVIAERNKKNKLPYY
	670
P48999_5_LO_mouse	YLSPDRIPNSVAI
P12527_5_LO_rat	YLSPDRIPNSVAI
P51399_5_LO_mesau	YLSPDRIPNSVAI
P09917_5_LO_human	YLSPDRIPNSVAI

Prim.cons.	YLSPDRIPNSVAI

Tab. 8.5 Proteinsequenz-Vergleich humaner, Maus, Meerschweinchen und Ratten-5-LO.
 Der Vergleich wurde mit der Software ClustalW durchgeführt. Innerhalb der Konsensussequenz sind identische Aminosäuren durch „*“, ähnliche durch „:“ und schwach ähnliche durch „.“ gekennzeichnet.

Anhang

Nr.	[M+1] ⁺	Position	#MC	Sequenz	+ 1 x U-731 22	+ 2x U-731 22	+ 1x GSH	+ 2x GSH
1	5514,5885	473-519	1	DDGLLVWEAIRFTAEVVDIYYEG DQVVEEDPELQDFVNDVYYVGMGR				
2	5248,4884	2-48	1	PSYTVTVAATGSGWVAGTDDYYL SLVGSAGCSEKHLDDKPFYNDFER	5712,7923		5553,5562	
3	5203,5444	534-580	1	EQLSEYLTYYIFTASAQHAAVNFQ QYDWCSWMPNAPPTMRAPPPTAK	5667,8483		5508,6122	
4	5166,6417	270-315	1	QLSLEQEYQQGNIFYDFELLDGI ANKTDPCTLQFLA.APICLLYK	5630,9456		5471,7095	
5	4784,3024	532-573	1	SREGLSEYLTYYIFTASAQHAAV NFGQYDWCSWMPNAPPTMR	5248,6063		5089,3702	
6	4763,3793	256-297	1	LPVTTMEMVECSLERQLSLEQEYQ QGNIFYDFELLDGIANK	5227,6832		5068,4471	
7	4721,2777	598-637	1	SCWHLGAVWALSQFGENELFLG MYPEEHFIEKPVKEAMAR	5185,5816		5026,3455	
8	4541,1692	534-573	0	EQLSEYLTYYIFTASAQHAAVNF GQYDWCSWMPNAPPTMR	5005,4731		4846,2370	
9	4460,0550	484-521	1	TFTAEVVDIYYEGDQVVEEDPEL QDFVNDVYYVGMGR				
10	4376,1419	596-632	1	GRSCWHLGAVWALSQFGENEL FLGMYPEEHFIEKPVK	4840,4458		4681,2097	
11	4246,9324	484-519	0	TFTAEVVDIYYEGDQVVEEDPEL QDFVNDVYYVGMGR				
12	4163,0193	598-632	0	SCWHLGAVWALSQFGENELFL GMYPEEHFIEKPVK	4627,3232		4468,0871	
13	3981,9504	36-69	1	HLLDKPFYNDFERGAVDSYDVT VDEELGEIQLVR				
14	3924,8982	215-247	1	ISNTISERVMINHWGEDLMFGYGF LNGCNPVLR	4389,2021		4229,9660	
15	3591,9460	321-352	1	IVPIAIGLNQIPGDENPIFLPSDAKY DWLLAK				
16	3573,6729	2-35	0	PSYTVTVAATGSGWVAGTDDYY LSLVGSAGCSEK	4037,9768		3878,7407	
17	3394,7477	357-385	1	SSDFHVHQITITHLLRTHLVSEVF GIAMYR				
18	3255,4485	185-210	1	AMENLFINRFMHMFQSSVWVNDFA DFEK	3719,7524		3560,5163	
19	3242,7783	316-345	1	NLANKIVPIAIGLNQIPGDENPIFL PSDAK				
20	3180,5328	223-248	1	VMNHWGEDLMFGYGFVFLNGCNP VLIRR	3644,8367		3485,6006	
21	3175,6157	270-297	0	QLSLEQEYQQGNIFYDFELLDGI DANK				
22	3024,4317	223-247	0	VMNHWGEDLMFGYGFVFLNGCNP VLIRR	3488,7356		3329,4995	
23	2865,4028	90-113	1	TPHGDYIEFFPCYRVMITGDVEVVL R	3329,7067		3170,4706	
24	2861,3491	413-439	1	EQLICECGLFDKANATGGGGHV GMVQR	3325,6530	3789,9569	3166,4169	3471,4847
25	2753,4959	372-395	1	THLVSEVFGIAMYRQLPAVHPIFK				
26	2702,4763	321-345	0	IVPIAIGLNQIPGDENPIFLPSDAK				

Anhang

Nr.	PI+I+	Position	ABC	Sequenz	+ 1x U-F3122	+ 2x U-F3122	+ 1x GSH	+ 2x GSH
27	2677,3566	49-72	1	GAVDSYDVTVDEELGEIQLVRIEK				
28	2654,2206	194-214	1	FMHMFQSSVMNDFADFEKIFVK				
29	2550,3458	298-320	1	TDPCTLQFLAAPICLLYKNLANK	3014,6497	3478,9536	2855,4136	3160,4814
30	2533,2397	464-483	1	EDIPYYFYRDDGLLVWEAIR				
31	2407,1553	249-289	1	CTELPEKLPVTTMVECSLER	2871,4592	3335,7631	2712,2231	3017,2909
32	2345,2625	353-371	1	MWRSSDFHVBHTITHLLR				
33	2317,2761	574-595	1	APPPTAKGVVTEIQIVDTLPDR				
34	2307,1350	49-69	0	GAVDSYDVTVDEELGEIQLVIR				
35	2238,0800	142-159	1	QYRMMMEWNPGFPLSIDAK				
36	2230,1325	175-193	1	GVDFVLNYSKAMENLFINR				
37	2216,0844	85-102	1	YITLKTTPHGDYIEFPCYR	2680,3883		2521,1522	
38	2166,9048	194-210	0	FMHMFQSSVMNDFADFEK				
39	2159,0201	145-162	1	VMEWNPGFPLSIDAKCHK	2623,3240		2464,0879	
40	2109,1015	657-674	1	QLPYYLSPDRIPNSVAI				
41	2104,0233	167-184	1	DIGFDSEKGVDFVLNYSK				
42	2034,0371	75-89	1	YWLNDWVYLKYITLK				
43	2010,0438	298-315	0	TDPCTLQFLAAPICLLYK	2474,3477	2938,6516	2315,1116	2620,1794
44	1938,1799	386-402	1	QLPAVHPFKLLVAHVIR				
45	1900,9547	440-456	1	AMKDLTYASLCFPEAIK	2365,2586		2206,0225	
46	1868,0235	581-597	1	GVVTEIQIVDTLPDRGR				
47	1812,8955	425-442	1	ANATGGGGHVQMVQRAMK				
48	1797,9203	443-458	1	DLTYASLCFPEAIKAR	2262,2242		2102,9881	
49	1797,8152	459-472	1	GMESKEDIPYYFYR				
50	1790,9296	357-371	0	SSDFHVBHTITHLLR				
51	1790,8570	145-159	0	VMEWNPGFPLSIDAK				
52	1696,0268	396-410	1	LLVAHVRFIAINTK				
53	1693,8332	36-48	0	HLLDKPFYNDFER				
54	1654,9010	581-595	0	GVVTEIQIVDTLPDR				
55	1624,7821	411-424	1	AREQLICECGLFDK	2089,0860	2553,3899	1929,8499	2234,9177
56	1622,8359	372-385	0	THLVSEVFGIAMYR				
57	1614,8598	103-116	1	WMTGDVEVYLRDGR				
58	1606,7815	256-269	0	LPVTTMVECSLER	2071,0854		1911,8493	
59	1597,7104	90-102	0	TPHGDYIEFPCYR	2062,0143		1902,7782	
60	1570,7821	443-456	0	DLTYASLCFPEAIK	2035,0860		1875,8499	
61	1555,8802	641-654	1	NLEAIVSVAERNK				
62	1543,7580	74-84	1	KYWLNDDWVYLK				
63	1542,7951	656-667	1	KQLPYYLSPDR				
64	1482,7230	425-439	0	ANATGGGGHVQMVQR				
65	1462,8205	346-356	1	YDAMLLAKIMVVR				
66	1462,7172	163-174	1	DLPRDIQFDSEK				
67	1441,8373	640-652	1	KNLEAIVSVAIER				
68	1415,6630	75-84	0	YWLNDWVYLK				
69	1414,7001	657-667	0	QLPYYLSPDR				
70	1406,8002	211-222	1	IFVKISNTISER				
71	1402,7549	122-132	1	DDQIHILKQHR				
72	1397,6439	413-424	0	EQLICECGLFDK	1861,9478	2326,2517	1702,7117	2007,7795
73	1321,7586	119-129	1	LARDDQIHILK				
74	1313,7423	641-652	0	NLEAIVSVAIER				
75	1286,7103	103-113	0	WMTGDVEVYLR				
76	1286,6739	473-483	0	DDGLLVWEAIR				

Anhang

Nr.	Wahlzettel-Nr.	Position	AMC	Sequenz	+1x U-F3122	+2x U-F31 22	+1x GSH	+2x GSH
77	1265,5837	464-472	0	EDIPYYFYR				
78	1149,6778	386-395	0	QLPAVHPIFK				
79	1141,5888	175-184	0	GVDFVLNYSK				
80	1134,6629	403-412	1	FTIAINTKAR				
81	1107,5615	185-193	0	AMENLFINR				
82	981,5363	122-129	0	DDQIHILK				
83	981,4523	167-174	0	DIGFDSEK				
84	975,4928	248-255	1	RCTELPEK	1439,7967		1280,5606	
85	936,5149	523-531	1	SSGFPKSVK				
86	919,4843	215-222	0	ISNTISER				
87	908,4876	346-352	0	YDMVLLAK				
88	907,5247	403-410	0	FTIAINTK				
89	903,4894	135-141	1	ELETRQK				
90	880,4458	633-639	1	EAMARFR				
91	868,4458	160-166	1	CHKDLPR	1332,7497		1173,5136	
92	819,3917	249-255	0	CTELPEK	1283,6956		1124,4595	
93	807,5199	396-402	0	LLVAHVR				
94	778,3876	457-463	1	ARGMESK				
95	775,4308	134-139	1	KELETR				
96	750,4144	522-528	1	KSSGFPK				
97	722,3944	140-144	1	QKQYR				
98	713,4192	668-674	0	IPNSVAI				
99	681,3930	574-580	0	APPPTAK				
100	647,3359	135-139	0	ELETR				
101	637,3919	85-89	0	YITLK				
102	622,3195	523-528	0	SSGFPK				
103	596,3375	130-133	1	QHRR				
104	577,2762	633-637	0	EAMAR				
105	576,3464	529-533	1	SVKSR				
106	573,3507	353-356	0	MVVR				
107	559,3198	316-320	0	NLANK				
108	558,3722	117-121	1	AKLAR				
109	551,2494	459-463	0	GMESK				
110	546,2994	114-118	1	DGRAK				
111	545,3405	70-73	1	IEKR				
112	506,3337	211-214	0	IFVK				
113	500,2827	163-166	0	DLPR				
114	466,2408	142-144	0	QYR				
115	450,2823	638-640	1	FRK				
116	440,2364	130-132	0	QHR				
117	389,2507	653-655	1	NKK				
118	389,2394	70-72	0	IEK				
119	387,1809	160-162	0	CHK	851,4848		692,2487	
120	360,2354	520-522	1	GRK				
121	359,2401	119-121	0	LAR				
122	349,1904	440-442	0	AMK				
123	347,1673	114-116	0	DGR				
124	333,2132	529-531	0	SVK				
125	322,1873	638-639	0	FR				
126	303,2139	73-74	1	RK				

Anhang

Nr.	[M+1] ⁺	Position	#MC	Sequenz	+ 1x U-73122	+ 2x U-73122	+ 1x GSH	+ 2x GSH
127	303,2139	133-134	1	RK				
128	275,2077	655-656	1	KK				
129	275,1714	140-141	0	QK				
130	262,1510	532-533	0	SR				
131	261,1557	653-654	0	NK				
132	246,1560	411-412	0	AR				
133	246,1560	457-458	0	AR				
134	232,1404	520-521	0	GR				
135	232,1404	596-597	0	GR				
136	218,1499	117-118	0	AK				
137	175,1189	73-73	0	R				
138	175,1189	133-133	0	R				
139	175,1189	248-248	0	R				
140	147,1128	74-74	0	K				
141	147,1128	134-134	0	K				
142	147,1128	522-522	0	K				
143	147,1128	640-640	0	K				
144	147,1128	655-655	0	K				
145	147,1128	656-656	0	K				

Tab. 8.6 Peptidmassen-Vorhersage für Trypsin-verdaute 5-LO kombiniert mit den Massen für Peptide, die U-73122 bzw. Glutathion gebunden haben.

Massenliste nach Verdau von 5-LO mit Trypsin. Angegeben sind die Massen [M+1]⁺ der resultierenden Massen, die Position, die Nummer des nicht-geschnittenen Peptide (#MC, Number of miscleaveges) und die Peptidsequenz. Anschließend sind die Massen aufgelistet, die nach kovalenter Bindung von U-73122 oder GSH an die Cysteine bzw. Peptide der 5-LO resultieren können.

Anhang

392.3003	393.2889	400.2870	429.0579	433.0413	441.0453
443.2813	448.3599	488.3359	490.4321	492.3647	493.3590
495.3390	497.3675	504.3504	573.3731	589.3865	592.3719
617.0812	624.3905	644.0577	650.0589	666.0367	682.0158
697.9921	743.4626	807.5361	855.0664	871.0440	877.0502
893.0240	907.2516	908.4878	909.4839	1107.5731	1110.5840
1149.6759	1237.6342	1247.5869	1248.5892	1265.5929	1269.6508
1281.5960	1286.6832	1290.6867	1313.7499	1318.6759	1349.3452
1350.3531	1395.6364	1397.6612	1414.7100	1415.6896	1482.7245
1543.7624	1570.7874	1597.7116	1599.7239	1600.7350	1607.8382
1610.8371	1622.8179	1638.8308	1654.8985	1693.8338	1720.8689
1721.8617	1722.8545	1738.8795	1790.9221	1797.8145	1806.9064
1867.9776	2092.0614	2109.0817	2237.1718	2238.1801	2307.1054
2405.1099	2409.1187	2860.3102	2861.3030		

Tab. 8.7 Massenliste eines MALDI-MS-Experiments von Trypsin-verdauter 5-LO Es wurde mittels MALDI-MS Voyager DE PRO gemessen und die erhaltenen Massen wurden auf die charakteristischen Peaks des Trypsins kalibriert.

851.5485	1107.6196	1265.6398	1269.7338	1286.7386	1300.7155
1313.7931	1318.7226	1441.8862	1543.8013	1597.7414	1598.8437
1607.8734	1622.8679	1637.8778	1638.8716	1654.9339	1693.8654
1721.8830	1738.9115	1774.8269	1790.9543	1797.8354	1806.9372
1812.8711	1867.0031	2062.0101	2092.0828	2109.1006	2166.9200
2237.1904	2307.1350	2405.1357	2561.2429	2653.2610	3165.4564

Tab. 8.8 Massenliste eines MALDI-MS-Experiments von Trypsin-verdauter 5-LO, vorab inkubiert mit 10 μ M U-73122. Es wurde mittels MALDI-MS Voyager DE PRO gemessen und die erhaltenen Massen wurden auf die charakteristischen Peaks des Trypsins kalibriert.

289.1376	294.1187	311.0592	311.2955	333.1304	335.1455
362.1151	379.1370	401.1162	420.1709	436.1610	439.0639
441.0629	443.3103	444.3058	461.0616	573.3920	650.0862
666.0603	682.0311	908.5083	1107.5793	1149.6920	1237.6279
1265.5994	1269.6245	1286.6893	1313.7501	1397.6657	1414.7048
1415.6869	1416.6791	1482.7246	1543.7592	1570.7855	1597.7094
1607.8357	1622.8227	1638.8273	1654.8975	1678.7219	1693.8338
1720.8549	1721.8447	1722.8443	1738.8707	1790.9123	1867.9749
1875.8479	1902.7766	2092.0498	2109.0753	2237.1646	2307.1095
2405.1034	2408.1128				

Tab. 8.9 Massenliste eines MALDI-MS-Experiments von Trypsin-verdauter 5-LO, vorab inkubiert mit 1 mM GSH. Es wurde mittels MALDI-MS Voyager DE PRO gemessen und die erhaltenen Massen wurden auf die charakteristischen Peaks des Trypsins kalibriert.

9. Literatur

- (1) Feisst, C.; Albert, D.; Steinhilber, D.; Werz, O. The aminosteroid phospholipase C antagonist U-73122 (1-[6-[[17-beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione) potently inhibits human 5-lipoxygenase in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 1751-1757.
- (2) Kellaway, C.; Trethewie, E. R. The liberation of a slow reacting smooth-muscle stimulating substance in anaphylaxis. *Q J Exp Physiol* **1940**, *30*, 121-145.
- (3) Brocklehurst, W. E. The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J Physiol* **1960**, *151*, 416-435.
- (4) Orange, R. P.; Murphy, R. C.; Karnovsky, M. L.; Austen, K. F. The physicochemical characteristics and purification of slow-reacting substance of anaphylaxis. *J Immunol* **1973**, *110*, 760-770.
- (5) Bach, M. K.; Brashler, J. R. In vivo and in vitro production of a slow reacting substance in the rat upon treatment with calcium ionophores. *J Immunol* **1974**, *113*, 2040-2044.
- (6) Borgeat, P.; Samuelsson, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 3213-3217.
- (7) Borgeat, P.; Samuelsson, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 2148-2152.
- (8) Kuhn, H.; Thiele, B. J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **1999**, *449*, 7-11.
- (9) Brash, A. R.; Boeglin, W. E.; Chang, M. S. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 6148-6152.
- (10) Dailey, L. A.; Imming, P. 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr Med Chem* **1999**, *6*, 389-398.
- (11) Bürkert, E.; Arnold, C.; Hammarberg, T.; Rådmark, O.; Steinhilber, D. et al. The C2-like beta-barrel domain mediates the Ca²⁺-dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 42846-42853.
- (12) Nalefski, E. A.; Falke, J. J. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **1996**, *5*, 2375-2390.
- (13) Hörnig, C. C2-Domänen; Steinhilber, V. A. Ed.: Frankfurt / Main, 2004.
- (14) Rådmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, *68-69*, 211-234.
- (15) Gillmor, S. A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E.; Browner, M. F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 1003-1009.
- (16) Hemak, J.; Gale, D.; Brock, T. G. Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme. *J Mol Model* **2002**, *8*, 102-112.
- (17) Choi, J.; Chon, J. K.; Kim, S.; Shin, W. Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* **2008**, *70*, 1023-1032.
- (18) Funk, C. D.; Hoshiko, S.; Matsumoto, T.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2587-2591.

- (19) Sun, D.; McDonnell, M.; Chen, X. S.; Lakkis, M. M.; Li, H. et al. Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 33540-33547.
- (20) Hoshiko, S.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 9073-9077.
- (21) Silverman, E. S.; Du, J.; De Sanctis, G. T.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. et al. Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1998**, *19*, 316-323.
- (22) Werz, O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2002**, *1*, 23-44.
- (23) Steinhilber, D.; Brungs, M.; Werz, O.; Wiesenberg, I.; Danielsson, C. et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 7037-7040.
- (24) Matsumoto, T.; Funk, C. D.; Rådmark, O.; Hoog, J. O.; Jornvall, H. et al. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 26-30.
- (25) Steinhilber, D. 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm Acta Helv* **1994**, *69*, 3-14.
- (26) Janssen-Timmen, U.; Vickers, P. J.; Wittig, U.; Lehmann, W. D.; Stark, H. J. et al. Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 6966-6970.
- (27) Spanbroek, R.; Stark, H. J.; Janssen-Timmen, U.; Kraft, S.; Hildner, M. et al. 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 663-668.
- (28) Su, A. I.; Cooke, M. P.; Ching, K. A.; Hakak, Y.; Walker, J. R. et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**.
- (29) Steinhilber, D.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 5984-5988.
- (30) Brungs, M.; Rådmark, O.; Samuelsson, B.; Steinhilber, D. On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D3, retinoic acid, DMSO and TGF beta. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *205*, 1572-1580.
- (31) Brungs, M.; Rådmark, O.; Samuelsson, B.; Steinhilber, D. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 107-111.
- (32) Silverman, E. S.; Drazen, J. M. The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* **1999**, *111*, 525-536.
- (33) Uhl, J.; Klan, N.; Rose, M.; Entian, K. D.; Werz, O. et al. The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 4374-4379.
- (34) Klan, N.; Seuter, S.; Schnur, N.; Jung, M.; Steinhilber, D. Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity. *Biol Chem* **2003**, *384*, 777-785.
- (35) Hammarberg, T.; Rådmark, O. 5-Lipoxygenase Binds Calcium. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4441-4447.
- (36) Hammarberg, T.; Provost, P.; Persson, B.; Rådmark, O. The N-terminal Domain of 5-Lipoxygenase Binds Calcium and Mediates Calcium Stimulation of Enzyme Activity. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 38787-38793.
- (37) Funk, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* **2001**, *294*, 1871-1875.

- (38) Borgeat, P.; Naccache, P. H. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄. *Clin Biochem* **1990**, *23*, 459-468.
- (39) Ohd, J. F.; Wikstrom, K.; Sjolander, A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 1007-1018.
- (40) Kanaoka, Y.; Boyce, J. A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* **2004**, *173*, 1503-1510.
- (41) O'Flaherty, J. T.; Taylor, J. S.; Thomas, M. J. Receptors for the 5-oxo class of eicosanoids in neutrophils. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 32535-32541.
- (42) Ghosh, J.; Myers, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 13182-13187.
- (43) Miller, T. A.; Ghosh, J.; Myers, C. E.; Macdonald, T. L. 5-HETE congeners as modulators of cell proliferation. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 1913-1916.
- (44) O'Flaherty, J. T.; Taylor, J. S.; Kuroki, M. The coupling of 5-oxo-eicosanoid receptors to heterotrimeric G proteins. *J Immunol* **2000**, *164*, 3345-3352.
- (45) Hosoi, T.; Koguchi, Y.; Sugikawa, E.; Chikada, A.; Ogawa, K. et al. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem* **2002**, *277*, 31459-31465.
- (46) McMahan, B.; Godson, C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol* **2004**, *286*, F189-201.
- (47) Chiang, N.; Arita, M.; Serhan, C. N. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2005**, *73*, 163-177.
- (48) Peters-Golden, M.; Brock, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett* **2001**, *487*, 323-326.
- (49) Werz, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med* **2007**, *73*, 1331-1357.
- (50) Jakschik, B. A.; Sun, F. F.; Lee, L.; Steinhoff, M. M. Calcium stimulation of a novel lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **1980**, *95*, 103-110.
- (51) Aharony, D.; Stein, R. L. Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 11512-11519.
- (52) Rouzer, C. A.; Samuelsson, B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, 6040-6044.
- (53) Shimizu, T.; Izumi, T.; Seyama, Y.; Tadokoro, K.; Rådmark, O. et al. Characterization of leukotriene A₄ synthase from murine mast cells: evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 4175-4179.
- (54) Skorey, K. I.; Gresser, M. J. Calcium Is Not Required for 5-Lipoxygenase Activity at High Phosphatidyl Choline Vesicle Concentrations. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8027-8034.
- (55) Reddy, K. V.; Hammarberg, T.; Rådmark, O. Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1840-1848.
- (56) Percival, M. D.; Denis, D.; Riendeau, D.; Gresser, M. J. Investigation of the mechanism of non-turnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase. Inactivation by H₂O₂ and inhibition by metal ions. *Eur J Biochem* **1992**, *210*, 109-117.

- (57) Noguchi, M.; Miyano, M.; Matsumoto, T.; Noma, M. Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA₄ synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1215*, 300-306.
- (58) Kulkarni, S.; Das, S.; Funk, C. D.; Murray, D.; Cho, W. Molecular Basis of the Specific Subcellular Localization of the C₂-like Domain of 5-Lipoxygenase. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 13167-13174.
- (59) Schatz-Munding, M.; Hatzelmann, A.; Ullrich, V. The involvement of extracellular calcium in the formation of 5-lipoxygenase metabolites by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* **1991**, *197*, 487-493.
- (60) Sailer, E. R.; Schweizer, S.; Boden, S. E.; Ammon, H. P.; Safayhi, H. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* **1998**, *256*, 364-368.
- (61) Falguyret, J. P.; Denis, D.; Macdonald, D.; Hutchinson, J. H.; Riendeau, D. Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling and enzyme immobilization. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13603-13611.
- (62) Noguchi, M.; Miyano, M.; Matsumoto, T. Physicochemical characterization of ATP binding to human 5-lipoxygenase. *Lipids* **1996**, *31*, 367-371.
- (63) Ochi, K.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Taniguchi, K.; Miyamoto, T. Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 5754-5758.
- (64) Ford-Hutchinson, A. W.; Gresser, M.; Young, R. N. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* **1994**, *63*, 383-417.
- (65) Rizo, J.; Sudhof, T. C. C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 15879-15882.
- (66) Rouzer, C. A.; Shimizu, T.; Samuelsson, B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: characterization of a membrane-associated stimulatory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, 7505-7509.
- (67) Goetze, A. M.; Fayer, L.; Bouska, J.; Bornemeier, D.; Carter, G. W. Purification of a mammalian 5-lipoxygenase from rat basophilic leukemia cells. *Prostaglandins* **1985**, *29*, 689-701.
- (68) Hogaboom, G. K.; Cook, M.; Newton, J. F.; Varrichio, A.; Shorr, R. G. et al. Purification, characterization, and structural properties of a single protein from rat basophilic leukemia (RBL-1) cells possessing 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthetase activities. *Mol Pharmacol* **1986**, *30*, 510-519.
- (69) Puustinen, T.; Scheffer, M. M.; Samuelsson, B. Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1988**, *960*, 261-267.
- (70) Riendeau, D.; Falguyret, J. P.; Meisner, D.; Sherman, M. M.; Laliberte, F. et al. Interfacial catalysis and production of a high ratio of leukotriene A₄ to 5-HPETE by 5-lipoxygenase in a coupled assay with phospholipase A₂. *J Lipid Mediat* **1993**, *6*, 23-30.
- (71) Noguchi, M.; Miyano, M.; Kuhara, S.; Matsumoto, T.; Noma, M. Interfacial kinetic reaction of human 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* **1994**, *222*, 285-292.
- (72) Chen, X. S.; Funk, C. D. The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 811-818.
- (73) Pande, A. H.; Moe, D.; Nemecek, K. N.; Qin, S.; Tan, S. et al. Modulation of human 5-lipoxygenase activity by membrane lipids. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14653-14666.

- (74) Pande, A. H.; Qin, S.; Tatulian, S. A. Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase. *Biophys J* **2005**, *88*, 4084-4094.
- (75) Qiu, Z. H.; Gijon, M. A.; de Carvalho, M. S.; Spencer, D. M.; Leslie, C. C. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 8203-8211.
- (76) Gijon, M. A.; Spencer, D. M.; Kaiser, A. L.; Leslie, C. C. Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Cell Biol* **1999**, *145*, 1219-1232.
- (77) Walther, M.; Anton, M.; Wiedmann, M.; Fletterick, R.; Kuhn, H. The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 27360-27366.
- (78) Hörnig, C.; Albert, D.; Fischer, L.; Hörnig, M.; Rådmark, O. et al. 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 26913-26921.
- (79) Werz, O.; Klemm, J.; Samuelsson, B.; Rådmark, O. 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 5261-5266.
- (80) Werz, O.; Bürkert, E.; Fischer, L.; Szellas, D.; Dishart, D. et al. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J* **2002**, *16*, 1441-1443.
- (81) Luo, M.; Jones, S. M.; Phare, S. M.; Coffey, M. J.; Peters-Golden, M. et al. Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 41512-41520.
- (82) Peters-Golden, M.; McNish, R. W.; Sporn, P. H.; Balazovich, K. Basal activation of protein kinase C in rat alveolar macrophages: implications for arachidonate metabolism. *Am J Physiol* **1991**, *261*, 462-471.
- (83) Lepley, R. A.; Muskardin, D. T.; Fitzpatrick, F. A. Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 6179-6184.
- (84) Lepley, R. A.; Fitzpatrick, F. A. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks activation and redistribution of 5-lipoxygenase in HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* **1996**, *331*, 141-144.
- (85) Lee, J. C.; Kumar, S.; Griswold, D. E.; Underwood, D. C.; Votta, B. J. et al. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* **2000**, *47*, 185-201.
- (86) Werz, O.; Klemm, J.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. *J Leukoc Biol* **2001**, *70*, 830-838.
- (87) Werz, O.; Szellas, D.; Steinhilber, D.; Rådmark, O. Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* **2002**, *277*, 14793-14800.
- (88) Provost, P.; Samuelsson, B.; Rådmark, O. Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 1881-1885.
- (89) Provost, P.; Doucet, J.; Stock, A.; Gerisch, G.; Samuelsson, B. et al. Coactosin-like protein, a human F-actin-binding protein: critical role of lysine-75. *Biochem J* **2001**, *359*, 255-263.

- (90) Provost, P.; Doucet, J.; Hammarberg, T.; Gerisch, G.; Samuelsson, B. et al. 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 16520-16527.
- (91) Brock, T. G. Capturing proteins that bind polyunsaturated fatty acids: demonstration using arachidonic acid and eicosanoids. *Lipids* **2008**, *43*, 161-169.
- (92) Liu, L.; Wei, Z.; Wang, Y.; Wan, M.; Cheng, Z. et al. Crystal structure of human coactosin-like protein. *J Mol Biol* **2004**, *344*, 317-323.
- (93) Ewing, R. M.; Chu, P.; Elisma, F.; Li, H.; Taylor, P. et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* **2007**, *3*, 89.
- (94) Zhou, X. Z.; Lu, K. P. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **2001**, *107*, 347-359.
- (95) Nakamura, M.; Zhou, X. Z.; Kishi, S.; Kosugi, I.; Tsutsui, Y. et al. A specific interaction between the telomeric protein Pin2/TRF1 and the mitotic spindle. *Curr Biol* **2001**, *11*, 1512-1516.
- (96) Kishi, S.; Zhou, X. Z.; Ziv, Y.; Khoo, C.; Hill, D. E. et al. Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 29282-29291.
- (97) Kibel, A.; Iliopoulos, O.; DeCaprio, J. A.; Kaelin, W. G., Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **1995**, *269*, 1444-1446.
- (98) Li, Z.; Na, X.; Wang, D.; Schoen, S. R.; Messing, E. M. et al. Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 4656-4662.
- (99) Osler, M. E.; Zierath, J. R. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Endocrinology* **2008**, *149*, 935-941.
- (100) Peters, R. T.; Liao, S. M.; Maniatis, T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* **2000**, *5*, 513-522.
- (101) MacRae, I. J.; Ma, E.; Zhou, M.; Robinson, C. V.; Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 512-517.
- (102) Tijsterman, M.; Plasterk, R. H. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* **2004**, *117*, 1-3.
- (103) Rossi, J. J. Mammalian Dicer finds a partner. *EMBO Rep* **2005**, *6*, 927-929.
- (104) MacRae, I. J.; Zhou, K.; Li, F.; Repic, A.; Brooks, A. N. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **2006**, *311*, 195-198.
- (105) Takeshita, D.; Zenno, S.; Lee, W. C.; Nagata, K.; Saigo, K. et al. Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. *J Mol Biol* **2007**, *374*, 106-120.
- (106) Amarzguioui, M.; Rossi, J. J. Principles of Dicer substrate (D-siRNA) design and function. *Methods Mol Biol* **2008**, *442*, 3-10.
- (107) Dance, M.; Montagner, A.; Salles, J. P.; Yart, A.; Raynal, P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal* **2008**, *20*, 453-459.
- (108) Schlaepfer, D. D.; Hanks, S. K.; Hunter, T.; van der Geer, P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **1994**, *372*, 786-791.
- (109) McDonald, C. B.; Seldeen, K. L.; Deegan, B. J.; Lewis, M. S.; Farooq, A. Grb2 adaptor undergoes conformational change upon dimerization. *Arch Biochem Biophys* **2008**, in press.

- (110) Schiering, N.; Casale, E.; Caccia, P.; Giordano, P.; Battistini, C. Dimer formation through domain swapping in the crystal structure of the Grb2-SH2-Ac-pYVNV complex. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13376-13382.
- (111) Birge, R. B.; Knudsen, B. S.; Besser, D.; Hanafusa, H. SH2 and SH3-containing adaptor proteins: redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes Cells* **1996**, *1*, 595-613.
- (112) Lim, W. A.; Richards, F. M.; Fox, R. O. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* **1994**, *372*, 375-379.
- (113) Marengere, L. E.; Songyang, Z.; Gish, G. D.; Schaller, M. D.; Parsons, J. T. et al. SH2 domain specificity and activity modified by a single residue. *Nature* **1994**, *369*, 502-505.
- (114) Lepley, R. A.; Fitzpatrick, F. A. 5-Lipoxygenase contains a functional Src homology 3-binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 24163-24168.
- (115) Maignan, S.; Guilloteau, J. P.; Fromage, N.; Arnoux, B.; Becquart, J. et al. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* **1995**, *268*, 291-293.
- (116) Wurthner, J. U.; Frank, D. B.; Felici, A.; Green, H. M.; Cao, Z. et al. Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 19495-19502.
- (117) Gijon, M. A.; Leslie, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol* **1999**, *65*, 330-336.
- (118) Bingham, C. O., 3rd; Austen, K. F. Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation. *Proc Assoc Am Physicians* **1999**, *111*, 516-524.
- (119) Six, D. A.; Dennis, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1488*, 1-19.
- (120) Balsinde, J.; Bianco, I. D.; Ackermann, E. J.; Conde-Frieboes, K.; Dennis, E. A. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 8527-8531.
- (121) Alonso, F.; Henson, P. M.; Leslie, C. C. A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **1986**, *878*, 273-280.
- (122) Kramer, R. M.; Checani, G. C.; Deykin, A.; Pritzker, C. R.; Deykin, D. Solubilization and properties of Ca²⁺-dependent human platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1986**, *878*, 394-403.
- (123) Dessen, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1488*, 40-47.
- (124) Diez, E.; Louis-Flamberg, P.; Hall, R. H.; Mayer, R. J. Substrate specificities and properties of human phospholipases A2 in a mixed vesicle model. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 18342-18348.
- (125) Leslie, C. C. Kinetic properties of a high molecular mass arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 that exhibits lysophospholipase activity. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 11366-11371.
- (126) Reynolds, L. J.; Hughes, L. L.; Louis, A. I.; Kramer, R. M.; Dennis, E. A. Metal ion and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1167*, 272-280.

- (127) Lin, L. L.; Lin, A. Y.; DeWitt, D. L. Interleukin-1 alpha induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 23451-23454.
- (128) Schievella, A. R.; Regier, M. K.; Smith, W. L.; Lin, L. L. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 30749-30754.
- (129) de Carvalho, M. G.; McCormack, A. L.; Olson, E.; Ghomashchi, F.; Gelb, M. H. et al. Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 6987-6997.
- (130) Lin, L. L.; Wartmann, M.; Lin, A. Y.; Knopf, J. L.; Seth, A. et al. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **1993**, *72*, 269-278.
- (131) Rouzer, C. A.; Ford-Hutchinson, A. W.; Morton, H. E.; Gillard, J. W. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J Biol Chem* **1990**, *265*, 1436-1442.
- (132) Miller, D. K.; Gillard, J. W.; Vickers, P. J.; Sadowski, S.; Leveille, C. et al. Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* **1990**, *343*, 278-281.
- (133) Kennedy, B. P.; Diehl, R. E.; Boie, Y.; Adam, M.; Dixon, R. A. Gene characterization and promoter analysis of the human 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Biol Chem* **1991**, *266*, 8511-8516.
- (134) Dixon, R. A.; Diehl, R. E.; Opas, E.; Rands, E.; Vickers, P. J. et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **1990**, *343*, 282-284.
- (135) Peters-Golden, M.; McNish, R. W. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, *196*, 147-153.
- (136) Woods, J. W.; Evans, J. F.; Ethier, D.; Scott, S.; Vickers, P. J. et al. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* **1993**, *178*, 1935-1946.
- (137) Woods, J. W.; Coffey, M. J.; Brock, T. G.; Singer, II; Peters-Golden, M. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* **1995**, *95*, 2035-2046.
- (138) Brock, T. G.; McNish, R. W.; Peters-Golden, M. Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 21652-21658.
- (139) Pouliot, M.; McDonald, P. P.; Krump, E.; Mancini, J. A.; McColl, S. R. et al. Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem* **1996**, *238*, 250-258.
- (140) Coffey, M.; Peters-Golden, M.; Fantone, J. C., 3rd; Sporn, P. H. Membrane association of active 5-lipoxygenase in resting cells. Evidence for novel regulation of the enzyme in the rat alveolar macrophage. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 570-576.
- (141) Kargman, S.; Vickers, P. J.; Evans, J. F. A23187-induced translocation of 5-lipoxygenase in osteosarcoma cells. *J Cell Biol* **1992**, *119*, 1701-1709.
- (142) Hatzelmann, A.; Fruchtmann, R.; Mohrs, K. H.; Raddatz, S.; Muller-Peddinghaus, R. Mode of action of the new selective leukotriene synthesis inhibitor BAY X 1005 ((R)-2-[4-(quinolin-2-yl-methoxy)phenyl]-2-cyclopentyl acetic acid) and structurally related compounds. *Biochem Pharmacol* **1993**, *45*, 101-111.

- (143) Brock, T. G.; McNish, R. W.; Peters-Golden, M. Capacity for repeatable leukotriene generation after transient stimulation of mast cells and macrophages. *Biochem J* **1998**, *329* (Pt 3), 519-525.
- (144) Mancini, J. A.; Abramovitz, M.; Cox, M. E.; Wong, E.; Charleson, S. et al. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett* **1993**, *318*, 277-281.
- (145) Hatzelmann, A.; Goossens, J.; Fruchtmann, R.; Mohrs, K. H.; Raddatz, S. et al. Inversely-correlated inhibition of human 5-lipoxygenase activity by BAY X1005 and other quinoline derivatives in intact cells and a cell-free system--implications for the function of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochem Pharmacol* **1994**, *47*, 2259-2268.
- (146) Charleson, S.; Evans, J. F.; Leger, S.; Perrier, H.; Prasit, P. et al. Structural requirements for the binding of fatty acids to 5-lipoxygenase-activating protein. *Eur J Pharmacol* **1994**, *267*, 275-280.
- (147) Abramovitz, M.; Wong, E.; Cox, M. E.; Richardson, C. D.; Li, C. et al. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* **1993**, *215*, 105-111.
- (148) Mancini, J. A.; Waterman, H.; Riendeau, D. Cellular oxygenation of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by 5-lipoxygenase is stimulated by 5-lipoxygenase-activating protein. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 32842-32847.
- (149) Plante, H.; Picard, S.; Mancini, J.; Borgeat, P. 5-lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem J* **2006**, *393*, 211-218.
- (150) Ferguson, A. D.; McKeever, B. M.; Xu, S.; Wisniewski, D.; Miller, D. K. et al. Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science* **2007**, *317*, 510-512.
- (151) Haeggstrom, J. Z. Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, *161*, S25-31.
- (152) Rådmark, O.; Shimizu, T.; Jornvall, H.; Samuelsson, B. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 12339-12345.
- (153) Mancini, J. A.; Evans, J. F. Cloning and characterization of the human leukotriene A4 hydrolase gene. *Eur J Biochem* **1995**, *231*, 65-71.
- (154) Vallee, B. L.; Auld, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5647-5659.
- (155) Malfroy, B.; Kado-Fong, H.; Gros, C.; Giros, B.; Schwartz, J. C. et al. Molecular cloning and amino acid sequence of rat kidney aminopeptidase M: a member of a super family of zinc-metallohydrolases. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, *161*, 236-241.
- (156) Haeggstrom, J. Z.; Wetterholm, A.; Shapiro, R.; Vallee, B. L.; Samuelsson, B. Leukotriene A4 hydrolase: a zinc metalloenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, *172*, 965-970.
- (157) Medina, J. F.; Wetterholm, A.; Radmark, O.; Shapiro, R.; Haeggstrom, J. Z. et al. Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 7620-7624.
- (158) Haeggstrom, J. Z.; Wetterholm, A.; Vallee, B. L.; Samuelsson, B. Leukotriene A4 hydrolase: an epoxide hydrolase with peptidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**, *173*, 431-437.

- (159) Wetterholm, A.; Haeggstrom, J. Z. Leukotriene A4 hydrolase: an anion activated peptidase. *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1123*, 275-281.
- (160) Evans, J. F.; Nathaniel, D. J.; Zamboni, R. J.; Ford-Hutchinson, A. W. Leukotriene A3. A poor substrate but a potent inhibitor of rat and human neutrophil leukotriene A4 hydrolase. *J Biol Chem* **1985**, *260*, 10966-10970.
- (161) Mueller, M. J.; Blomster, M.; Oppermann, U. C.; Jornvall, H.; Samuelsson, B. et al. Leukotriene A4 hydrolase: protection from mechanism-based inactivation by mutation of tyrosine-378. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 5931-5935.
- (162) Orning, L.; Gierse, J.; Duffin, K.; Bild, G.; Krivi, G. et al. Mechanism-based inactivation of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by leukotriene A4. Mass spectrometric and kinetic characterization. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 22733-22739.
- (163) Wetterholm, A.; Macchia, L.; Haeggstrom, J. Z. Zinc and other divalent cations inhibit purified leukotriene A4 hydrolase and leukotriene B4 biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Arch Biochem Biophys* **1994**, *311*, 263-271.
- (164) Thunnissen, M. M.; Nordlund, P.; Haeggstrom, J. Z. Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol* **2001**, *8*, 131-135.
- (165) Orning, L.; Krivi, G.; Fitzpatrick, F. A. Leukotriene A4 hydrolase. Inhibition by bestatin and intrinsic aminopeptidase activity establish its functional resemblance to metallohydrolase enzymes. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 1375-1378.
- (166) Yuan, J. H.; Birkmeier, J.; Yang, D. C.; Hribar, J. D.; Liu, N. et al. Isolation and identification of metabolites of leukotriene A4 hydrolase inhibitor SC-57461 in rats. *Drug Metab Dispos* **1996**, *24*, 1124-1133.
- (167) Osher, E.; Weisinger, G.; Limor, R.; Tordjman, K.; Stern, N. The 5-lipoxygenase system in the vasculature: emerging role in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* **2006**, *252*, 201-206.
- (168) Byrum, R. S.; Goulet, J. L.; Snouwaert, J. N.; Griffiths, R. J.; Koller, B. H. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. *J Immunol* **1999**, *163*, 6810-6819.
- (169) Yoshimoto, T.; Soberman, R. J.; Spur, B.; Austen, K. F. Properties of highly purified leukotriene C4 synthase of guinea pig lung. *J Clin Invest* **1988**, *81*, 866-871.
- (170) Orning, L.; Kaijser, L.; Hammarstrom, S. In vivo metabolism of leukotriene C4 in man: urinary excretion of leukotriene E4. *Biochem Biophys Res Commun* **1985**, *130*, 214-220.
- (171) Lam, B. K.; Austen, K. F. Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, *68-69*, 511-520.
- (172) Jakobsson, P. J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford-Hutchinson, A.; Persson, B. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, *161*, S20-24.
- (173) Bresell, A.; Weinander, R.; Lundqvist, G.; Raza, H.; Shimoji, M. et al. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *Febs J* **2005**, *272*, 1688-1703.
- (174) Nicholson, D. W.; Ali, A.; Vaillancourt, J. P.; Calaycay, J. R.; Mumford, R. A. et al. Purification to homogeneity and the N-terminal sequence of human leukotriene C4 synthase: a homodimeric glutathione S-transferase composed of 18-kDa subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 2015-2019.

- (175) Ago, H.; Kanaoka, Y.; Irikura, D.; Lam, B. K.; Shimamura, T. et al. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature* **2007**, *448*, 609-612.
- (176) Martinez Molina, D.; Wetterholm, A.; Kohl, A.; McCarthy, A. A.; Niegowski, D. et al. Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature* **2007**, *448*, 613-616.
- (177) Kemp, J. P. Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. *Am J Respir Med* **2003**, *2*, 139-156.
- (178) McMillan, R. M.; Walker, E. R. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **1992**, *13*, 323-330.
- (179) Summers, J. B.; Mazdiyasi, H.; Holms, J. H.; Ratajczyk, J. D.; Dyer, R. D. et al. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **1987**, *30*, 574-580.
- (180) Summers, J. B.; Gunn, B. P.; Martin, J. G.; Martin, M. B.; Mazdiyasi, H. et al. Structure-activity analysis of a class of orally active hydroxamic acid inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J Med Chem* **1988**, *31*, 1960-1964.
- (181) Tateson, J. E.; Randall, R. W.; Reynolds, C. H.; Jackson, W. P.; Bhattacharjee, P. et al. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br J Pharmacol* **1988**, *94*, 528-539.
- (182) Brooks, C. D.; Summers, J. B. Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J Med Chem* **1996**, *39*, 2629-2654.
- (183) Liu, M. C.; Dube, L. M.; Lancaster, J. Acute and chronic effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in asthma: a 6-month randomized multicenter trial. Zileuton Study Group. *J Allergy Clin Immunol* **1996**, *98*, 859-871.
- (184) Dahlen, B.; Nizankowska, E.; Szczeklik, A.; Zetterstrom, O.; Bochenek, G. et al. Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 1187-1194.
- (185) Carter, G. W.; Young, P. R.; Albert, D. H.; Bouska, J.; Dyer, R. et al. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**, *256*, 929-937.
- (186) Weinblatt, M. E.; Kremer, J. M.; Coblyn, J. S.; Helfgott, S.; Maier, A. L. et al. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **1992**, *19*, 1537-1541.
- (187) Brooks, C. D.; Stewart, A. O.; Basha, A.; Bhatia, P.; Ratajczyk, J. D. et al. (R)-(+)-N-[3-[5-[(4-fluorophenyl)methyl]-2-thienyl]-1-methyl-2-propynyl]-N-hydroxyurea (ABT-761), a second-generation 5-lipoxygenase inhibitor. *J Med Chem* **1995**, *38*, 4768-4775.
- (188) Lehnigk, B.; Rabe, K. F.; Dent, G.; Herst, R. S.; Carpentier, P. J. et al. Effects of a 5-lipoxygenase inhibitor, ABT-761, on exercise-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 in asthmatic patients. *Eur Respir J* **1998**, *11*, 617-623.
- (189) Bird, Bruneau, P.; Crawley, G. C.; Edwards, M. P.; Foster, S. J. et al. (Methoxyalkyl)thiazoles: a new series of potent, selective, and orally active 5-lipoxygenase inhibitors displaying high enantioselectivity. *J Med Chem* **1991**, *34*, 2176-2186.
- (190) Turner, C. R.; Smith, W. B.; Andresen, C. J.; Eggler, J. F.; Watson, J. W. The effect of 5-lipoxygenase inhibition on Ascaris antigen (Ag)-induced responses in atopic monkeys. *Inflamm Res* **1996**, *45*, 42-49.
- (191) Werz, O.; Szellas, D.; Henseler, M.; Steinhilber, D. Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol Pharmacol* **1998**, *54*, 445-451.

- (192) Ducharme, Y.; Brideau, C.; Dube, D.; Chan, C. C.; Falguyret, J. P. et al. Naphthalenic lignan lactones as selective, nonredox 5-lipoxygenase inhibitors. Synthesis and biological activity of (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran hybrids. *J Med Chem* **1994**, *37*, 512-518.
- (193) Hamel, P.; Riendeau, D.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Desmarais, S. et al. Substituted (pyridylmethoxy)naphthalenes as potent and orally active 5-lipoxygenase inhibitors; synthesis, biological profile, and pharmacokinetics of L-739,010. *J Med Chem* **1997**, *40*, 2866-2875.
- (194) Laufer, S.; Tries, S.; Augustin, J.; Dannhardt, G. Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* **1994**, *44*, 629-636.
- (195) Boileau, C.; Martel-Pelletier, J.; Jouzeau, J. Y.; Netter, P.; Moldovan, F. et al. Licofelone (ML-3000), a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: inhibition of pro-apoptotic factors. *J Rheumatol* **2002**, *29*, 1446-1453.
- (196) Köberle, A.; Siemoneit, U.; Bühring, U.; Northoff, H.; Laufer, S. et al. Licofelone suppresses prostaglandin E2 formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, *in press*.
- (197) Bokoch, G. M.; Reed, P. W. Evidence for inhibition of leukotriene A4 synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **1981**, *256*, 4156-4159.
- (198) Koshihara, Y.; Neichi, T.; Murota, S.; Lao, A.; Fujimoto, Y. et al. Selective inhibition of 5-lipoxygenase by natural compounds isolated from Chinese plants, *Artemisia rubripes* Nakai. *FEBS Lett* **1983**, *158*, 41-44.
- (199) Kim, H. P.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* **2004**, *96*, 229-245.
- (200) Bas, E.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Manez, S.; Cerda-Nicolas, M. et al. Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Med* **2006**, *72*, 136-142.
- (201) Yoshimoto, T.; Furukawa, M.; Yamamoto, S.; Horie, T.; Watanabe-Kohno, S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **1983**, *116*, 612-618.
- (202) Chi, Y. S.; Jong, H. G.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S. et al. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem Pharmacol* **2001**, *62*, 1185-1191.
- (203) Son, J. K.; Son, M. J.; Lee, E.; Moon, T. C.; Son, K. H. et al. Ginkgetin, a Biflavone from *Ginkgo biloba* leaves, inhibits cyclooxygenases-2 and 5-lipoxygenase in mouse bone marrow-derived mast cells. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 2181-2184.
- (204) Albert, D.; Zündorf, I.; Dingermann, T.; Müller, W. E.; Steinhilber, D. et al. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* **2002**, *64*, 1767-1775.
- (205) Feisst, C.; Albert, D.; Verotta, L.; Werz, O. Evaluation of hyperforin analogues for inhibition of 5-lipoxygenase. *Med Chem* **2005**, *1*, 287-291.
- (206) Prasad, N. S.; Raghavendra, R.; Lokesh, B. R.; Naidu, K. A. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2004**, *70*, 521-528.

- (207) Kiuchi, F.; Iwakami, S.; Shibuya, M.; Hanaoka, F.; Sankawa, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1992**, *40*, 387-391.
- (208) Hiermann, A.; Schantl, D. Antiphlogistic and antipyretic activity of Peucedanum ostruthium. *Planta Med* **1998**, *64*, 400-403.
- (209) Benrezzouk, R.; Terencio, M. C.; Ferrandiz, M. L.; Hernandez-Perez, M.; Rabanal, R. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase activity by the natural anti-inflammatory compound aethiopinone. *Inflamm Res* **2001**, *50*, 96-101.
- (210) Poeckel, D.; Werz, O. Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 3359-3369.
- (211) Benrezzouk, R.; Terencio, M. C.; Ferrandiz, M. L.; San Feliciano, A.; Gordaliza, M. et al. Inhibition of human sPLA2 and 5-lipoxygenase activities by two neoclerodane diterpenoids. *Life Sci* **1999**, *64*, 205-211.
- (212) Vavreckova, C.; Gawlik, I.; Muller, K. Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta Med* **1996**, *62*, 397-401.
- (213) Peters-Golden, M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 227-231.
- (214) Dickinson Zimmer, J. S.; Völker, D. R.; Bernlohr, D. A.; Murphy, R. C. Stabilization of leukotriene A4 by epithelial fatty acid-binding protein in the rat basophilic leukemia cell. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 7420-7426.
- (215) Brock, T. G.; Paine, R., 3rd; Peters-Golden, M. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 22059-22066.
- (216) Nieves, D.; Moreno, J. J. Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation. *Biochemical Pharmacology* **2006**, *72*, 1022-1030.
- (217) Christmas, P.; Fox, J. W.; Ursino, S. R.; Soberman, R. J. Differential Localization of 5- and 15-Lipoxygenases to the Nuclear Envelope in RAW Macrophages. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 25594-25598.
- (218) Higgins, R. C.; Dahmus, M. E. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1979**, *93*, 257-260.
- (219) Renner, S.; Schneider, G. Fuzzy Pharmacophore Models from Molecular Alignments for Correlation-Vector-Based Virtual Screening. *J Med Chem* **2004**, *47*, 4653-4664.
- (220) Feisst, C.; Werz, O. Suppression of receptor-mediated Ca²⁺ mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem Pharmacol* **2004**, *67*, 1531-1539.
- (221) Bleasdale, J. E.; Bundy, G. L.; Bunting, S.; Fitzpatrick, F. A.; Huff, R. M. et al. Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73, 122. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **1989**, *19*, 590-593.
- (222) Smith, R. J.; Sam, L. M.; Justen, J. M.; Bundy, G. L.; Bala, G. A. et al. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* **1990**, *253*, 688-697.
- (223) Bleasdale, J. E.; Thakur, N. R.; Gremban, R. S.; Bundy, G. L.; Fitzpatrick, F. A. et al. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* **1990**, *255*, 756-768.
- (224) Hou, C.; Kirchner, T.; Singer, M.; Matheis, M.; Argentieri, D. et al. In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-

- yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole -2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *309*, 697-704.
- (225) Friedmann, E. Spectrophotometric investigation of the interaction of glutathione with maleimide and n-ethylmaleimide. *Biochim Biophys Acta* **1952**, *9*, 65-75.
- (226) Wilsher, N. E.; Court, W. J.; Ruddle, R.; Newbatt, Y. M.; Aherne, W. et al. The phosphoinositide-specific phospholipase C inhibitor U73122 (1-(6-((17beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrol e-2,5-dione) spontaneously forms conjugates with common components of cell culture medium. *Drug Metab Dispos* **2007**, *35*, 1017-1022.
- (227) André, M.; Karas, M. Investigation of sample-purification procedures for MALDI-based proteomic studies. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *389*, 1047-1053.
- (228) Kosower, N. S.; Kosower, E. M.; Wertheim, B.; Correa, W. S. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1969**, *37*, 593-596.
- (229) Kosower, N. S.; Kosower, E. M. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* **1995**, *251*, 123-133.
- (230) Ault, J. G.; Lawrence, D. A. Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. *Experimental Cell Research* **2003**, *285*, 9-14.
- (231) Erlemann, K. R.; Rokach, J.; Powell, W. S. Oxidative stress stimulates the synthesis of the eosinophil chemoattractant 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by inflammatory cells. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 40376-40384.
- (232) Hatzelmann, A.; Ullrich, V. Regulation of 5-lipoxygenase activity by the glutathione status in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* **1987**, *169*, 175-184.
- (233) Jakobsson, P. J.; Steinhilber, D.; Odlander, B.; Radmark, O.; Claesson, H. E. et al. On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 3521-3525.
- (234) Chakravarthi, S.; Jessop, C. E.; Bulleid, N. J. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* **2006**, *7*, 271-275.
- (235) Hatzelmann, A.; Schatz, M.; Ullrich, V. Involvement of glutathione peroxidase activity in the stimulation of 5-lipoxygenase activity by glutathione-depleting agents in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* **1989**, *180*, 527-533.
- (236) Klatt, P.; Lamas, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **2000**, *267*, 4928-4944.
- (237) Humphries, K. M.; Juliano, C.; Taylor, S. S. Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 43505-43511.
- (238) Kuhn, H.; Saam, J.; Eibach, S.; Holzhutter, H. G.; Ivanov, I. et al. Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338*, 93-101.
- (239) Charlier, C.; Henichart, J. P.; Durant, F.; Wouters, J. Structural insights into human 5-lipoxygenase inhibition: combined ligand-based and target-based approach. *J Med Chem* **2006**, *49*, 186-195.
- (240) Huang, Z.; Pinto, J. T.; Deng, H.; Richie, J. P., Jr. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochem Pharmacol* **2008**, *75*, 2234-2244.
- (241) Sykes, M. C.; Mowbray, A. L.; Jo, H. Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Circ Res* **2007**, *100*, 152-154.

- (242) Casagrande, S.; Bonetto, V.; Fratelli, M.; Gianazza, E.; Eberini, I. et al. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 9745-9749.
- (243) Caplan, J. F.; Filipenko, N. R.; Fitzpatrick, S. L.; Waisman, D. M. Regulation of annexin A2 by reversible glutathionylation. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 7740-7750.
- (244) Johansson, M.; Lundberg, M. Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary. *BMC Biochem* **2007**, *8*, 26.
- (245) Kil, I. S.; Kim, S. Y.; Park, J. W. Glutathionylation regulates IkappaB. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *373*, 169-173.
- (246) Dalle-Donne, I.; Milzani, A.; Gagliano, N.; Colombo, R.; Giustarini, D. et al. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* **2008**, *10*, 445-473.
- (247) Shackelford, R. E.; Heinloth, A. N.; Heard, S. C.; Paules, R. S. Cellular and molecular targets of protein S-glutathiolation. *Antioxid Redox Signal* **2005**, *7*, 940-950.
- (248) Seres, T.; Ravichandran, V.; Moriguchi, T.; Rokutan, K.; Thomas, J. A. et al. Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J Immunol* **1996**, *156*, 1973-1980.
- (249) Diaz, A.; Chepenik, K. P.; Korn, J. H.; Reginato, A. M.; Jimenez, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res* **1998**, *241*, 222-229.
- (250) Silverstein, F. E.; Faich, G.; Goldstein, J. L.; Simon, L. S.; Pincus, T. et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* **2000**, *284*, 1247-1255.
- (251) Steinbach, G.; Lynch, P. M.; Phillips, R. K.; Wallace, M. H.; Hawk, E. et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **2000**, *342*, 1946-1952.
- (252) Grosch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Brautigam, L.; Geisslinger, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* **2001**, *15*, 2742-2744.
- (253) Maier, T. J.; Schilling, K.; Schmidt, R.; Geisslinger, G.; Grosch, S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* **2004**, *67*, 1469-1478.
- (254) Werz, O.; Steinhilber, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *112*, 701-718.
- (255) Maier, T. J.; Tausch, L.; Hörnig, M.; Coste, O.; Schmidt, R. et al. Celecoxib is a 5-lipoxygenase inhibitor. *Biochem Pharmacol* **2008**, *in revision*.
- (256) Maier, T. J. Celecoxib did not affect 5-lipoxygenase activity in whole blood assay of mice, 2007.
- (257) Werz, O.; Steinhilber, D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* **2005**, *70*, 327-333.
- (258) McAdam, B. F.; Catella-Lawson, F.; Mardini, I. A.; Kapoor, S.; Lawson, J. A. et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 272-277.

- (259) Niederberger, E.; Tegeder, I.; Vetter, G.; Schmidtko, A.; Schmidt, H. et al. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J* **2001**, *15*, 1622-1624.
- (260) Metzner, J.; Popp, L.; Marian, C.; Schmidt, R.; Manderscheid, C. et al. The effects of COX-2 selective and non-selective NSAIDs on the initiation and progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *J Mol Med* **2007**, *85*, 623-633.
- (261) Celotti, F.; Laufer, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacological Research* **2001**, *43*, 429-436.
- (262) Ding, C.; Cicutini, F. Licofelone (Merckle). *IDrugs* **2003**, *6*, 802-808.
- (263) Laufer, S. A.; Augustin, J.; Dannhardt, G.; Kiefer, W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic Acids, a Novel Class of Potent Dual Inhibitors of Both Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase. *J Med Chem* **1994**, *37*, 1894-1897.
- (264) Fischer, L.; Hörnig, M.; Pergola, C.; Meindl, N.; Franke, L. et al. The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol* **2007**, *152*, 471-480.
- (265) Tries, S.; Neupert, W.; Laufer, S. The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm Res* **2002**, *51*, 135-143.
- (266) Rotondo, S.; Dell'Elba, G.; Krauze-Brzosko, K.; Manarini, S.; Martelli, N. et al. Licofelone, a dual lipoxygenase-cyclooxygenase inhibitor, downregulates polymorphonuclear leukocyte and platelet function. *Eur J Pharmacol* **2002**, *453*, 131-139.
- (267) Evans, J. F.; Leville, C.; Mancini, J. A.; Prasit, P.; Therien, M. et al. 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a quinoline class of leukotriene synthesis inhibitors. *Mol Pharmacol* **1991**, *40*, 22-27.
- (268) Kargman, S.; Prasit, P.; Evans, J. F. Translocation of HL-60 cell 5-lipoxygenase. Inhibition of A23187- or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced translocation by indole and quinoline leukotriene synthesis inhibitors. *J Biol Chem* **1991**, *266*, 23745-23752.
- (269) Vickers, P. J.; Adam, M.; Charleson, S.; Abramovitz, M.; O'Neill, G. et al. Amino acid residues of 5-lipoxygenase-activating protein critical for the binding of leukotriene biosynthesis inhibitors. *J Lipid Mediat* **1993**, *6*, 31-42.
- (270) Mancini, J. A.; Coppolino, M. G.; Klassen, J. H.; Charleson, S.; Vickers, P. J. The binding of leukotriene biosynthesis inhibitors to site-directed mutants of human 5-lipoxygenase-activating protein. *Life Sci* **1994**, *54*, PL137-142.
- (271) Vickers, P. J.; Adam, M.; Charleson, S.; Coppolino, M. G.; Evans, J. F. et al. Identification of amino acid residues of 5-lipoxygenase-activating protein essential for the binding of leukotriene biosynthesis inhibitors. *Mol Pharmacol* **1992**, *42*, 94-102.
- (272) Biber, A.; Fischer, H.; Romer, A.; Chatterjee, S. S. Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* **1998**, 36-43.
- (273) Maisenbacher, P.; Kovar, K. A. Analysis and stability of Hyperici oleum. *Planta Med* **1992**, *58*, 351-354.
- (274) Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Jakupovic, J.; Bombardelli, E. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from st. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J Nat Prod* **1999**, *62*, 770-772.
- (275) Verotta, L.; Appendino, G.; Jakupovic, J.; Bombardelli, E. Hyperforin analogues from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J Nat Prod* **2000**, *63*, 412-415.

- (276) Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O. et al. Synthesis and biological evaluation of hyperforin analogues. Part I. Modification of the enolized cyclohexanedione moiety. *J Nat Prod* **2002**, *65*, 433-438.
- (277) Vajs, V.; Vugdelija, S.; Trifunovic, S.; Karadzic, I.; Juranic, N. et al. Further degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* (St John's Wort). *Fitoterapia* **2003**, *74*, 439-444.
- (278) Fukuyama, Y.; Kuwayama, A.; Minami, H. Garsubellin A, a novel polyprenylated phloroglucin derivative, increasing choline acetyltransferase (ChAT) activity in postnatal rat septal neuron cultures. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1997**, *45*, 947-949.
- (279) Müller, W. E. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* **2003**, *47*, 101-109.
- (280) Schempp, C. M.; Winghofer, B.; Ludtke, R.; Simon-Haarhaus, B.; Schopf, E. et al. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol* **2000**, *142*, 979-984.
- (281) Schempp, C. M.; Hezel, S.; Simon, J. C. [Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream. A randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study]. *Hautarzt* **2003**, *54*, 248-253.
- (282) Spessard, S. J.; Stoltz, B. M. Progress toward the Synthesis of garsubellin A and related phloroglucins: the direct diastereoselective synthesis of the bicyclo[3.3.1]nonane core. *Org Lett* **2002**, *4*, 1943-1946.
- (283) Feisst, C.; Pergola, C.; Köberle, A.; Dodt, G.; Rakonjac, M. et al. Hyperforin inhibits 5-Lipoxygenase by interference with the C2-like domain. *Manuskript* **2008**.
- (284) Kuramochi, A.; Usuda, H.; Yamatsugu, K.; Kanai, M.; Shibasaki, M. Total synthesis of (+/-)-garsubellin A. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14200-14201.
- (285) Siegel, D. R.; Danishefsky, S. J. Total synthesis of garsubellin A. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 1048-1049.
- (286) Douillard, J. Y.; Hoffman, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibody production using enzyme-labeled second antibody. *Methods Enzymol* **1983**, *92*, 168-174.
- (287) Brennand, D. M.; Danson, M. J.; Hough, D. W. A comparison of ELISA screening methods for the production of monoclonal antibodies against soluble protein antigens. *J Immunol Methods* **1986**, *93*, 9-14.
- (288) de StGroth, S. F.; Scheidegger, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods* **1980**, *35*, 1-21.
- (289) Brand, K. M.; Klein, C.; Zündorf, I.; Dingermann, T.; Knoss, W. Generation and characterisation of monoclonal antibodies to oleanolic acid. *Planta Med* **2004**, *70*, 986-992.

10. Danksagung

...Dieter Steinhilber gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können, sowie für die Bereitschaft, alle weiteren Nebentätigkeiten zu unterstützen.

...Sven George und Astrid Brüggerhoff möchte ich hervorzuheben, die mir bei vielen, vielen Arbeiten unter die Arme gegriffen haben und mich immer tatkräftig unterstützt haben.

...Angela Michel möchte ich danken für die vielen konstruktiven Gespräche, die die ein oder andere Idee zu Tage gefördert haben.

...Danke an Irina Schlags, die über die gesamte Zeit unserer Ausbildung eine verlässliche Gesprächspartnerin war.

...Oliver Werz möchte ich nicht unerwähnt lassen, der durch seine Arbeit, seinen Fleiß und seine Freundlichkeit immer eine große Hilfe für mich und diese Arbeit war.

...Lars Tausch danke ich für die bisherige Zusammenarbeit und hoffe, dass wir irgendwann daran anknüpfen können!

...Beate Firla, Oliver Rau, Bernd Sorg, Thorsten Maier, Daniel Pöckel, Michael Ermisch, Lutz Fischer, Lutz Franke, Sabine Seuter, Bettina Hoffmann, Carina Richter, Nadine Corvey, Nicole Schnur, Adriane Lechtken, Ann-Kathrin Häfner, Kirsten Stoffers, Marika Hoffmann, Careen Katryniok und vielen weiteren möchte ich meinen ganz herzlichen Dank zum Ausdruck bringen und wünsche allen eine gute Zukunft!

...Bei Theo Dingermann und Ilse Zündorf möchte ich mich ebenfalls für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

...Ein Dankeschön an den AK Karas für die Unterstützung und Hilfestellung bei MALDI-MS-Untersuchungen.

...Mein größter Dank gilt aber meiner Frau Tina, die zu jeder Zeit und zu jeder Stunde für mich da ist und alle meine Tätigkeiten unterstützt. Ohne Tina, unsere Tochter Lara und unsere Familien wären insbesondere die letzten Wochen und Monate nicht machbar gewesen.

11. Akademische Lehrer

Prof. Dr. Th. Dingermann

Prof. Dr. V. Dötsch

Prof. Dr. J. Dressman

Prof. Dr. E. Ehlers

Prof. Dr. M. Karas

Prof. Dr. J. Kreuter

Prof. Dr. W. E. Müller

Prof. Dr. C. R. Noe

Prof. Dr. G. Schneider

Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec

Prof. Dr. H. Stark

Prof. Dr. D. Steinhilber

Prof. Dr. O. Werz

12. Publikationen

Fischer, L.; Hörnig, M.; Pergola, C.; Meindl, N.; Franke, L.; Tanrikulu, Y.; Dodt, G.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Werz, O.; The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products; *Br J Pharmacol.* 2007 Aug 20; 152, 471-480

Maier, T. J.; Tausch, L.; Hörnig, M.; Coste, O.; Schmidt, R.; Angioni, C.; Metzner, J.; Grösch, S.; Steinhilber, D.; Werz, O. and Geisslinger, G. (2007) Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol.*, 2008 Oct 1; 76(7): 862-872

Lechtken, A.; Hörnig, M.; Werz, O.; Corvey, N.; Zündorf, I.; Dingermann, T.; Brandes, R.; Steinhilber, D.; Extracellular signal-regulated kinase-2 phosphorylates RORalpha4 in vitro; *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007 Jul 6; 358(3):890-896

Hörnig, M.; Thunnissen, M.M.G.M.; Rudberg P.C.; Nordlund, P.; Werz, O. and Haeggström, J. (2007) Leukotriene A4 hydrolase, structural and functional analysis of a putative regulatory phosphorylation site. *Biochim Biophys Acta*, in revision

Werz, O.; Tretiakova, I.; Michel, A.; Ulke-Lemee, A.; Hörnig, M.; Franke, L.; Schneider, G.; Samuelsson, B.; Radmark, O.; Steinhilber, D.; Caspase-mediated degradation of human 5-lipoxygenase in B lymphocytic cells; *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2005 Sep 13; 102(37): 13164-13169

Hörnig, C.; Albert, D.; Fischer, L.; Hörnig, M.; Radmark, O.; Steinhilber, D.; Werz, O.; 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)-lipid binding site within the N-terminal C2-like domain; *J Biol Chem.*, 2005 Jul 22; 280(29):26913-26921

13. Lebenslauf

Persönliche Daten Michael Hörnig

Geburtsdatum und -ort: 18. Juni 1974 in Frankfurt am Main

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 01/2008 Leiter des Zentralen Prüflaboratoriums des
Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) in Eschborn

Akademische Ausbildung

01/2003 – 12/2007 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

12/2002 Abschluss der Ausbildung mit dem Dritten Prüfungsabschnitt der
Pharmazeutischen Prüfung und Approbation zum Apotheker

05/2002 – 10/2002 2. Halbjahr der praktischen Ausbildung zum Apotheker am
Pharmazeutischen Institut für Chemie an der Universität Wien

11/2001 – 04/2002 1. Halbjahr der praktischen Ausbildung zum Apotheker in einer
öffentlichen Apotheke in Frankfurt/Main

10/2001 Abschluss des Studiums mit dem Zweitem Prüfungsabschnitt der
Pharmazeutischen Ausbildung

10/1997 – 09/2001 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt

Berufs- und Schulausbildung

09/1994 – 07/1997 Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Cassella AG

06/1985 - 06/1994 Abitur am Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Frankfurt am Main