

Regulation der 5-Lipoxygenaseaktivität durch niedermolekulare Verbindungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Christina Hörnig
aus Frankenthal/Pfalz

Frankfurt am Main (2010)
(DF30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie 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: 09. Juli 2010

Für Lara und Felix

Nicht Kunst und Wissenschaft allein, Geduld will bei dem Werke sein. Goethe

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	3
2	Einleitung	6
2.1	Lipoxygenasen	6
2.2	5-Lipoxygenase	6
2.2.1	5-Lipoxygenase-Struktur.....	6
2.2.2	5-Lipoxygenase-Gen und Regulation der 5-Lipoxygenase-Proteinexpression.....	9
2.2.3	Enzymatische Funktion	10
2.2.4	Regulation der Enzymaktivität der 5-Lipoxygenase.....	11
2.2.5	Biologische Funktion der 5-Lipoxygenase-Produkte.....	14
2.2.6	5-Lipoxygenase: Inhibitoren	15
2.3	C2-Domänen	17
2.3.1	Struktur der C2-Domänen	18
2.3.2	Ca ²⁺ -abhängige Membranbindung der C2-Domänen.....	19
2.4	N-terminale, C2-ähnliche „β-Barrel“ der 5-Lipoxygenase.....	20
2.5	Diacylglyceride	21
2.5.1	Diacylglyceride und 5-Lipoxygenase.....	24
2.6	Ziel der Arbeit	25
3	Materialien und Methoden.....	26
3.1	Zellen und Zellkultur.....	26
3.2	Isolierung von humanen polymorphkernigen Leukozyten (PMNL).....	27
3.3	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität.....	28
3.4	Expression des 5-Lipoxygenase (5-LO)-Proteins in Escherichia coli (E. coli)	28
3.5	Aufreinigung des Proteins 5-Lipoxygenase	28
3.6	Gewinnung des 100.000g Überstands (S100).....	29
3.7	Partielle Isolierung der 5-Lipoxygenase mit Hilfe von ATP-Agarose.....	29
3.8	Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Aktivität anhand der Bildung von 5-Lipoxygenase-Produkten	30
3.9	Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.....	31
3.10	Transiente Transfektion.....	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Stimulation der 5-Lipoxygenase durch 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol.....	33
4.1.1	OAG induziert 5-Lipoxygenase-Aktivität <i>in vitro</i> in Abwesenheit von Ca ²⁺	33
4.1.2	OAG aktiviert die 12- und 15-Lipoxygenase in Abwesenheit von Ca ²⁺	35
4.1.3	Einfluss der Substratkonzentration auf die Stimulation durch OAG	36
4.1.4	Phospholipide verhindern die 5-Lipoxygenase-Aktivierung durch OAG.....	38
4.1.5	Effekte weiterer Glyceride	41
4.1.6	OAG-vermittelte Resistenz der 5-Lipoxygenase gegen Glutathionperoxidase und GSH.....	42
4.1.7	OAG zeigt keinen Effekt auf die Aktivität der GPx	46
4.1.8	Mutation der Phospholipid-Bindungsstelle der 5-Lipoxygenase verhindert den OAG-Effekt.....	47
4.1.9	Interaktion von OAG mit dem 5-Lipoxygenase-Inhibitor Hyperforin.....	50

4.1.10	Nachweis der möglichen Bindung von OAG an die 5-Lipoxygenase mittels $^3\text{[H]OAG}$	51
4.1.11	Etablierung eines Lipid Protein Overlay Assays für 5-Lipoxygenase zum Nachweis der OAG-Bindung	52
4.1.12	Zelllinienspezifität des OAG-Effekts	54
4.1.13	Interaktion zwischen OAG und dem MBP-Fusionsprotein der regulatorischen Domäne der 5-Lipoxygenase	57
4.2	Identifizierung von Pirinixinsäure-Derivaten als potente Inhibitoren der 5-Lipoxygenase	61
4.2.1	Einfluss der Pirinixinsäure-Derivate auf die 5-Lipoxygenase-Aktivität	61
4.2.2	OAG unterbindet die Inhibition der 5-Lipoxygenase durch LP 121 und LP 119	63
4.2.3	Phosphatidylcholin verhindert die 5-Lipoxygenase-Hemmung durch LP 105 und LP 121	65
4.2.4	Einfluss der Pirinixinsäure-Derivate auf die Translokation der 5-Lipoxygenase	67
4.3	Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren mittels Screening virtueller Datenbanken	68
4.3.1	Untersuchung der Substanzen des ersten virtuellen Screening-Verfahrens	68
4.3.2	Ergebnisse des zweiten Screening-Verfahrens	70
5	Diskussion	72
5.1	Aktivierung der 5-Lipoxygenase durch Glyceride/OAG <i>in vitro</i>	72
5.1.1	Interaktion von OAG mit Ca^{2+} , Glutathion-Peroxidase und Phospholipiden	72
5.1.2	Zelllinienspezifität	80
5.1.3	Nachweis einer möglichen Bindung zwischen OAG und 5-Lipoxygenase	82
5.1.4	Interaktion zwischen OAG und regulatorischer Domäne der 5-Lipoxygenase	84
5.2	Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren	86
5.2.1	Identifizierung von Pirinixinsäure-Derivaten als neue 5-Lipoxygenase-Inhibitoren	86
5.2.2	Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren mittels Screening virtueller Datenbanken	89
6	Zusammenfassung	93
7	Literaturverzeichnis	96
8	Publikationsliste	110
9	Danksagung	112
10	Lebenslauf	114

1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AdC	5-Aza-2'-deoxycytidin
AP-2	Activating Protein 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA/AM	bis-(O-aminophenoxy)ethan-N,N,N,N-tetraessigsäure/Acetoxymethylester
CBR	Calcium-bindende Region
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CLP	Coactosin-like protein
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
COX	Cyclooxygenase
cysLT	Cysteinyl-Leukotrien
DAG	Diacylglycerid
DGK	Diglyceridkinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	1,2 Dioctanoyl-sn-glycerol
DTT	Dithiothreol
EAG	1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1/2	early-growth response factor-1
ERKs	extracellular signal-related kinases
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GPx	Glutathionperoxidase
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSH	Glutathion
HL-60	Humane leukämische Zelllinie

HL-60TB	5-LO negative HL-60 Zellen
H(P)ETE	Hydro(pero)xyeicosatetraensäure
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranopyranosid
LB	Luria-Broth Base Medium
LO	Lipoxygenase
LPP	Lipidphosphat-Phosphatasen
LT	Leukotrien
MAPKAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MK1/2	MAPKAP Kinase 1/2
MM6	Mono Mac 6 Zellen
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NFκB	nuclear factor of κ-light polypeptide gene enhancer in B cells
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
OG	1-O-Oleyl-sn-glycerol
PA	Phosphatidsäure
PA-P	Phosphatidsäure-Phosphatase
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC/D	Phospholipase C/D
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RBL-1	Basophile leukämische Zelllinie aus Ratten
ROR α	retinoic acid related orphan receptor α
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RZR α	Retinoid Z Rezeptor α
SAG	1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol
Sp1/2	serum protein/specific protein/selective promoter factor 1/2
SRS-A	slow-reacting substance of anaphylaxis
STI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
TGF β	Transforming growth factor β
VDR	Vitamin D Rezeptor
w/o	without, ohne
-/-	knock out

2 Einleitung

2.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LO) sind Oxidoreduktasen und katalysieren den Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Der Sauerstoff-Einbau erfolgt dabei stereospezifisch an einem definierten C-Atom innerhalb der cis,cis-1,4-Pentadien-Teilstruktur der Fettsäure, es entsteht eine 1-Hydroperoxy-2,4-trans,cis-Pentadien-Teilstruktur [1]. Als Hauptsubstrat der Lipoxygenasen in Säugetieren dient Arachidonsäure (20:4), in Pflanzen werden dagegen bevorzugt Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) durch Lipoxygenasen umgesetzt. Die Namensgebung der Lipoxygenasen erfolgt entsprechend der Position des C-Atoms der Arachidonsäure, an dem die Einführung des Sauerstoffs erfolgt. Einige Lipoxygenasen sind in der Lage, unterschiedliche Substrate umzusetzen bzw. unterschiedliche Produkte zu bilden. Sie werden nach ihren Hauptprodukten benannt [2,3].

Lipoxygenasen sind in Tieren, Pflanzen und Pilzen weit verbreitet, in Bakterien und Hefezellen dagegen nicht. Die erste Lipoxygenase wurde aus Sojabohnen isoliert und als 15-LO identifiziert [4]. 1974 wurde mit der 12-LO aus Thrombozyten die erste Lipoxygenase in Säugetieren entdeckt [5], es folgte die Entdeckung der ersten 5-LO aus Kaninchen-Leukozyten [6]. Heute sind 18 verschiedene Säugetier-Lipoxygenasen bekannt, die nach ihren enzymatischen Eigenschaften in 4 Familien eingeteilt werden. In humanen Zellen werden fünf Lipoxygenase-Typen unterschieden [7].

2.2 5-Lipoxygenase

2.2.1 5-Lipoxygenase-Struktur

Humane 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 78 kDa. Bis heute konnte nur bei vier Lipoxygenasen die Struktur aufgeklärt werden. Von der 5-LO existiert keine Röntgenkristallstruktur. Anhand der Kristallstruktur der 15-LO aus Kaninchen-Retikulozyten [8] und experimenteller Daten entwickelten mehrere Arbeitsgruppen ähnliche

Modelle für die 5-LO. Abb. 2.1 zeigt ein neueres Modell aus dem Arbeitskreis von Prof. Gisbert Schneider, Universität Frankfurt.

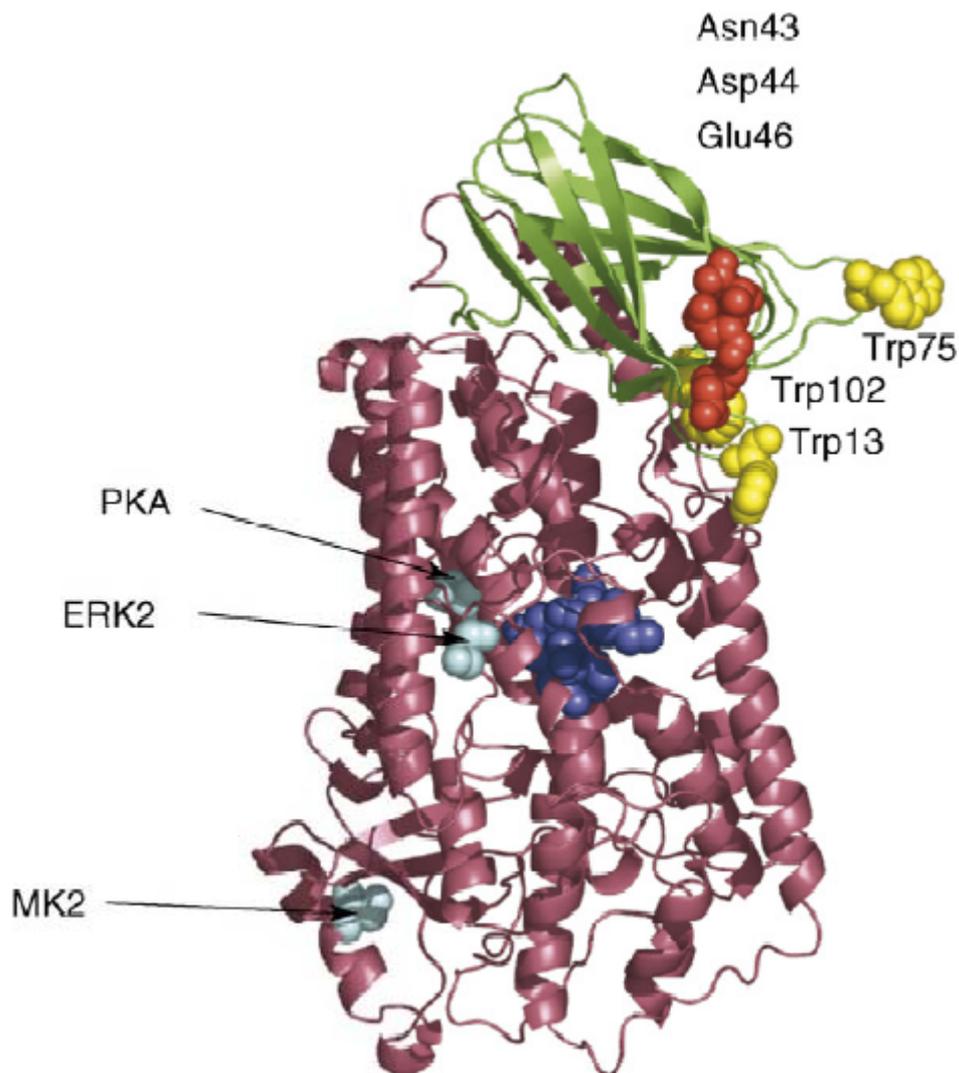


Abb. 2.1: Mögliche Struktur der 5-LO. Modell basierend auf der Kristallstruktur der Kaninchenretikulozyten 15-LO [9]. Die N-terminale regulatorische β -Barrel Domäne ist grün, die C-terminale katalytische Domäne violett eingefärbt. Darstellung der Eisenliganden im aktiven Zentrum in blau, Phosphorylierungsstellen in hellblau, Ca^{2+} -Bindungsstelle in rot, Membranbindung vermittelnde Aminosäuren in gelb.

5-LO besteht wie andere Lipoxygenasen auch aus einer C-terminalen katalytischen Domäne (Aminosäuren 121-673) und einer N-terminalen β -Barrel Domäne (Aminosäuren 1-121). Die N-terminale β -Barrel Domäne bindet Ca^{2+} im stöchiometrischen Verhältnis 2:1 [10] und

vermittelt die Translokation zur Zellkernmembran [11]. Diese Eigenschaften findet man auch bei einer Reihe anderer Ca^{2+} -bindender Proteine wie die Proteinkinase (PK) C und der zytosolischen Phospholipase (cPL) A_2 , die eine N-terminale C2-Domäne in ihrer Struktur beinhalten. Tatsächlich ähnelt die N-terminale β -Barrel-Domäne der 5-LO mit dem aus acht Faltblättern bestehenden antiparallelen β -Sandwich in ihrer Struktur diesen C2-Domänen (ausführliche Beschreibung siehe C2-Domänen). Die drei Aminosäuren Asn-43, Asp-44 und Glu-46 vermitteln die Bindung von Ca^{2+} und die Aktivierung der 5-LO durch Ca^{2+} [10]. Für die Membranbindung konnte die Beteiligung dreier Tryptophanreste (Trp-13, -75 und -102) gezeigt werden [12].

Alle Lipoxygenasen enthalten in der C-terminalen katalytischen Domäne ein nicht an Häm gebundenes Eisen im aktiven Zentrum. Liganden dieses prosthetischen Eisen sind His-372, His-550 und das C-terminale Ile-673 [13,14] sowie His-367, Asn-554 und ein Wassermolekül dienen als flexible Liganden [15].

Die Aktivität der 5-LO lässt sich durch ATP steigern, außerdem kann 5-LO mittels Affinitätschromatographie über ATP-Agarose aufgereinigt werden. Diese Beobachtungen deuten auf ATP-Bindungsstellen hin. Die Primärsequenz zeigt allerdings keine typische Nukleotid-Bindungsstelle. Mittels Photoaffinitäts-Labeling mit reaktiven ATP-Analogen wurden die beiden Tryptophanreste Trp-75 und -201 als mögliche ATP-Bindungsstellen identifiziert [16], allerdings konnten Mutationsstudien dies nicht bestätigen [17]. Eine weitere mögliche Bindungsstelle wird in der regulatorischen Domäne vermutet [18].

Innerhalb des Prolin-reichen Bereichs zwischen Aminosäure 566-577 konnte ein src homology (SH) 3 Bindungsmotiv gezeigt werden, welches mit der SH Domäne von Grb2 und Proteinen des Zytoskeletts interagiert [19]. Des Weiteren wurden verschiedene nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) innerhalb der 5-LO-Struktur postuliert, die unterschiedlich bewertet werden [20-23].

Für ein aktives 5-LO-Enzym scheinen sowohl die regulatorische als auch die katalytische Domäne notwendig zu sein. Zwar konnte für die Sojabohnen-LO und die humane 15-LO an Deletionsmutanten für die katalytische Domäne Aktivität gezeigt werden [24], dies trifft jedoch für die 5-LO nicht zu. Weder GFP-getaggte noch alleinige katalytische Domäne der 5-LO zeigen Aktivität [11,25].

2.2.2 5-Lipoxygenase-Gen und Regulation der 5-Lipoxygenase-Proteinexpression

Die molekulare Masse der monomeren Lipoxygenasen aus Säugetieren und Pflanzen liegt im Bereich von 78-80 kDa bzw. 94-104 kDa. 5-LO-cDNAs wurden aus humanen Zellen sowie aus Maus-, Ratten- und Hamster-Zellen kloniert, die kodierten Proteine zeigen zu 93-96% Sequenzhomologie. Das humane 5-LO-Gen befindet sich auf Chromosom 10q11.21, umfasst eine Länge von 82 Kilobasen und besteht aus 14 Exons [26]. Der Promotor ist GC-reich, TATAA oder CCAAT-Boxen, wie sie für House-Keeping Gene charakteristisch sind, fehlen. Für eine basale 5-LO-Transkription sind die beiden Transkriptionsfaktoren Egr-1 und Sp1 nötig [27,28]. Weiterhin enthält der Promotor mehrere Konsensusbindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie c-Myb, NF κ B, Sp1, Sp3, Egr-1, Egr-2, AP-2, sowie für die nukleären Rezeptoren VDR, den Retinoid Z Rezeptor α (RZR α) und den retinoic acid related orphan receptor α (ROR α) [29].

Die Expression von 5-LO findet hauptsächlich in Zellen myeloiden Ursprungs wie Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Langerhans-Zellen statt. Außerhalb des myeloiden Systems findet man in B-Lymphozyten und differenzierten Keratinozyten der Haut 5-LO. Oftmals wird gleichzeitig neben der Expression des 5-LO-Proteins auch FLAP exprimiert [30-32]. T-Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten sind 5-LO negativ.

Die Zelltyp-abhängigen Mechanismen der 5-LO-Expression sind nicht vollständig aufgeklärt. In den humanen Zelllinien Mono Mac 6 (MM6) und HL-60 führt eine durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und TGF β induzierte Differenzierung der Zellen zu einem signifikanten Anstieg der 5-LO-Expression und Aktivität [32-34]. Neuere Untersuchungen konnten im Reporterassay Erkennungssequenzen für 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im 5-LO-Promotor nachweisen. Die Bindung von Vitamin D₃ [35] und die Funktionalität der Erkennungssequenzen konnten gezeigt werden [36].

Die Regulierung der 5-LO-Genexpression kann auch durch DNA-Methylierung erfolgen. In den 5-LO negativen Zelllinien U937 und HL-60TB liegt der Promotor des 5-LO-Gens methyliert vor. Behandlung dieser Zellen mit dem DNA-Methylase-Inhibitor AdC führt zum Anstieg von 5-LO-pre-mRNA und reifer mRNA sowie zu gesteigerter 5-LO-Aktivität [37]. In MM6 Zellen konnte ein über eine Sp1-Bindungsstelle aktivierender Effekt des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A auf den 5-LO-Promotor gezeigt werden [38,39].

2.2.3 Enzymatische Funktion

5-Lipoxygenase katalysiert die ersten beiden Schritte in der Biosynthese der Leukotriene (Abb.). Der erste Schritt ist die stereospezifische Abspaltung des pro-*S* Wasserstoffatoms des cis,cis-1,4-Pentadiens der Arachidonsäure und die Einführung eines molekularen Sauerstoffs [40]. Es entsteht 5(S)-Hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraensäure (5(S)-HPETE), die zum korrespondierenden Alkohol 5-HETE reduziert werden kann.

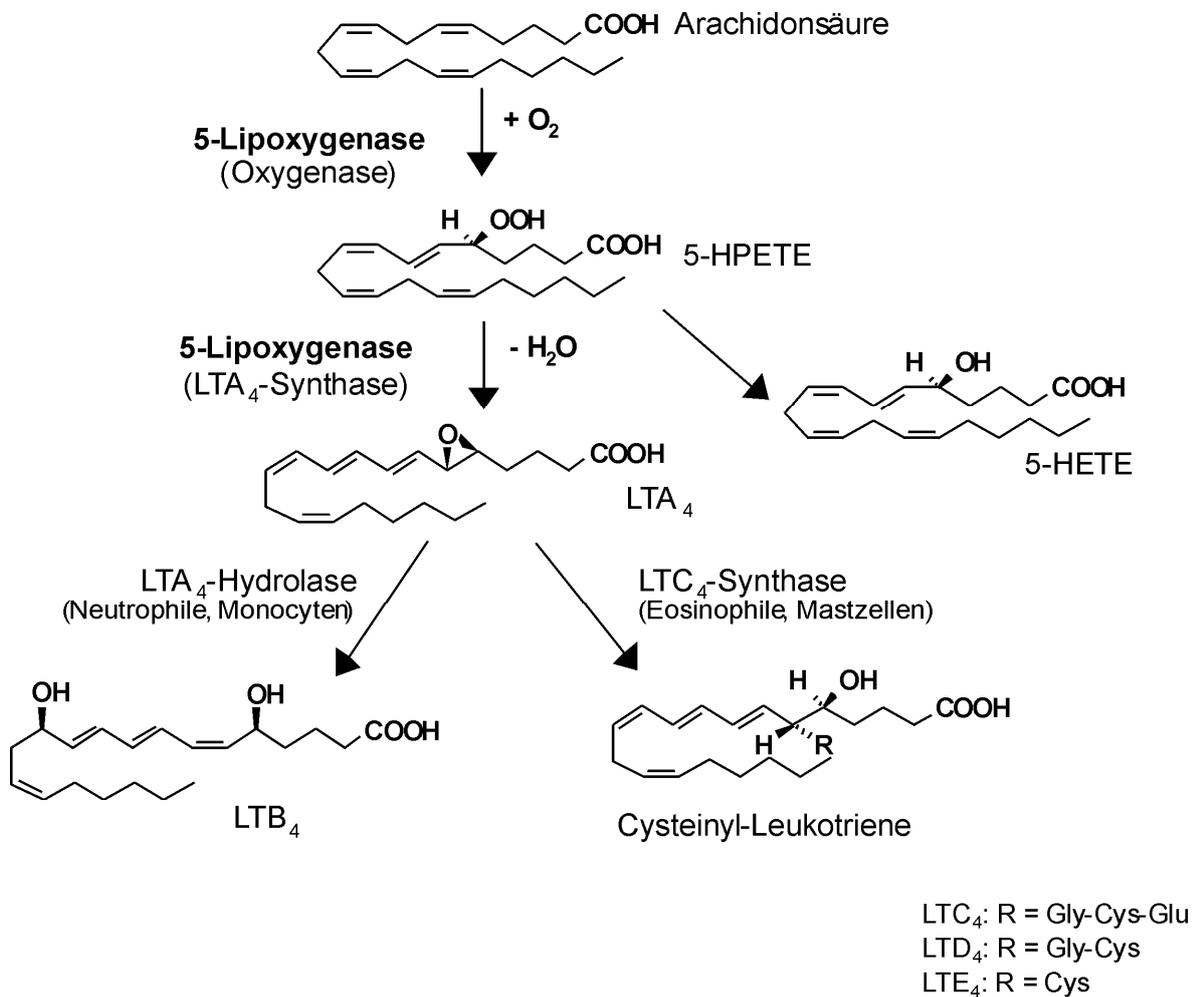


Abb. 2.2: 5-Lipoxygenase Stoffwechsel.

Neben dieser Oxygenase-Aktivität besitzt die 5-LO außerdem LTA₄ Synthase-Aktivität und ist in der Lage, 5-HPETE durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms an C10 und Radikalshift zu C6 zum instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) umzuwandeln [41].

LTA₄ kann durch die LTA₄ Hydrolase in Leukotrien B₄ (LTB₄) überführt werden, oder durch Konjugation mit Glutathion zum Cysteinylleukotrien C₄ (LTC₄) umgesetzt werden. LTC₄ kann dann zu den beiden Cysteinylleukotrienen D₄ und E₄ metabolisiert werden [42].

2.2.4 Regulation der Enzymaktivität der 5-Lipoxygenase

Die subzelluläre Verteilung der 5-LO ist abhängig vom Zelltyp. In ruhenden peripheren Neutrophilen und Monozyten, differenzierten HL-60 und MM6-Zellen findet man sie hauptsächlich im Zytosol. In ruhenden Alveolar-Makrophagen, Mäuse-Mastzellen und RBL-1-Zellen befindet sich die 5-LO dagegen vorwiegend in der löslichen Fraktion des Nukleus [43]. Für die 5-LO werden mehrere nukleäre Importsequenzen [20-23] und ein Exportsignal [44] postuliert. Durch die unabhängige Regulation der nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) scheint die Feinregulation des nukleären Imports möglich. Nach der Stimulation der Zellen transloziert die 5-LO zur Kernmembran [45], an der sich ebenfalls das membranassoziierte Protein FLAP befindet [46]. Auch für die cytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) konnte die Translokation zur Kernmembran gezeigt werden [47], sie spielt eine zentrale Rolle bei der Freisetzung von AA aus Phospholipiden.

FLAP (5-Lipoxygenase aktivierendes Protein) hat große Bedeutung für die enzymatische Funktion der 5-LO. Das 18 kDa Protein gehört zur MAPEG-Familie (membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) und ist für die zelluläre 5-LO-Aktivität unbedingt notwendig [48]. Vermutlich erleichtert es durch die Bindung von AA den Substrattransfer zur 5-LO und fördert die Bildung von 5-HPETE und LTA₄ [49,50]. In B-Lymphozyten und einigen myeloiden Zelllinien wie PMNL wird FLAP zusammen mit 5-LO exprimiert, aber auch in 5-LO negativen Zelllinien wie T-Lymphozyten und undifferenzierte MM6-Zellen konnte die Expression von FLAP gezeigt werden [51]. Die Translokation der 5-LO wird im Allgemeinen durch einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ausgelöst, außerdem fördert die Bindung von Ca²⁺ an die N-terminale C2-ähnliche Domäne die Membranbindung der 5-LO [52,53].

Durch Phosphorylierung der 5-LO kann die Translokation ebenfalls beeinflusst werden. Für die beiden aktivierenden Phosphorylierungen an Ser-271 und Ser-663 sind MK 1/2 (mitogen-activated protein kinase activated protein (MAPKAP) kinase) sowie ERKs (extracellular signal-related kinase) aus der Familie der mitogen-activated protein kinases (MAPK) verantwortlich. MK 1/2 sind erst nach Aktivierung durch p38 in der Lage, 5-LO zu

phosphorylieren [54,55]. Neueste Untersuchungen zeigen eine Regulation der 5-LO durch Androgene, die über ERKs vermittelt wird. Hieraus resultiert ein geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich der 5-LO-Aktivität, PMNL von weiblichen Probanden zeigten eine höhere Aktivität als PMNL männlicher Probanden [56]. Die Phosphorylierung durch Proteinkinase A an Ser-533 hat dagegen einen hemmenden Effekt auf die 5-LO, verhindert den nukleären Import und führt zur Inhibition der LT-Synthese [57].

Eine Reihe verschiedener Proteine scheinen mit der 5-LO zu interagieren, aber nur für wenige konnte die tatsächliche Bindung an das Enzym gezeigt werden. Im Hefe-Two-Hybrid System wurde Coactosin-Like Protein (CLP), ein F-Aktin-bindendes Protein von 17kDa Größe als Bindungspartner der 5-LO identifiziert [58]. CLP bindet Ca^{2+} -unabhängig an die 5-LO im Verhältnis 1:1 [59]. Lys-131 im CLP und Trp-13,-75 und-102 in der 5-LO konnten als an der Bindung beteiligte Aminosäuren identifiziert werden. Ein tertiäres Komplex von F-Aktin, CLP und 5-LO ist nicht nachweisbar, nur eine Konkurrenz zwischen F-Aktin und 5-LO um die Bindung an CLP wird beschrieben [59]. Betrachtet man die für die Bindung von F-Aktin bzw. 5-LO an CLP verantwortlichen Lysin-Reste Lys-75 und Lys-131, liegen diese auf der Oberfläche des CLP dicht beieinander und eine gleichzeitige Bindung beider Proteine scheint sterisch nicht möglich.

Ebenfalls im Hefe-Two-Hybrid System wurden Dicer und TRAP (TGF β receptor-I-associated protein)-1 als Bindungspartner der 5-LO identifiziert [58]. Für Dicer, auch als Ribonuklease (Rnase) III bezeichnet, konnte bisher keine funktionelle Verbindung zur 5-LO gezeigt werden. Der Bindung von TRAP-1 an 5-LO lässt sich durch die Stimulation der 5-LO-Expression und -Aktivität beispielsweise in HL-60 durch TGF β und Calcitriol [33] eine Bedeutung zusprechen.

Eine direkte Interaktion zwischen FLAP und 5-LO konnte bisher nicht gezeigt werden.

Für die 5-LO-Aktivität ist die oxidierte Form Fe^{3+} des Eisens im aktiven Zentrum essentiell. Daher spielt der zelluläre Redoxstatus eine wichtige Rolle bei der Überführung der 5-LO in ihre aktive Form. Lipidhydroperoxide wie 5-HPETE, 12-HETE und 13-HPODE sind in der Lage, die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu katalysieren, anorganische Hydroperoxide wie H_2O_2 führen zu keiner Oxidation [60,61].

Der zelluläre Redoxstatus wird durch endogene selenhaltige Glutathionperoxidasen (GPx) streng reguliert. GPx reduzieren Lipidhydroperoxide, verhindern damit die Oxidation des Eisens im aktiven Zentrum und somit die Aktivierung der 5-LO [62]. Bis heute wurden vier

verschiedene GPx identifiziert: klassische zytosolische (c)GPx (GPx-1), gastrointestinale (GI-)GPx (GPx-2), Plasma (p)GPx (GPx-3) und Phospholipid-Hydroperoxid (PH-)GPx (GPx-4). Diese vier Isoenzyme unterscheiden sich in ihren bevorzugten Substraten, Kosubstraten und ihrer Lokalisation (zur Übersicht siehe [63]). Humane zytosolische GPx (GPx-1), ein Homotetramer von 84 kDa Größe wird bei ausreichender Selen-Zufuhr ubiquitär exprimiert, als Cosubstrat dient hauptsächlich GSH. In MM6-Zellen ist die GPx-1 für die Repression der zellulären 5-LO-Aktivität verantwortlich [64]. GPx-4, früher als Phospholipid-Hydroperoxid (PH-)GPx bezeichnet, liegt als Monomer vor. Sie ist in der Lage, Hydroperoxid-Gruppen in membrangebundenen Fettsäuren zu reduzieren, als Cosubstrat akzeptiert sie neben GSH auch andere Thiole wie β -Mercaptoethanol oder DTT. Ca^{2+} und Glyceride sind vermutlich durch eine Absenkung des Lipidhydroperoxidbedarfs in der Lage, die Anfälligkeit der 5-LO für eine Hemmung durch GPx zu senken [65].

Ein weiterer Regulationsmechanismus der 5-LO-Aktivität könnte der Abbau von 5-LO durch Caspasen sein. In einer B-Lymphozyten-Zelllinie wurde in der Proliferationsphase ein Abbau der 5-LO durch Caspase-6 beobachtet [66].

Für die Enzymaktivität *in vitro* ist Ca^{2+} von großer Bedeutung. Eine maximale Aktivierung erreicht man bei 4-10 μM Ca^{2+} [67]. In intakten Zellen sind dagegen niedrigere Konzentrationen zwischen 200-400 nM Ca^{2+} ausreichend [68]. Durch die Bindung von Ca^{2+} an 5-LO erhöht sich die Hydrophobizität des Enzyms [67], die Bindung an PC-Vesikel [69], aber auch die Translokation und Membranbindung *in vivo* zur Kernmembran wird vermittelt [52,53,70]. Mg^{2+} ist ebenfalls in der Lage, die Aktivität der 5-LO zu steigern, allerdings ist der Effekt weniger stark ausgeprägt [71,72].

Die enzymatische Aktivität der 5-LO lässt sich des Weiteren durch ATP steigern, andere Nukleotide zeigen schwächere Effekte [73,74]. ATP dient hierbei nicht als Energielieferant, es erfolgt keine Hydrolyse. ATP wird heute als allosterischer Regulator gesehen, mehrere mögliche Bindungsstellen werden – wie bereits beschrieben - postuliert. Die Fähigkeit von 5-LO, ATP zu binden, wird bei der Aufreinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie über ATP-Agarose ausgenutzt.

Einen weiteren Faktor, der einen Einfluss auf die 5-LO-Aktivität ausübt, stellen Membranbestandteile dar. Membranfraktionen sind in der Lage, aufgereinigte 5-LO zu stabilisieren und die Aktivität des Enzyms zu steigern. PC-Vesikel sind in der Lage, die Membranfraktionen zu ersetzen, nicht aber Vesikel aus PS, PI oder PE [75,76]. Diese Beobachtungen decken sich mit der Erkenntnis, dass die 5-LO bevorzugt zur PC-reichen

Kernmembran transloziert. Als verantwortlich für die Selektivität zum zwitterionische PC konnten die drei Tryptophane Trp-13, -75 und -102 identifiziert werden [12]. Ebenfalls über diese drei Aminosäuren bindet das Protein CLP, das *in vitro* in der Lage ist, die Aktivität der 5-LO zu steigern [77].

2.2.5 Biologische Funktion der 5-Lipoxygenase-Produkte

Leukotriene spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen und sind an Reaktionen des Immunsystems beteiligt. LTB₄ als proinflammatorischer Mediator vermittelt die Chemotaxis und Sekretion von Granulozyten [78], die Anheftung von Leukozyten an der Gefäßwand sowie die Phagozytenaggregation und Freisetzung lysosomaler Enzyme [79]. In Lymphozyten stimuliert LTB₄ die Freisetzung von IgE und IgM (siehe Übersichtsartikel [51]).

Die Cysteinylleukotriene (CysLTs) wurden vor ihrer genauen Charakterisierung zunächst als slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) benannt. Sie führen zur Kontraktion der glatten Muskulatur [80] und damit zur Bronchokonstriktion, steigern die Schleimsekretion der Lunge [81] und die Gefäßpermeabilität. Sie sind wesentlich an den pathophysiologischen Vorgängen des Asthma bronchiale beteiligt [82].

Für 5-HETE konnte eine Steigerung der Zellproliferation und die Vermittlung anti-apoptotischer Effekte in verschiedenen Tumorzellen gezeigt werden [83,84]. Bei einer Überexpression von 5-LO-Protein in Tumorzellen konnten Inhibitoren für 5-LO und FLAP Apoptose induzieren [85]. 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraensäure (5-oxo-HETE) stimuliert Chemotaxis, Aktinpolymerisation und Ca²⁺ Mobilisation in Eosinophilen sowie die Expression von CD11b/CD8 auf der Zelloberfläche von polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) [86].

Experimente an 5-LO-knockout-Mäusen (5-LO^{-/-}) zeigten keine Unterschiede in der Entwicklung, im Phänotyp und in der Lebenserwartung im Vergleich zu WT-Mäusen [87]. Allerdings wurden geringere Anzeichen induzierter Entzündungen, Resistenz gegen PAF-induzierte Schockzustände [87] sowie geringere Hyperreaktivität und Reduktion der Eosinophilen-Anzahl bei allergischen Entzündungen der Atemwege [88] bei den 5-LO^{-/-}-Mäusen beobachtet. Sie zeigten weiterhin einen höheren Schutz gegen bakterielle Infektionen und Lungenfibrose [89].

Neben 5-LO sind Cyclooxygenasen (COX) 1 und 2 wichtige Enzyme innerhalb der Arachidonsäure-Kaskade. Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane sind Produkte der COX, sie zeigen Effekte auf Thrombozytenaktivität, glatte Muskulatur, Magenschleimhaut, Neurotransmitterfreisetzung, Temperaturkontrolle, Schmerz und Entzündung [90]. COX-2 setzt AA zu PGH₂ um, welches dann durch die membrangebundene PGE Synthase (mPGES) -1 zu PGE₂ umgewandelt wird. mPGES-1 spielt damit ebenfalls eine wichtige Rolle Entstehung von Entzündung, Schmerz, Fieber und Artherosklerose [91].

2.2.6 5-Lipoxygenase: Inhibitoren

Die Beteiligung der Leukotriene an der Entstehung einer Vielzahl pathophysiologischer Zustände wie entzündlichen und allergischen Erkrankungen, aber auch Osteoporose, Atherosklerose und Krebs ist heute bekannt oder wird vermutet, 5-LO selbst und ihr Stoffwechselweg stellen daher wichtige Angriffspunkte für die Therapie dar.

Glucocorticoide können die Freisetzung von Arachidonsäure durch cPLA₂ und die Bildung von Eicosanoiden verhindern, allerdings ist auch bei hohen Dosen die Hemmung der LT Synthese nur unvollständig [82].

Leukotrienrezeptor-Antagonisten wie Montelukast (Singulair®) befinden sich bereits seit einigen Jahren auf dem Markt und zeigen gute Therapieeffekte bei der Behandlung von Asthma [92].

Inhibitoren der LT-Biosynthese greifen direkt an der 5-LO an. Sie werden nach ihrem molekularen Wirkmechanismus in redoxaktive, Eisenligand- und nicht redoxaktive 5-LO-Inhibitoren unterteilt.

Redoxaktive Inhibitoren verhindern entweder die Oxidation des zweiwertigen Eisens im aktiven Zentrum und damit die Aktivierung der 5-LO, oder sie reduzieren bereits dreiwertiges Eisen zu inaktivem Fe²⁺. Naturstoffe mit Phenol-Gruppen wie Nordihydroguarsäure, Kaffeesäure, Flavonoide und Cumarine gehören in diese Gruppe. Leider zeigen diese Verbindungen aufgrund geringer Selektivität stark ausgeprägte unerwünschte Nebenwirkungen, synthetisch entwickelte Abkömmlinge wie AA-861, BW755C oder L-656,224 sind zwar oral bioverfügbar, zeigen aber ebenfalls keine ausreichende Selektivität [3].

Eisenligand-5-LO-Inhibitoren besitzen eine Hydroxamsäure- oder N-Hydroxyharnstoff-Gruppe in ihrer Struktur, die in der Lage ist, das Eisen im aktiven Zentrum zu chelatisieren.

Die Ausgangsverbindung dieser Gruppe ist die Hydroxamsäure BWA4C, ein potenter 5-LO-Inhibitor, der allerdings sehr schnell inaktiviert wird und toxische NO Radikale bildet [93]. Zileuton (Zyflo CRTM) enthält eine N-Hydroxyharnstoffstruktur und ist in den USA zur Behandlung von Asthma zugelassen [94]. Bei allergischer Rhinitis und rheumatoider Arthritis zeigt es dagegen keine positiven Effekte [95].

Da die beiden ersten Gruppen keine ausreichende Selektivität und Bioverfügbarkeit erreichen, wurden nicht-redoxaktive Inhibitoren entwickelt. Sie enthalten meist eine Methoxyalkylthiazol- oder Methoxytetrahydropyran-Teilstruktur wie beispielsweise die oral bioverfügbaren Verbindungen ZD2138 und ZM230487. Als möglicher Wirkmechanismus wird die kompetitive Verdrängung der AA an der 5-LO angenommen [96]. Es zeigte sich allerdings eine Abhängigkeit der Wirksamkeit vom Stimulus, vom Signalweg der 5-LO-Aktivierung und vom Redoxstatus. Bei entzündlichen Erkrankungen *in vivo*, wahrscheinlich bedingt durch hohe Peroxidkonzentrationen, zeigen sie nur sehr niedrige Effizienz.

Die Hemmung der 5-LO durch 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) und ihrem Derivat Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA), Bestandteile des Gummiharzes von *Boswellia serrata* (Weihrauch), beruht auf einem neuen molekularen Wirkmechanismus, denkbar ist die Bindung an eine zweite, regulatorische Fettsäure-Bindungsstelle neben der eigentlichen AA-Bindungsstelle im katalytischen Zentrum [97,98]. Bisher konnte die Inhibition der 5-LO allerdings nur *in vitro* gezeigt werden, die orale Gabe von Weihrauchextrakt an Testpersonen führte zu keiner nachweisbaren 5-LO-Hemmung [99].

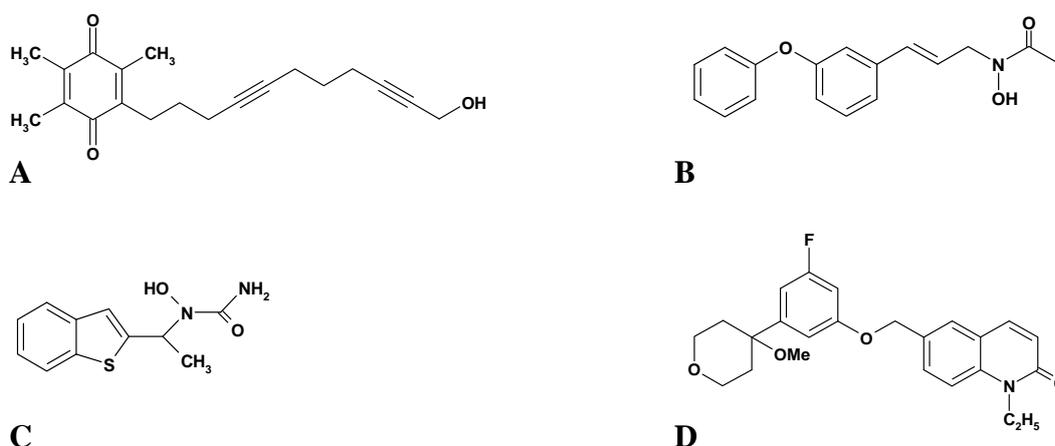


Abb. 2.3: 5-LO-Inhibitoren. Redoxaktiver Inhibitor A) AA-861, Eisenligand-Inhibitoren B) BWA4C und C) Zileuton, Nicht-redoxaktiver Inhibitor D) ZM230487

Hyperforin, Hauptinhaltsstoff von *Hypericum perforatum* (Johanniskraut)-Extrakten konnte als dualer Inhibitor der 5-LO und COX-1 identifiziert werden [100]. Neue Untersuchungen zeigten, dass Hyperforin mit der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO interagiert, die drei Tryptophan-Reste Trp-13, -75 und -102 sind maßgeblich an der Interaktion beteiligt. *In vivo* konnte eine gute antiinflammatorische Wirksamkeit nachgewiesen werden [101].

Myrtucommulon, Inhaltsstoff der Blätter von *Myrtus communis* (Myrte), hemmt ebenfalls 5-LO und COX-1 [102,103]. Neueste Untersuchungen zeigen auch für Celecoxib einen dualen Wirkmechanismus [104]. Für Garcinol, Inhaltsstoff in Guttiferae (Johanniskrautgewächse) – Arten, wird die duale Hemmung der 5-LO und mPGES-1 beschrieben [105].

Verschiedene FLAP-Inhibitoren wie MK886, Bay X1005 oder MK-0591 wurden entwickelt, sie zeigen an isolierten intakten PMNL gute inhibitorische Effekte auf die 5-LO-Aktivität. In Vollblut und *in vivo* dagegen zeigen sie nur sehr niedrige Effekte, als mögliche Erklärung ist eine Bindung an Plasmaproteine und/oder Konkurrenz von FLAP und AA denkbar [43].

2.3 C2-Domänen

C2-Domänen wurden ursprünglich als Sequenzmotiv von ca. 120 Aminosäureresten innerhalb der Proteinkinasen C entdeckt. Bis heute wurden über 600 C2-Domänen in mehr als 400 verschiedenen Proteinen identifiziert, die unterschiedlichste Funktionen innerhalb der Zelle ausüben. cPLA₂, Proteinkinase C (PKC)- β und PKC- δ sind an Signaltransduktionskaskaden und der Entstehung von Entzündungsreaktionen beteiligt, Synaptotagmin I (SytI) an der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung durch Exocytose synaptischer Vesikel.

Ein Großteil der C2-Domänen bindet in Anwesenheit von Ca²⁺ an Phospholipid-Membranen, es wurden aber auch C2-Domänen identifiziert, die keine Ca²⁺-Bindung zeigen. Eine weitere Möglichkeit ist die Ca²⁺-abhängige oder unabhängige Bindung anderer Proteine, eine Ca²⁺-unabhängige Bindung an Inositolpolyphosphate wird ebenfalls beschrieben [106].

2.3.1 Struktur der C2-Domänen

Die Struktur der C2-Domänen besteht aus einem β -Sandwich, der wiederum aus 2 gegenüberliegenden, jeweils viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird. Die acht β -Stränge sind durch insgesamt 7 Schleifen miteinander verbunden. Innerhalb der β -Stränge konnte eine hohe Sequenzhomologie gezeigt werden. Bedingt durch die Möglichkeit einer unterschiedlichen Reihenfolge der β -Stränge innerhalb der Domäne entstehen allerdings zwei Topologien. Die Sequenzen von Typ I (S-Typ) und Typ II (P-Typ) der C2-Domänen beginnen an unterschiedlichen β -Strängen und stellen wie in Abb. 2.4 gezeigt zirkuläre Permutationen voneinander dar. Der Grund für diese beiden Topologien ist nicht vollständig geklärt, man vermutet eine Beeinflussung der räumlichen Orientierung der Domäne zu anderen Domänen innerhalb des Proteins.

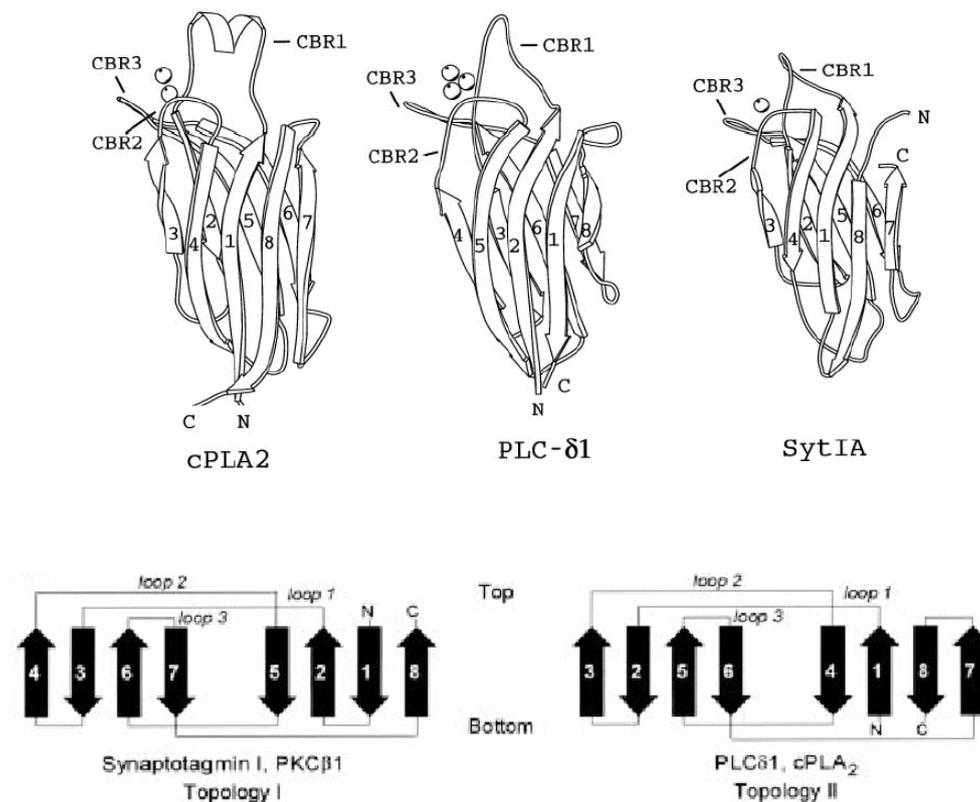


Abb. 2.4: C2-Domänen. Struktur aus cPLA₂, PLC und SytIA [107], sowie Darstellung der Topologie I und II [108].

Die Sequenzen der sieben verbindenden Schleifen differieren hingegen stark. Man findet drei Schleifen oberhalb und vier Schleifen unterhalb der C2-Domäne. Die drei oberen Schleifen sind in der Lage, Ca^{2+} zu binden und werden daher auch als Calcium-bindende Regionen (CBR) bezeichnet. Diese CBR sind nicht nur an der Ca^{2+} -Bindung der Ca^{2+} -abhängigen C2-Domänen beteiligt, sondern auch für die Membranbindung und möglicherweise für weitere Ligandbindungen verantwortlich. Die Phospholipid-Spezifität der C2-Domänen wird dabei ebenfalls durch die CBR bestimmt und ist abhängig von den jeweiligen Aminosäureresten der beteiligten Schleifen [106,108].

2.3.2 Ca^{2+} -abhängige Membranbindung der C2-Domänen

Es gibt verschiedene Theorien, in welcher Weise Ca^{2+} die Membranbindung der C2-Domänen vermittelt.

Im Ca^{2+} -Brücken-Modell wird die Koordinierung des Ca^{2+} -Ions durch funktionelle Gruppen sowohl der C2-Domäne als auch der Phospholipide der Membran vorgeschlagen. Bisher konnten Untersuchungen dies nicht als alleinigen Mechanismus bestätigen, sondern weisen lediglich auf eine Beteiligung der Ca^{2+} -Brücke an der Ca^{2+} -Bindung hin.

Das zweite Modell beruht auf einer durch die Ca^{2+} -Bindung vermittelten Konformationsänderung innerhalb der CBR und damit einer Verstärkung der Membranbindung. Bisherige Daten verschiedener C2-Domänen weisen auf eine Ca^{2+} -vermittelte Konformationsänderung der CBR hin, beispielsweise konnte für die C2-Domäne von SytI eine Stabilisierung der CBR durch Ca^{2+} gezeigt werden. Das Ausmaß der Beteiligung dieser Konformationsänderungen an der Membranbindung ist aber bisher nicht vollständig geklärt.

Dem dritten postulierten Mechanismus liegt die Änderung des elektrochemischen Potentials der C2-Domäne durch die Ca^{2+} -Bindung zugrunde, das Potential an der Spitze der C2-Domäne verschiebt sich von negativ zu positiv. Das Modell kann allerdings nur die Bindung für C2-Domänen erklären, die spezifisch an saure Phospholipidstrukturen binden, da hier bei steigender Ionenstärke die Interaktion unterbunden werden kann. Für die spezifische Bindung an neutrale Phospholipid-Strukturen bietet das Modell keine Erklärung.

Keiner der drei vorgestellten Mechanismen kann alleine die Bindung der Ca^{2+} -abhängigen C2-Domänen erklären, je nach Protein variiert der Anteil der verschiedenen Möglichkeiten an der Bindung [106].

2.4 N-terminale, C2-ähnliche „ β -Barrel“ der 5-Lipoxygenase

Wie bereits erwähnt, existiert von der 5-LO nur ein Computermodell basierend auf der Struktur der 15-LO aus Kaninchen-Retikulozyten. Die N-terminale Domäne der 15-LO besteht aus 8 β -Strängen, angeordnet in 2 β -Faltblättern. Innerhalb der β -Stränge geht man zwischen 15-LO und 5-LO davon aus, dass die beiden Bereiche homolog sind. Im Gegensatz dazu befindet sich in den verbindenden Schleifen nicht-konservierte Reste und Lücken.

Betrachtet man die Struktur der N-terminalen Domäne der LO, gleicht diese sehr stark den „echten“ C2-Domänen. Auffallend ist der Unterschied in der Anordnung der beiden β -Faltblätter. Sind diese beiden Ebenen im LO-Modell im 45° -Winkel zueinander verschoben, liegen sie bei der C2-Domäne der cPLA₂ annähernd parallel (Abb. 2.5). Die typischen Topologien der C2-Domänen lassen sich in der N-terminalen Domäne der LO nicht finden, auch die Sequenzen unterscheiden sich.

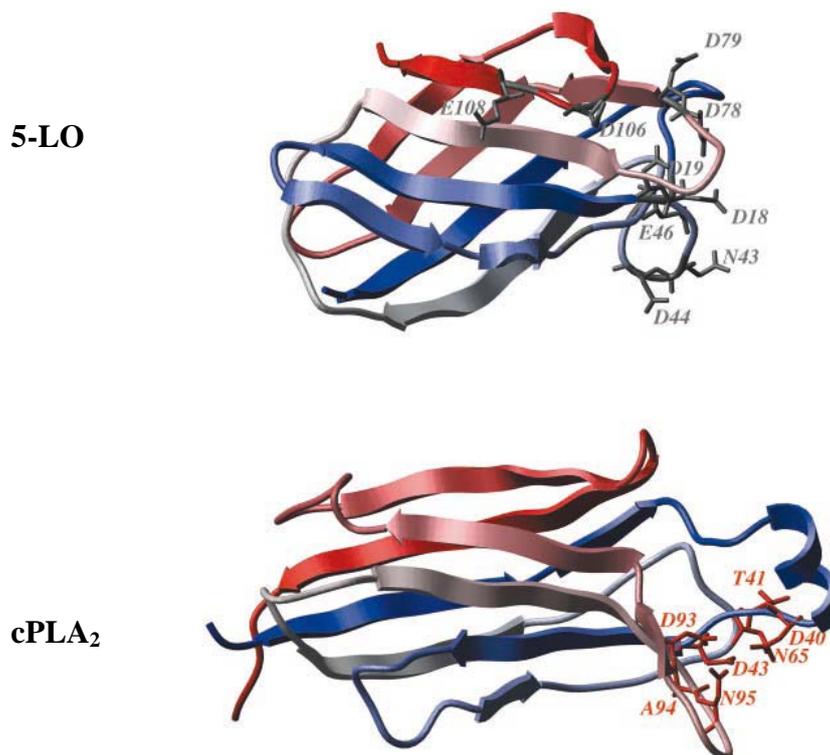


Abb. 2.5: Vergleich N-terminale Domäne der 5-LO (oben) und C2-Domäne der cPLA₂(unten). Die Reihenfolge der β -Faltblattstruktur ist durch den Farbverlauf beginnend am N-Terminus von rot nach blau gekennzeichnet. Dargestellt ist die parallele Anordnung der β -Faltblätter in der cPLA₂ und die im 45° Winkel zueinander angeordneten β -Faltblätter der 5-LO. Die gekennzeichneten Aminosäuren vermitteln die Ca^{2+} -Bindung [10].

Die Ähnlichkeit der Funktionalität der beiden Domänen ist durch zahlreiche experimentelle Daten belegt. Auch die C2-ähnliche Domäne der LO bindet Ca^{2+} über die verbindenden Schleifen, sie vermittelt die Translokation zur Kernmembran und ist für die PC-Selektivität verantwortlich. Untersuchungen an 5-LO-Deletionsmutanten deuten – wie bereits beschrieben – darauf hin, dass die N-terminale regulatorische Domäne für die Enzymaktivität unabkömmlich ist. Ein Fusionsprotein aus GFP und katalytischer Domäne zeigt keine Aktivität [11]. Gleiches gilt für alleinige katalytische Domäne, für die eine Fehlfaltung als Ursache des Aktivitätsverlustes ausgeschlossen wurde [25].

Für weitere Untersuchungen der C2-Domäne wurde in unserem Arbeitskreis von Dr. A. Michel im Rahmen ihrer Dissertation eine neue Methode zur Expression und Aufreinigung entwickelt. Der N-Terminus der 5-LO (1-128) wird als MBP-Fusionsprotein exprimiert und mittels Amylose-Affinitätschromatographie aufgereinigt, das MBP kann durch Verdau über eine TEV-Protease Schnittstelle abgespalten werden [109]. Gibt man die so aufgereinigte C2-ähnliche Domäne der 5-LO in niedrigen Konzentrationen zu wt-5-LO aus *E. coli*, zeigt sich eine Steigerung in der 5-LO-Produktbildung. Interessanterweise geht dieser Effekt bei höheren Konzentrationen an regulatorischer Domäne verloren bis hin zur Hemmung der 5-LO-Aktivität. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die C2-ähnliche Domäne der 5-LO in der Lage ist, in Abhängigkeit von der Anwesenheit von PC und/oder Ca^{2+} das Zwischenprodukt 5-HPETE zu reduzieren [25].

2.5 Diacylglyceride

Diacylglyceride (DAG) bestehen aus einem Glycerol-Grundgerüst, das an Position 1 und 2 meist Ester-gebundene Fettsäurereste trägt. Neben ihrer Funktion als Zwischenprodukte im Lipidstoffwechsel und als Bestandteile in biologischen Membranen spielen sie hauptsächlich in Lipid-vermittelten Signaltransduktionkaskaden eine wichtige Rolle.

Im Lipidstoffwechsel werden DAG als Grundbausteine zur Synthese komplexer Lipide genutzt, aber auch als Lieferant für Fettsäuren. Beteiligte Enzyme sind Lipidphosphat-Phosphatasen (LPPs), Phospholipase C (PLC) und PLD sowie Diacylglycerolkinasen (DGKs). DAG Produktion und Abbau werden in der Zelle streng reguliert, um die erforderlichen Konzentrationen zu garantieren [110].

Dienen DAG dagegen als second messenger in der Signaltransduktion, können externe Signale zu einem raschen Anstieg der DAG-Konzentration führen. Diese schnelle Produktion von DAG erfolgt über PLC oder PLD durch Hydrolyse von Glycerophospholipiden. Phosphatidylinositol-spezifische PLC (PI-PLC) -Isoenzyme hydrolysieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-3,4,5-Triphosphat (IP₃) und DAG. IP₃ führt zur Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die PI-PLC generieren damit zwei second messenger gleichzeitig und stellen daher wichtige Schlüsselenzyme in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Immunantwort dar [110]. Die Effekte von Ca²⁺-Ionophor und Thapsigargin auf die 5-LO-Produktbildung werden über die PLD/PA-P-Signaltransduktion vermittelt [111].

Die Metabolisierung von Glycerophospholipiden zu DAG kann auch über eine kombinierte Reaktion von PLD und Phosphatidsäure-Phosphatase (PA-P) erfolgen. Als Hauptsubstrat dient hier Phosphatidylcholin (PC) [110].

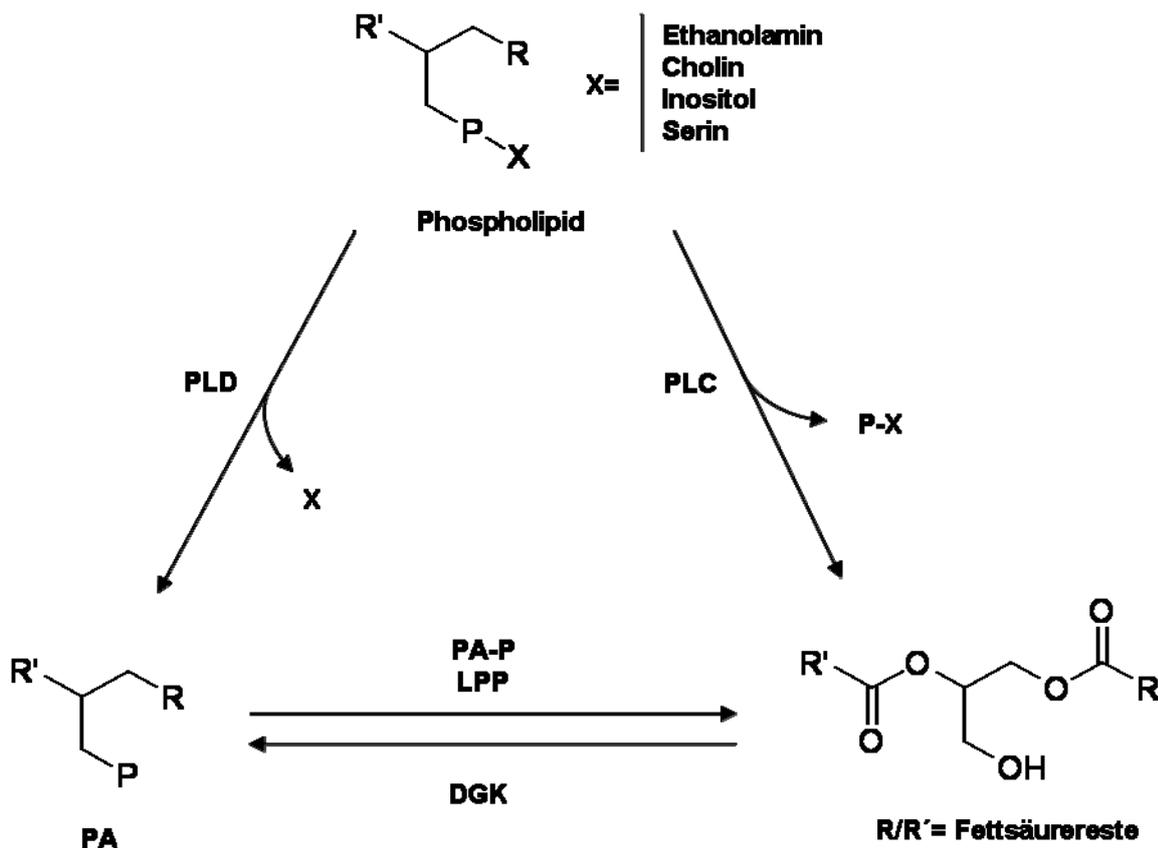


Abb. 2.6: DAG-Stoffwechsel. Vereinfachte Darstellung von Synthese und Abbau.

DGK: Diglyceridkinase, LPP: Lipidphosphat-Phosphatasen, PA: Phosphatidsäure, PA-P: Phosphatidsäure-Phosphatase, PLC/PLD: Phospholipase C/D

Durch die Vielzahl der in Zellen vorkommenden unterschiedlichen Fettsäuren variiert die Zusammensetzung der DAG in den Fettsäurekomponenten je nach beteiligtem Enzym. Mindestens 50 strukturell verschiedene DAG sind bekannt, deren Fettsäurereste gesättigt, einfach oder mehrfach ungesättigt sein können [112]. Dabei erfolgt die Bindung an die sn-2-Position meist über eine Esterstruktur, der Fettsäurerest an der sn-1-Position kann ester-, ether-, oder alkenylether-gebunden sein. Aus PIP₂ durch PLC gebildete DAG enthalten meist mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-glycerol. Aus PC entstandene DAG tragen häufig gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäurereste. Das Ausmaß der Beteiligung der verschiedenen DAG an der Signaltransduktion ist nicht geklärt [113].

Für den Abbau der DAG wurden unterschiedliche Metabolisierungswege charakterisiert, durch Diacylglycerolkinasen (DGK) erfolgt beispielsweise der Abbau zu PA, durch Lipasen zu Monoacylglycerolen und freien Fettsäuren [113].

Zu den Proteinen, die durch die DAG reguliert werden, gehören neben der Proteinkinase C (PKC)-Familie Vertreter aus fünf weiteren Proteinfamilien. Beispielsweise werden auch die Funktionen der Proteinkinase D, DGKs, Chimaerine, RasGRP (Ras guanyl nucleotide-releasing protein) und Munc13 durch eine direkte Interaktion mit DAG moduliert [114,115]. Alle werden durch mindestens eine C1-Domäne innerhalb ihrer Proteinsequenz charakterisiert. C1-Domänen bestehen aus der konservierten, cysteinreichen Sequenz HX₁₁₋₁₃CX₂CX₁₂₋₁₄CX₂CX₄HX₂CX₆₋₇C und wurden ursprünglich als Bindungsmotiv für Phorbolster beschrieben [110]. Es werden 2 Subtypen unterschieden, die typischen und die atypischen C1-Domänen. Die Rolle der atypischen C1-Domänen ist nicht vollständig geklärt, sie vermitteln Protein- und Membran-Interaktionen. Zu den atypischen C1-Domänen gehört die Familie der DGK. Proteine, die eine typische C1-Domäne tragen, sind beispielsweise die klassische und die neue PKC. Als Folge der Bindung von DAG an die typische C1-Domäne wird die Kontrolle der Aktivität und der Proteinlokalisierung beschrieben [110]. Für die Regulation der Aktivität der klassischen PKC wird ein Zusammenspiel der C1-Domäne mit einer weiteren regulatorischen Sequenz, der C2-Domäne, beschrieben. Im inaktiven Zustand findet sich das Protein im Zytosol, die Substrat-Bindungsstelle wird durch ein Pseudosubstrat gehemmt. Für die Aktivierung der klassischen PKC müssen sowohl die Ca²⁺-Spiegel als auch die DAG-Konzentration erhöht sein. Der Bindung von Ca²⁺ an die C2-Domäne folgt die Translokation des Proteins zur Membran, hier bindet DAG an die C1-Domäne. Durch die

folgende Konformationsänderung löst sich das inhibitorische Pseudosubstrat, die Bindungstasche wird frei zugänglich, das Substrat kann phosphoryliert werden [116].

Für die Aktivierung der PKC scheinen ungesättigte Fettsäurereste innerhalb der DAG von Vorteil zu sein, gesättigte DAG aktivieren die PKC nur in geringem Maß. Mehrfach ungesättigte DAG wie beispielsweise 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-glycerol sind dagegen sehr potente Aktivatoren der PKC [113].

2.5.1 Diacylglyceride und 5-Lipoxygenase

Die Vorinkubation von PMNL mit dem Diacylglycerid 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) und anschließender Stimulation mit fMLP führt zu einer gesteigerten 5-LO-Produktbildung [117]. Der Einfluss von DAG auf die Bildung von PAF [118] und auf den sogenannten „respiratory burst“ [119] in Neutrophilen wurde beschrieben. Eine direkte Stimulation der 5-LO-Aktivität in intakten PMNL durch OAG konnte gezeigt werden. Dabei steigern 100 μM OAG die Menge der gebildeten Produkte bis zu 40fach. Dieser Effekt ist nur bei Zugabe exogener AA zu beobachten, OAG alleine führt nicht zu einer Bereitstellung von endogenem Substrat. Notwendig sind ebenfalls basale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen. Entfernt man durch Zugabe von EDTA oder BAPTA/AM das intrazelluläre Ca^{2+} , ist OAG nicht in der Lage, eine gesteigerte 5-LO-Aktivität zu induzieren. Eine Beteiligung weiterer bekannter Signaltransduktionswege der 5-LO-Aktivierung wurde ebenfalls ausgeschlossen. OAG alleine beeinflusst weder die 5-LO-Translokation noch die Ca^{2+} -Mobilisierung. Hemmt man die PLD und somit die endogene DAG-Synthese, wird die 5-LO-Translokation unterbunden. Durch die Zugabe von OAG kann dieser Effekt wieder aufgehoben werden [111]. Der OAG-Effekt wird nicht über die Phosphorylierung durch MAPK vermittelt, auch die PKC konnte durch entsprechende Inhibitorexperimente als signalvermittelndes Protein ausgeschlossen werden [120]. Die Rolle des endogenen Synthesewegs für DAG über PLC konnte nicht aufgeklärt werden, da die entsprechenden Inhibitoren U73122 und D609 die 5-LO-Aktivität direkt hemmen [111,121]. Endogen generierte DAG über PLD/PA-P scheinen jedoch eine wichtige Rolle in der 5-LO-Aktivierung zu spielen. Hemmt man PLD durch 1-Butanol, wird die 5-LO-Produktbildung effektiv verhindert, dieser Effekt kann durch die exogene Zugabe von OAG überwunden werden [111].

2.6 Ziel der Arbeit

Basierend auf der vorausgegangenen Dissertation von Dr. D. Albert sollte die Aktivierung der 5-LO durch OAG und anderen DAG weiter untersucht werden. Durch die Ergebnisse konnte die Beteiligung bekannter Signaltransduktionsmechanismen wie beispielsweise Ca^{2+} - Mobilisierung und Enzymphosphorylierung ausgeschlossen werden, der molekulare Mechanismus für OAG blieb unklar. OAG führt nicht nur nach Vorbehandlung („Priming“) von PMNL und anschließender Agonist-induzierter 5-LO-Stimulation zu einer gesteigerten Leukotrienbildung, sondern dient selbst als direkter Agonist [120].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine direkte Interaktion von OAG mit der 5-LO *in vitro* aufgeklärt werden. Da die bisherigen Studien weitgehend an intakten Zellen und Zellhomogenaten durchgeführt wurden, sollten nun die möglichen Effekte unter anderem an 100.000g Überständen und am partiell über ATP-Agarose aufgereinigten 5-LO-Enzym untersucht werden. Neben OAG sollten weitere DAG auf ihre Fähigkeit, die 5-LO-Aktivität zu steigern, getestet werden. Der Einfluss und das Mitwirken weiterer Kofaktoren wie beispielsweise Ca^{2+} , ATP und PC waren zu berücksichtigen, denkbare Interaktionen zwischen OAG und Ca^{2+} bzw. OAG und Phospholipiden sind von Interesse. Für den OAG-Effekt wurde eine gewisse Zelllinienspezifität ermittelt, die zusätzlich untersucht werden sollte.

Die potentielle Bindungsstelle für OAG sollte identifiziert und charakterisiert werden.

5-LO als Schlüsselenzym in der Leukotrien-Biosynthese stellt einen wichtigen Angriffspunkt für die Behandlung der durch LTs bedingten Erkrankungen wie beispielsweise Asthma dar. LT Antagonisten werden heute schon vielversprechend in der Asthmatherapie eingesetzt. Die Entwicklung neuer, direkter 5-LO-Inhibitoren erweist sich dagegen als schwierig. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten daher mögliche neue 5-LO-Inhibitoren identifiziert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Zellen und Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien werden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Mono Mac 6 (MM6) Zellen wurden von Dr. H.W. Ziegler-Heitbrock, München zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine monozytäre Zelllinie, die phänotypische und funktionelle Eigenschaften reifer Monozyten besitzt [122]. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit Glutamin, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat, 1x Nicht-essentielle Aminosäuren, 10 µg/ml Insulin und 1 mM Oxalacetat supplementiert wurde, kultiviert. Die serumfreie Kultur der Zellen erfolgte ebenfalls in RPMI 1640 Medium mit Glutamin, dem kein FCS zugesetzt wurde. Alle anderen Zusätze bleiben unverändert. Die Zellen erhielten zusätzlich 10 ng/ml Se⁴⁺ und 2 µg/ml Catalase direkt in das Wachstumsmedium der jeweiligen Zellkulturflasche. Die Differenzierung der Zellen erfolgte bei einer Ausgangszelldichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen mit 2 ng/ml TGFβ und 50 nM Calcitriol für 4 Tage.

Undifferenzierte MM6 Zellen exprimieren zwar konstitutiv FLAP, zeigen allerdings nach Stimulation mit Ca-Ionophor keine 5-LO-Produktsynthese. Durch viertägige Differenzierung mit TGFβ und Calcitriol [34,123] steigt die 5-LO-Expression und -Aktivität stark an [124].

Die Zelllinie BL41-E95-A wurde von Dr. H.-E. Claesson, Karolinska Institut, Stockholm zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Burkitt's Lymphoma Zellen, die transient mit dem Epstein-Barr-Virus Variante B95-A transfiziert sind [125]. Die Kultivierung erfolgt in RPMI 1640 Medium mit Glutamin, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin ergänzt wurde. Die Suspensionszellen werden durch Zentrifugation gernnet, gewaschen und in PBS-Puffer mit 1mg/ml Glucose resuspendiert.

Die Zellen exprimieren konstitutiv FLAP und 5-LO-Protein. Nach Stimulation intakter Zellen mit Ca-Ionophor und Arachidonsäure lassen sich allerdings nur sehr geringe Mengen an gebildeten 5-LO-Metaboliten nachweisen [126]. Im Gegensatz dazu konnte in korrespondierenden Homogenaten eine höhere 5-LO-Aktivität gefunden werden [127].

HeLa-Zellen (epithelartige Zellen eines Zervixkarzinoms) werden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Das Medium wird mit 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin supplementiert.

3.2 Isolierung von humanen polymorphkernigen Leukozyten (PMNL)

Humane PMNL werden aus Lymphozyten-Konzentraten (Buffy Coats) frisch isoliert. Diese Konzentrate werden aus venösem Blut gesunder Erwachsener durch Zentrifugation und Abpressen des Plasmas am Markus-Krankenhaus Frankfurt gewonnen und zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Leukozyten wird nach einem Standardprotokoll durchgeführt [128]. Die Buffy Coats werden vereinigt und mit dem gleichen Volumen an PBS-Puffer verdünnt. Die Abtrennung noch enthaltener Erythrozyten erfolgt durch Dextran-Sedimentation. Je 40 ml des verdünnten Leukozytenkonzentrats werden mit 10 ml einer 10%igen Dextranlösung in PBS-Puffer gemischt. Nach 30-40 min sind die Erythrozyten großteils sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen und über 10 ml Lymphozytenseparationsmedium überschichtet. Es folgt eine Dichtezentrifugation (800g, RT, 10 min ohne Bremse) zur Entfernung von Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet, bestehend aus Granulozyten und restlichen Erythrozyten, in 50 ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (300g, RT, 10 min) und Absaugen des Überstand erfolgt die hypotone Lyse der restlichen Erythrozyten. Das Pellet wird dazu mit 10 ml eiskaltem Milli-Q Wasser versetzt. Die Lyse wird nach 45 sec. durch Zugabe von 40 ml PBS-Puffer gestoppt. Nach Zentrifugation (200g, RT, 10 min) folgt ein Waschschrift mit PBS-Puffer sowie eine weitere Lyse. Abschließend werden die erhaltenen Leukozyten in PBS-Puffer mit 1mg/ml Glucose resuspendiert.

Das entsprechende Volumen für 5×10^6 Zellen abgenommen, mit PBS/Glucose auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und sofort wie unter Abschnitt 3.8 beschrieben für die 5-LO-Aktivitätstests eingesetzt.

3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer „Bürker“ Zählkammer bestimmt. Die jeweiligen Zellsuspensionen in PBS werden mit einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung gemischt, auf die Zählkammer aufgetragen und visuell unter dem Mikroskop ausgezählt. Intakte Zellen nehmen keinen Farbstoff auf, tote Zellen werden blau angefärbt.

3.4 Expression des 5-Lipoxygenase (5-LO)-Proteins in *Escherichia coli* (*E. coli*)

Wildtyp und Mutanten der 5-LO werden als Plasmide pT3-5LO (wt) [129], pT3-5LO-N43A-D44A-E46A (loop2 mut-5LO) [10] und pT3-5LO-W13A-W75A-W102A (3W mut-5LO) in *E. coli* Stamm MV1190 transformiert und bei 27°C exprimiert.

Eine Kultur aus 20 ml LB-Medium (2,5% Luria-Broth Base Medium), 200 µl transformierter *E. coli* MV1190 und Ampicillin (0,2 mg/ml) wird angesetzt und über Nacht geschüttelt (220 U/min, 37°C).

5 ml dieser Übernachtskultur werden zu 1 Liter 10%iger M9-Lösung (48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,5 mM NaCl, 19 mM NH₄Cl, 6,3 mM NaOH, pH 7,4 mit 4% Glycerol (50%ig) und 2 g Casein) gegeben, Ampicillin (0,1 mg/ml), MgSO₄ (2 mM) und FeSO₄ (5 µM) zugesetzt und geschüttelt (210 U/min, 27°C). Nach 6-8 Stunden bzw. bei Erreichen einer optischen Dichte (OD₆₂₀) von 0,2 bis 0,3 wird IPTG (0,2 mM) zugegeben. Die Kultur wird weitere 14-16 Stunden geschüttelt.

3.5 Aufreinigung des Proteins 5-Lipoxygenase

Zur Beginn der Aufreinigung des Proteins aus *E. coli* wird das Pellet nach Zentrifugation (10.000g, 10 min, 4°C) der Kultur durch Inkubation in 10 ml Homogenisierungspuffer (50 mM Triethanolamin/HCl, pH 8,0, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), soybean trypsin inhibitor (STI) (60µg/ml), 1 mM Phenylmethylsulfonylchlorid (PMSF), Lysozym (500 µg/ml)) resuspendiert und 5 min bei RT lysiert. Im Anschluß werden die Zellen 25 min auf Eis gehalten, dann 3 × 10 sec mittels Ultraschall homogenisiert. Nach Zentrifugation (19.000g, 14 min, 4°C) wird der Überstand mit dem gleichen Volumen gesättigter

(NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt. Die wurden mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung unter ständigem Rühren auf Eis ausgefällt und das Präzipitat bei 16000 × g für 25 Minuten abzentrifugiert. Die enthaltenen Proteine einschließlich der 5-LO werden unter Rühren auf Eis (40 min) gefällt. Es folgt eine Zentrifugation (16.000g, 25 min, 4°C), das Pellet wird in 20 ml PBS-Puffer mit 1 mM EDTA resuspendiert.

Für die Aufreinigung der 5-LO aus PMNL werden 5×10^8 Zellen in 10 ml PBS-Puffer mit 1 mM EDTA resuspendiert. Bevor sie mittels Ultraschall 3×10 sec. homogenisiert werden, steht die Zellsuspension für 10 min auf Eis.

Sowohl diese Homogenate der PMNL als auch das resuspendierte Pellet der E. coli werden anschließend zentrifugiert (100.000g, 70 min, 4°C) und die erhaltenen 100.000g-Überstände (S100) auf eine ATP-Agarose-Säule aufgegeben. Die Elution der 5-LO von der Säule erfolgt wie unter Abschnitt 3.7 beschrieben.

3.6 Gewinnung des 100.000g Überstands (S100)

Die entsprechenden Zellen werden in PBS/ 1 mM EDTA resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wird 3×10 sec mittels Ultraschallstab homogenisiert, die Homogenate werden ultrazentrifugiert (100.000g, 70 min, 4°C). Der Überstand wird abgenommen, die entsprechende Menge für 1×10^7 Zellen wird mit PBS/1 mM EDTA auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt. Nach Zugabe von 1 mM ATP wird der S100 sofort wie unter Abschnitt 3.8 beschrieben für die 5-LO-Aktivitätstests eingesetzt.

3.7 Partielle Isolierung der 5-Lipoxygenase mit Hilfe von ATP-Agarose

Die partielle Isolierung der 5-LO erfolgt durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von ATP-Agarose [34]. Alle Schritte werden bei 4°C durchgeführt.

Für die verwendete Säule wird ATP-Agarose in destilliertem Wasser vorgequollen, in eine Kunststoffkartusche gefüllt (Säulenbettvolumen: 1,5-2ml) und mit 30 ml PBS/1 mM EDTA equilibriert. Auf diese Säule wird der jeweilige 100.000g Überstand der entsprechenden Zellen (2×10^8 /ml) aufgetragen. Es folgen mehrere Waschschrte mit verschiedenen

Pufferlösungen. Es wird mit 10 ml PBS/ 1mM EDTA, anschließend mit 10 ml 0,5 M NaCl/1mM EDTA in PB (50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) und zum Abschluss mit 10 ml PB/1 mM EDTA gewaschen.

Alle Durchläufe werden getrennt aufgefangen und für mögliche weitere Untersuchungen bei 4°C aufbewahrt.

Das Protein 5-LO wird mit einer 20 mM ATP-Lösung in PB/1 mM EDTA eluiert. Das Eluat wird bei 4°C mit Hilfe von Vivaspin Zentrifugationssäulen (2 ml, Sartorius) eingengt auf <1 ml eingengt. Mit PBS/ 1 mM EDTA wird das eingengte Eluat auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt. Nach Zugabe von 1 mM ATP wird das Eluat sofort wie unter Abschnitt 3.8 für die 5-LO-Aktivitätstest eingesetzt.

3.8 Bestimmung der 5-Lipoxygenase-Aktivität anhand der Bildung von 5-Lipoxygenase-Produkten

Zur Untersuchung der 5-LO-Produktbildung in intakten Zellen wird zunächst mit den jeweiligen Testsubstanzen vorinkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von Ca-Ionophor und Arachidonsäure in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml Methanol abgestoppt. 500 µl PBS, 30 µl 1 N HCl und 200 ng PGB₁ (interner Standard) werden zugesetzt.

Die gebildeten LO-Metabolite werden nach einem Standardprotokoll extrahiert und mittels HPLC bestimmt [130].

Nach Zentrifugation (800g, 10 min, RT) werden die 5-LO-Produkte mittels Festphasenextraktion über RP18-Säulen (Clean-Up[®] Extraction Columns, United Chemical Technologies) gewonnen. Die Extraktionssäulen werden vor zunächst mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert, anschließend werden die Proben aufgetragen. Es folgen zwei Reinigungsschritte mit 1 ml Wasser und 1 ml Methanol 25%. Die Elution der 5-LO-Metabolite erfolgt mit 300 µl Methanol. Dem Eluat wird 120 µl Wasser zugesetzt, ein Aliquot (100 µl) dieser Lösung wird mittels HPLC analysiert. Als stationäre Phase dient eine Novapak C-18 Radial-Pak-Säule (100 mm × 5 mm I.D., 4 µm Partikelgröße, Waters), das Fließmittel ist aus Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure (72/28/0,007 V/V) zusammengesetzt. Die Flussrate beträgt 1,2 ml/min. Die Detektion erfolgt durch UV bei 280 nm zu Beginn eines Laufs, nach 8 min wird auf 235 nm gewechselt. Die 5-LO-Aktivität wird in ng 5-LO-

Metabolite/ 10^6 Zellen angegeben und setzt sich zusammen aus den 5-LO-Produkten LTB₄, den all-trans-Isomeren des LTB₄, 5-HPETE und 5-HETE.

Zur Bestimmung der 5-LO-Aktivität in Homogenaten und 100.000g Überständen sowie der Aktivität des partiell aufgereinigten Enzyms werden die Proben nach Zugabe der Testsubstanzen 30 sec bei 37°C vorinkubiert, gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von Ca²⁺ und Arachidonsäure in den jeweils angegebenen Konzentrationen. Die weitere Inkubation und Extraktion erfolgt wie für intakte Zellen bereits beschrieben.

3.9 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Die Glutathion-Peroxidase-Aktivität wird nach einer Vorschrift von Wendel [131] bestimmt.

Eine Gemisch aus 190 µl Phosphatpuffer (0,25 M) pH 7,0/ 2,5 mM EDTA/ 2,5 mM NaN₃, 100 µl Glutathion-Reduktase (Aktivität pro ml Phosphatpuffer: 6 µmol/min bei 25°C), 100 µl 12 mM reduziertes Glutathion (pH 4-5), 100 µl 2,5 mM NADPH (in 0,1% NaHCO₃) und 500 µl Untersuchungslösung wird in einer Küvette 10 min bei 37°C vorinkubiert.

Als Untersuchungslösung dient der 100.000g Überstand der zu untersuchenden Zellen oder im oben angegebenen Phosphatpuffer gelöste Glutathion-Peroxidase.

Nach der Vorinkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µl einer 120 mM Cumolhydroperoxid-Lösung als Substrat gestartet.

Während der Reaktion der Glutathion-Peroxidase mit Cumolhydroperoxid wird reduziertes Glutathion (GSH) in das Glutathiondisulfid (GSSG) überführt. Das entstehende Disulfid wird von der Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch reduziert, aus NADPH entsteht NADP⁺.

Die Abnahme der NADPH-Konzentration spiegelt sich in der Abnahme der Absorption des Reaktionsgemisches wieder und wird bei 366 nm photometrisch vermessen. Die relative Aktivität der GPx-1 bezogen auf eine Kontrolle wird als Steigungsabnahme/min angegeben. Auf die quantitative Bestimmung der absoluten Peroxidaseaktivität wurde verzichtet.

3.10 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen werden mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation durchgeführt. 24 Stunden vor der Transfektion werden in T-75 Zellkulturflaschen je $1,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen ausgesät. 10 μg Plasmid werden mit sterilem MilliQ-Wasser zu 450 μl verdünnt und 50 μl 2,5 M CaCl_2 -Lösung zugegeben. Diese Mischung wird langsam unter gleichmäßigem Einstrom von steriler Luft zu 500 μl HeBS-Lösung (50 mM HEPES, 28 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,05 mit 5 N NaOH) getropft. Nach einer Präzipitationszeit von 5-10 min wird die Suspension in das Wachstumsmedium der HeLa-Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wird das Zellkulturmedium durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen geerntet, gewaschen und in PBS-Puffer mit 1mg/ml Glucose aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Stimulation der 5-Lipoxygenase durch 1-Oleoyl-2-acetyllycerol

4.1.1 OAG induziert 5-Lipoxygenase-Aktivität *in vitro* in Abwesenheit von Ca^{2+}

Zur Untersuchung des Einflusses von OAG (Abb. 4.2) auf die 5-LO-Aktivität *in vitro* wurden von frisch isolierten PMNL Homogenate, S100 und über ATP-Agarose partiell aufgereinigtes Enzym eingesetzt.

Unter optimalen Assay-Bedingungen, also in Anwesenheit von 1mM ATP und 1 mM Ca^{2+} , zeigt OAG keinerlei stimulierenden Effekte auf die Enzymaktivität (Abb. 4.1). Es kommt im Gegenteil sogar konzentrationsabhängig zu einer leichten Abnahme der 5-LO-Produktbildung. Diese Ergebnisse sind unabhängig von der eingesetzten Substratkonzentration (2-40 μM AA) und lassen sich an Homogenaten, S100 und partiell aufgereinigter 5-LO beobachten.

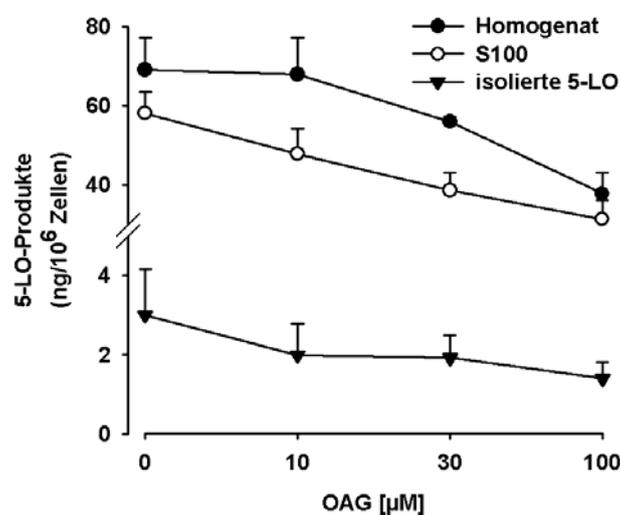


Abb. 4.1: Effekte von OAG in Anwesenheit von Ca^{2+} . Homogenate und S100 aus frisch isolierten PMNL ($7,5 \times 10^6$) oder partiell aufgereinigte 5-LO aus PMNL (2×10^7) werden in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und mit den angegebenen Konzentrationen an OAG bei 4°C für 5 min vorinkubiert. Nach Erwärmen wird 2mM CaCl_2 und 5 μM AA zugesetzt, die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit den resultierenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

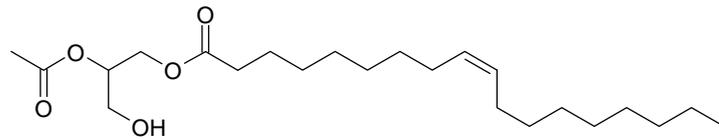


Abb. 4.2: Strukturformel von 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol

Da Ca^{2+} als ein potenter Aktivator der 5-LO bekannt, aber nicht unbedingt essentiell für die Leukotrien-Bildung ist, wurde es für die nächsten Untersuchungen aus den Inkubationsansätzen entfernt.

Wird unter diesen suboptimalen Versuchsbedingungen die Aktivität der 5-LO bestimmt, findet man im Vergleich zu den Ergebnissen unter optimalen Assay-Bedingungen insgesamt eine geringere 5-LO-Produktbildung. Dies gilt insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen unter $20 \mu\text{M}$ AA und konnte bereits früher beobachtet werden [128]. Allerdings lässt sich in Homogenaten auch unter diesen Versuchsbedingungen in Abwesenheit von Ca^{2+} die Aktivität der 5-LO durch OAG nicht beeinflussen. Anders verhält es sich im S100 und am partiell aufgereinigten Enzym. Hier wird die Leukotrien-Bildung in Abwesenheit von Ca^{2+} durch OAG 8-fach bzw. 14-fach gesteigert (Abb. 4.3). Der Einfluss von OAG kann bereits ab einer Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ OAG beobachtet werden, die maximale Aktivierung wird durch $30 \mu\text{M}$ OAG erreicht.

Der stimulierende Effekt von OAG ist sowohl im S100 als auch am partiell aufgereinigten Enzym unabhängig von der gewählten Vorinkubationszeit (nicht gezeigt). Die Zeitabstände zwischen der Zugabe von OAG und AA scheinen variabel zu sein. Es ergaben sich keinerlei Unterschiede im Ausmaß der Aktivierung bei der gleichzeitigen Zugabe von OAG und AA im Vergleich zu einer Vorinkubationszeit für OAG bis zu 60 min vor der Zugabe von AA (nicht gezeigt).

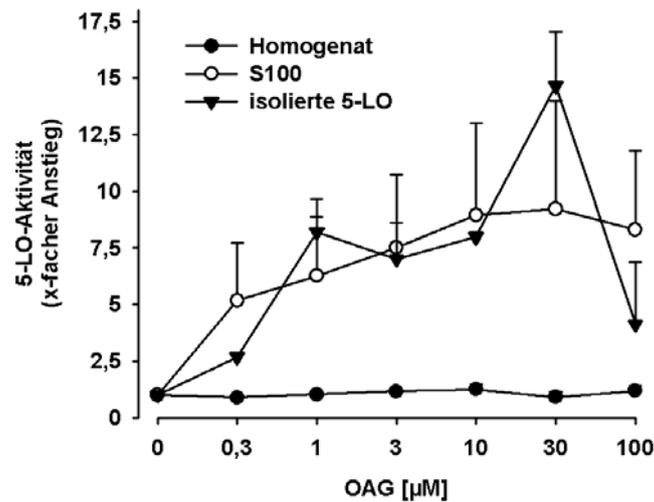


Abb. 4.3: Stimulation der 5-LO-Aktivität durch OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} . Homogenate und S100 aus frisch isolierten PMNL ($7,5 \times 10^6$) oder partiell aufgereinigte 5-LO aus PMNL (2×10^7) werden in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und mit den angegebenen Konzentrationen an OAG bei $4^\circ C$ für 5 min vorinkubiert. Nach Erwärmen wird $5 \mu M$ AA zugesetzt, die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bestimmt. Die 5-LO-Aktivitäten der Kontrollen ohne OAG betragen für Homogenat, S100 bzw. partiell isolierte 5-LO $4,7 \pm 1,6$, $5,9 \pm 1,4$ und $0,9 \pm 0,3$ ng/ 10^6 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen. Die Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler dieser Experimente.

4.1.2 OAG aktiviert die 12- und 15-Lipoxygenase in Abwesenheit von Ca^{2+}

Der Einfluss von OAG auf andere Lipoxygenasen wurde ebenfalls untersucht. Wie aus Abb. 4.4 ersichtlich, ist OAG unter suboptimalen Versuchsbedingungen, also in Abwesenheit von Ca^{2+} ebenfalls in der Lage, die Aktivität der 12-Lipoxygenase aus Thrombozyten zu steigern. Gleichzeitig wird auch ein Anstieg der 15-LO-Produktbildung beobachtet. Die Effekte sind verglichen mit der Aktivitätssteigerung der 5-LO allerdings wesentlich geringer, es wird maximal ein 3-4facher Anstieg erreicht. Entsprechend den Ergebnissen für 5-LO können die OAG-Effekte auf die 12- und 15-LO unter optimalen Bedingungen in Anwesenheit von Ca^{2+} nicht beobachtet werden.

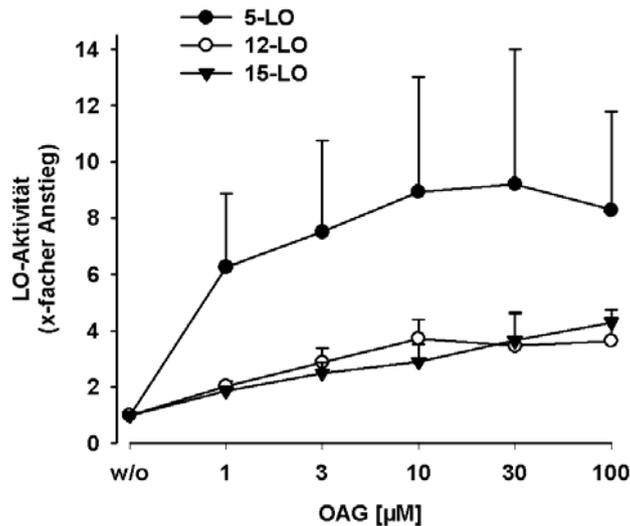


Abb. 4.4: Effekte von OAG auf 12- und 15-LO. Die Aktivitäten der 5- und 15-LO werden im S100 frisch isolierter PMNL bestimmt, die der 12-LO im S100 von Thrombozyten (10^8). Die Proben werden wie unter Abb. 4.2 in Abwesenheit von Ca^{2+} inkubiert und ausgewertet. Die 5-, 12- bzw. 15-LO-Aktivität der Kontrolle ohne OAG beträgt $5,9 \pm 1,4$, $0,52 \pm 0,06$ und $4,3 \pm 0,9$ ng/ 10^6 Zellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit resultierendem Standardfehler aus drei unabhängigen Bestimmungen.

4.1.3 Einfluss der Substratkonzentration auf die Stimulation durch OAG

In den folgenden Experimenten sollte bestimmt werden, bei welchen Substratkonzentrationen OAG am effektivsten in der Lage ist, die Leukotrien-Bildung zu beeinflussen. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Art der Aktivierung durch OAG und Ca^{2+} sich ähneln. Die Beobachtungen aus vorausgegangenen Studien [128], dass Ca^{2+} besonders bei niedrigen Substrat-Konzentrationen in der Lage ist, die 5-LO-Produktbildung zu steigern, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei höheren Substrat-Konzentrationen über 20 μ M AA sind keine stimulierenden Effekte mehr durch Ca^{2+} zu beobachten. Ähnlich verhalten sich nun auch die Effekte mit OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} . Im Bereich niedriger Substrat-Konzentrationen zwischen 0,5 - 10 μ M AA wird die 5-LO-Aktivität durch OAG am effektivsten gesteigert, dagegen zeigt sich für OAG ab Substrat-Konzentrationen von 20 μ M AA und mehr keinerlei Einfluss auf die Menge der gebildeten 5-LO-Produkte (Abb. 4.5).

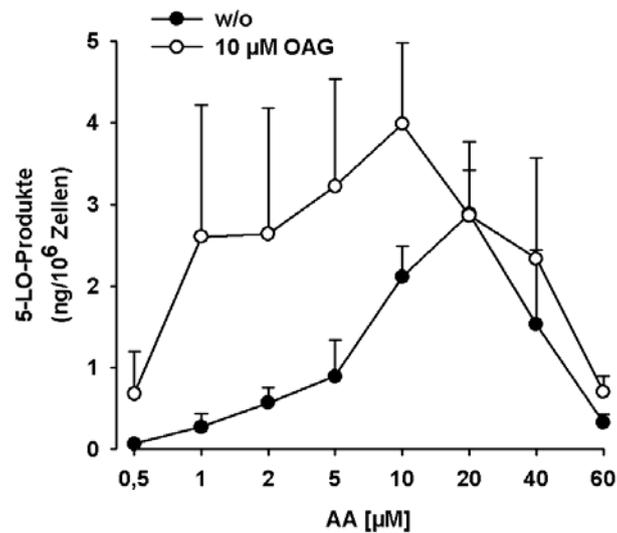


Abb. 4.5: *Abhängigkeit der Induktion durch OAG von der Substratkonzentration.* Partiiell aufgereinigte 5-LO aus frisch isolierten PMNL (2×10^7) wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und 10 µM OAG für 5 min bei 4°C vorinkubiert, die angegebene Konzentration an AA wird zugegeben, nach 10 min bei 37°C wird die Menge der 5-LO-Produkte mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

In vorangegangenen Untersuchungen [65] wurde vermutet, dass die Aktivitätssteigerung durch Ca^{2+} auf einer erhöhten Affinität für aktivierende Hydroperoxide zurückzuführen ist. Gibt man allerdings 5-HPETE in Abwesenheit von Ca^{2+} und OAG zu S100 frisch isolierter PMNL, führt dies allein schon zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der LTA_4 -Synthase Aktivität der 5-LO (Abb. 4.6). Es ist denkbar, dass die zugesetzte 5-HPETE aber unter diesen Bedingungen nur als Substrat für die LTA_4 -Synthase dient und so die Menge der LTA_4 -Hydrolyseprodukte erhöht wird.

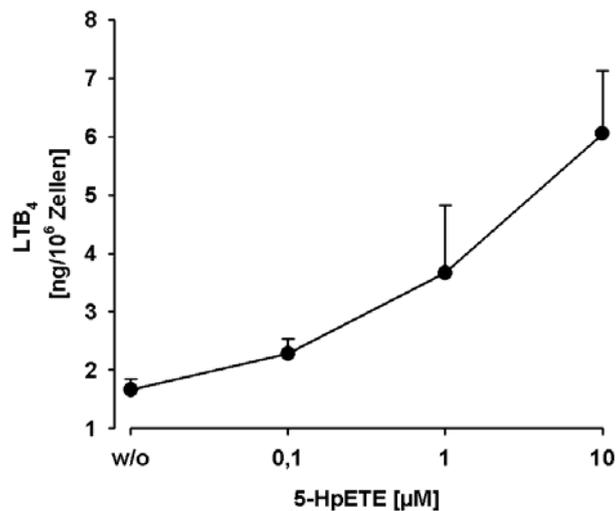


Abb. 4.6: Steigerung der Menge an gebildetem LTB₄. S100 frisch isolierter PMNL ($7,5 \times 10^6$) wird in PBS mit 1mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen an 5-HpETE versetzt und 5 min bei 4°C vorinkubiert. Nach Erwärmen auf 37°C wird 5 μM AA zugegeben. Die LTB₄-Produktmenge wird nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit zugehörigem Standardfehler.

4.1.4 Phospholipide verhindern die 5-Lipoxygenase-Aktivierung durch OAG

Da OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} nur im PMNL S100 und am partiell aufgereinigten Enzym in der Lage ist, die Aktivität der 5-Lipoxygenase zu steigern, nicht jedoch in PMNL Homogenaten, liegt die Vermutung nahe, dass in den Homogenaten ein oder mehrere Bestandteile vorhanden sind, die in der Lage sind, den OAG-Effekt aufzuheben. Es könnte sich hierbei um Phospholipide handeln, die als Bestandteile der Zellmembranen in Zellhomogenaten noch vorhanden sind, durch die Zentrifugation bei 100.000 g aber im Wesentlichen abgetrennt werden und daher im PMNL S100 und auch im partiell aufgereinigten Enzym fehlen. Die folgenden Versuche unter suboptimalen Versuchsbedingungen, also wiederum in Abwesenheit von Ca^{2+} , sollten den möglichen Einfluss verschiedener Phospholipide auf die Aktivierung der 5-LO durch OAG aufklären. Zunächst wurde die Interaktion zwischen OAG und Phospholipiden am S100 frisch isolierter PMNL untersucht. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) wurden in einer Konzentration von 30 μg/ml zu den Inkubationsansätzen zugegeben und die 5-LO-Aktivität bestimmt. Keines der eingesetzten Phospholipide führte zu einer Hemmung der 5-LO in Abwesenheit von OAG.

Interessanterweise waren aber alle in der Lage, die Steigerung der 5-LO-Produktbildung durch OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} zu unterbinden (Abb. 4.7).

Die Aufhebung des OAG-Effekts ist dabei konzentrationsabhängig ($\text{IC}_{50} \approx 20\mu\text{g/ml}$) (Abb. 4.8A). Durch die Zugabe von $100\mu\text{g/ml}$ PC lässt sich die Aktivierung der 5-LO durch $10\mu\text{M}$ OAG vollständig unterdrücken.

Diese Beobachtungen am PMNL S100 konnten durch Untersuchungen am partiell gereinigten 5-LO-Enzym bestätigt werden, das wie der S100 frei von Zellmembran-Bestandteilen, also Phospholipiden, ist. Auch hier hemmen die eingesetzten Phospholipide in Abwesenheit von OAG nicht die 5-LO-Aktivität. Sie verhindern aber alle konzentrationsabhängig den Anstieg der 5-LO-Produktmenge durch OAG. Im Gegensatz zum S100 wird am partiell gereinigten Enzym der Effekt von $10\mu\text{M}$ OAG bereits durch $3\mu\text{g/ml}$ PC nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 4.8B).

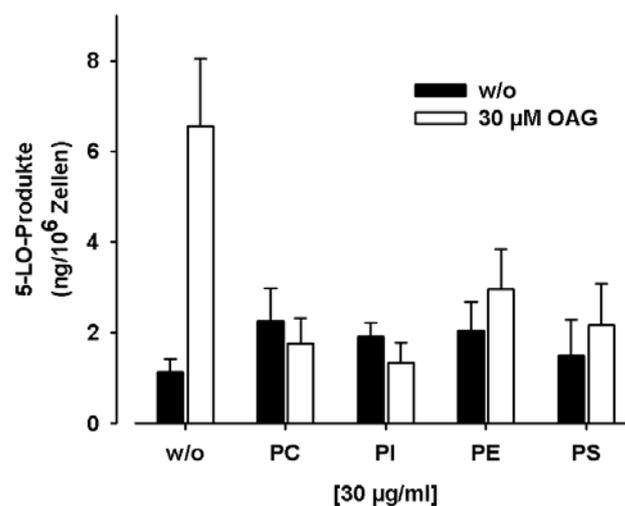
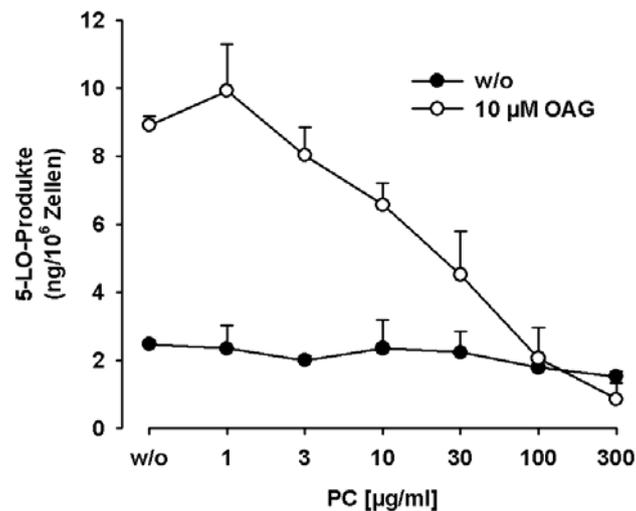


Abb. 4.7: Unterbindung des OAG-Effekts durch Phospholipide. S100 von frisch isolierten PMNL ($7,5 \times 10^6$) wird in PBS mit 1mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Phospholipiden ($30\mu\text{g/ml}$) sowohl ohne als auch mit $10\mu\text{M}$ OAG vorinkubiert. Nach 5 min bei 4°C werden die Proben erwärmt und $5\mu\text{M}$ AA zugesetzt. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus einer unabhängigen Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

A



B

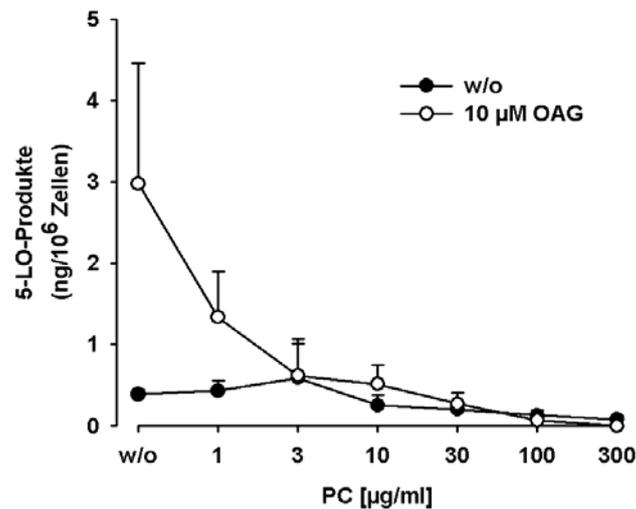


Abb. 4.8: A) *Phospholipide verhindern OAG-Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration.* S100 aus PMNL wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen an Phosphatidylcholin bei 4°C für 5 min vorinkubiert, in Ab- oder Anwesenheit von 10 µM OAG. Die Bestimmung der 5-LO-Aktivität erfolgt nach 10 min bei 37°C. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit resultierenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Bestimmungen. B) *Aufhebung der OAG-induzierten Aktivierung partiell gereinigter 5-LO durch PC.* Partiiell gereinigte 5-LO aus frisch isolierten PMNL wird wie unter A) für PMNL-S100 beschrieben inkubiert und die 5-LO-Aktivität bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit resultierenden Standardfehlern.

4.1.5 Effekte weiterer Glyceride

Der Einfluss anderer, strukturell mit OAG verwandter Glyceride (Abb. 4.10) wurde ebenfalls in Abwesenheit von Ca^{2+} im PMNL S100 untersucht. Das Diacylglycerol 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG) sowie die Etherverbindungen 1-O-oleyl-rac-glycerol (OG) und 1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol (EAG) aktivieren konzentrationsabhängig die 5-LO, allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß als OAG selbst (Abb. 4.9). Im Gegensatz dazu ist das längerkettige Diglycerid 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol (SAG) nicht in der Lage, die 5-LO zu stimulieren. In Anwesenheit von Ca^{2+} kann wie auch bei OAG für keines der Glyceride eine Aktivierung der 5-LO beobachtet werden.

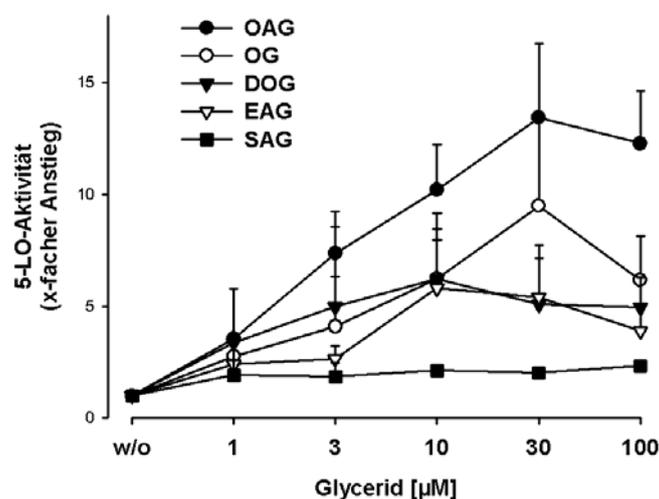


Abb. 4.9: Einfluß strukturell verwandter Glyceride. S100 frisch isolierter PMNL ($7,5 \times 10^6$) wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Glyceriden in steigenden Konzentrationen bei 4°C für 5 min vorinkubiert. Nach Erwärmen wird 10 µM AA zugesetzt, die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit zugehörigen Standardfehlern.

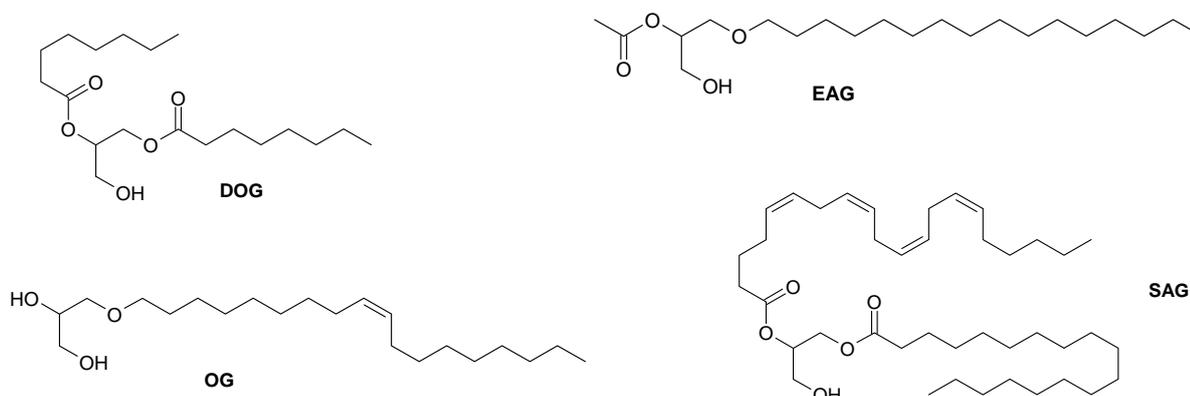


Abb. 4.10: Strukturformeln weiterer untersuchter Glyceride.

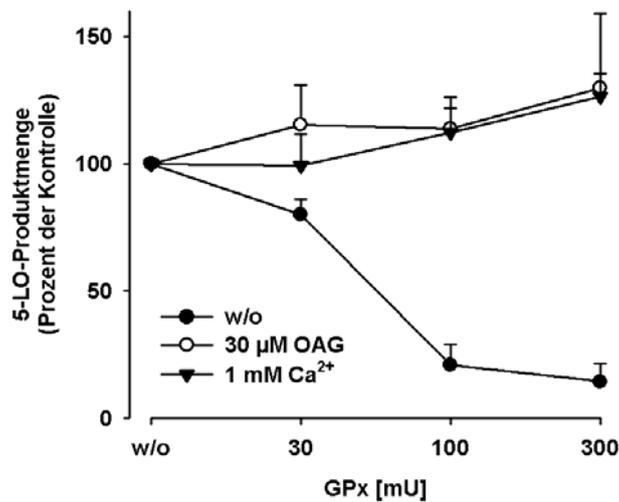
4.1.6 OAG-vermittelte Resistenz der 5-Lipoxygenase gegen Glutathionperoxidase und GSH

Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass Ca^{2+} die 5-LO-Aktivität gegen den inhibitorischen Effekt der Glutathionperoxidase (GPx-1) stabilisiert [65]. Es sollte gezeigt werden, dass OAG wie Ca^{2+} ebenfalls diese Resistenz vermitteln kann. Um die Aktivität der 5-LO durch GPx zu hemmen, wurden zu PMNL S100 definierte Mengen exogener GPx-1 aus Rindererythrozyten zugegeben, endogen in PMNL vorhandene Thiole dienen als Kosubstrat. Eine weitere Möglichkeit ist die Wiederherstellung der Aktivität der endogen im PMNL S100 vorhandenen GPx durch Steigerung der Konzentration des Kosubstrats, dies erfolgt durch Zugabe von 1mM GSH. Wie bereits bekannt, wird die 5-LO-Produktbildung konzentrationsabhängig durch GPx gehemmt. Dies gilt sowohl für die Zugabe exogener GPx-1 bei niedrigen Thiol-Konzentrationen (Abb. 4.11A) als auch für die Aktivierung endogen vorhandener GPx durch Thiol-Zugabe (Abb. 4.11B). Das Ausmaß des inhibitorischen Effekts einer definierten GPx-Aktivität ist dabei unabhängig von der Menge an 5-LO-Enzym.

Wie Ca^{2+} ist OAG tatsächlich in der Lage, die 5-LO-Aktivität vor der Hemmung durch die GPx zu schützen. Bei Konzentrationen von 3-10 μM kann OAG die Aktivität der 5-LO trotz vorhandener aktiver GPx teilweise aufrechterhalten, 30-100 μM OAG stellen die Aktivität der 5-LO nahezu vollständig wieder her (Abb. 4.12). Die eingesetzte Substratkonzentration betrug 20 μM AA. Wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, ist OAG bei dieser Konzentration nicht in der Lage, die 5-LO-Produktmenge weiter zu steigern.

Auch andere Glyceride sind in der Lage, die 5-LO-Aktivität vor der Hemmung durch GPx zu schützen (Abb. 4.13 A,B). Dies gilt für OG, DOG, EAG und in geringem Ausmaß auch für SAG. Wie schon bei OAG beobachtet, wird die Grundaktivität der 5-LO in Abwesenheit von GPx nicht (EAG, SAG) oder nur sehr schwach (OG, DOG) gesteigert.

A



B

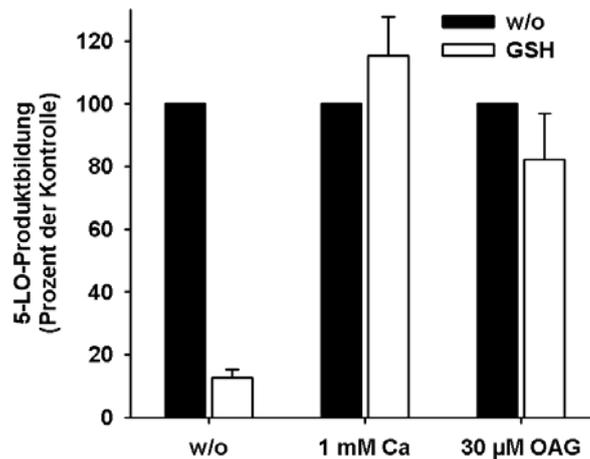
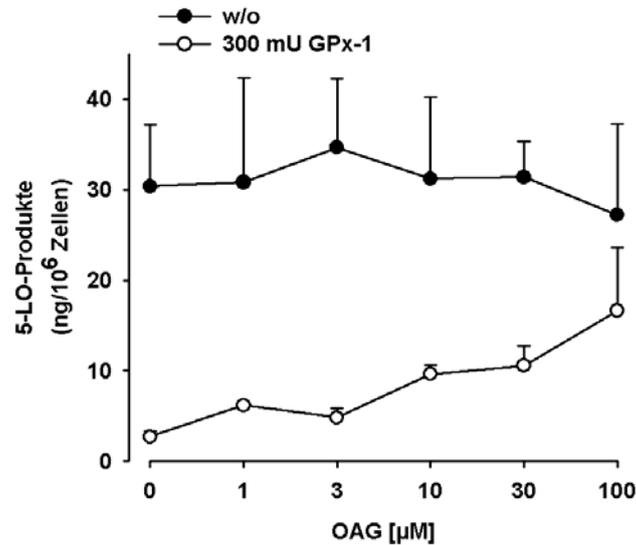


Abb. 4.11: A) OAG unterbindet GPx-vermittelte 5-LO-Hemmung. S100 aus frisch isolierten PMNL wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Mengen GPx-1 versetzt. Die Proben werden direkt vorgewärmt und 2 mM CaCl₂ und 20 µM AA zugegeben, oder für 5 min bei 4°C mit 10 µM OAG vorinkubiert, erwärmt und mit 20 µM AA versetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C mittels HPLC bestimmt. **B) OAG schützt die 5-LO vor GSH.** Die Proben werden wie unter A) beschrieben vorbereitet und ausgewertet, anstelle von GPx-1 wird GSH in den angegebenen Mengen zugesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardfehler dreier unabhängiger Experimente.

A



B

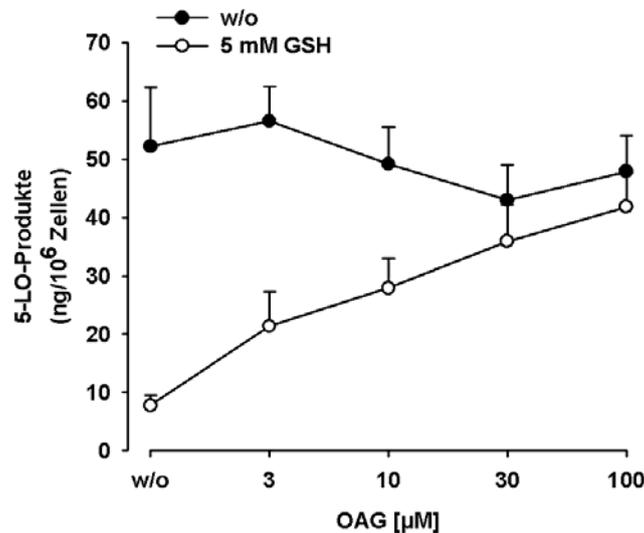
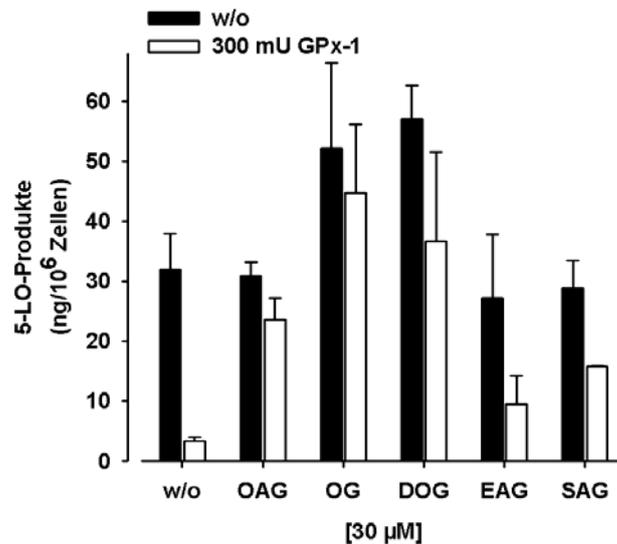


Abb. 4.12: Aufhebung der Peroxidase-vermittelten 5-LO-Inhibition durch OAG ist konzentrationsabhängig. A) S100 aus frisch isolierten PMNL wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP, mit oder ohne 300 mU GPx-1 und den angegebenen Konzentrationen an OAG versetzt. Nach 5 min bei 4°C wird erwärmt und 20 μM AA zugesetzt. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C bestimmt. B) PMNL-S100 wird wie unter A) beschrieben inkubiert und die 5-LO-Aktivität bestimmt, anstelle von GPx-1 wird 1 mM GSH zugesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

A



B

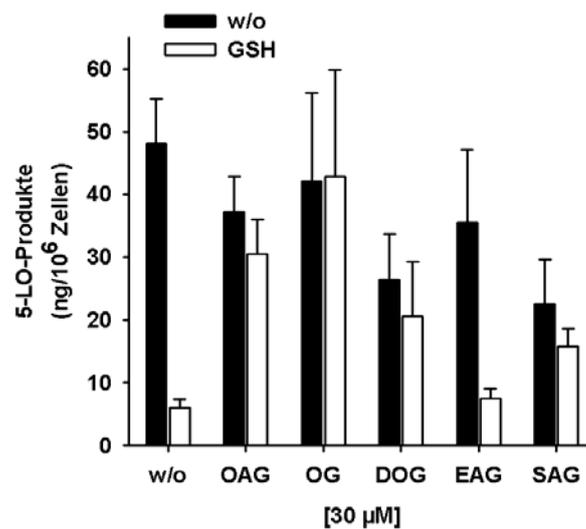


Abb. 4.13: Einfluss von Glyceriden auf die GPx-vermittelte Inhibition der 5-LO. S100 aus frisch isolierten PMNL wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 30 μM des angegebenen Glycerids und mit oder ohne A) 300 mU GPx-1 bzw. B) 1 mM GSH bei 4°C für 5 min vorinkubiert. Nach Erwärmen wird 20 μM AA zugegeben, die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit zugehörigen Standardfehlern.

4.1.7 OAG zeigt keinen Effekt auf die Aktivität der GPx

Um eine direkte Hemmung der Glutathionperoxidase durch OAG auszuschließen, wurde der Einfluss von OAG auf die Aktivität der GPx-1 aus Rindererythrozyten untersucht. Bei der Messung der GPx-Aktivität zeigten Konzentrationen bis 100 μM OAG keinerlei Hemmeffekt. Als Kontrolle diente Mercaptosuccinat, das bei 30 μM zu der erwarteten Inhibition auf 45 % Restaktivität der Peroxidase führt (nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind unabhängig von der eingesetzten Menge an GPx-1 und konnten sowohl an 100 mU/ml GPx als auch für 300 mU/ml GPx gefunden werden (Abb. 4.14).

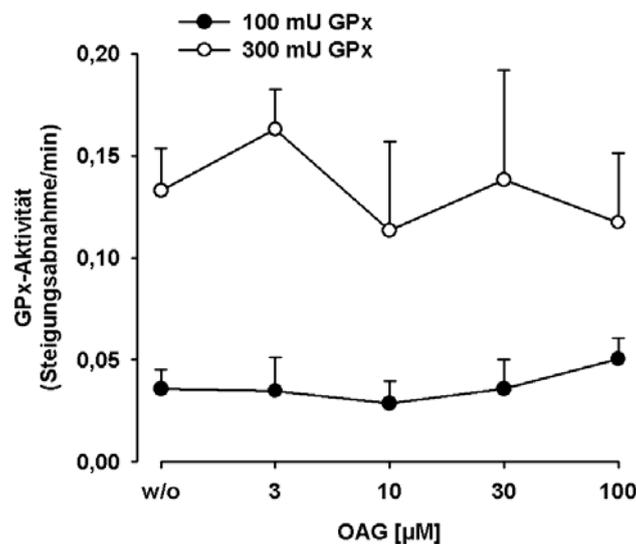


Abb. 4.14: Keine Hemmung der GPx durch OAG. GPx-1 aus Rindererythrozyten wird in Phosphatpuffer (0,25 M) pH 7,0/ 2,5 mM EDTA/ 2,5 mM NaN_3 mit 100 μl Glutathion-Reduktase, 100 μl 12 mM reduziertem Glutathion (pH 4-5), 100 μl 2,5 mM NADPH (in 0,1% NaHCO_3) und den angegebenen Konzentrationen an OAG 10 min bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 10 μl einer 120 mM Cumolhydroperoxid-Lösung wird die Abnahme der Absorption des Reaktionsgemisches photometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit zugehörigem Standardfehler.

4.1.8 Mutation der Phospholipid-Bindungsstelle der 5-Lipoxygenase verhindert den OAG-Effekt

Die 5-Lipoxygenase ist in der Lage, über ihre C2-ähnliche Domäne zwei Ca^{2+} -Ionen zu binden. Diese Bindung erfolgt über die Aminosäuren Asn-43, Asp-44 und Glu-46 innerhalb der loop 2. Wie bereits bekannt, führt die Mutation dieser drei Aminosäuren zu Alanin (loop2 mut-5LO) zur verminderten Fähigkeit, Ca^{2+} -Ionen zu binden und es sind höhere Konzentrationen an Ca^{2+} nötig, um 5-LO-Aktivität zu induzieren [10].

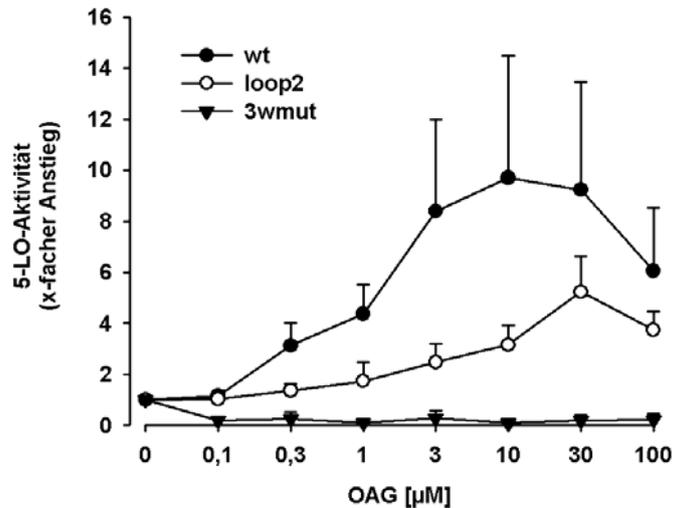
Gleichzeitig bindet die C2-ähnliche Domäne der 5-LO Phosphatidylcholin und Lipidmembranen über drei Tryptophan-Reste (Trp-13, -75 und -102) [11,70]. Mutiert man diese zu Alanin (3W mut-5LO), wird die Affinität der 5-LO zu PC-Vesikeln stark herabgesetzt [12,70].

Möglicherweise wird der aktivitätssteigernde Effekt von OAG auf die 5-LO über diese Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt. Wt-5LO, loop2 mut-5LO und 3W mut-5LO wurden in *E. coli* exprimiert und der Effekt von OAG auf die partiell aufgereinigten 5-LO-Mutanten untersucht.

In Abwesenheit von Ca^{2+} wird die Aktivität der wt-5LO bei einer Substratkonzentration von 5 μM AA sowohl im S100 (Abb. 4.15A) als auch am partiell gereinigten Enzym (Abb. 4.15B) konzentrationsabhängig bis zu 10fach durch OAG gesteigert. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Untersuchungen an 5-LO aus PMNL. Die Enzymaktivität der loop2 mut-5LO wird durch OAG ebenfalls erhöht. Für die 3W mut-5LO lässt sich dagegen keinerlei Induktion der Aktivität durch OAG erkennen, weder im S100 noch am partiell aufgereinigten Enzym. Ca^{2+} war in Kontroll-Untersuchungen hingegen in der Lage, die Menge der 5-LO-Produkte der 3W mut-5LO deutlich zu steigern. Dies deutet darauf hin, dass eine intakte Phospholipid-Bindungsstelle für die Aktivierung durch Glyceride nötig ist.

Die durch OAG und Ca^{2+} vermittelte Resistenz der 5-LO aus PMNL gegen die Hemmung durch GPx konnte ebenfalls für *E. coli* wt-5LO gefunden werden (Abb. 4.16A). Hemmt man hingegen 3W mut-5LO durch 200 mU/ml GPx, ist nur Ca^{2+} , nicht aber OAG, in der Lage, diese Hemmung zumindest teilweise wieder aufzuheben (Abb. 4.16B).

A



B

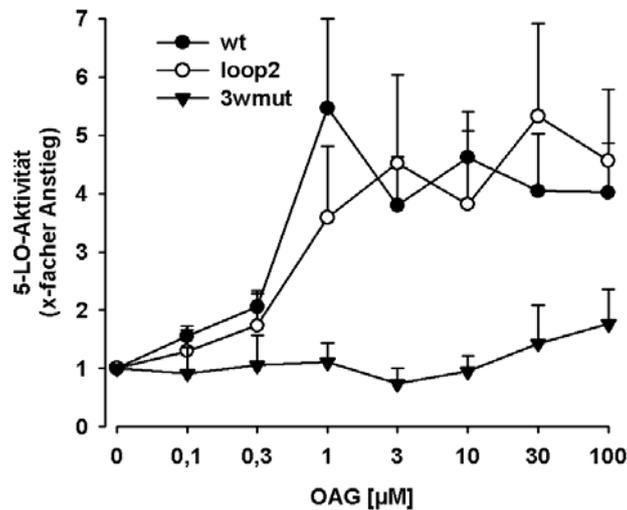
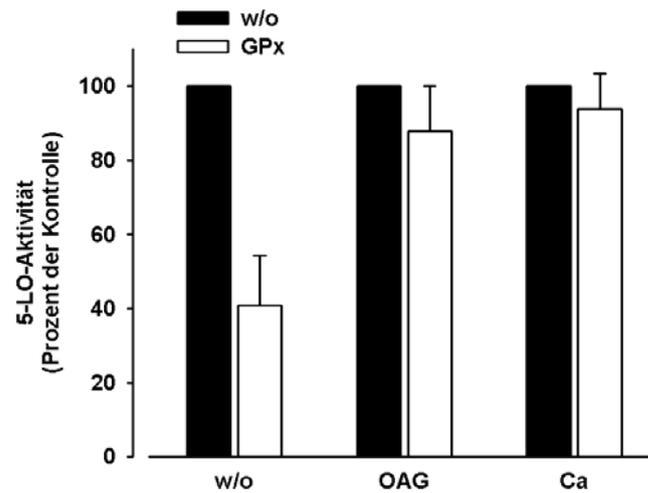


Abb. 4.15: Mutation der Tryptophan-Reste in der Phospholipid-Bindungsstelle unterbindet die Induktion der 5-LO durch OAG. Die 5-LO-Enzyme wt, loop2 mut und 3W mut werden in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. A) S100 oder B) partiell aufgereinigtes Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen an OAG bei 4°C vorinkubiert. Nach 5 min wird erwärmt und 5 µM AA zugegeben. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. Die 5-LO-Aktivitäten in Abwesenheit von OAG für wt-5LO S100, loop2-mut 5-LO bzw 3W-mut 5LO betragen $16,1 \pm 3,5$, $6,25 \pm 1,5$ und $4,2 \pm 0,8$ ng/ml. Im partiell aufgereinigten Enzym betragen die Aktivitäten für wt-5LO S100, loop2-mut 5-LO bzw 3W-mut 5LO $22,4 \pm 2$, $3,2 \pm 1,2$ und $2,8 \pm 0,8$ ng/ml. Angegeben sind die Mittelwerte mit resultierendem Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

A



B

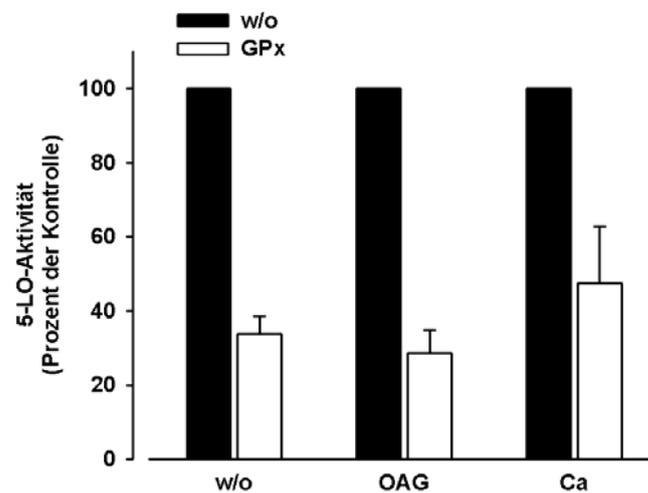


Abb. 4.16: GPx-induzierte Hemmung der 3W mut-5LO ist nicht durch OAG beeinflussbar. Wt-5LO (A) und 3W mut-5LO (B) werden in *E. coli* exprimiert. S100 wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP in An- oder Abwesenheit von GPx-1 für 5 min bei 4°C vorinkubiert, nach Erwärmen wird 2 mM CaCl₂ (falls angegeben) und 20 µM AA zugesetzt. Bei Zugabe von OAG wird nach Erwärmen nur 20 µM AA zugegeben. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken geben den zugehörigen Standardfehler an.

4.1.9 Interaktion von OAG mit dem 5-Lipoxygenase-Inhibitor Hyperforin

Hyperforin wurde bereits als potenter Inhibitor der 5-Lipoxygenase identifiziert [100], dieser Effekt wird wie auch der des OAG über die Phospholipid-Bindungsstelle in der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO vermittelt [101]. Die Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen Hyperforin und OAG wurde an intakten Zellen frisch isolierter PMNL sowie am partiell aufgereinigten Enzym aus *E. coli* durchgeführt. Wie bereits bekannt, wird die 5-LO-Produktmenge in vivo durch Hyperforin gemindert ($IC_{50} = 1-2 \mu\text{M}$). Durch Zugabe von OAG wird der IC_{50} von Hyperforin allerdings deutlich erhöht auf $10 \mu\text{M}$. Diese Beobachtungen gelten sowohl in Anwesenheit von $20 \mu\text{M}$ AA als exogene Substratquelle (Abb. 4.17) als auch ohne exogen zugesetztes Substrat. In intakten Zellen ist OAG aber trotz der hohen Konzentration nicht in der Lage, die Hemmung der 5-LO durch Hyperforin komplett zu unterbinden. Am partiell aufgereinigten Enzym interagiert OAG ebenfalls mit Hyperforin, der IC_{50} erhöht sich auf $10 \mu\text{M}$. Interessanterweise ist OAG hier in der Lage, auch der Inhibition durch höhere Konzentrationen Hyperforin ($30 \mu\text{M}$) entgegen zu wirken, die Restaktivität der 5-LO sinkt nicht unter 50 Prozent (Abb. 4.18).

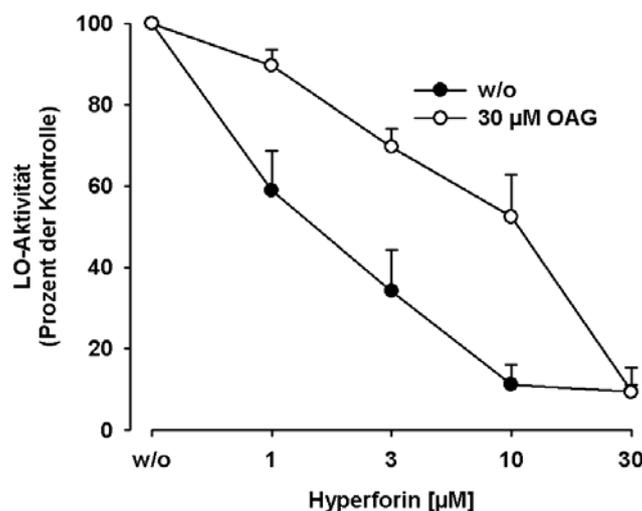


Abb. 4.17: OAG vermindert die Hemmung der 5-LO durch Hyperforin. Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an Hyperforin für 10 min bei 37°C vorinkubiert. $30 \mu\text{M}$ OAG wird 3 min vor der Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Ca-Ionophor und $20 \mu\text{M}$ AA zugesetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte fünf unabhängiger Experimente mit zugehörigem Standardfehler.

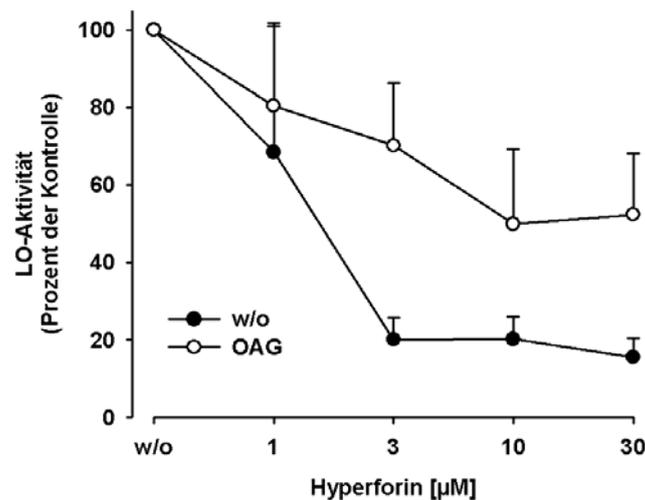


Abb. 4.18: Interaktion zwischen Hyperforin und OAG an partiell aufgereinigter 5-LO. *Wt-5LO* wird in *E. coli* exprimiert und partiell aufgereinigt. 0,5 µg Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen Hyperforin sowie in An- oder Abwesenheit von OAG für 5-10 min bei 4°C vorinkubiert. Nach Erwärmen auf 37°C werden 2 mM CaCl₂ und 20 µM AA zugegeben. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardfehler aus fünf unabhängigen Bestimmungen.

4.1.10 Nachweis der möglichen Bindung von OAG an die 5-Lipoxygenase mittels ³[H]OAG

Um die mögliche Bindung von OAG an die 5-LO zu beweisen, sollte partiell aufgereinigte 5-LO an ATP-Agarose-Beads oder Protein-A-Sepharose-Beads immobilisiert und mit ³[H]OAG inkubiert werden, gebundenes ³[H]OAG sollte mittels Beta-Counter bestimmt werden. Die Tritiierung erfolgt an der Doppelbindung des Oleoyl-Restes von OAG, dabei wird der ungesättigte Ölsäure-Rest in den gesättigten Stearinsäure-Rest überführt. Vorversuche wurden in intakten Zellen aus frisch isolierten PMNL mit kalt hydriertem OAG durchgeführt. Wie bereits bekannt [120], aktiviert OAG die 5-LO *in vivo*. Die gesättigte OAG-Verbindung ist dagegen nicht in der Lage, die 5-LO-Produktmenge zu steigern (Abb. 4.19). Die Doppelbindung im Oleoyl-Rest des OAG scheint also essentiell für den stimulatorischen Effekt der Substanz zu sein. Auf weitere Versuche mit ³[H]OAG wurde aufgrund dieser Ergebnisse verzichtet.

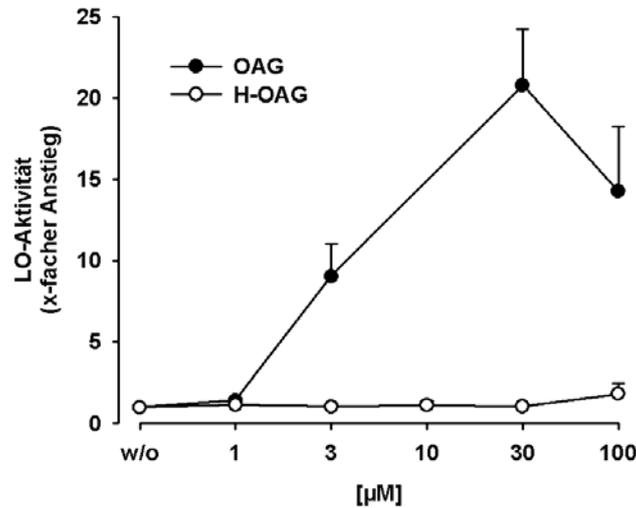


Abb. 4.19: Keine Aktivierung der 5-LO durch hydriertes OAG. Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an OAG bzw. hydriertem OAG (H-OAG) bei 37°C vorinkubiert. Nach 3 min wird 40 µM AA zugegeben. Die gebildeten 5-LO-Metabolite werden nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Bestimmungen. Fehlerbalken geben den resultierenden Standardfehler an.

4.1.11 Etablierung eines Lipid Protein Overlay Assays für 5-Lipoxygenase zum Nachweis der OAG-Bindung

Der Nachweis einer Bindung zwischen Protein und Lipid gelang in mehreren Publikationen durch Auftragen der Lipide auf eine Hybond-C[®] Membran, die Bindung von Ceramid-1-phosphat an cPLA₂ wurde auf diesem Weg gezeigt. Industriell vorgefertigte, bereits mit Lipiden beschichtete Membranen sind ebenfalls erhältlich, beispielsweise PIP Strips oder Sphingo Strips (Molecular Probes, Invitrogen). Mittels dieser Strips wurde die Bindung der humanen 15-LO-1 an verschiedene Phospholipide nachgewiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte für 5-LO anlehnend an die bereits beschriebenen Methoden ein Lipid Protein Overlay Assay ausgearbeitet werden. Als zu untersuchenden Substanzen wurden OAG, OG, PC und AA ausgewählt. Sie wurden als ethanolische Lösung auf die Hybond-C Membran aufgetüpfelt und anschließend getrocknet. Die ursprünglich verwendeten Lösungen aus DMSO wurden verworfen, da das Lösungsmittel die Membran

zerstörte. Als Positivkontrolle der Detektion dient auf die Membran aufgetragenes 5-LO-Protein. Die getrockneten Membranen wurden 10 min mit PBS gewaschen und nach einstündigem Blocken in einer 3%igen Lösung von Fatty-acid free BSA in TBS und einem weiteren PBS-Waschschritt mit 5-LO-Lösung (1 µg/ml 5-LO-Protein, 1 mM Ca^{2+} , 3% Fatty-acid free BSA in TBS-T) bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten Waschschritte mit TBS (1 mM Ca^{2+}), die Inkubation im 5-LO-Antikörper 6A12 und die Inkubation im Zweitantikörper (LI-COR IRDye 800CW Goat Anti-Mouse IgG, LI-COR IRDye 700 DX Goat Anti-Mouse IgG, in Odyssey® Blocking Buffer). Alle verwendeten Waschpuffer enthielten 1 mM Ca^{2+} .

Nach einem finalen Waschschritt in PBS ohne Ca^{2+} wurden die Membranen durch Scannen am Infrarot-Detektor (LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System) ausgewertet. Die Detektion der 5-LO mittels NBT/BciP schlug fehl, da die aufgetragenen Lipide selbst reagieren. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich mit der bisherigen Versuchsdurchführung die bereits bekannte Bindung von PC an 5-LO nachweisen lässt (Abb. 4.20, Membran B, Spot 5), wenn 1 mM Ca^{2+} in den Puffern enthalten war. Die Bindung von OAG an die 5-LO ließ sich dagegen unter diesen Versuchsbedingungen nicht zeigen, eine Optimierung des Assays ist erforderlich.

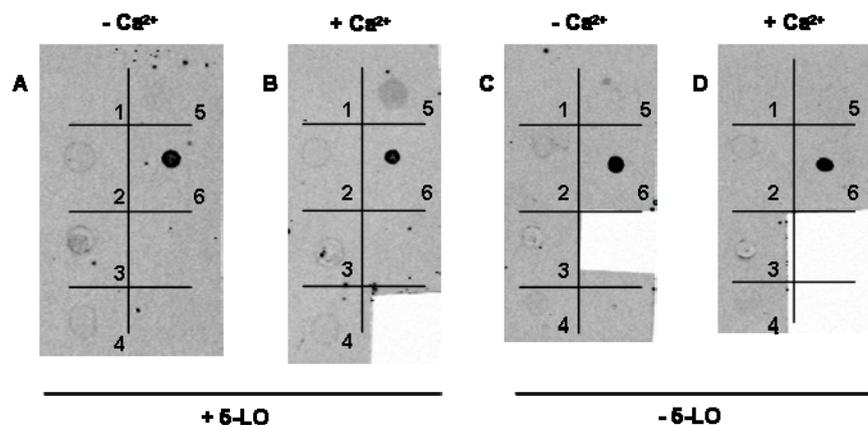


Abb. 4.20: Lipid Protein Overlay Assay. Die folgenden Substanzen wurden auf Hybond-C® Membranen aufgetragen: 1) Ethanol, 2) AA, 3) OAG, 4) OG, 5) PC und 6) 5-LO-Protein. Die Membranen A und B wurden mit 5-LO-Lösung, Erst- und Zweitantikörper inkubiert und anschließend mittels LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System ausgewertet. Bei den Membranen B und D enthielten alle Puffer 1 mM Ca^{2+} . Membranen C und D sind Negativkontrollen, sie wurden Puffer ohne 5-LO inkubiert.

4.1.12 Zellinienspezifität des OAG-Effekts

Aus vorangegangenen Arbeiten [121] ist bekannt, dass OAG an der Zelllinie RBL-1 und an differenzierten MM6-Zellen keine signifikante 5-LO-Aktivierung zeigt. Die OAG-induzierte 5-LO-Aktivierung scheint also abhängig vom Zelltyp zu sein. Diese Aussage sollte durch Untersuchungen an weiteren Zelllinien und an einer weiteren Lipoxygenase gefestigt werden.

Durch die Kultivierung und Differenzierung von MM6-Zellen in serumfreiem Medium sollte ausgeschlossen werden, dass fötales Kälberserum den aktivierenden Effekt von OAG unterbindet. Dem serumfreien Medium wird 10 ng/ml Selen zugesetzt, um einen Effekt über die GPx auszuschließen. Die Differenzierung erfolgt mit 50 nM Calcitriol und 2 ng/ml TGF β . Durch die Zugabe von OAG wird sowohl bei serumfrei kultivierten als auch bei FCS-supplementierten MM6-Zellen die Menge an 5-LO-Produkten nicht gesteigert. FCS hat keinen Einfluss auf den OAG-Effekt (Abb. 4.21). Es ist bekannt, dass durch die Stimulation von MM6-Zellen mit Ca-Ionophor die Glutathion-Peroxidase vermittelte Hemmung der 5-LO-Aktivität durch den raschen, drastischen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration überwunden werden kann [65]. Interessanterweise ist OAG hier nicht in der Lage, die Hemmung der 5-LO durch die endogene GPx der MM6-Zellen zu unterbinden.

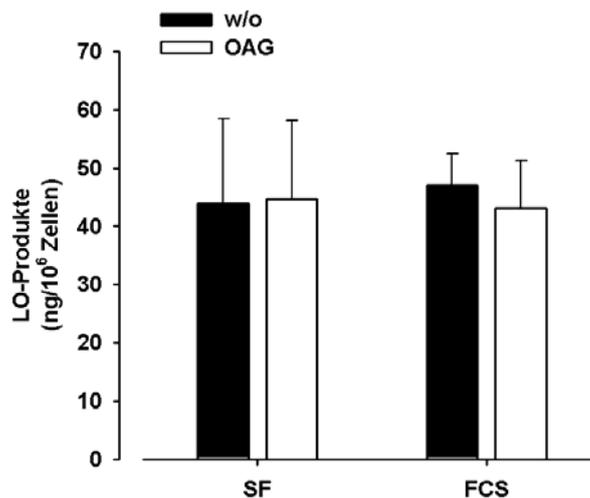


Abb. 4.21: OAG zeigt keine Effekte an MM6-Zellen. MM6 ($1-3 \times 10^6$) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit 10 μ M OAG bei 37°C vorinkubiert. Nach 3 min werden 5 μ M Ca-Ionophor und 20 μ M AA zugesetzt. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Bestimmungen. Fehlerbalken geben den resultierenden Standardfehler an.

Zur Untersuchung des Einflusses von OAG auf eine 15-Lipoxygenase wurde Sojabohnen-Lipoxygenase (SLOX), auch als Lipoxidase bezeichnet, in einer Konzentration von 0,3 µg/ml eingesetzt. OAG ist unter diesen Versuchsbedingungen nicht in der Lage, die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase (SLOX) zu steigern, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ca²⁺ (Abb. 4.22).

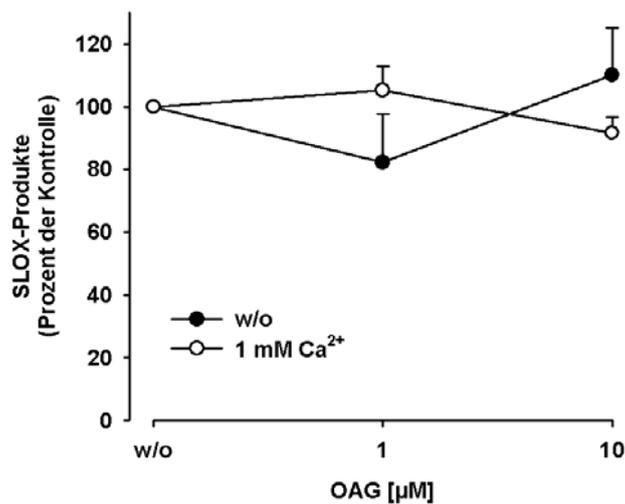


Abb. 4.22: Sojabohnen-Lipoxygenase ist nicht durch OAG stimulierbar. 0,3 µg/ml Sojabohnen-Lipoxygenase (Lipoxidase) werden in Tris pH 9,0 mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen an OAG für 5 min bei 4°C vorinkubiert. Nach Erwärmen wird 2 mM CaCl₂ und 2 µM AA zugesetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler.

Auch an HeLa-Zellen konnte kein Einfluss von OAG auf die 5-LO-Produktmenge gefunden werden. Die Zellen (zu ca. 80% konfluent gewachsen) waren zunächst mit pcDNA-5LO-Plasmid [59] durch Calcium-Phosphat-Präzipitation transient transfiziert worden. Wie aus Abb. 4.23 A ersichtlich, zeigt OAG bei Substratkonzentrationen von 10 und 30 µM AA keinen Einfluss auf die 5-LO. Als Positivkontrolle wurde Ca-Ionophor verwendet, welches zu der erwarteten 5-LO-Aktivierung führt (nicht gezeigt). Da die vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass die stärkste Aktivierung der 5-LO durch OAG bei Substratkonzentrationen unter 20 µM AA erfolgt, wurden die Folgeexperimente bei 10 µM AA durchgeführt. Die transiente Transfektion der Zellen erfolgte bei diesen Untersuchungen sowohl mit pcDNA-5LO-Plasmid [59] als auch mit dem Plasmid pcDNA3.1-5LO-3W. Dieses Plasmid kodiert für die Mutante des 5-LO-Proteins, in dem die drei Tryptophan-Reste Trp 13, 75 und 102 durch Alanin ersetzt wurden und die bereits an E. coli untersucht wurde. Weder

beim Wildtyp noch bei der Mutante wird die Leukotrien-Bildung durch OAG gesteigert (Abb. 4.23 B).

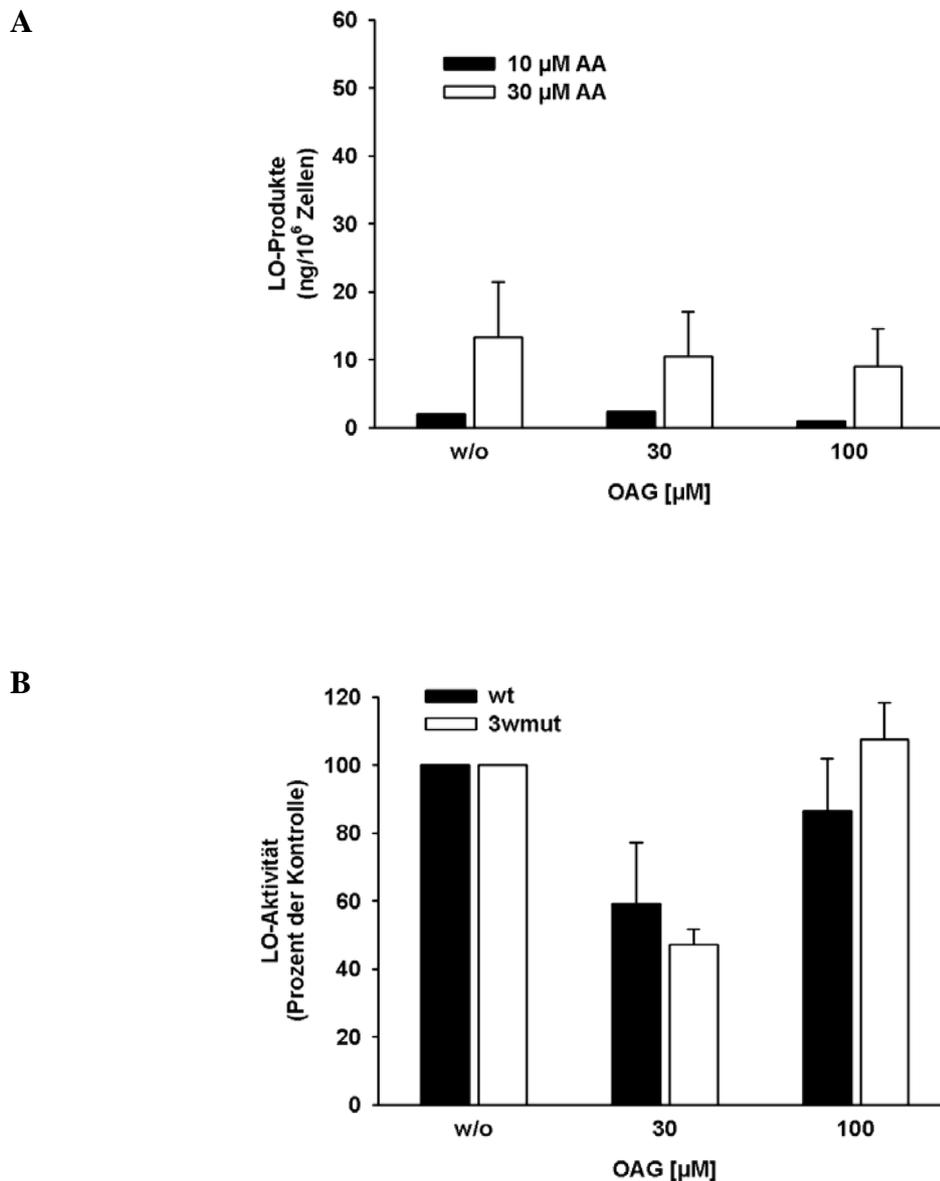


Abb. 4.23: Kein Einfluss von OAG auf die 5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen. **A)** Mit pcDNA-5LO transient transfizierte HeLa-Zellen ($1-3 \times 10^6$) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an OAG für 3 min bei 37°C vorinkubiert, 2,5 μM Ca-Ionophor und 10 bzw. 30 μM AA werden zugegeben. **B)** Mit pcDNA-5LO bzw. pcDNA3.1-5LO-3W transient transfizierte HeLa-Zellen ($1-3 \times 10^6$) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an OAG bei 37°C vorinkubiert. Nach 3 min werden 2,5 μM Ca-Ionophor und 10 μM AA zugesetzt.

Die 5-LO-Aktivität wird jeweils nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit resultierendem Standardfehler dreier unabhängiger Bestimmungen.

In BL41-E95-A Zellen scheint OAG keinen Effekt auf die 5-LO zu haben. Allerdings ist die Gesamtaktivität der 5-LO in intakten Zellen kaum nachweisbar (Abb. 4.24). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen früherer Untersuchungen, in denen 5-LO-Aktivität bei BL41-E95-A nur in Homogenaten, jedoch kaum in intakten Zellen nachgewiesen werden konnte [127].

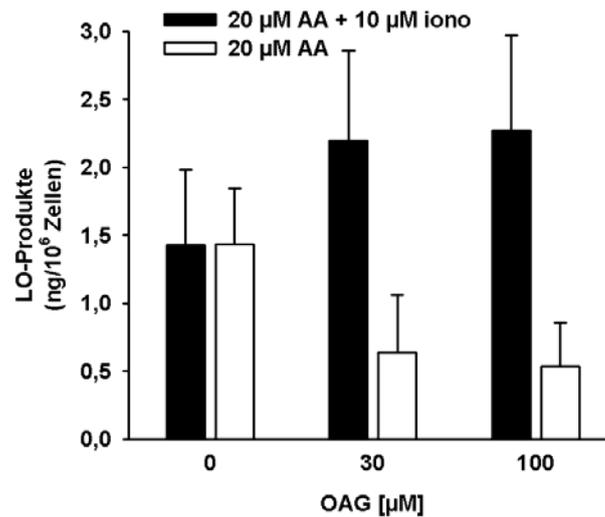


Abb. 4.24: Keine Aktivierung der 5-LO durch OAG in BL41-E95-A. BL41-E95-A (10×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an OAG bei 37°C vorinkubiert. Nach 3 min wird falls angegeben, 10 μM Ca-Ionophor und 20 μM AA zugegeben. Die gebildeten 5-LO-Metabolite werden nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Bestimmungen. Die Fehlerbalken geben den resultierenden Standardfehler an.

4.1.13 Interaktion zwischen OAG und dem MBP-Fusionsprotein der regulatorischen Domäne der 5-Lipoxygenase

Die Zugabe geringer Konzentrationen an regulatorischer Domäne der 5-LO (Aminosäure 1-128) als MBP-Fusionsprotein (MBP-5LO1-128) zu partiell aufreinigtem wt-5-LO-Enzym aus *E. coli* führt in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen zu einer Steigerung der 5-LO-Aktivität [25]. Außerdem reduziert sie 5-HPETE zu 5-HETE in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen und ist in der Lage, den hemmenden Effekt von Hyperforin auf die 5-LO-Aktivität zu mindern, der Zusatz steigender Mengen C2-ähnlicher Domäne der 5-LO führen zu einer Abnahme der 5-LO-Inhibition durch Hyperforin [25]. Daher war von

Interesse, inwiefern durch Zugabe von regulatorischer Domäne die Induktion der 5-LO-Aktivität durch OAG beeinflusst wird. In weiteren Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob OAG auf die Reduktion der 5-HPETE durch die regulatorische Domäne Einfluss nehmen kann.

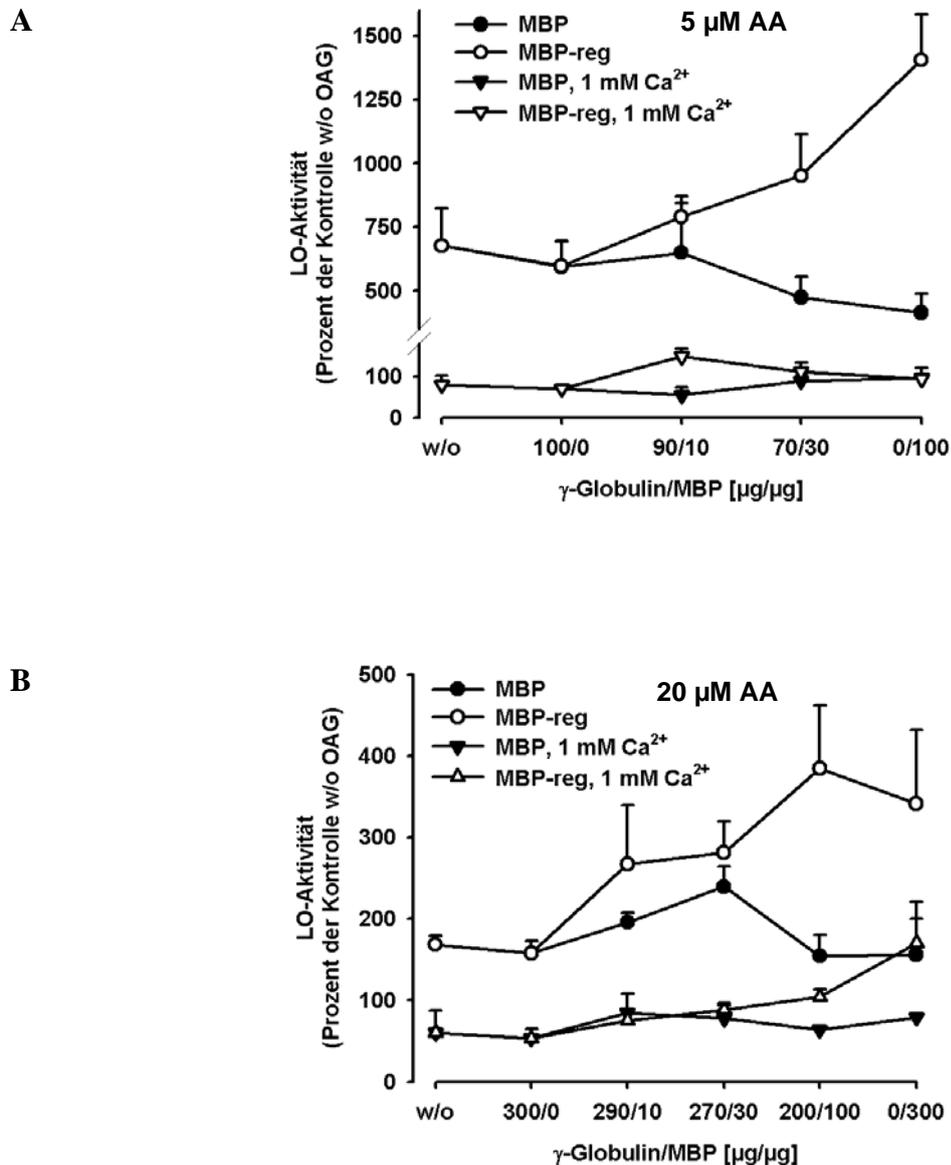
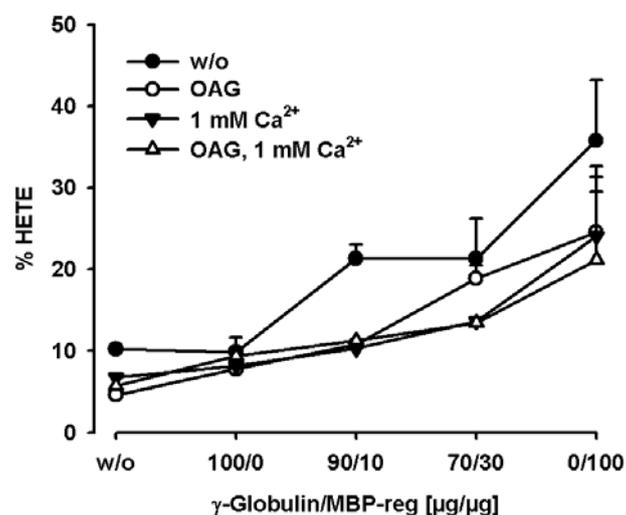


Abb. 4.25: 5-LO-Aktivität in Abhängigkeit von OAG und steigenden Mengen MBP-5LO-1-128(MBP-reg). Wt-5LO wird in *E. coli* exprimiert und partiell aufgereinigt. 0,5 μg Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 10 μM OAG mit steigenden Mengen MBP-5LO1-128 (MBP-reg) bzw. MBP versetzt. Mit γ-Globulin wird der Proteingehalt auf 300 μg/ml ausgeglichen. Nach Erwärmen auf 37°C werden 2 mM CaCl₂ (wenn angegeben) und **A**) 5 μM AA bzw. **B**) 20 μM AA zugegeben. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei unabhängigen Bestimmungen.

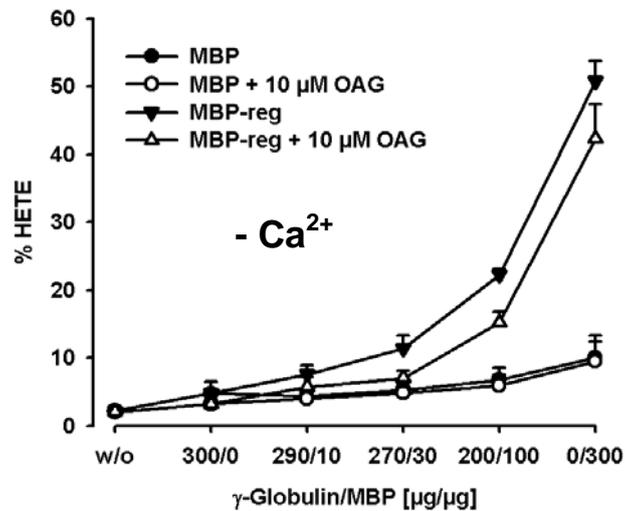
Zu partiell über ATP-Agarose aufgereinigtem 5-LO-Enzym aus *E. coli* wurden daher neben 10 μM OAG steigende Mengen an MBP-5LO1-128 zugesetzt. Als Kontrolle dient MBP alleine. Der Proteingehalt der Inkubationsansätze wurde durch die Zugabe γ -Globulin konstant gehalten, insgesamt wurde 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein zugesetzt. Interessanterweise wurde bei niedrigen Substratkonzentrationen (5 μM AA) in Abwesenheit von Ca^{2+} ein Anstieg der 5-LO-Aktivität mit steigenden Mengen MBP-5LO1-128 beobachtet (Abb. 4.25 A). Dieser Effekt geht bei einer Substratkonzentration von 20 μM AA nahezu verloren (Abb. 4.25 B). Bei Anwesenheit von Ca^{2+} ist die 5-LO-Produktmenge deutlich geringer. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen, dass OAG nur in Abwesenheit von Ca^{2+} in der Lage ist, die Enzymaktivität zu steigern.

Das 5-HETE/5-HPETE-Verhältnis unter Einfluss von OAG wurde zunächst an partiell aufgereinigtem 5-LO-Enzym aus *E. coli* bestimmt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen findet man nach Zusatz von OAG eine geringe Abnahme des HETE-Anteils. Einen ähnlichen Effekt ergab auch die Zugabe von 1 mM Ca^{2+} (Abb. 4.26 A). Unter Standardbedingungen, d.h. bei einer Substratkonzentration von 20 μM AA, scheint OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} bei Zugabe von 10 μg MBP-5LO1-128 den HETE-Anteil geringfügig zu mindern. Aus den Abbildungen 4.26 B und C ist ersichtlich, dass OAG unter Standardbedingungen keinen weiteren Einfluss auf das HETE/HPETE-Verhältnis nimmt, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} . Wechselt man in ein Testsystem, bei dem exogen 5-HPETE zu MBP-5LO1-128 zugegeben wird, kann man ebenfalls eine Reduktion der HPETE zu HETE beobachten. Der Anstieg des HETE-Anteils kann durch die Zugabe von OAG beeinflusst werden (nicht gezeigt).

A



B



C

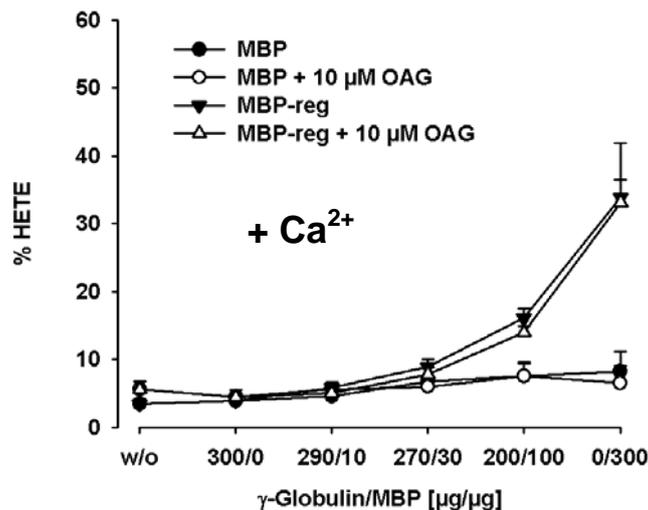


Abb. 4.26: Verhältnis der 5-HETE/HPETE-Mengen in Anhängigkeit von OAG und MBP-5LO-1-128(MBP-reg). Wt-5LO wird in *E. coli* exprimiert und partiell aufgereinigt. 0,5 μg Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 10 μM OAG (falls angegeben) und mit steigenden Mengen MBP-5LO1-128 bzw. MBP versetzt. Mit γ-Globulin wird der Proteingehalt auf 300 μg/ml ausgeglichen. Nach Erwärmen auf 37°C werden A) 2 mM CaCl₂ (falls angegeben) und 5 μM AA zugesetzt. B) und C) Nach Erwärmen auf 37°C werden 2 mM CaCl₂ (nur C)) und 20 μM AA zugesetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler.

4.2 Identifizierung von Pirinixinsäure-Derivaten als potente Inhibitoren der 5-Lipoxygenase

Pirinixinsäure gehört zur Gruppe der selektiven PPAR α -Agonisten. Zunächst war nur der lipidsenkende Charakter der Verbindung bekannt, mit Entdeckung der PPARs konnte dann auch das molekulare Target zugeordnet werden. Neuere Arbeiten deuten auf einen dualen PPAR α/γ -Agonismus hin [132].

In der chemisch-synthetisch ausgerichteten Dissertationsarbeit von L. Popescu, Arbeitskreis Prof. M. Schubert-Zsilavec, Uni Frankfurt, sollte die Leitstruktur Pirinixinsäure durch Modifikationen optimiert werden. Da ein Zusammenhang zwischen Entzündung und PPAR-Agonismus bekannt ist, wurde auch das inhibitorische Potential der synthetisierten Pirinixinsäure-Derivate bezüglich der 5-LO untersucht.

4.2.1 Einfluss der Pirinixinsäure-Derivate auf die 5-Lipoxygenase-Aktivität

Die von L. Popescu synthetisierten Verbindungen wurden zunächst an der 5-LO in intakten Zellen frisch isolierter PMNL untersucht. Pirinixinsäure selbst zeigt keinerlei inhibitorisches Potential. Für die Verbindungen LP 105, LP 117 und LP 119 wurden IC₅₀-Werte $\leq 1 \mu\text{M}$ gefunden. Auch die Substanzen LP 99 und LP 121 zeigen ebenfalls noch einen inhibitorischen Effekt auf die 5-LO. Keinen Einfluss auf die Aktivität der 5-LO haben die Substanzen LP 114, LP 120 und LP 131 (Abb. 4.27). Die ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tab. 4.1 angegeben.

Bei Untersuchungen an intakten Zellen frisch isolierter PMNL ohne exogen zugesetztem Substrat zeigte sich für alle Verbindungen eine Abnahme des inhibitorischen Potentials. Diese Abschwächung wurde ebenfalls unter induziertem Zellstress mit 300 mM NaCl beobachtet. Interessanterweise konnte an Homogenaten und S100 frisch isolierter PMNL kein Einfluss der Substanzen auf die 5-LO-Aktivität gefunden werden.

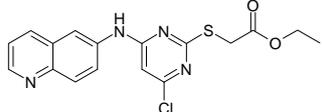
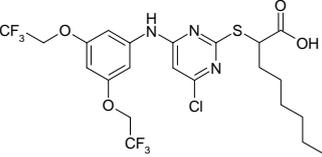
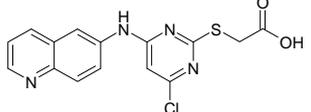
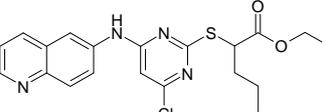
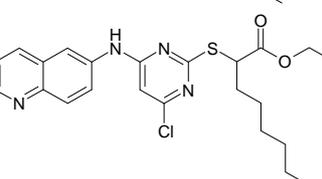
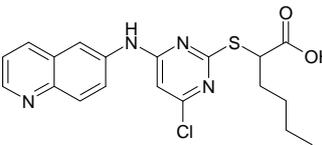
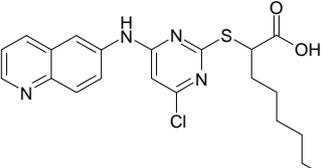
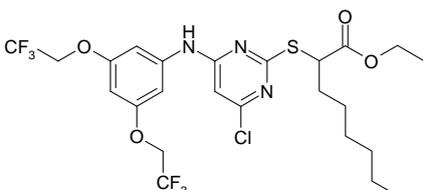
Substanz	Struktur	IC ₅₀ [μ M] intakte Zellen
LP 99		2,6
LP 105		1
LP 114		>10
LP 117		1,1
LP 119		0,6
LP 120		>10
LP 121		5
LP 131		>10

Tabelle 4.1: Strukturen und IC₅₀-Werte ausgewählter Pirinixinsäure-Derivate.

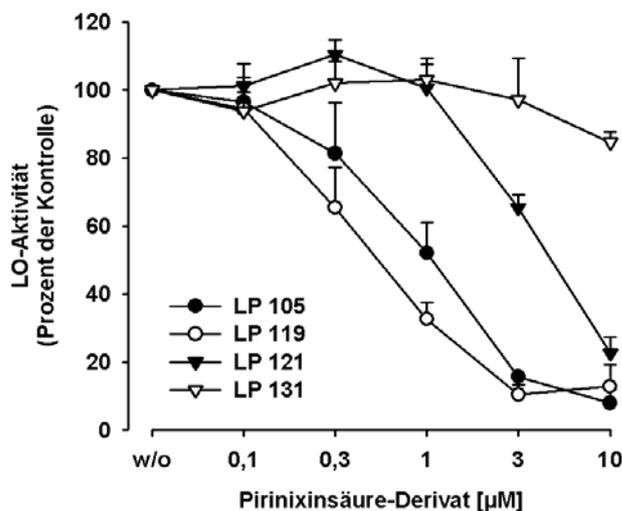


Abb. 4.27: Inhibition der 5-LO-Aktivität durch Pirinixinsäure-Derivate. Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz für 5-10 min bei RT vorinkubiert, 2,5 µM Ca-Ionophor und 20 µM AA werden zugegeben.

Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler.

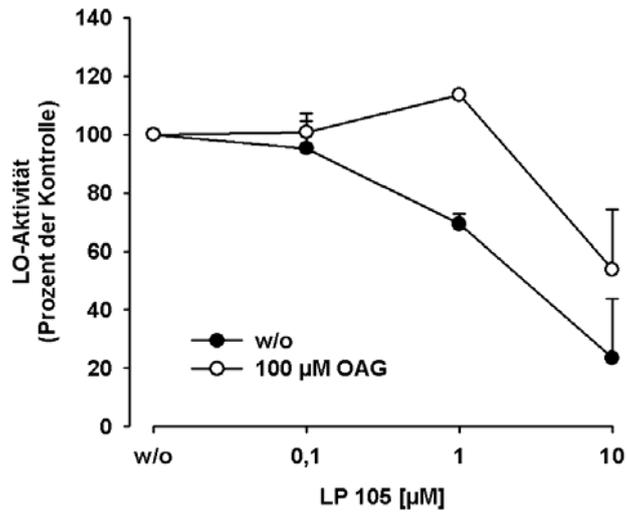
4.2.2 OAG unterbindet die Inhibition der 5-Lipoxygenase durch LP 121 und LP 119

Wie bereits beschrieben, wird der Effekt des 5-LO-Inhibitors Hyperforin durch die Zugabe von OAG abgeschwächt. Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen der Pirinixinsäure-Derivate deuten auf Ähnlichkeiten mit Hyperforin im Wirkmechanismus hin.

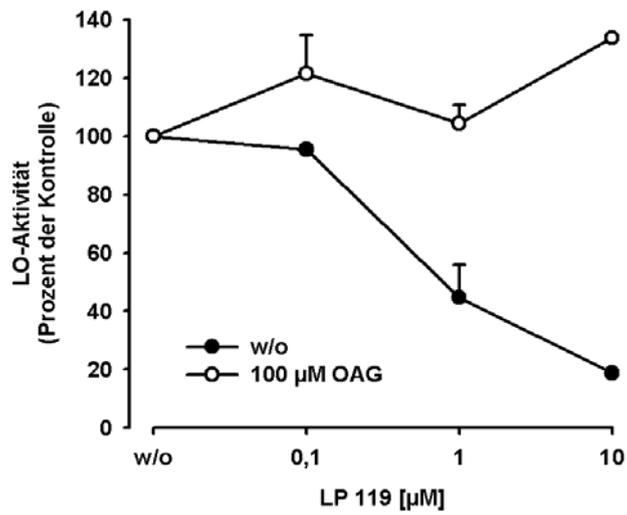
Tatsächlich ist OAG in der Lage, die Inhibition der 5-LO-Aktivität in intakten Zellen frisch isolierter PMNL durch die Pirinixinsäure-Verbindungen zu mindern bzw. aufzuheben. Die Substanzen LP 119 und LP 121 zeigen in Gegenwart von OAG (100 µM) selbst bei einer Konzentration von 10 µM keinerlei Einfluss mehr auf die 5-LO-Produktbildung (Abb. 4.28). Der inhibitorische Effekt der Verbindung LP 105 wird dagegen durch die Zugabe von OAG nicht vollständig aufgehoben, bei 10 µM LP 105 beträgt die Restaktivität der 5-LO noch

annähernd 50% (Abb. 4.28). Für LP 131 kann auch ohne Zugabe von OAG keine Hemmung der 5-LO nachgewiesen werden.

A



B



C

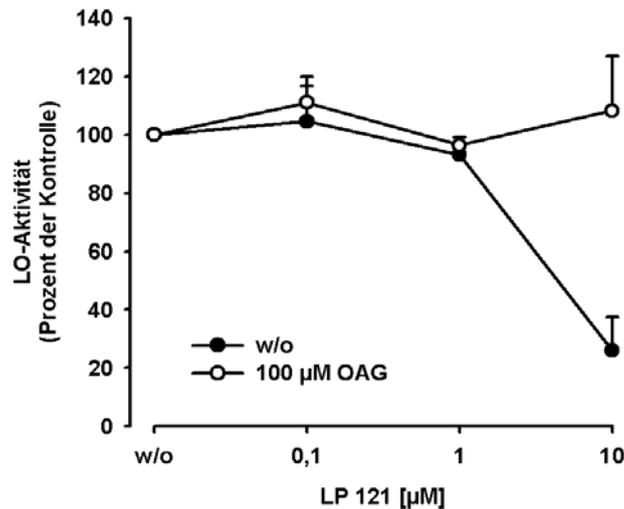


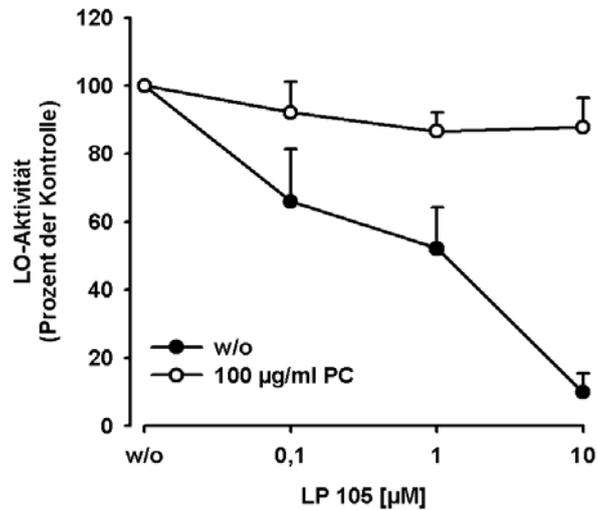
Abb. 4.28: Interaktion zwischen OAG und den Pirinixinsäure-Verbindungen. Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen an A) LP 105, B) LP 119 bzw. C) LP 121 für 10 min bei 37°C vorinkubiert. 100 µM OAG wird 3 min vor der Zugabe von 2,5 µM Ca-Ionophor und 20 µM AA zugesetzt. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit resultierendem Standardfehler dreier unabhängiger Bestimmungen.

4.2.3 Phosphatidylcholin verhindert die 5-Lipoxygenase-Hemmung durch LP 105 und LP 121

Sowohl der Einfluss von OAG auf die 5-LO-Aktivität als auch der Hyperforin-Effekt wird, wie bereits vorgestellt, über die Phospholipid-Bindungsstelle in der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO vermittelt. Der Effekt der Pirinixinsäure-Derivate auf die 5-LO in intakten Zellen frisch isolierter PMNL wird nun wie der Hyperforin-Effekt vollständig oder zumindest teilweise durch die Zugabe von OAG aufgehoben. Damit wird der Verdacht bekräftigt, dass der Effekt der Pirinixinsäure-Derivate ebenfalls über die Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt wird. Diese Vermutung wird auch durch die folgenden Beobachtungen gestützt: Wt-5LO wurde in *E. coli* exprimiert und partiell aufgereinigt. LP 105 und LP121 hemmen hier effektiv die 5-LO-Produktbildung. Durch Zugabe von Phosphatidylcholin (100 µg/ml) wird die Inhibition

der 5-LO-Aktivität vollständig aufgehoben, unabhängig von der Konzentration der Pirinixinsäure-Derivate (Abb. 4.29).

A



B

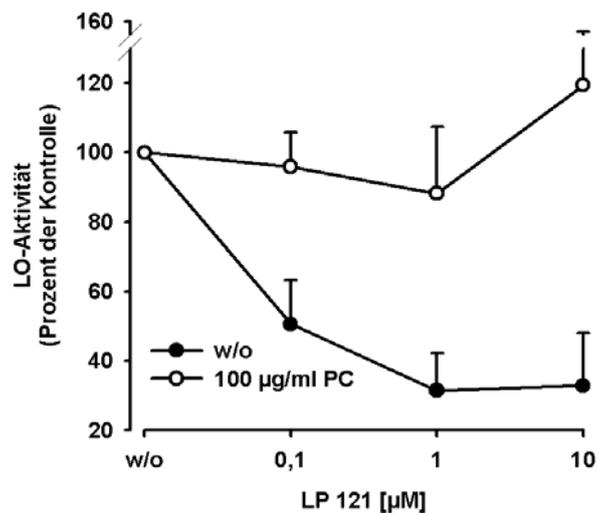


Abb. 4.29: Phosphatidylcholin unterbindet die Hemmung der 5-LO durch LP 105 und LP 121. *Wt-5LO* wird in *E. coli* exprimiert. Partiiell aufgereinigtes Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen an **A**) LP 105 bzw. **B**) LP 121 und 100 µg/ml PC (falls angegeben) für 5 min bei 4°C vorinkubiert. Nach Erwärmen wird 2 mM CaCl₂ und 20 µM AA zugesetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit resultierendem Standardfehler aus drei unabhängigen Bestimmungen.

4.2.4 Einfluss der Pirinixinsäure-Derivate auf die Translokation der 5-Lipoxygenase

In unstimulierten Zellen befindet sich die 5-LO vornehmlich im Zytosol. Nach Stimulation mit Ca-Ionophor transloziert die 5-LO aus dem Zytosol zur Membran des Zellkerns [52,53]. Untersucht wurde hier der Einfluss der beiden Substanzen LP 105 und 121 auf diese Ca-Ionophor induzierte Translokation der 5-LO zur Kernmembran in frisch isolierten PMNL. Die Zellen wurden durch eine NP40-Lyse in eine zytosolische und eine nukleäre Protein-Fraktion getrennt.

Interessanterweise scheint die Ionophor-induzierte Translokation der 5-LO in PMNL durch LP 105 und LP 121 nicht unterbunden, sondern verstärkt zu werden (nicht gezeigt). Diese ersten Erkenntnisse zum Einfluss der Pirinixinsäure-Derivate auf die subzelluläre Lokalisation der 5-LO werden derzeit im Rahmen einer anderen Dissertation durch weitere Experimente vertieft.

4.3 Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren mittels Screening virtueller Datenbanken

4.3.1 Untersuchung der Substanzen des ersten virtuellen Screening-Verfahrens

Im Arbeitskreis Prof. G. Schneider, Uni Frankfurt, wurden zur Identifizierung neuer 5-LO-Inhibitoren auf Naturstoffen basierende Datenbanken *in silico* durchsucht [133]. 43 bereits bekannte 5-LO-Inhibitoren wurden als Leitstrukturen verwendet, Ergebnis des ersten Screenings waren 18 Substanzen, die aufgrund mehrfacher Nennung oder großer Ähnlichkeit zu den Leitstrukturen für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden.

Das inhibitorische Potential dieser Verbindungen wurde zunächst an intakten Zellen frisch isolierter PMNL bestimmt. Zwei dieser Substanzen reduzieren die 5-LO-Produktbildung deutlich (Abb. 4.31A). Dabei gehören Substanz 1 ($IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$) und Substanz 2 ($IC_{50} = 0,9 \mu\text{M}$) zwei unterschiedlichen chemischen Strukturklassen an (Abb. 4.30).

Der Einfluss auf partiell aufgereinigtes 5-LO-Enzym aus *E. coli* wurde ebenfalls untersucht. Substanz 1 ist auch hier in der Lage, die Aktivität der 5-LO zu vermindern ($IC_{50} \sim 1 \mu\text{M}$). Substanz 2 dagegen reduziert zwar in geringem Ausmaß die gebildeten 5-LO-Metabolite bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$, der inhibitorische Effekt lässt sich aber bei höheren Konzentrationen nicht steigern (Abb. 4.31B).

Für beide Substanzen ist der Effekt dabei unabhängig vom Redoxstatus der Zelle, dies zeigen Untersuchungen in Gegenwart von reduzierenden Thiolen und GPx.

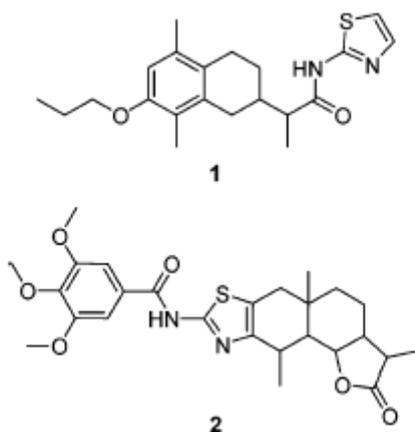
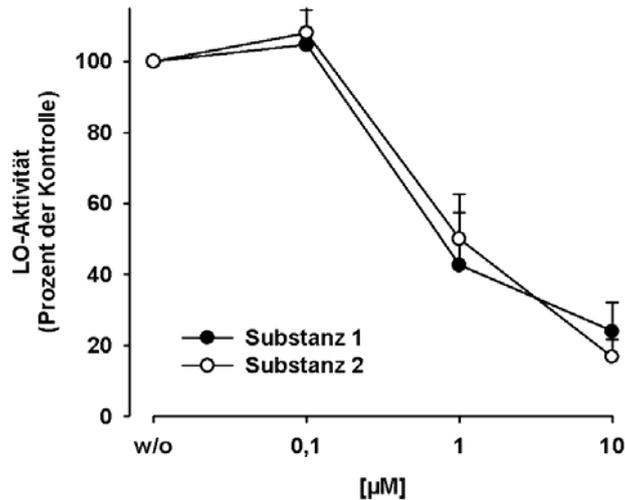


Abb. 4.30: *Strukturen der Substanzen 1 und 2. Die beiden Verbindungen sind die potentesten Inhibitoren der 5-LO, die im ersten Screening identifiziert werden konnten.*

A



B

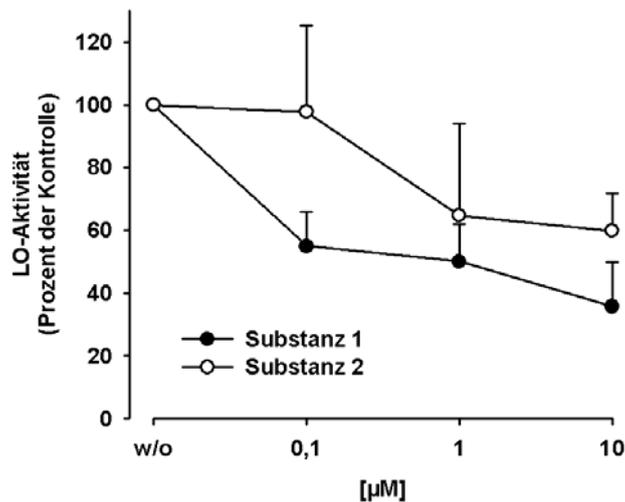


Abb. 4.31: Inhibition der 5-LO-Aktivität durch Substanz 1 und 2. A) Frisch isolierte PMNL (5×10^6) werden in PBS mit 1 mg/ml Glucose mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach 15 min wird $2,5 \mu\text{M}$ Ca-Ionophor und $20 \mu\text{M}$ AA zugesetzt. Die gebildeten 5-LO-Produkte werden nach 10 min bei 37°C bestimmt. B) 5-LO wird in *E. coli* exprimiert und partiell aufgereinigt. $0,5 \mu\text{g}$ Enzym wird in PBS mit 1 mM EDTA, 1 mM ATP und den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz für 5-10 min bei 4°C vorinkubiert. Nach Erwärmen auf 37°C werden 2 mM CaCl_2 und 20 mM AA zugegeben. Die 5-LO-Aktivität wird nach 10 min bei 37°C bestimmt.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit zugehörigem Standardfehler.

4.3.2 Ergebnisse des zweiten Screening-Verfahrens

Im ersten Screening-Verfahren konnten zwei potentielle 5-LO-Inhibitoren identifiziert werden. Beide Substanzen entstammen der gleichen virtuellen Datenbank (AnalytiCon Discovery NAT-5). Es folgte eine erweiterte Durchsuchung dieser Datenbank. Vier unterschiedliche Screening-Verfahren wurden genutzt [133], dabei wurden 17 analoge Verbindungen (Abb. 4.32) zu Substanz 1 bzw. Substanz 2 identifiziert. Die Substanzen 3 – 10 sind strukturell mit Substanz 2 verwandt, die Substanzen 11-19 ähneln in ihrer Struktur der Substanz 1.

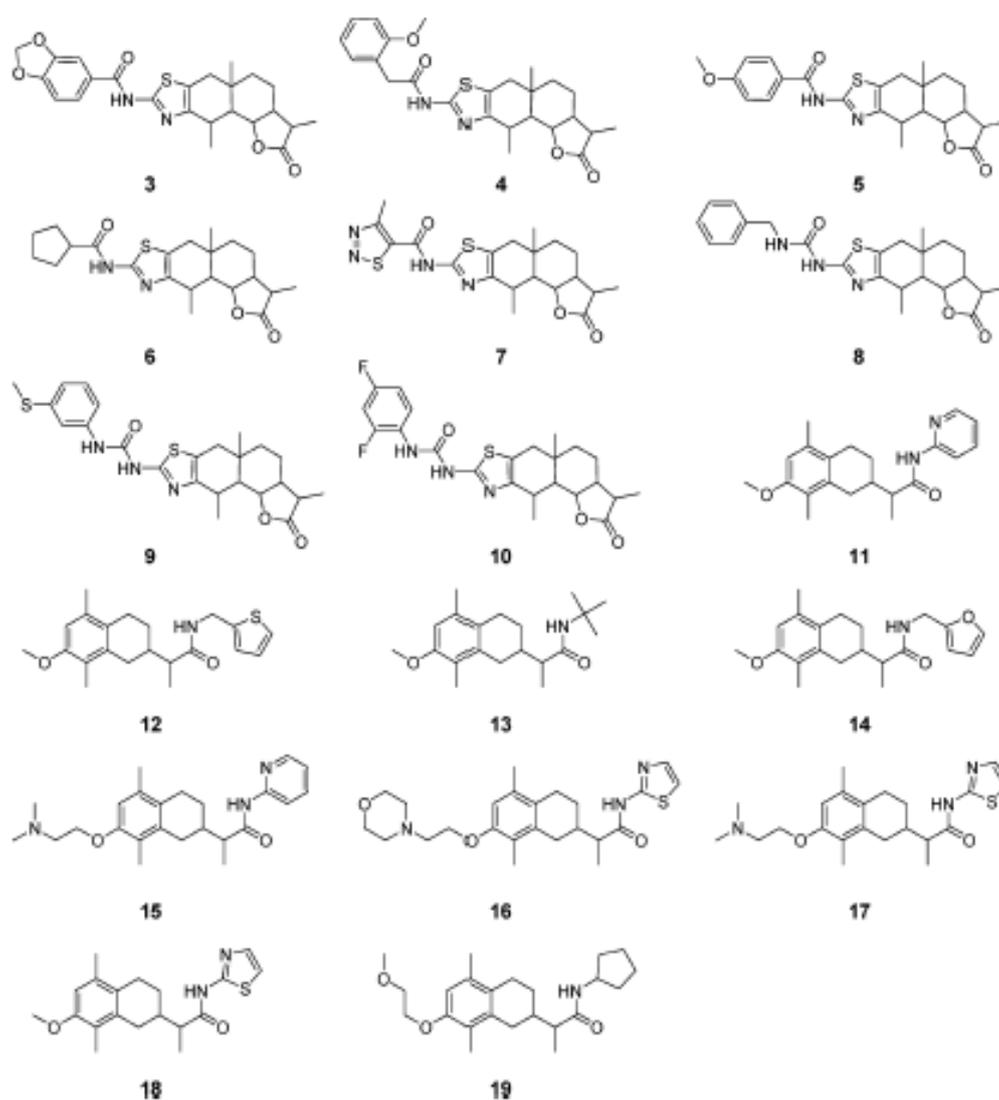


Abb. 4.32: Analoge der Substanzen 1 und 2. Die Verbindungen sind potentielle 5-LO-Inhibitoren des zweiten Screening-Verfahrens.

Der Einfluss dieser Substanzen wurde wiederum an intakten Zellen frisch isolierter PMNL untersucht. Bei einer Konzentration von 1 μM hemmt keine der Verbindungen besser als die beiden Ausgangssubstanzen 1 und 2. Die IC_{50} -Werte der Substanzen 3-10 liegen unter 10 μM , der inhibitorische Effekt ähnelt dem ihrer Leitstruktur Substanz 2. Am partiell aufgereinigten Enzym zeigen die Substanzen 3-10 in Analogie zu Substanz 2 bei 1 μM eine schwache Hemmung der 5-LO-Aktivität, die mit steigenden Konzentrationen nicht verstärkt werden kann. Eine Ausnahme stellen die Substanzen 9 und 10 dar, die am partiell aufgereinigten Enzym IC_{50} -Werte von $\sim 1 \mu\text{M}$ erreichen.

Die Substanzen 11-19 zeigen in intakten Zellen eine geringere Effektivität als ihre Ausgangsstruktur 1. Allein die Substanz 11 ist bei 10 μM in der Lage, die gebildeten 5-LO-Metabolite stärker zu reduzieren als das Leitmolekül. Bei einer Konzentration von 1 μM sind alle strukturellen Verwandten der Substanz 1 am partiell aufgereinigten Enzym potentere Inhibitoren als in intakten Zellen.

In dieser zweiten Screening-Runde wurden zusätzlich 38 weitere Substanzen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit manuell ausgewählt. Die Hälfte dieser Substanzen ist bei 10 μM in intakten Zellen frisch isolierter PMNL in der Lage, die 5-LO-Aktivität um 50 % oder mehr zu reduzieren. Für die Substanzen 54 und 55 ergibt sich ein IC_{50} von $\sim 1 \mu\text{M}$. In Tabelle 4.2 sind IC_{50} -Werte ausgewählter Substanzen dargestellt.

<i>Substanz</i>	<i>IC_{50} [μM] intakte Zellen</i>	<i>IC_{50} [μM] partiell aufgereinigte 5-LO</i>
1	0,8 \pm 2	1 \pm 10
2	0,9 \pm 2	>10
3	2 \pm 3	>10
4	4 \pm 1	>10
5	6 \pm 1	>10
6	8 \pm 1	10 \pm 5
7	10 \pm 2	>10
8	3 \pm 1	>10
9	4 \pm 1	~ 1
10	7 \pm 1	0,6 \pm 0,5
11	5 \pm 1	0,8 \pm 0,2
12	8 \pm 3	>10
13	>10	4 \pm 6
14	>10	0,9 \pm 10
15	>10	>10
16	>10	>10
17	>10	~ 1
18	>10	>10
19	>10	>10
53	8 \pm 2	3 \pm 3
54	0,9 \pm 1	6 \pm 3
55	1 \pm 1	0,8 \pm 2

Tabelle 4.2: IC_{50} -Werte der untersuchten Verbindungen.

5 Diskussion

5.1 Aktivierung der 5-Lipoxygenase durch Glyceride/OAG *in vitro*

Diacylglyceride (DAG) sind in der Lage, die Aktivität der 5-LO zu steigern. Vorangegangene Untersuchungen zeigten in intakten Zellen eine Stimulation der 5-LO durch das Diacylglycerid OAG, der Effekt ist nur in Anwesenheit exogener AA zu beobachten. Eine Beteiligung der für die 5-LO bekannten Aktivierungswege wie Phosphorylierung, Ca^{2+} -Mobilisierung und Translokation konnten ausgeschlossen werden [111,120,121]. Im Rahmen dieser Arbeit ist der molekulare Mechanismus von OAG weiter untersucht worden.

5.1.1 Interaktion von OAG mit Ca^{2+} , Glutathion-Peroxidase und Phospholipiden

Aus Untersuchungen an frisch isolierten, intakten PMNL ist bekannt, dass der OAG-Effekt *in vivo* bei basalen oder geringfügig erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen von 100-120 nM nach Zugabe exogener AA zu beobachten ist. Entfernt man bei diesen Versuchsansätzen das vorhandene Ca^{2+} durch Komplexierung mit EDTA oder BAPTA/AM, geht die Aktivierung der 5-LO teilweise bzw. vollständig verloren [120]. Interessanterweise scheint sich die Ca^{2+} -Abhängigkeit des OAG-Effektes *in vitro* umzukehren. Unter optimalen Assaybedingungen in Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} lässt sich weder an PMNL Homogenat, S100 noch am partiell aufgereinigten Enzym eine Steigerung der 5-LO-Produktmenge durch OAG beobachten. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Berichten [76,134]. Entfernt man Ca^{2+} dagegen aus den Versuchsansätzen, induziert OAG bei Substratkonzentrationen unter 20 μM AA die 5-LO-Aktivität im S100 und am partiell aufgereinigten Enzym bereits ab einer eingesetzten Konzentration von 0,3 μM , der maximale Effekt mit einer Aktivitätssteigerung um das 8- bzw. 14-fache wird bei 30 μM OAG beobachtet.

Für eine Erklärung dieser scheinbaren Umkehr der Ca^{2+} -Abhängigkeit muß man die gewählten Versuchsbedingungen allerdings näher betrachten. *In vivo* konnte nach Entfernung des extrazellulär vorhandenen Ca^{2+} durch EDTA weiterhin ein Effekt durch OAG gefunden werden, dieser war nur um 30% schwächer im Vergleich zu Versuchen ohne EDTA. Erst durch das Entfernen des intrazellulär vorhandenen Ca^{2+} durch BAPTA/AM ging der Effekt

vollständig verloren. Für intakte Zellen wird daher eine basale oder leicht erhöhte Ca^{2+} -Konzentration als Voraussetzung für den Anstieg der 5-LO-Produkte angesehen [120]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die *in vitro*- Inkubationsansätze als Standardkonzentration 1 mM Ca^{2+} gewählt, bei dieser Konzentration konnte – wie schon beschrieben – keine 5-LO-Aktivitätssteigerung durch OAG beobachtet werden. Daten aus eigenen weiteren Untersuchungen (Ergebnisse nicht gezeigt) weisen darauf hin, dass zumindest in Anwesenheit niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen von 10 μM auch *in vitro* eine Induktion der 5-LO-Aktivität durch OAG zu beobachten ist, wenn auch wesentlich schwächer. Möglicherweise ist bei der für diese Untersuchungen gewählten Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM die 5-LO in diesem artifiziellen Versuchssystem bereits maximal stimuliert, so dass sich keine weitere Aktivitätssteigerung durch OAG beobachten lässt.

In intakten Zellen spielt auch die endogene DAG-Synthese eine wichtige Rolle bei der 5-LO-Aktivierung. So konnte gezeigt werden, dass die Blockade der DAG-Synthese durch den PLD-Inhibitor 1-Butanol oder den PA-P-Inhibitor Propranolol zu einer erniedrigten 5-LO-Produktsynthese führt. Diese Hemmung kann durch die Zugabe von OAG wieder rückgängig gemacht werden [111]. Betrachtet man die Translokation der 5-LO nach Ca^{2+} -Stimulation, so zeigt OAG selbst keinen Einfluss. Entfernt man aber die endogenen DAG, kann keine Translokation mehr nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der DAG ist also Voraussetzung für die Translokation der 5-LO, ohne dass die DAG die Translokation selbst stimulieren könnten. Denkbar ist daher auch der Einfluss diverser *in vivo* noch intakter Signaltransduktionswege, die in Zelllysaten keine Rolle mehr spielen.

Während der OAG-Effekt auf die 5-LO-Aktivität *in vivo* direkt von der Anwesenheit von Ca^{2+} abhängig ist, scheint OAG *in vitro* eher die Ca^{2+} -Effekte nachzuahmen. Sowohl OAG als auch Ca^{2+} haben gemeinsam, dass sie im S100 und am partiell aufgereinigten Enzym besonders bei niedrigen Substratkonzentrationen unter 20 μM die 5-LO-Produktmenge zu steigern vermögen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Ca^{2+} zu einer Erniedrigung des K_m -Wertes der 5-LO für ihr Substrat Arachidonsäure führt. Denkbar wäre also eine erhöhte Substrataffinität der 5-LO durch OAG. Zur Erklärung der Ca^{2+} -Effekte auf die 5-LO wurden mehrere Theorien aufgestellt. Durch die Ca^{2+} -Bindung an die 5-LO könnte es zu einer Konformationsänderung kommen, die die Komplexbildung des inaktiven Eisens durch die beiden flexiblen Liganden His-367 und Asn-554 insofern beeinflusst, dass die Oxidation des inaktiven Fe^{2+} zu aktivem Fe^{3+} durch Lipidhydroperoxide erleichtert wird [135]. Diese Theorie widerspricht allerdings Veröffentlichungen, in denen kein Einfluss von Ca^{2+} auf den

Oxidationsstatus des Eisens im aktiven Zentrum gezeigt werden konnte [15]. Als Folge der Ca^{2+} -Bindung an die 5-LO steigt die Hydrophobizität des Enzyms und eine erleichterte Bindung der Lipidhydroperoxide an die postulierte zweite Fettsäurebindungsstelle wäre möglich [135]. Ein ähnlicher Mechanismus ist ebenfalls für OAG denkbar. Zur Erklärung der *in vivo* Daten wurde eine Bindung von OAG an die 5-LO mit anschließender Konformationsänderung und der damit verbundenen Aktivierung vorgeschlagen. In Analogie zur PKC-Aktivierung durch DAG und Ca^{2+} könnte eine Bindung von OAG an 5-LO das Bedürfnis an Ca^{2+} herabsetzen, die 5-LO wird bereits bei geringeren Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv [121]. Bei der PKC wird durch die Bindung von Ca^{2+} an die C2-Domäne das Enzym aktiviert, DAG binden an die C1-Domäne des Enzyms und erhöhen so die Affinität zu Ca^{2+} , die Aktivierung des Enzyms erfolgt bereits bei niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationen [136,137]. Ein ähnlicher Effekt wird auch für die cPLA₂ beschrieben [138].

OAG zeigt als Diacylglycerid allerdings andere Moleküleigenschaften als das zweiwertige Ion Ca^{2+} . Sollte tatsächlich eine Bindung von OAG an die 5-LO stattfinden, bleibt es fraglich, ob dadurch ebenfalls die Konformation oder die Hydrophobizität im gleichen Maße wie durch Ca^{2+} beeinflusst werden. Als vollständige Erklärung für die Gemeinsamkeiten zwischen OAG und Ca^{2+} *in vitro* reicht dies jedoch nicht aus.

Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Interaktion zwischen OAG und der 5-LO nicht durch die gleiche Bindungsstelle vermittelt wird. Für Ca^{2+} wird die Bindung von zwei Ionen Ca^{2+} pro Molekül 5-LO durch die Aminosäure-Reste Asn-43, Asp-44 und Glu-46 innerhalb der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO beschrieben. In der loop2 mut-5LO sind diese Aminosäuren zu Alanin mutiert. Diese Mutante zeigt eine verminderte Fähigkeit, Ca^{2+} zu binden und benötigt höhere Konzentrationen an Ca^{2+} zur Aktivitätsteigerung [10]. OAG zeigt auch an der loop2 mut-5LO eine Erhöhung der Enzymaktivität. Damit kann einer Beteiligung der Ca^{2+} -Bindungsstelle an der Interaktion zwischen 5-LO und OAG ausgeschlossen werden.

Für intakte Zellen wurde eine optimale Vorinkubationszeit mit OAG von drei Minuten ermittelt, bei einer Vorinkubationszeit von mehr als 10 min wird kein Effekt mehr gefunden. Die Vermutung liegt nahe, dass in intakten Zellen die eingesetzten DAG rasch wieder abgebaut werden. Auch endogene DAG werden, wie bereits beschrieben, rasch über verschiedene Metabolisierungswege durch entsprechende Kinasen und Lipasen abgebaut [120]. Im Gegensatz dazu kann an Zelllysaten keine Anhängigkeit der Stimulation der 5-LO durch OAG von der gewählten Vorinkubationszeit (bis 60 min) beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebene Vermutung.

In einem weiteren Punkt ähnelt der Einfluss von OAG auf die 5-LO dem Effekt von Ca^{2+} . Für Ca^{2+} konnte eine Stabilisierung der 5-LO-Aktivität gegen den inhibitorischen Effekt der Glutathionperoxidase (GPx)-1 gezeigt werden [65]. OAG ist ebenfalls in der Lage, die 5-LO-Aktivität vor der Hemmung durch die GPx zu schützen. Auch OG, DOG, EAG und in geringem Ausmaß auch SAG vermögen dies.

Für die Untersuchungen wurden definierte Mengen exogener GPx-1 aus Rindererythrozyten zu den Versuchsansätzen gegeben, als Kosubstrat dienten endogen im S100 der PMNL enthaltene Thiole. GPx liegt im aktiven Zustand in der Selenol-Form vor, durch Reduktion von Hydroperoxiden erfolgt die Oxidation der GPx zur Selensäure-Form und damit zum inaktiven Zustand. Zur Reduktion der inaktiven Selensäure-Form zur aktiven Selenol-Form wird das Kosubstrat GSH benötigt. Während des Aufreinigungsprozesses des PMNL S100 geht die aktive Form der GPx in die inaktive Form über. Die endogen im S100 enthaltenen Thiole werden in ihrer Konzentration durch die Aufreinigung verdünnt und sind nicht mehr ausreichend, um die GPx wieder in ihren aktiven Zustand zu überführen. Die Aktivität der endogen im PMNL S100 enthaltenen GPx kann daher auch durch Zugabe von Kosubstrat (1 mM GSH) wiederhergestellt werden.

Die Hemmung der 5-LO-Aktivität durch GPx lässt sich also nicht nur durch die Zugabe von Ca^{2+} , sondern auch durch die Zugabe von OAG überwinden. Niedrige OAG-Konzentrationen können dabei die Aktivität der 5-LO teilweise wieder herstellen, bei 30-100 μM OAG erlangt die 5-LO wieder ihre volle Aktivität. Die Versuche wurden bei einer Substratkonzentration von 20 μM AA durchgeführt, bei der OAG selbst die 5-LO-Produktmenge nicht steigert. Eine direkte Hemmung der Glutathionperoxidase durch OAG konnte ausgeschlossen werden, bei der Messung der GPx-Aktivität zeigten Konzentrationen bis 100 μM OAG keinerlei Hemmeffekt auf GPx-1 aus Rindererythrozyten.

OAG ermöglicht die 5-LO-Produktbildung damit auch in Anwesenheit aktiver GPx, d.h. bei geringen Lipidhydroperoxid-Konzentrationen. Die Ergebnisse dieser Versuche unterstützen damit die Theorie, dass OAG wie auch Ca^{2+} die Affinität der 5-LO zu Lipidhydroperoxiden erhöht und damit die Aktivierung erleichtert. Die möglichen Mechanismen wurden bereits im Abschnitt „ Ca^{2+} -Einfluss“ beschrieben.

Die Stimulation der 5-LO-Aktivität durch OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} lässt sich nur am S100 und am partiell aufgereinigten 5-LO-Enzym beobachten. Interessanterweise zeigt sich am Zellhomogenat keinerlei OAG-Effekt. Es liegt nahe, dass im Homogenat ein oder mehrere Bestandteile vorhanden sind, die die Aktivierung der 5-LO durch OAG verhindern. Durch die

weitere Aufreinigung des Homogenates mit der Ultrazentrifugation bei 100.000 g könnten diese Bestandteile abgetrennt werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei um noch vorhandene Zellmembranen und die darin enthaltenen Phospholipide handelt, konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Tatsächlich kann die Steigerung der 5-LO-Produktbildung durch OAG sowohl im S100 als auch am partiell gereinigten 5-LO-Enzym durch die Zugabe von Phosphatidylcholin und weiteren Phospholipiden unterbunden werden. Alle Untersuchungen wurden in Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Die Zugabe von PC zu durch OAG-aktivierter 5-LO und das damit verbundene Verschwinden des OAG-Effektes könnte nun an einer verminderten Bereitstellung des Substrats AA liegen. Denkbar ist ein Einschluss oder eine Anlagerung der AA an Micellen des PC nach der Zugabe der wässrigen PC-Lösung zum Versuchsansatz. Als Folge steht der 5-LO weniger Substrat zur Verfügung, die 5-LO-Produktmenge sinkt. Allerdings müsste bei dieser Theorie bereits bei der alleinigen Zugabe von wässriger PC-Lösung in Abwesenheit von OAG zu 5-LO eine Senkung der 5-LO-Aktivität zu beobachten sein. Dies war jedoch nicht der Fall. In den Kontrollexperimenten konnte durch Zugabe von PC zur 5-LO keine Hemmung der Aktivität, sondern eher ein leichter Anstieg gezeigt werden. Eine Verdrängung von OAG aus der Interaktion mit dem 5-LO-Enzym durch Phospholipide und damit die Unterdrückung des OAG-Effektes ist also denkbar. Ein Schwachpunkt dieser Theorie ist die Abwesenheit von Ca^{2+} . Die Effekte von PC auf die 5-LO in Abwesenheit von Ca^{2+} sind bisher nur wenig untersucht. Die ersten Berichte über die Bindung von PC gingen davon aus, dass es sich um einen Ca^{2+} -abhängigen Vorgang handelt. Mittlerweile wird auch in Abwesenheit von Ca^{2+} eine, wenn auch schwache Bindung, von PC an die 5-LO beschrieben [134]. Somit ist es also doch denkbar, dass PC auch in Abwesenheit von Ca^{2+} OAG an der Interaktion mit dem Enzym hindern kann. Interessanterweise zeigten außer PC auch andere Phospholipide, wie Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS), eine Aufhebung des OAG-Effektes. Aus der Literatur ist bekannt, dass nur PC-Vesikel in der Lage sind, Membranfraktionen zu ersetzen, nicht aber Vesikel aus PS, PI oder PE [75,76]. Die 5-LO transloziert bevorzugt zu Membranen mit einem hohen Anteil an zwitterionischem PC, hierbei vermitteln die Tryptophan-Reste Trp-13,-75 und -102 die Selektivität [12,70]. Dennoch kann in Abwesenheit von Ca^{2+} eine schwache Bindung an anionische und zwitterionische Membranen gezeigt werden, die Bindung an kationische Membranen ist trotz Abwesenheit von Ca^{2+} 20-fach höher und erscheint somit Ca^{2+} -unabhängig [134]. Dies erklärt, dass die Aktivitätssteigerung der 5-LO durch OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} nicht nur durch PC, sondern auch durch andere Phospholipide unterbunden werden kann.

Als möglicher Mechanismus kommt eine Konkurrenz zwischen OAG und PC um die gleiche Bindungsstelle in Frage. Diese Theorie konnte durch weitere Untersuchungen an der sogenannten 3W mut-5LO bestätigt werden. Bei dieser 5-LO-Mutante wurden die drei Tryptophan-Reste Trp-13,-75 und -102, die die Bindung von PC und Lipidmembranen an die C2-ähnliche Domäne der 5-LO vermitteln, durch Alanin-Reste ersetzt [12,70]. Die Aktivität der 3W mut-5LO lässt sich durch OAG unter den bereits beschriebenen Versuchsbedingungen nicht steigern. Im Gegensatz dazu induzierte Ca^{2+} in Kontrollversuchen die Produktbildung der 3W mut-5LO. Der OAG-Effekt wird wohl über die intakte Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt. Unterstützt wird diese Theorie von Ergebnissen aus Versuchen zur Interaktion zwischen OAG und Hyperforin, Hauptinhaltsstoff von Johanniskraut-Extrakten. Neue Untersuchungen zeigten, dass Hyperforin ebenfalls mit der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO interagiert, die drei Tryptophan-Reste Trp-13, -75 und -102 sind maßgeblich an der Interaktion beteiligt [101]. Durch Zugabe von OAG kann der IC_{50} -Wert von Hyperforin deutlich erhöht werden, dies gilt sowohl für intakte Zellen als auch für partiell aufgereinigtes 5-LO-Enzym. Damit scheint OAG tatsächlich über die drei Tryptophan-Reste der Phospholipid-Bindungsstelle in der C2-ähnlichen Domäne mit der 5-LO zu interagieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die Aktivitätssteigerung der 5-LO durch OAG, sondern auch durch andere, strukturell ähnliche Substanzen getestet. Es handelte sich hierbei um die Diacylglyceride 1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycerol (DOG) und 1-Stearoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycerol (SAG) sowie die Etherverbindungen 1-O-oleyl-*rac*-glycerol (OG) und 1-O-Hexadecyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (EAG). Dabei aktivieren DOG, OG und EAG konzentrationsabhängig die 5-LO, allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß als OAG selbst. Im Gegensatz dazu ist das längerkettige SAG nicht in der Lage, die 5-LO zu stimulieren.

Für intakte Zellen konnte nur durch OAG und EAG eine Aktivierung der 5-LO gezeigt werden, andere Mono- und Diacylglyceride blieben ohne Effekt. Als Begründung wurde die strukturelle Verwandtschaft zwischen OAG und EAG genannt. Beide tragen an Position C2 eine Acetylgruppe, die die Membranpassage ermöglicht. OG wurde als zu hydrophil, SAG als zu lipophil für die Membranpassage eingestuft [121]. Bei den Untersuchungen an Zelllysaten müssen die getesteten DAG keine Zellmembranen mehr passieren. Daher können auch DOG und OG die Aktivität der 5-LO aus S100 oder partiell aufgereinigtes Enzym stimulieren. Bei OAG handelt es sich um ein synthetisches Analogon der endogen in Zellen tatsächlich vorkommenden Diacylglyceride. Trotzdem ist es gut vorstellbar, dass die 5-LO-Aktivität *in*

in vivo durch endogene DAG reguliert werden kann, da die 5-LO keine reine Selektivität zu OAG zeigt, sondern auch andere, strukturell ähnliche Substanzen zu einer Steigerung der 5-LO-Produktmenge führen.

Interessanterweise ist SAG nicht in der Lage, die Aktivität der 5-LO zu steigern. Dabei handelt es sich hierbei um eines der Diacylglyceride, die endogen in Zellen nachgewiesen werden konnten. Allerdings war es zumindest teilweise in der Lage, die 5-LO vor der Inaktivierung durch GPx zu schützen. Möglicherweise gewährleisten endogene DAG damit die Aktivität der 5-LO auch bei verändertem Redox-Status der Zelle.

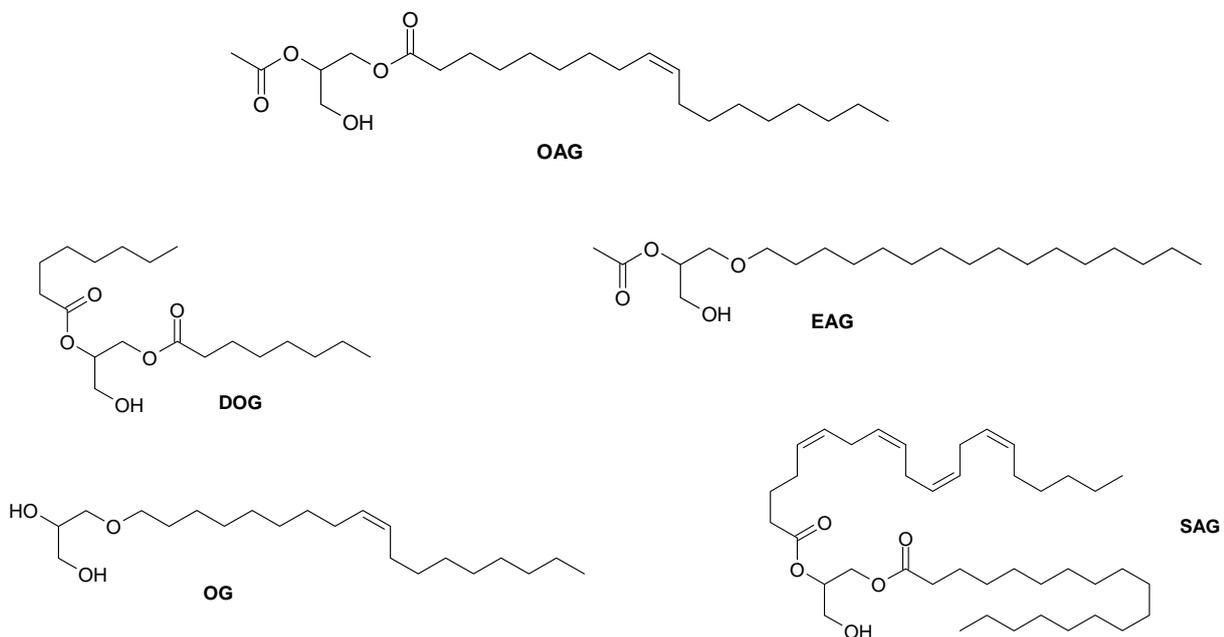


Abb. 5.1: Strukturformeln der getesteten (Diacyl)glyceride.

Für OAG selbst weisen die Ergebnisse mit kalt hydriertem OAG (H-OAG) darauf hin, dass für den aktivierenden Effekt die Doppelbindung im Fettsäure-Rest an Position C1 essentiell ist. Überführt man den ungesättigten Ölsäure-Rest durch eine Hydrierung der Doppelbindung in einen gesättigten Stearinsäure-Rest, geht die Aktivierung der 5-LO verloren. Ursprünglich sollte eine Markierung des OAG mit Tritium an der Doppelbindung dazu dienen, eine Bindung von OAG an die 5-LO nachzuweisen. Da aber bereits H-OAG in der Aktivierung versagte, kann man davon ausgehen, dass auch das $^3\text{[H]OAG}$ zu keiner Aktivierung der 5-LO führt. Ohne diese Steigerung der 5-LO-Aktivität ist dann fraglich, ob überhaupt eine Interaktion zwischen dem Diacylglycerid und der 5-LO stattfindet. Die Versuche mit H-OAG wurden nur an intakten Zellen durchgeführt, besser wäre die Untersuchung am S100 oder am

partiell aufgereinigten Enzym gewesen. Trotzdem kann man davon ausgehen, dass auch H-OAG zur Membranpassage fähig ist, da hierfür vornehmlich die Acetylgruppe an Position C2 als verantwortlich gilt. Bedingt durch diese Überlegungen wurde auf weitere Versuche mit ^3H OAG verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass OAG und auch andere DAG die 5-LO-Aktivität direkt zu steigern vermögen. Die OAG-Effekte ähneln dabei häufig den Effekten, die durch Ca^{2+} auf die 5-LO ausgeübt werden. Sowohl OAG als auch Ca^{2+} steigern besonders bei niedrigen Substratkonzentrationen unter $20\ \mu\text{M}$ AA die 5-LO-Produktmenge und beide Substanzen sind in der Lage, die 5-LO-Aktivität vor einer Hemmung durch die GPx zu schützen. Interessanterweise konnte für OAG eine Aktivitätssteigerung der 12- und 15-LO gezeigt werden, verglichen mit den Ergebnissen für 5-LO ist diese Induktion allerdings wesentlich geringer. Analog zu OAG ist auch Ca^{2+} bei den beiden anderen LO nur in geringem Ausmaß zur Aktivierung der Enzyme fähig.

Die Interaktion von OAG mit der 5-LO scheint über die drei Tryptophan-Reste der Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt zu werden, der aktivitätssteigernde Effekt von OAG geht durch Zugabe von Phospholipiden verloren und kann nicht an der 3W mut-5LO beobachtet werden. Damit ergeben sich zwischen OAG und Ca^{2+} wesentliche Unterschiede: Ca^{2+} aktiviert die 5-LO auch in Gegenwart von PC und anderen Phospholipiden, die Menge der 5-LO-Produkte steigt sogar an. Die 3W mut-5LO kann durch Ca^{2+} weiterhin stimuliert werden und vor einem hemmenden Effekt durch die GPx geschützt werden, OAG vermag dies nicht. OAG führt dagegen bei der loop2 mut-5LO, die kein Ca^{2+} mehr bindet, zu einer Induktion der Aktivität.

Aus der Literatur ist bekannt, dass DAG in der Lage sind, an die C1-Domänen verschiedener Enzyme zu binden, beispielsweise die PKC-Isoenzyme. Die cysteinreichen C1-Domänen besitzen, wie bereits in der Einleitung unter 2.5 beschrieben, die Zinkfinger-ähnliche Sequenz $\text{HX}_{11-13}\text{CX}_2\text{CX}_{12-14}\text{CX}_2\text{CX}_4\text{HX}_2\text{CX}_{6-7}\text{C}$ und wurden ursprünglich als Bindungsmotiv für Phorbolster beschrieben [110]. Die Bindung der DAG an die C1-Domäne wirkt häufig mit einer gleichzeitigen Bindung der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipid-Bindung an die C2-Domäne des Enzyms zusammen und führt zur Aktivierung des Enzyms und Translokation zu Zellmembranen.

Im Gegensatz zu den PKC-Isoenzymen besitzt die 5-LO zwar eine C2-ähnliche Domäne, die ebenfalls die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung und Translokation vermitteln kann, aber keine C1-Domäne. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen weisen nun darauf hin, dass

es auch für 5-LO trotz des Fehlens einer C1-Domäne möglich ist, mit OAG zu interagieren. Die Aktivierung der 5-LO durch OAG wird über die auf der C2-ähnlichen Domäne gelegene Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt. Der OAG-Effekt unterscheidet sich dabei deutlich von dem Einfluss, den Phospholipide auf das 5-LO-Enzym haben. Durch Phospholipide lässt sich nur eine geringe Steigerung der 5-LO-Produkte erreichen, außerdem zeigen sie in Anwesenheit von Ca^{2+} eine Aktivierung der 5-LO. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Phospholipide allein nicht in der Lage sind, die GPx-induzierte Hemmung der 5-LO zu überwinden.

5.1.2 Zellinienspezifität

Es ist bekannt, dass OAG in RBL-1- und an differenzierten MM6-Zellen die 5-LO-Produktmenge nicht steigern kann. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte an FCS-kultivierten, differenzierten MM6-Zellen keine Aktivierung der 5-LO durch OAG beobachtet werden. Die Untersuchungen mit OAG wurden auf serumfrei kultivierte, differenzierte MM6-Zellen ausgeweitet, um den Effekt von FCS in der Kultur zu untersuchen. Der serumfreien Kultur wurde 10 ng/ml Selen zugesetzt, um die Aktivität der vorhandenen GPx zu erhalten. Ohne Selen-Zusatz könnte eine Aktivitätssteigerung der 5-LO auf der erniedrigten GPx-Aktivität beruhen und fälschlicherweise als OAG-Effekt ausgelegt werden. Analog zu MM6-Zellen aus FCS-haltiger Kultur wird auch bei serumfrei kultivierten Zellen durch Zugabe von OAG die Menge an 5-LO-Produkten nicht gesteigert. Ein Einfluss von FCS auf den OAG-Effekt kann daher ausgeschlossen werden.

Für MM6-Zellen ist bekannt, dass durch Stimulation mit Ca-Ionophor und dem daraus resultierenden raschen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Hemmung der 5-LO-Aktivität durch die GPx überwunden werden kann [65]. Analog zu den Ergebnissen aus PMNL S100 erwartet man zunächst, dass OAG auch in inakten MM6-Zellen die 5-LO-Aktivität gegen die GPx-Hemmung stabilisieren könnte. OAG ist aber entgegen dieser Erwartung nicht in der Lage, die Hemmung der 5-LO durch die endogene GPx der MM6-Zellen zu unterbinden. Diese Beobachtungen decken sich mit Berichten aus früheren Untersuchungen und wurden damals mit einem stark veränderten Stoffwechsel der Zelllinie erklärt [121]. Eine einfache Erklärung wäre auch, dass es Unterschiede im Aufbau der Plasmamembran zwischen MM6-Zellen und PMNL gibt und OAG keine oder nur eine geringe Membranpassage möglich ist. Dann müsste allerdings eine Aktivierung der 5-LO

durch OAG in MM6-Zellysaten (S100 oder partiell aufgereinigtes Enzym) zu beobachten sein. Bekannt ist, dass die 5-LO im S100 aus MM6-Zellen nur in Anwesenheit von Ca^{2+} aktiv ist [139]. Daher wäre es interessant zu wissen, ob sich analog zu den Versuchen am PMNL S100 auch im MM6 S100 5-LO-Aktivität durch OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachten lässt. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt.

Bei der in MM6-Zellen vorhandenen GPx handelt es sich um die sogenannte klassische GPx, also GPx-1. Diese zeigt bereits bei geringen Thiol-Konzentrationen eine hohe Aktivität. PMNL zeigen im Vergleich mit MM6-Zellen eine wesentlich geringere GPx-Aktivität [65]. Wahrscheinlich ist in MM6-Zellen unter diesen Bedingungen nur Ca^{2+} , nicht aber OAG in der Lage, die starke GPx-Aktivität zu überwinden. Eine Kultivierung der MM6-Zellen unter serumfreien und selenfreien Bedingungen wäre von Interesse, da dann keine Aktivität der endogenen GPx vorhanden wäre und möglicherweise eine 5-LO-Aktivierung durch OAG beobachtet werden kann.

Das Versagen von OAG an BL41-E95-A-Zellen hat möglicherweise eine ähnliche Ursache wie in MM6-Zellen. Bereits früher wurde gezeigt, dass in intakten BL41-E95-A-Zellen trotz Stimulation mit Ca-Ionophor und exogener AA keine 5-LO-Aktivität vorhanden ist. Durch Absenken der GSH-Level konnte ein Anstieg der 5-LO-Produktmenge beobachtet werden. Erklärt wurde dies mit einem möglichen Kontrollsystem der 5-LO-Aktivität, an dem auch der Redoxstatus und die GSH-Konzentration beteiligt ist [127]. Anscheinend verhindert der besondere Redoxstatus der Zellen die Aktivierung der 5-LO sowohl durch Ca^{2+} als auch durch OAG.

Für die Sojabohnen-Lipoxygenase (SLOX) konnte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} keine Steigerung der Produktmenge gezeigt werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, scheinen für den OAG-Effekt die drei Tryptophan-Reste Trp-13, -75 und -102 der Phospholipid-Bindungsstelle essentiell zu sein. Für die SLOX konnte ebenfalls eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an Phospholipide gezeigt werden. Allerdings scheinen die in der SLOX vorhandenen Tryptophan-Reste nur teilweise an der Phospholipid-Bindung beteiligt zu sein, da sie bedingt durch die räumliche Anordnung des Enzyms vermutlich kaum mit den Phospholipid-Seitenketten interagieren können. Eine eher periphere Bindung der SLOX an Membranen wird postuliert, vermittelt über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen [140]. Als Erklärung für das Versagen von OAG bezüglich einer Aktivitätssteigerung der SLOX liegt nahe, dass wohl auch für OAG die Interaktion mit den Tryptophan-Resten sterisch gehindert ist.

5.1.3 Nachweis einer möglichen Bindung zwischen OAG und 5-Lipoxygenase

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Stimulation der 5-LO durch OAG führen zu der Schlussfolgerung, dass der Effekt von OAG und der anderer DAG über die Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt wird. Damit ist auch eine direkte Bindung von OAG an die 5-LO denkbar. Um diese mögliche Bindung nachzuweisen, sollte der unter Abschnitt 4.1.11 beschriebene Lipid Protein Overlay Assay ausgearbeitet werden. Für cPLA₂ konnte die Bindung von Ceramid-1-Phosphat durch Auftragen der Lipide auf eine Hybond-C[®] Membran gezeigt werden [141]. Ebenfalls durch auf Hybond-C[®] Membranen aufgetragene Lipide konnte die Bindung an PH-Domänen nachgewiesen werden [142]. Industriell vorgefertigte, mit Lipiden beschichtete Membranen dienen zum Nachweis der Bindung von humaner 15-LO an Phospholipide [143]. Anlehnend an diese Publikationen sollte für die 5-LO ein entsprechender Assay ausgearbeitet werden. Zu Beginn wurden die ausgewählten Substanzen OAG und OG als Lösungen in DMSO auf die Hybond-C[®] Membran aufgetragen. AA lag als ethanolische Lösung vor, PC in einer wässrigen Lösung. Die DMSO-Lösungen zeigten sich problematisch, da hier die Membran durch das Lösemittel angegriffen wurde. Für die wässrige PC-Lösung gestaltete sich die Trocknung der Membran schwierig. Daher wurden alle Substanzen für weitere Versuche aus ethanolischer Lösung aufgetragen. Trotzdem erweist sich das Auftragen der Lipide weiterhin als schwierig.

Als Negativkontrollen dienen jeweils Membranen, auf die ebenfalls Lipide aufgetragen sind, die aber nicht mit 5-LO-Lösung, sondern nur mit Pufferlösung inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte anschließend mit NBT/BciP. Es zeigte sich durch die Negativkontrollen, dass auch die Lipide selbst mit NGT/BciP reagieren, daher wurde die Detektion auf das LICOR Odyssey[®] Infrared Imaging System umgestellt. Als Positivkontrollen dient bei jeder Membran aufgereinigtes, direkt auf die Membran aufgetragenes 5-LO-Protein (Aufreinigung: Dr. M. Hörnig). Alle verwendeten Waschpuffer enthalten 1 mM Ca²⁺. Zu Beginn waren Waschpuffer ohne Ca²⁺ verwendet worden, allerdings war selbst die bereits bekannte Bindung von PC an die 5-LO nicht nachweisbar. Da die PC-Bindung an 5-LO fast ausschließlich ein Ca²⁺-abhängiger Prozess ist, erscheint die Anwesenheit von Ca²⁺ in den Puffern eine logische Notwendigkeit. In Anwesenheit von 1 mM Ca²⁺ war es möglich, mit der bisherigen Versuchsdurchführung die Bindung von PC an 5-LO nachzuweisen. Für OAG lässt sich unter diesen Versuchsbedingungen keine Bindung zeigen. Wie bereits beschrieben, ist der aktivierende Effekt von OAG auf die 5-LO im S100 und am partiell aufgereinigten Enzym nur in Abwesenheit von Ca²⁺ zu beobachten. Möglicherweise verhindert also gerade Ca²⁺ in den Puffern die Bindung von OAG an die 5-LO. Als weitere Kontrollen wurden die Versuche

daher auch ohne Ca^{2+} in den Puffern durchgeführt, leider kann aber auch unter diesen Bedingungen keine Bindung von 5-LO an auf die Membran aufgetragenes OAG nachgewiesen werden.

Der bisher erarbeitete Assay bedarf weiterer Optimierung. Der Hintergrund der behandelten Membranen ist immer noch sehr stark. Als Lösung zum Blocken wird eine 3%igen Lösung von Fatty-acid free BSA in TBS verwendet. Möglicherweise würde ein Wechsel der verwendeten Blocking-Lösung den Hintergrund verbessern, in Frage kommen beispielsweise Casein-Lösung oder der LiCor-Blocking Puffer.

Als Alternative wurden kurzzeitig die erwähnten industriell vorgefertigten Membranen (Sphingo Strips, Molecular Probes/Invitrogen) verwendet, die allerdings keine Verbesserung brachten. Wie bereits beschrieben, wurde mittels dieser Strips die Bindung der 15-LO-1 an Phospholipide nachgewiesen. Interessanterweise konnten unter gleichen Versuchsbedingungen für die 5-LO keine reproduzierbaren Ergebnisse gefunden werden [143].

Das Auftragen der Lipidlösungen ist ebenfalls verbesserungsfähig. Denkbar wäre, die zu untersuchenden Lipide nicht direkt als Lösung, sondern als Vesikel aufzutragen. Die Vesikel könnten aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerophosphocholin (POPC) durch Ultraschall-Behandlung hergestellt werden. Möglich wäre auch der direkte Einbau steigender Mengen OAG in die Vesikel.

Zum Nachweis der Bindung zwischen OAG und 5-LO könnten die hergestellten Vesikel auch direkt mit 5-LO inkubiert werden, nach Abzentrifugation der Vesikel könnte gebundene 5-LO mittels Western-Blot analysiert werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der denkbaren Bindung von OAG an 5-LO wäre die Immobilisierung von OAG an eine Trägermatrix und die Auswertung beispielsweise über BIACORE[®] System. Für das gekoppelte OAG müsste eine Aktivitätskontrolle möglich sein, daher sollte die Immobilisierung über einen Linker/Spacer erfolgen, der gleichzeitig eine mögliche Bindung verbessern kann. Aus den bereits dargelegten und diskutierten Gründen sollte die Kopplung nicht unter Einbeziehung der Doppelbindung im Fettsäure-Rest an C1 von OAG erfolgen.

5.1.4 Interaktion zwischen OAG und regulatorischer Domäne der 5-Lipoxygenase

Im Rahmen ihrer Dissertation untersuchte Dr. A. Michel die Funktion der regulatorischen, C2-ähnlichen Domäne der 5-LO in Bezug auf die Aktivität des Gesamtproteins. Gibt man niedrige Konzentrationen ($<100 \mu\text{g/ml}$) an aufgereinigter regulatorischer Domäne als MBP-Fusionsprotein (MBP-5LO1-128) in Abwesenheit von PC zu wt 5-LO, kann eine Steigerung der 5-LO-Aktivität beobachtet werden. Da für 5-LO aus Rattenleukozyten ein aktives Dimer bekannt ist und auch für die humane 5-LO eine Dimerbildung postuliert wird, diente als Erklärung eine mögliche „Dimerbildung“ zwischen regulatorischer Domäne und 5-LO und eine damit verbundene Aktivitätssteigerung des Gesamtproteins. Durch Zugabe von PC zu den Inkubationsansätzen wird dieser Effekt unterbunden, möglicherweise wird die Interaktion der „Dimere“ aufgebrochen. Bei Zugabe höherer Mengen an MBP-5LO1-128 über $100 \mu\text{g/ml}$ wird dagegen eine Abnahme der 5-LO-Aktivität gezeigt. Die regulatorische Domäne MBP-5LO1-128 ist außerdem in der Lage, 5-HPETE zu 5-HETE zu reduzieren, die Zugabe von PC schützt die 5-HPETE teilweise vor einer Reduktion. Mit dieser Beobachtung kann die Aktivitätsabnahme des Gesamtproteins, die mit der Reduktion der 5-HPETE zu 5-HETE korreliert, bei höheren Konzentrationen an MBP-5LO1-128 erklärt werden. In einem Kompetitionsassay konnte für Hyperforin eine dosisabhängige Verminderung der Inhibition der 5-LO-Aktivität durch die Zugabe von MBP-5LO1-128 gezeigt werden [25].

Diese Erkenntnisse führten zu der Überlegung, ob OAG ebenfalls in der Lage ist, mit der aufgereinigten regulatorischen Domäne zu interagieren. Erwartet wurde, dass durch Zugabe steigender Mengen MBP-5LO1-128 der OAG-Effekt auf die 5-LO unterbunden werden kann, analog zu den berichteten Ergebnissen für Hyperforin. In Abwesenheit von PC und Ca^{2+} zeigt sich für OAG allerdings ein überraschender Effekt: bei Zugabe steigender Mengen MBP-5LO1-128 wird die Induktion durch OAG bei niedriger Substrat-Konzentration ($5 \mu\text{M AA}$) noch gesteigert. Sogar bei einer Substratkonzentration von $20 \mu\text{M AA}$, bei der am PMNL S100 und am partiell aufgereinigten 5-LO-Enzym OAG zu keiner weiteren Aktivierung der 5-LO in der Lage ist, wird ein leichter Anstieg der 5-LO-Produktmenge beobachtet. Betrachtet man den Einfluss von OAG auf das 5-HETE/5-HPETE-Verhältnis, so kann bei niedrigen Substrat-Konzentrationen ($5 \mu\text{M AA}$) und bei niedrigen Mengen ($10 \mu\text{g}$) MBP-5LO1-128 eine leichte Abnahme des 5-HETE-Anteils gefunden werden, einen ähnlichen Effekt zeigt die Zugabe von Ca^{2+} . Bei einer Substrat-Konzentration von $20 \mu\text{M AA}$ lässt sich der 5-HETE-Anteil durch OAG nur in Abwesenheit von Ca^{2+} und bei niedrigen Mengen ($10 \mu\text{g}$) MBP-5LO1-128 geringfügig mindern. Ansonsten ist unter Standardbedingungen kein Effekt von

OAG auf das 5-HETE/5-HPETE-Verhältnis zu beobachten. Gibt man MBP-5LO1-128 direkt zu käuflich erworbener 5-HPETE, wird diese durch die regulatorische Domäne zu 5-HETE reduziert, diese Reaktion ist durch OAG nicht beeinflussbar.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen sind interessant. Während für Hyperforin gezeigt wurde, dass der inhibitorische Effekt auf die 5-LO-Aktivität durch Zugabe von MBP-5LO1-128 gemindert werden kann [25], wird in Anwesenheit von OAG die 5-LO-Produktmenge durch Zugabe von regulatorischer Domäne sogar bis auf das 15-fache gesteigert (bei 100 µg/ml MBP-5-LO1-128), bezogen auf die Aktivität ohne OAG. Die Aktivitätssteigerung der wt 5-LO durch Zugabe geringer Mengen MBP-5LO1-128 wurde durch eine mögliche „Dimerisierung“ zwischen 5-LO-Gesamtzym und regulatorischer Domäne begründet [25], allerdings gestaltet sich eine Erklärung der stärkeren Aktivierung durch OAG über die postulierte Dimerbildung schwierig. Möglicherweise kann OAG die Dimerisierung in irgendeiner Art und Weise unterstützen. Alle bisherigen Untersuchungen zu OAG weisen darauf hin, dass die Interaktion über die Phospholipid-Bindungsstelle vermittelt wird. Damit widersprechen auf den ersten Blick diese Ergebnisse allerdings der aufgestellten Theorie zum Einfluss von PC auf die Aktivierung der wt 5-LO durch MBP-5LO1-128, in Anwesenheit von PC kommt es eher zu einer Hemmung der 5-LO-Produktmenge durch MBP-5LO1-128, erklärt über ein Aufbrechen der gebildeten Dimere [25]. Es ist fraglich, ob PC tatsächlich die gebildeten Dimere zerstört, während OAG über die gleiche Interaktionsstelle diese Dimerisierung sogar unterstützt. Eine Abklärung über Docking-Studien am Computermodell ist denkbar, wurde aber bisher nicht durchgeführt. Vielleicht wird aber auch durch OAG das gebildete Dimer zwischen Gesamtzym und regulatorischer Domäne aufgebrochen und der beobachtete Effekt ist alleine auf eine Interaktion zwischen OAG und 5-LO-Gesamtzym zurückzuführen. Die zum Vergleich nötige Versuchsreihe nur mit OAG ohne Zugabe regulatorischer Domäne unter diesen Versuchsbedingungen fehlt leider.

Bei höheren Konzentrationen MBP-5LO1-128 wurde auch in Abwesenheit von PC eine Hemmung der 5-LO-Aktivität des Wildtyps beobachtet, begründet mit der Reduktion der gebildeten 5-HPETE [25]. OAG steigert auch unter diesen Bedingungen die 5-LO-Produktmenge. Diese Ergebnisse lassen sich wiederum gut damit erklären, dass OAG in der Lage ist, die Affinität der 5-LO zu Hydroperoxiden zu erhöhen bzw. das Bedürfnis der 5-LO für Hydroperoxide zu senken und damit geringere Mengen an 5-HPETE zur Aktivierung der 5-LO ausreichen.

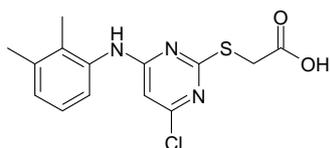
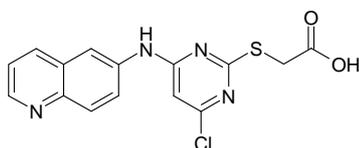
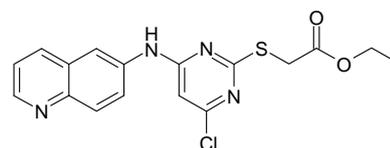
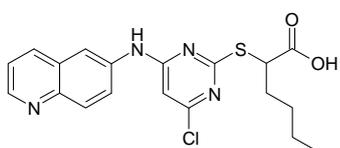
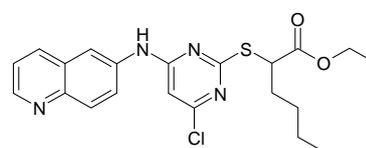
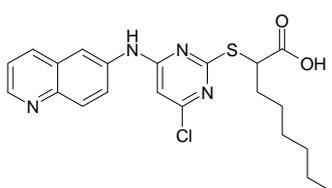
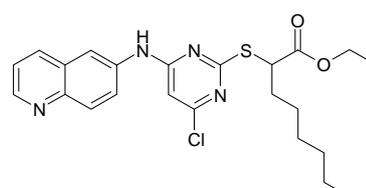
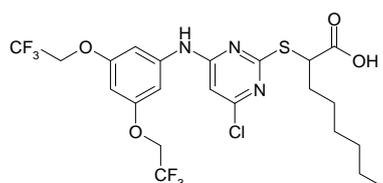
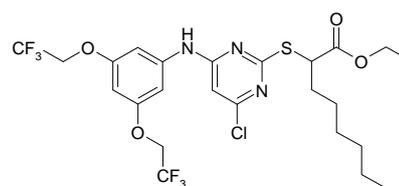
Der Einfluss von OAG auf das 5-HETE/5-HPETE-Verhältnis lässt sich nur schwer interpretieren. Die Abnahme des 5-HETE-Anteils durch OAG lässt sich nur bei sehr niedrigen Mengen (10 µg) MBP-5LO1-128 und in Abwesenheit von Ca^{2+} beobachten. Möglicherweise kann OAG bei diesen geringen Konzentrationen an MBP-5LO1-128 den Reduktionsprozess stören, damit wären diese Ergebnisse ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen OAG und MBP-5LO1-128, die nur in Abwesenheit von Ca^{2+} stattfindet. Dass OAG die Reduktion käuflich erworbener 5-HPETE durch MBP-5LO1-128 nicht beeinflussen kann (Ergebnisse nicht gezeigt), liegt somit anscheinend an den gewählten Versuchsbedingungen. Die eingesetzte Menge an MBP-5LO1-128 lag bei allen dieser Untersuchungen über 50 µg. Die Versuche an käuflich erworbener 5-HPETE müssten mit 10 µg MBP-5LO1-128 wiederholt werden, um den Einfluss von OAG auf die Reduktion der 5-HPETE zu 5-HETE genauer aufzuklären. Die Reaktion kann aber mit den bisherigen Ergebnissen als möglicher Angriffspunkt für OAG nicht ausgeschlossen werden.

5.2 Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren

5.2.1 Identifizierung von Pirinixinsäure-Derivaten als neue 5-Lipoxygenase-Inhibitoren

Ein Teil der vorgestellten Ergebnisse wurden bereits in der Publikation „Novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase product synthesis based on the structure of pirinixic acid. Werz O., Greiner C., Koeberle A., Hörnig C., George S., Popescu L., Syha I., Schubert-Zsilavec M. und Steinhilber D. (2008). *J Med Chem*, 51, 5449-5453.“ veröffentlicht und diskutiert.

Für einige der untersuchten Pirinixinsäure-Derivate konnte eine Inhibition der 5-LO in intakten PMNL-Zellen im µM-Bereich gezeigt werden, die IC_{50} -Werte der Verbindungen sind in Tabelle 4.1 im Ergebnisteil angegeben. Die unterschiedlich gute Wirksamkeit der Derivate lässt sich zum Großteil durch Betrachten der Strukturen erklären. Es ist allerdings sinnvoll, für die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Derivate auch die Ausgangssubstanz Pirinixinsäure mit einzubeziehen, deren Ergebnisse nicht im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden. In Abb. 5.2 sind die Strukturformeln der Pirinixinsäure und der im Ergebnisteil vorgestellten Derivate abgebildet.

**Pirinixinsäure****LP 114****LP 99****LP 120****LP 117****LP 121****LP 119****LP 105****LP 131****Abb. 5.2: Strukturformeln der untersuchten Pirinixinsäure-Derivate.**

Die Ausgangssubstanz Pirinixinsäure selbst ist nicht in der Lage, die 5-LO-Aktivität zu hemmen. Verestert man die freie Carboxyl-Gruppe, kann eine leichte Hemmung der 5-LO-Aktivität beobachtet werden. Ersetzt man das Dimethylanilin-Ringsystem der Pirinixinsäure durch ein 6-Aminochinolin, erhält man Substanz LP 114, die keinen Einfluss auf die 5-LO-Produktmenge nehmen kann, weder in intakten Zellen noch am partiell aufgereinigten 5-LO-

Enzym. Verestert man in LP 114 die freie Säurefunktion, erhält man LP 99. Auch hier führt die Veresterung wie schon bei Pirinixinsäure selbst zu einer Substanz, die in der Lage ist, die 5-LO-Aktivität zu hemmen.

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch α -Substitution mit Alkyl-Ketten in Pirinixinsäure eine Steigerung des PPAR-Agonismus gezeigt werden. Ein ähnlicher Einfluss konnte für die Inhibition der 5-LO-Aktivität beobachtet werden. Durch Butyl-Substitution der α -Position in Substanz LP 114 erhält man Substanz LP 120, der dazugehörige Ester ist LP 117. Eine Hexyl-Substitution führt zu Substanz LP 121 und den analogen Ester LP 119. Interessanterweise sind hier nicht nur die Ester potente 5-LO-Inhibitoren, durch die α -Substitution ist es auch den freien Säuren möglich, die 5-LO in intakten Zellen zu hemmen. Möglicherweise wird durch die eingeführte Alkylkette die Lipophilie derart erhöht, dass dann eine Membranpassage für die Substanzen möglich ist.

Paradox verhält es sich mit den beiden Derivaten LP 105 und LP 131. Sie enthalten anstelle des Dimethylanilin-Ringsystems einen substituierten Resorcin-Ring. Hier war zunächst nur die freie Säure LP 105 synthetisiert worden, die bereits einen vielversprechenden IC_{50} -Wert zeigte. Da sonst die freien Säuren häufig inaktiv waren, wurden für den korrespondierenden Ester hohe Erwartungen geweckt. Der dann verspätet synthetisierte Ester LP 131 enttäuschte allerdings hinsichtlich der 5-LO-Inhibition, an intakten Zellen zeigten sich keinerlei Effekte. Der Grund hierfür ist bisher völlig unklar.

Eine Einteilung der Substanzen in die bekannten 5-LO-Inhibitoren-Klassen ist noch nicht erfolgt. Weder redoxaktive noch Eisen-komplexierende Molekülteile sind in den Pirinixinsäure-Derivaten enthalten, möglicherweise handelt es sich um nicht-redoxaktive 5-LO-Inhibitoren. Diese benötigen allerdings reduzierende Bedingungen, was für hier vorliegenden Verbindungen ausgeschlossen werden konnte. Da sich im zellfreien System an *E. coli* eine geringere Effizienz zeigte als in intakten Zellen, ist eine Inhibition von FLAP denkbar. Für diese Annahme spricht auch, dass viele FLAP-Inhibitoren ebenfalls ein Chinolin-System innerhalb ihrer Struktur tragen. Aber auch ein direkter Einfluss auf die 5-LO-Aktivität wird nicht ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Interaktion der Pirinixinsäure-Derivate mit OAG und PC deuten darauf hin, dass diese Verbindungen direkt mit der Phospholipid-Bindungsstelle in der C2-ähnlichen Domäne interagieren können, da die Inhibition der 5-LO-Aktivität verschiedener Derivate durch die Zugabe von OAG bzw. von PC unterbunden wird.

Nach neuesten Berichten handelt es sich bei den Pirinixinsäure-Derivaten um duale Inhibitoren der 5-LO und mPGE₂-Synthase [144].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Modifikationen der Pirinixinsäure durch Austausch des Dimethylanilin-Ringsystem zu 6-Aminochinolin, Veresterung der Säurefunktion und α -Substitution mit einem Hexyl-Rest zu dem potenten 5-LO-Inhibitor LP 119 geführt haben.

5.2.2 Identifizierung neuer 5-Lipoxygenase-Inhibitoren mittels Screening virtueller Datenbanken

Die vorgestellten Ergebnisse wurden bereits in der Publikation „Identification of natural-product-derived inhibitors of 5-lipoxygenase activity by ligand-based virtual screening. Franke L., Schwarz O., Müller-Kuhrt L., Hörnig C., Fischer L., George S., Tanrikulu Y., Schneider P., Werz O., Steinhilber D. und Schneider G. (2007). *J Med Chem*, 50, 2640-2646.“ veröffentlicht und diskutiert.

Im Zuge des ersten Screening-Verfahrens wurden 18 Substanzen für Untersuchungen an der 5-LO ausgewählt. Zwei dieser Substanzen mit unterschiedlichen chemischen Grundgerüsten zeigen eine deutliche Inhibition der 5-LO-Aktivität. Für Substanz 1 wurde an intakten PMNL ein IC₅₀-Wert von 0,8 μ M ermittelt, partiell aufgereinigtes 5-LO-Enzym aus *E. coli* hemmt diese Substanz mit einem IC₅₀-Wert von \sim 1 μ M. Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Substanz um einen direkten 5-LO-Inhibitor handelt, da sie sowohl in intakten als auch am partiell aufgereinigten Enzym eine Hemmung der 5-LO zeigt. Substanz 2 hemmt an intakten PMNL die 5-LO-Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 0,9 μ M. Interessanterweise kann für diese Substanz zwar eine geringe Hemmung der Aktivität von partiell aufgereinigter 5-LO gezeigt werden, der IC₅₀-Wert liegt aber über 10 μ M. Damit wird der Einfluss von Substanz 2 auf die 5-LO-Produktbildung wohl nicht über eine direkte Interaktion zwischen Substanz und 5-LO vermittelt, die Beeinflussung der 5-LO erfolgt eher über andere Mechanismen wie beispielsweise Translokation, Phosphorylierung oder Lipid-Bindung, die in intakten Zellen eine Rolle bei der Aktivierung der 5-LO spielen. Auch eine Interaktion mit FLAP ist denkbar.

Sowohl Substanz 1 als auch Substanz 2 stammen aus der gleichen virtuellen Datenbank (AnalytiCon Discovery NAT-5). Im zweiten Screening-Verfahren wurde daher diese Datenbank mit erweiterten Parametern erneut durchsucht. 17 analoge Verbindungen zu Substanz 1 bzw. Substanz 2 wurden für Untersuchungen an der 5-LO ausgewählt. Die Substanzen 3 – 10 sind strukturell mit Substanz 2 verwandt, die Substanzen 11-19 ähneln in ihrer Struktur der Substanz 1. An intakten PMNL hemmt keine der ausgewählten Verbindungen besser als die beiden Ausgangssubstanzen. Im Vergleich zu Substanz 1 zeigen die strukturellen Verwandten 11-19 eine geringere Effektivität als ihre Ausgangsverbindung, alle hemmen bei einer Konzentration von 1 μM am partiell aufgereinigten Enzym die 5-LO-Aktivität besser als an intakten Zellen, sie scheinen aber demnach direkte 5-LO-Inhibitoren zu sein.

Für die Substanzen 3-10 liegen die IC_{50} -Werte für die Hemmung der 5-LO aus intakten Zellen unter 10 μM , analog zu ihrer Ausgangsverbindung Substanz 2 kann am partiell aufgereinigten Enzym nur eine schwache Hemmung der 5-LO-Aktivität beobachtet werden. Damit scheinen auch diese Verbindungen in intakten Zellen die 5-LO-Produktbildung über andere Aktivierungswege zu beeinflussen, direkte 5-LO-Inhibitoren sind sie jedoch nicht. Allein die Substanzen 9 und 10 erreichen auch am partiell aufgereinigten Enzym IC_{50} -Werte von ~ 1 μM .

In dieser zweiten Screening-Runde wurden weitere Substanzen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit manuell ausgewählt. Dabei konnte für zwei dieser Substanzen (54 und 55) ein IC_{50} von ~ 1 μM ermittelt werden.

Um ein mögliches Pharmakophor innerhalb der Substanzen zu ermitteln, wurden einige Strukturformeln verglichen. Betrachtet man in Abb. 5.3 die Substanzen 1 sowie 53-55, weisen alle Strukturen das aromatische Ringsystem mit gleicher Position der Ether-Gruppe auf. Substanz 1 und 54 tragen einen unsubstituierten Heterozyklus. Dagegen ist bei Substanz 53 der Thiophen-Rest über eine weiteres C-Atom mit dem Amin verbunden, dies führt zu einem Anstieg des IC_{50} -Wertes. Als Ether-Gruppe scheint der Propoxy-Rest von Vorteil zu sein, ein Austausch gegen eine Methoxy-Gruppe wie bei Substanz 18 führt zum Wirkverlust. An dieser Position wird im Molekül anscheinend ein raumfüllender, lipophiler Rest benötigt, um eine potente Hemmung der 5-LO zu gewährleisten. Tragen die Substanzen wie 15 und 17 in dieser Position allerdings eine Dimethylamin-Gruppe, geht der inhibitorische Effekt auf die 5-LO in intakten Zellen vollständig verloren, obwohl am partiell aufgereinigten Enzym eine effiziente

Hemmung der 5-LO-Produktbildung beobachtet wird. Der Grund hierfür könnte eine gehinderte Membranpassage in die intakten Zellen sein.

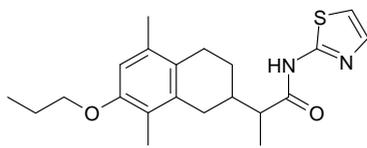
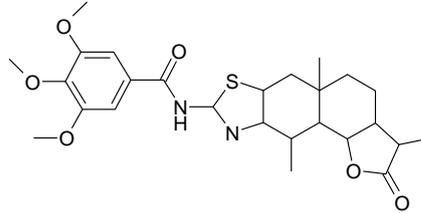
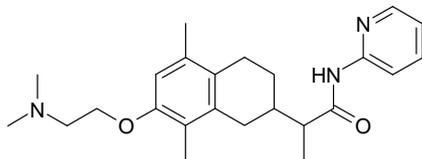
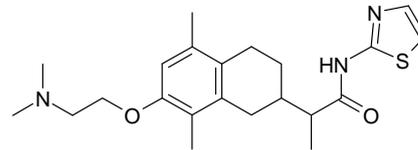
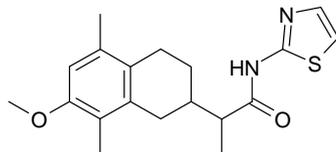
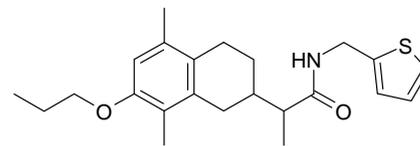
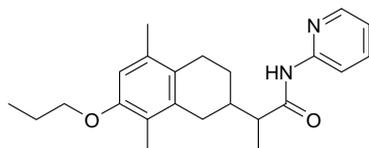
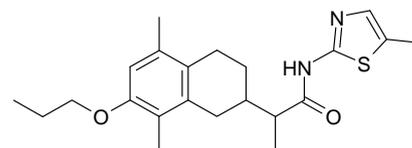
**1****2****15****17****18****53****54****55**

Abb. 5.3: Strukturformeln ausgewählter Substanzen.

Eine Zuteilung zu einer bestimmten Klasse von 5-LO-Inhibitoren ist derzeit nicht möglich. Die Moleküle enthalten keine Strukturen, die das Eisen der 5-LO komplexieren könnten, auch redoxaktive Strukturen fehlen. Eine Zuordnung zu den nicht-redoxaktiven Inhibitoren fällt ebenfalls schwer, da ihre Effizienz normalerweise vom Redoxstatus der Zelle abhängig sind. Für Substanz 1 und 2 ist der Effekt dagegen unabhängig vom Redoxstatus der Zelle, dies zeigen Untersuchungen in Gegenwart von reduzierenden Thiolen und GPx.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass basierend auf Strukturen bereits bekannter 5-LO-Inhibitoren durch systematisches Durchsuchen der virtuellen Datenbanken eine neue Strukturklasse gefunden wurde, die sowohl an intakten Zellen wie auch am partiell aufgereinigten Enzym die 5-LO-Aktivität hemmt.

6 Zusammenfassung

5-Lipoxygenase katalysiert die ersten beiden Schritte in der Biosynthese der Leukotriene, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen spielen und an Reaktionen des Immunsystems beteiligt sind. Die 5-LO-Aktivität wird durch verschiedene Faktoren wie Ca^{2+} , ATP, Phospholipide und den zellulären Redoxstatus beeinflusst, ihre Regulation ist sehr komplex. Die 5-LO besteht aus einer katalytischen und einer N-terminalen, C2-ähnlichen β -Barrel Domäne. Die katalytische Domäne enthält im aktiven Zentrum ein prosthetisches Eisen, welches im inaktiven Zustand in der zweiwertigen Fe^{2+} -Form vorliegt, durch Oxidation zur Fe^{3+} -Form wird das Enzym aktiv. Die C2-ähnliche Domäne bindet Ca^{2+} und PC und ist für die Membranbindung der 5-LO verantwortlich, Ca^{2+} scheint dabei das Bedürfnis der 5-LO für aktivierende Hydroperoxide zu reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der 5-LO durch das Diacylglycerid OAG untersucht. Bekannt war die Stimulation der Agonist-induzierten 5-LO-Aktivität in intakten Zellen durch OAG, die nicht auf den bekannten Aktivierungswegen wie Translokation, Phosphorylierung oder Ca^{2+} -Mobilisierung beruht. Hier kann nun die direkte Aktivierung des 5-LO-Enzyms durch OAG *in vitro* gezeigt werden. Untersucht man den Einfluss von OAG auf die 5-LO-Aktivität unter optimalen Assaybedingungen in Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} , lässt sich weder an Homogenat, S100 noch am partiell aufgereinigten Enzym aus PMNL ein Effekt beobachten. Entfernt man dagegen Ca^{2+} aus den Versuchsansätzen, induziert OAG bei Substratkonzentrationen unter 20 μM AA die 5-LO-Aktivität im S100 und am partiell aufgereinigten Enzym bereits ab einer eingesetzten Konzentration von 0,3 μM , der maximale Effekt mit einer Aktivitätssteigerung um das 8- bzw. 14-fache wird bei 30 μM OAG beobachtet. Auch andere Di(acyl)glyceride wie DOG, OG und EAG aktivieren konzentrationsabhängig die 5-LO, allerdings in geringerem Ausmaß. SAG war nicht zu einer Stimulation der 5-LO-Aktivität fähig.

OAG stabilisiert die 5-LO-Aktivität vor der Hemmung durch die Glutathionperoxidase (GPx), dies vermögen ebenfalls die Di(acyl)glyceride OG, DOG, EAG und in geringem Ausmaß auch SAG.

Damit ähnelt der Einfluss von OAG auf die 5-LO in zwei Punkten dem bereits bekannten Effekt von Ca^{2+} : es ist in der Lage, vor allem bei niedrigen Substratkonzentrationen die 5-LO-Produktmenge direkt zu erhöhen und kann die 5-LO-Aktivität gegen den inhibitorischen Effekt der Glutathionperoxidase (GPx) stabilisieren. Ähnlich wie Ca^{2+} scheint OAG die

Affinität der 5-LO für das Substrat AA zu erhöhen und das Bedürfnis für aktivierende Hydroperoxide zu erniedrigen. Durch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kann eine Beteiligung der Ca^{2+} -Bindungsstelle an der Interaktion zwischen 5-LO und OAG ausgeschlossen werden, da OAG auch an der loop2 mut-5LO die Aktivität zu steigern vermag.

Der Anstieg der 5-LO-Produktbildung durch OAG in S100 und am partiell aufgereinigten 5-LO-Enzym lässt sich durch die Zugabe von PC und anderen Phospholipiden unterbinden. Damit erklärt sich gleichzeitig, weshalb OAG am Homogenat aus PMNL keine Effekte zeigt, da hier noch Zellmembran-Bestandteile enthalten sind. Der OAG-Effekt wird wohl über die drei Tryptophan-Reste Trp-13,-75 und -102 der Phospholipid-Bindungsstelle auf der C2-ähnlichen Domäne der 5-LO vermittelt. Dies zeigen auch Untersuchungen an der 3W mut-5LO, bei der die drei Tryptophan-Reste zu Alanin-Resten mutiert sind. Die Aktivität dieser Mutante lässt sich durch OAG unter den bereits beschriebenen Versuchsbedingungen nicht steigern. Ein weiterer Hinweis auf die Phospholipid-Bindungsstelle ist die Interaktion zwischen OAG und dem 5-LO-Inhibitor Hyperforin. Hyperforin selbst hemmt die 5-LO über diese Bindungsstelle, durch OAG wird der IC_{50} -Wert von Hyperforin deutlich erhöht.

Ein direkter Nachweis der Bindung zwischen OAG und 5-LO ist bisher nicht gelungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Ausarbeitung eines entsprechenden Assays begonnen, aber bisher konnte mittels des sogenannten Lipid Protein Overlay Assay für 5-LO keine Bindung an OAG nachgewiesen werden.

OAG ist nicht in der Lage, die Aktivität des 5-LO-Enzyms aus serumfrei kultivierten MM6-Zellen, BL41-E95-A Zellen und transfizierten HeLa-Zellen zu steigern, auch die Produktmenge der Sojabohnen-Lipoxygenase kann nicht durch OAG beeinflusst werden.

Untersucht man die Interaktion von OAG mit aufgereinigter regulatorischer Domäne (MBP-Fusionsprotein, MBP-5LO1-128), so zeigt sich eine weitere Steigerung der durch OAG-induzierten 5-LO-Aktivität. Obwohl MBP-5LO1-128 bei höheren Konzentrationen eine Hemmung der 5-LO-Aktivität des Wildtyps durch Reduktion der gebildeten 5-HPETE verursacht, steigert OAG auch unter diesen Bedingungen die 5-LO-Produktmenge. Diese Ergebnisse lassen sich wiederum gut damit erklären, dass OAG das Bedürfnis der 5-LO für Hydroperoxide senkt und damit geringere Mengen an 5-HPETE zur Aktivierung der 5-LO ausreichen. Betrachtet man das 5-HETE/5-HPETE-Verhältnis, führt die Zugabe OAG in Abwesenheit von Ca^{2+} und bei 10 μg MBP-5LO1-128 zu einer geringen Abnahme des 5-HETE-Anteils.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neue 5-LO-Inhibitoren identifiziert. Aus der Reihe der Pirinixinsäure-Derivate konnte durch entsprechende Modifikationen der potente 5-LO-Inhibitor LP 119 mit einem IC_{50} -Wert von 0,6 μ M in intakten PMNL-Zellen identifiziert werden.

Durch systematisches Durchsuchen virtueller Datenbanken basierend auf Strukturen bereits bekannter 5-LO-Inhibitoren konnten mindestens zwei Substanzen gefunden werden, die sowohl an intakten Zellen wie auch am partiell aufgereinigten Enzym die 5-LO-Aktivität hemmen. Beide Substanzen entstammen der Datenbank AnalytiCon Discovery NAT-5. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich wohl zumindest bei einer Strukturklasse um einen direkten 5-LO-Inhibitor handelt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kuhn, H. (2000) Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62, 255-270.
- [2] Brash, A. R. (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274, 23679-23682.
- [3] Ford-Hutchinson, A. W., Gresser, M., and Young, R. N. (1994) 5-Lipoxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 383-417
- [4] Theorell, H., Holman, R. T., and Akeson, A. (1947) Crystalline Lipoxydase. *Acta Chemica Scandinavica* 1, 571-576
- [5] Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 3400-3404
- [6] Borgeat, P., Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1976) Transformation of arachidonic acid and homo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem* 251, 7816-7820
- [7] Kuhn, H., and Thiele, B. J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 449, 7-11.
- [8] Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., and Browner, M. F. (1997) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* 4, 1003-1009.
- [9] Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., and Samuelsson, B. (2007) 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 32, 332-341
- [10] Hammarberg, T., Provost, P., Persson, B., and Radmark, O. (2000) The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 275, 38787-38793
- [11] Chen, X. S., and Funk, C. D. (2001) The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 276, 811-818.
- [12] Kulkarni, S., Das, S., Funk, C. D., Murray, D., and Cho, W. (2002) Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 277, 13167-13174

- [13] Hammarberg, T., Zhang, Y. Y., Lind, B., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1995) Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 230, 401-407
- [14] Zhang, Y. Y., Lind, B., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1993) Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues. *J. Biol. Chem.* 268, 2535-2541
- [15] Hammarberg, T., Kuprin, S., Radmark, O., and Holmgren, A. (2001) EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide. *Biochemistry* 40, 6371-6378.
- [16] Zhang, Y. Y., Hammarberg, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., Ng, C. F., Funk, C. D., and Loscalzo, J. (2000) Analysis of a nucleotide-binding site of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences. *Biochem J.* 351 Pt 3, 697-707
- [17] Okamoto, H., Hammarberg, T., Zhang, Y. Y., Persson, B., Watanabe, T., Samuelsson, B., and Rådmark, O. (2005) Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: support for a stabilizing C-terminal loop. *Biochim. Biophys. Acta* 1749, 123-131
- [18] Allard, J. B., and Brock, T. G. (2005) Structural organization of the regulatory domain of human 5-lipoxygenase. *Curr Protein Pept Sci* 6, 125-131
- [19] Lepley, R. A., and Fitzpatrick, F. A. (1994) 5-lipoxygenase contains a functional Src homology 3- binding motif that interacts with the Src homology 3 domain of Grb2 and cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 24163-24168
- [20] Chen, X. S., Zhang, Y. Y., and Funk, C. D. (1998) Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins. *J Biol Chem* 273, 31237-31244.
- [21] Healy, A. M., Peters-Golden, M., Yao, J. P., and Brock, T. G. (1999) Identification of a bipartite nuclear localization sequence necessary for nuclear import of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 274, 29812-29818
- [22] Jones, S. M., Luo, M., Healy, A. M., Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2002) Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein. *J. Biol. Chem.* 277, 38550-38556
- [23] Jones, S. M., Luo, M., Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2003) Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein. *J. Biol. Chem.* 278, 10257-10263

- [24] Maccarrone, M., Salucci, M. L., van Zadelhoff, G., Malatesta, F., Veldink, G., Vliegthart, J. F., and Finazzi-Agro, A. (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* 40, 6819-6827
- [25] Michel, A. (2008) Die regulatorische Domäne der 5-Lipoxygenase: Expression, Aufreinigung und funktionelle Untersuchungen. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.*
- [26] Funk, C. D., Hoshiko, S., Matsumoto, T., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1989) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2587-2591
- [27] Hoshiko, S., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1990) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9073-9077
- [28] Silverman, E. S., Du, J., De Sanctis, G. T., Rådmark, O., Samuelsson, B., Drazen, J. M., and Collins, T. (1998) Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19, 316-323
- [29] In, K. H., Asano, K., Beier, D., Grobholz, J., Finn, P. W., Silverman, E. K., Silverman, E. S., Collins, T., Fischer, A. R., Keith, T. P., Serino, K., Kim, S. W., De Sanctis, G. T., Yandava, C., Pillari, A., Rubin, P., Kemp, J., Israel, E., Busse, W., Ledford, D., Murray, J. J., Segal, A., Tinkleman, D., and Drazen, J. M. (1997) Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J. Clin. Invest.* 99, 1130-1137.
- [30] Steinhilber, D. (1994) 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Acta Helv.* 69, 3-14
- [31] Spanbroek, R., Stark, H. J., Janßen-Timmen, U., Kraft, S., Hildner, M., Andl, T., Bosch, F. X., Fusenig, N. E., Bieber, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., and Habenicht, A. J. R. (1998) 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 663-668
- [32] Janssen-Timmen, U., Vickers, P. J., Wittig, U., Lehmann, W. D., Stark, H. J., Fusenig, N. E., Rosenbach, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., and Habenicht, A. J. R. (1995) Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6966-6970

- [33] Brungs, M., Rådmark, O., Samuelsson, B., and Steinhilber, D. (1994) On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D₃, retinoic acid, DMSO and TGFβ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1572-1580
- [34] Brungs, M., Radmark, O., Samuelsson, B., and Steinhilber, D. (1995) Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 107-111.
- [35] Sorg, B. L., Klan, N., Seuter, S., Dishart, D., Rådmark, O., Habenicht, A., Carlberg, C., Werz, O., and Steinhilber, D. (2006) Analysis of the 5-lipoxygenase promoter and characterization of a vitamin D receptor binding site. *Biochim Biophys Acta* 1761, 686-697
- [36] Seuter, S., Vaisanen, S., Radmark, O., Carlberg, C., and Steinhilber, D. (2007) Functional characterization of vitamin D responding regions in the human 5-Lipoxygenase gene. *Biochim Biophys Acta* 1771, 864-872. Epub 2007 Apr 2019.
- [37] Uhl, J., Klan, N., Rose, M., Entian, K. D., Werz, O., and Steinhilber, D. (2002) The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 277, 4374-4379
- [38] Klan, N., Seuter, S., Schnur, N., Jung, M., and Steinhilber, D. (2003) Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity. *Biol. Chem.* 384, 777-785
- [39] Schnur, N., Seuter, S., Katryniok, C., Radmark, O., and Steinhilber, D. (2007) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. *Biochim Biophys Acta* 1771, 1271-1282
- [40] Corey, E., and Landburry, J. (1983) Stereochemical course of 5-Lipoxygenation by rat basophil leukemic cell (RBL-1) and potato enzymes. *J Am Chem Soc* 105, 4093-4094
- [41] Shimizu, T., Izumi, T., Seyama, Y., Tadokoro, K., Radmark, O., and Samuelsson, B. (1986) Characterization of leukotriene A₄ synthase from murine mast cells: evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4175-4179.
- [42] Samuelsson, B. (1983) Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220, 568-575

- [43] Werz, O. (2004) 5-lipoxygenase: Regulation and pharmacology. *Med. Chem. Rev.* 1, 201-223
- [44] Hanaka, H., Shimizu, T., and Izumi, T. (2002) Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. *Biochem J* 361, 505-514
- [45] Peters-Golden, M., and McNish, R. W. (1993) Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 147-153.
- [46] Woods, J. W., Evans, J. F., Ethier, D., Scott, S., Vickers, P. J., Hearn, L., Heibin, J. A., Charleson, S., and Singer, II. (1993) 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* 178, 1935-1946
- [47] Pouliot, M., McDonald, P. P., Krump, E., Mancini, J. A., McColl, S. R., Weech, P. K., and Borgeat, P. (1996) Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem* 238, 250-258
- [48] Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2003) 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69, 99-109
- [49] Mancini, J. A., Abramovitz, M., Cox, M. E., Wong, E., Charleson, S., Perrier, H., Wang, Z. Y., Prasit, P., and Vickers, P. J. (1993) 5-Lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.* 318, 277-281
- [50] Abramovitz, M., Wong, E., Cox, M. E., Richardson, C. D., Li, C., and Vickers, P. J. (1993) 5-Lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 215, 105-111
- [51] Werz, O. (2002) 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 23-44.
- [52] Rouzer, C. A., and Samuelsson, B. (1987) Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7393-7397.
- [53] Rouzer, C. A., and Kargman, S. (1988) Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 263, 10980-10988.

- [54] Werz, O., Klemm, J., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2000) 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5261-5266
- [55] Werz, O., Bürkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., Rådmark, O., and Steinhilber, D. (2002) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J.* 16, 1441-1443.
- [56] Pergola, C., Dodt, G., Rossi, A., Neunhoeffer, E., Lawrenz, B., Northoff, H., Samuelsson, B., Radmark, O., Sautebin, L., and Werz, O. (2008) ERK-mediated regulation of leukotriene biosynthesis by androgens: a molecular basis for gender differences in inflammation and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19881-19886
- [57] Luo, M., Jones, S. M., Phare, S. M., Coffey, M. J., Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2004) Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J. Biol. Chem.* 279, 41512-41520
- [58] Provost, P., Samuelsson, B., and Rådmark, O. (1999) Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1881-1885
- [59] Provost, P., Doucet, J., Hammarberg, T., Gerisch, G., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2001) 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem* 276, 16520-16527
- [60] Riendeau, D., Denis, D., Choo, L. Y., and Nathaniel, D. J. (1989) Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation. *Biochem. J.* 263, 565-572
- [61] Rouzer, C. A., and Samuelsson, B. (1986) The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. *FEBS Lett.* 204, 293-296
- [62] Hatzelmann, A., and Ullrich, V. (1987) Regulation of 5-lipoxygenase activity by the glutathione status in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Biochem.* 169, 175-184
- [63] Arthur, J. R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 57, 1825-1835
- [64] Straif, D., Werz, O., Kellner, R., Bahr, U., and Steinhilber, D. (2000) Glutathione peroxidase-1 but not 4 is involved in the regulation of cellular 5-lipoxygenase activity in monocytic cells. *Biochem. J.* 349, 455-461

- [65] Bürkert, E., Arnold, C., Hammarberg, T., Radmark, O., Steinhilber, D., and Werz, O. (2003) The C2-like beta-barrel domain mediates the Ca²⁺-dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem* 278, 42846-42853
- [66] Werz, O., Tretiakova, I., Michel, A., Ulke-Lemee, A., Hörnig, M., Franke, L., Schneider, G., Samuelsson, B., Rådmark, O., and Steinhilber, D. (2005) Caspase-mediated degradation of human 5-lipoxygenase in B lymphocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13164-13169
- [67] Hammarberg, T., and Radmark, O. (1999) 5-lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry* 38, 4441-4447
- [68] Schatz-Munding, M., Hatzelmann, A., and Ullrich, V. (1991) The involvement of extracellular calcium in the formation of 5-lipoxygenase metabolites by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Biochem.* 197, 487-493
- [69] Noguchi, M., Miyano, M., Matsumoto, T., and Noma, M. (1994) Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA₄ synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* 1215, 300-306
- [70] Kulkarni, S., Das, S., Funk, C. D., Murray, D., and Cho, W. (2002) Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 277, 13167-13174. Epub 12002 Jan 13116.
- [71] Bindu, P. H., Sastry, G. M., and Sastry, G. N. (2004) Characterization of calcium and magnesium binding domains of human 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 461-467
- [72] Reddy, K. V., Hammarberg, T., and Radmark, O. (2000) Mg²⁺ activates 5-lipoxygenase in vitro: dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid. *Biochemistry* 39, 1840-1848
- [73] Ochi, K., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Taniguchi, K., and Miyamoto, T. (1983) Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate. *J Biol Chem* 258, 5754-5758
- [74] Denis, D., Falgoutyret, J. P., Riendeau, D., and Abramovitz, M. (1991) Characterization of the activity of purified recombinant human 5-lipoxygenase in the absence and presence of leukocyte factors. *J. Biol. Chem.* 266, 5072-5079
- [75] Rouzer, C. A., and Samuelsson, B. (1985) On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: Enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6040-6044

- [76] Puustinen, T., Scheffer, M. M., and Samuelsson, B. (1988) Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar calcium levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 960, 261-267
- [77] Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2006) Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13150-13155
- [78] Haeggstrom, J. Z., Kull, F., Rudberg, P. C., Tholander, F., and Thunnissen, M. M. (2002) Leukotriene A4 hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 495-510
- [79] Samuelsson, B., Dahlén, S.-E., Lindgren, J.-Å., Rouzer, C. A., and Serhan, C. N. (1987) Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237, 1171-1176
- [80] Dahlén, S. E., Hedqvist, P., Hammarström, S., and Samuelsson, B. (1980) Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 288, 484-486
- [81] Marom, Z., Shelhamer, J. H., Bach, M. K., Morton, D. R., and Kaliner, M. (1982) Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 126, 449-451
- [82] Claesson, H. E., and Dahlen, S. E. (1999) Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J. Intern. Med.* 245, 205-227
- [83] Avis, I., Hong, S. H., Martinez, A., Moody, T., Choi, Y. H., Trepel, J., Das, R., Jett, M., and Mulshine, J. L. (2001) Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 15, 2007-2009
- [84] Romano, M., Catalano, A., Nutini, M., D'Urbano, E., Crescenzi, C., Claria, J., Libner, R., Davi, G., and Procopio, A. (2001) 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J* 15, 2326-2336
- [85] Yoshimura, R., Matsuyama, M., Tsuchida, K., Kawahito, Y., Sano, H., and Nakatani, T. (2003) Expression of lipoxygenase in human bladder carcinoma and growth inhibition by its inhibitors. *J Urol* 170, 1994-1999
- [86] Powell, W. S., Gravel, S., and Halwani, F. (1999) 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of L-selectin shedding, surface expression of CD11b, actin polymerization, and calcium mobilization in human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 163-170

- [87] Chen, X. S., Sheller, J. R., Johnson, E. N., and Funk, C. D. (1994) Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 372, 179-182
- [88] Irvin, C. G., Tu, Y. P., Sheller, J. R., and Funk, C. D. (1997) 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am. J. Physiol.* 16, L1053-L1058
- [89] Peters-Golden, M., Bailie, M., Marshall, T., Wilke, C., Phan, S. H., Toews, G. B., and Moore, B. B. (2002) Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 229-235
- [90] Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- [91] Samuelsson, B., Morgenstern, R., and Jakobsson, P. J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 59, 207-224
- [92] Leff, J. A., Busse, W. W., Pearlman, D., Bronsky, E. A., Kemp, J., Hendeles, L., Dockhorn, R., Kundu, S., Zhang, J., Seidenberg, B. C., and Reiss, T. F. (1998) Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med* 339, 147-152
- [93] Tateson, J. E., Randall, R. W., Reynolds, C. H., Jackson, W. P., Bhattacharjee, P., Salmon, J. A., and Garland, L. G. (1988) Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex vivo. *Br J Pharmacol* 94, 528-539
- [94] Drazen, J. M. (1999) Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 547-559
- [95] Weinblatt, M. E., Kremer, J. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S., Maier, A. L., Petrillo, G., Henson, B., Rubin, P., and Sperling, R. (1992) Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19, 1537-1541
- [96] Lambert-van der Brempt, C., Bruneau, P., Lamorlette, M. A., and Foster, S. J. (1994) Conformational analysis of 5-lipoxygenase inhibitors: role of the substituents in chiral recognition and on the active conformations of the (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran series. *J Med Chem* 37, 113-124.
- [97] Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M. I., Subramanian, L. R., and Ammon, H. P. T. (1992) Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1143-1146

- [98] Sailer, E.-R., Schweizer, S., Boden, S. E., Ammon, H. P. T., and Safayhi, H. (1998) Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur. J. Biochem.* 256, 364-368
- [99] Siemoneit, U., Pergola, C., Jazzar, B., Northoff, H., Skarke, C., Jauch, J., and Werz, O. (2009) On the interference of boswellic acids with 5-lipoxygenase: mechanistic studies in vitro and pharmacological relevance. *Eur J Pharmacol* 606, 246-254
- [100] Albert, D., Zundorf, I., Dingermann, T., Muller, W. E., Steinhilber, D., and Werz, O. (2002) Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 64, 1767-1775.
- [101] Feisst, C., Pergola, C., Rakonjac, M., Rossi, A., Koeberle, A., Dodt, G., Hoffmann, M., Hoernig, C., Fischer, L., Steinhilber, D., Franke, L., Schneider, G., Radmark, O., Sautebin, L., and Werz, O. (2009) Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell Mol Life Sci* 66, 2759-2771
- [102] Feisst, C., Franke, L., Appendino, G., and Werz, O. (2005) Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 389-396
- [103] Rossi, A., Di Paola, R., Mazzon, E., Genovese, T., Caminiti, R., Bramanti, P., Pergola, C., Koeberle, A., Werz, O., Sautebin, L., and Cuzzocrea, S. (2009) Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 76-86
- [104] Maier, T. J., Tausch, L., Hoernig, M., Coste, O., Schmidt, R., Angioni, C., Metzner, J., Groesch, S., Pergola, C., Steinhilber, D., Werz, O., and Geisslinger, G. (2008) Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 76, 862-872
- [105] Koeberle, A., Northoff, H., and Werz, O. (2009) Identification of 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as functional targets of the anti-inflammatory and anti-carcinogenic garcinol. *Biochem Pharmacol* 77, 1513-1521
- [106] Hurley, J. H., and Misra, S. (2000) Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 49-79.
- [107] Perisic, O., Fong, S., Lynch, D. E., Bycroft, M., and Williams, R. L. (1998) Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 273, 1596-1604.

- [108] Rizo, J., and Sudhof, T. C. (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273, 15879-15882.
- [109] Michel, A. A., Steinhilber, D., and Werz, O. (2008) Development of a method for expression and purification of the regulatory C2-like domain of human 5-lipoxygenase. *Protein Expr Purif* 59, 110-116
- [110] Carrasco, S., and Merida, I. (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* 32, 27-36
- [111] Albert, D., Pergola, C., Koeberle, A., Dodt, G., Steinhilber, D., and Werz, O. (2008) The role of diacylglyceride generation by phospholipase D and phosphatidic acid phosphatase in the activation of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 83, 1019-1027
- [112] Wakelam, M. J. (1998) Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta* 1436, 117-126
- [113] Goto, K., Hozumi, Y., Nakano, T., Saino-Saito, S., and Martelli, A. M. (2008) Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective. *Tohoku J Exp Med* 214, 199-212
- [114] Yang, C., and Kazanietz, M. G. (2003) Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends Pharmacol Sci* 24, 602-608
- [115] Brose, N., Betz, A., and Wegmeyer, H. (2004) Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr Opin Neurobiol* 14, 328-340
- [116] Newton, A. C. (2009) Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* 50 Suppl, S266-271
- [117] Bauldry, S. A., Wykle, R. L., and Bass, D. A. (1988) Phospholipase A2 activation in human neutrophils. Differential actions of diacylglycerols and alkylacylglycerols in priming cells for stimulation by N-formyl-Met-Leu-Phe. *J Biol Chem* 263, 16787-16795
- [118] Bauldry, S. A., Wykle, R. L., and Bass, D. A. (1991) Differential actions of diacyl- and alkylacylglycerols in priming phospholipase A2, 5-lipoxygenase and acetyltransferase activation in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1084, 178-184

- [119] Bass, D. A., McPhail, L. C., Schmitt, J. D., Morris-Natschke, S., McCall, C. E., and Wykle, R. L. (1988) Selective priming of rate and duration of the respiratory burst of neutrophils by 1,2-diacyl and 1-O-alkyl-2-acyl diglycerides. Possible relation to effects on protein kinase C. *J Biol Chem* 263, 19610-19617
- [120] Albert, D., Buerkert, E., Steinhilber, D., and Werz, O. (2003) Induction of 5-lipoxygenase activation in polymorphonuclear leukocytes by 1-oleoyl-2-acetyl glycerol. *Biochim Biophys Acta* 1631, 85-93.
- [121] Albert, D. (2005) Zur Modulation der 5-Lipoxygenaseaktivität durch 1-Oleoyl-2-Acetyl glycerol und Hyperforin. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.*
- [122] Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmuller, G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 41, 456-461.
- [123] Steinhilber, D., Radmark, O., and Samuelsson, B. (1993) Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5984-5988.
- [124] Härle, D., Radmark, O., Samuelsson, B., and Steinhilber, D. (1998) Calcitriol and transforming growth factor-beta upregulate 5-lipoxygenase mRNA expression by increasing gene transcription and mRNA maturation. *Eur J Biochem* 254, 275-281.
- [125] Avila-Carino, J., Torsteinsdottir, S., Ehlin-Henriksson, B., Lenoir, G., Klein, G., Klein, E., and Masucci, M. G. (1987) Paired Epstein-Barr virus (EBV)-negative and EBV-converted Burkitt lymphoma lines: stimulatory capacity in allogeneic mixed lymphocyte cultures. *Int J Cancer* 40, 691-697.
- [126] Jakobsson, P. J., Odlander, B., Steinhilber, D., Rosen, A., and Claesson, H. E. (1991) Human B lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B4. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 302-308.
- [127] Jakobsson, P. J., Steinhilber, D., Odlander, B., Radmark, O., Claesson, H. E., and Samuelsson, B. (1992) On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3521-3525.
- [128] Werz, O., Burkert, E., Samuelsson, B., Radmark, O., and Steinhilber, D. (2002) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99, 1044-1052.

- [129] Zhang, Y. Y., Radmark, O., and Samuelsson, B. (1992) Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 485-489.
- [130] Werz, O., and Steinhilber, D. (1996) Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells. *Eur J Biochem* 242, 90-97.
- [131] Wendel, A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77, 325-333.
- [132] Rau, O. (2007) Screening pflanzlicher Extrakte auf Aktivierung des humanen Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors und seiner Subtypen. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.*
- [133] Franke, L., Schwarz, O., Muller-Kuhrt, L., Hoernig, C., Fischer, L., George, S., Tanrikulu, Y., Schneider, P., Werz, O., Steinhilber, D., and Schneider, G. (2007) Identification of natural-product-derived inhibitors of 5-lipoxygenase activity by ligand-based virtual screening. *J Med Chem* 50, 2640-2646. Epub 2007 Apr 2627.
- [134] Pande, A. H., Moe, D., Nemeč, K. N., Qin, S., Tan, S., and Tatulian, S. A. (2004) Modulation of human 5-lipoxygenase activity by membrane lipids. *Biochemistry* 43, 14653-14666
- [135] Bürkert, E. (2003) Concerted Action of Phosphorylation, Lipid Hydroperoxides and Calcium in 5-Lipoxygenase Activation. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a.M.*
- [136] Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. (1991) Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5149-5153
- [137] Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* 255, 2273-2276
- [138] Leslie, C. C., and Channon, J. Y. (1990) Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. *Biochim Biophys Acta* 1045, 261-270
- [139] Bürkert, E., Radmark, O., Steinhilber, D., and Werz, O. (2002) Monocyte-derived soluble protein confers 5-lipoxygenase activity Ca²⁺-dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 985-991.

- [140] Tatulian, S. A., Steczko, J., and Minor, W. (1998) Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 37, 15481-15490
- [141] Pettus, B. J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D. S., Maceyka, M., Leslie, C. C., Evans, J. H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y. A., and Chalfant, C. E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 279, 11320-11326
- [142] Dowler, S., Currie, R. A., Campbell, D. G., Deak, M., Kular, G., Downes, C. P., and Alessi, D. R. (2000) Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J* 351, 19-31
- [143] Andersson, E., Schain, F., Svedling, M., Claesson, H. E., and Forsell, P. K. (2006) Interaction of human 15-lipoxygenase-1 with phosphatidylinositol bisphosphates results in increased enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1498-1505
- [144] Koeberle, A., Zettl, H., Greiner, C., Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M., and Werz, O. (2008) Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* 51, 8068-8076

8 Publikationsliste

Bürkert E., Arnold C., Hammarberg T., Rådmark O., Steinhilber D. und Werz O. (2003). The C2-like β -barrel domain mediates the Ca^{2+} -dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem*, 278, 42846-42853.

Hörnig C., Albert D., Fischer L., Hörnig M., Rådmark O., Steinhilber D. und Werz O. (2005). 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain. *J Biol Chem*, 280, 26913-26921.

Franke L., Schwarz O., Müller-Kuhrt L., Hörnig C., Fischer L., George S., Tanrikulu Y., Schneider P., Werz O., Steinhilber D. und Schneider G. (2007). Identification of natural-product-derived inhibitors of 5-lipoxygenase activity by ligand-based virtual screening. *J Med Chem*, 50, 2640-2646.

Pöckel D., Greiner C., Verhoff M., Rau O., Tausch L., Hörnig C., Steinhilber D., Schubert-Zsilavecz M. und Werz O. (2008). Carnosic acid and carnosol potently inhibit 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol*, 76, 91-97.

Wertz O., Greiner C., Koeberle A., Hörnig C., George S., Popescu L., Syha I., Schubert-Zsilavecz M. und Steinhilber D. (2008). Novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase product synthesis based on the structure of pirinixic acid. *J Med Chem*, 51, 5449-5453.

Feisst, C., Pergola, C., Rakonjac, M., Rossi, A., Koeberle, A., Dodt, G., Hoffmann, M., Hoernig, C., Fischer, L., Steinhilber, D., Franke, L., Schneider, G., Radmark, O., Sautebin, L., und Werz, O. (2009). Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell Mol Life Sci* 66, 2759-2771.

Koeberle, A., Rossi, A., Zettl, H., Pergola, C., Dehm, F., Bauer, J., Greiner, C., Reckel, S., Hoernig, C., Northoff, H., Bernhard, F., Doetsch, V., Sautebin, L., Schubert-Zsilavec, M., und Werz, O. (2009). The molecular pharmacology and in vivo activity of YS121 {2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio)octanoic acid}, a dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther*, Nov 24.

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an...

...meinen Doktorvater Prof. Dr. Dieter Steinhilber für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, für hilfreiche Anregungen und Diskussionen, aber auch für die Geduld und das Verständnis für manches Problem einer „promovierenden Mama“.

...meinen Betreuer Prof. Dr. Oliver Werz für die Einarbeitung in das Thema, die Unterstützung und das jederzeitige Interesse an Daten und Ergebnissen, für fachliche Diskussionen, aber auch für private Gespräche. Die Frage „Und – gibt’s was Neues?“ werde ich nie wieder vergessen.

...Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec und Prof. Dr. G. Schneider für die Möglichkeit, an Arbeitskreis-übergreifenden Projekten mitwirken zu können.

...Carina Bereiter, Michael Ermisch, Dr. Beate Firla, Dr. Careen Katryniok, Dr. Michael Hörnig, Dr. Marika Hoffmann und Dr. Lars Tausch für die gemeinsame Zeit und gegenseitige Unterstützung bei Problemen im Rahmen der Betreuung der Studierenden im Praktikum des 8. Semesters.

...Frau Dr. S. Ueberall und den ehemaligen Assistenten und Technikern im Arzneibuch-Praktikum für die kollegiale Zusammenarbeit.

...Dr. Dana Albert, Rolf Becht, Carina Bereiter, Astrid Brüggerhoff, Dr. Nadine Corvey, Anna Engin, Michael Ermisch, Dr. Christian Feißt, Dr. Beate Firla, Dr. Lutz Fischer, Sven George, Ann-Kathrin Häfner, Dr. Marika Hoffmann, Dr. Careen Katryniok, Sabine Lindner, Dr. Angela Michel, Uwe Mölter, Dr. Daniel Pöckel, Laura Popescu, Bernd Rosenmeyer, Dr. Irina Schlags, Dr. Nicole Schnur, Dr. Sabine Seuter, Dr. Bernd Sorg, Dr. Kirsten Stoffers, Dr. Lars Tausch und Brigitte Welter für gemeinsame Arbeits- und auch Freizeit-Stunden, die angenehme Zusammenarbeit im Laboralltag und so manches nette Beisammensein, sowie an alle weiteren ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter der Pharmazeutischen Chemie für die freundliche Aufnahme und Kollegialität.

...Sven George, ohne den doch einige Versuche zum Ende der Arbeit hin unvollendet geblieben wären und für viel Spaß selbst am tristesten Labortag.

...Dr. Angela Michel in „Down Under“, für zahlreiche fachliche Diskussionen, aber auch ihre unnachahmliche Art und ihre manchmal andere Sichtweise des Lebens.

...Dr. Irina Schlags für das gemeinsame Durchstehen der gesamten Studien- und Promotionszeit, den gegenseitigen Ansporn und die nette WG-Zeit in Wien.

...meine Eltern und besonders an meine Großeltern, durch die das Studium in der großen fremden Stadt Frankfurt zur Realität wurde.

...meine beiden Familien, die immer daran geglaubt haben, dass ich diese Arbeit beenden werde und durch zahlreiche Kinder-Betreuungsstunden dies überhaupt ermöglicht haben.

...meinen Mann Dr. Michael Hörnig. Ohne ihn hätte ich die Promotion zuerst wahrscheinlich nicht begonnen und zuletzt möglicherweise nicht beendet. Nur gemeinsam konnten wir den nicht alltäglichen, manchmal holprigen Weg mit den Geburten unserer beiden Kinder Lara und Felix während der Promotionszeit gehen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Christina Hörnig geb. Arnold
geboren 02.07.1975 in Frankenthal/Pfalz
verheiratet, zwei Kinder
deutsche Staatsbürgerschaft

Hochschulausbildung und beruflicher Werdegang

01/03 – 03/09	Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität, wissenschaftliche Mitarbeiterin
	Studentenausbildung des 8. Semesters Pharmazie (Arzneimittelanalytik, Therapeutischem Drug Monitoring, toxikologische und umwelt-relevanten Untersuchungen)
	09/06-11/07 Mutterschutz und Elternzeit
seit 04/03	Tätigkeit als Apothekerin in der Viktoria-Apotheke, Frankfurt am Main
01/03	Approbation als Apothekerin
12/02	Dritter Prüfungsabschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
05/02 – 11/02	Zweites Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin am Pharmazeutischen Institut für Chemie, Universität in Wien
11/01 – 04/02	Erstes Halbjahr der praktischen Ausbildung zur Apothekerin in der Schweizer Apotheke, Frankfurt/Main
10/01	Abschluss des Studiums mit dem Zweitem Prüfungsabschnitt der pharmazeutischen Ausbildung
09/99 – 09/01	Tätigkeit als Pharmazeutisch-Technische Assistentin in der Schweizer Apotheke, Frankfurt am Main

1997 – 2001 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt innerhalb von 8 Semestern

03/97-07/97 Tätigkeit als Pharmazeutisch-Technische Assistentin in der Ring-
Apotheke, Frankenthal/Pfalz

Berufs- und Schulausbildung

1994 – 1997 Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen Assistentin am PTA-
Berufskolleg der Heinrich-Lanz-Schule II, Mannheim und in der Ring-
Apotheke, Frankenthal/Pfalz

1985-1994 Karolinen-Gymnasium, Frankenthal/Pfalz, Abitur

1981-1985 Grundschule, Frankenthal/Pfalz

Akademische Lehrer

Prof. Dr. H. Blume

Prof. Dr. Th. Dingermann

Prof. Dr. J. Dressman

Prof. Dr. E. Ehlers

Prof. Dr. J. Kreuter

Prof. Dr. G. Lambrecht

Prof. Dr. W. E. Müller

Prof. Dr. C. R. Noe

Prof. Dr. G. Schneider

Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec

Prof. Dr. H. Stark

Prof. Dr. D. Steinhilber

Prof. Dr. O. Werz