

1 Einleitung

1.1 Die Arachidonsäurekaskade

Die Aufklärung der Arachidonsäure-Kaskade geht in das Jahr 1913 zurück, als Battezz und Poulet [1] erstmals die blutdrucksenkende Wirkung eines frischen Extraktes aus menschlicher Prostata zeigten. In den 30er Jahren wird durch von Euler [2][3] für den von ihm und Goldblatt [4] unabhängig voneinander entdeckten lipidartigen Faktor der Samenflüssigkeit, der für die Blutdrucksenkung verantwortlich gemacht werden konnte, der Name Prostaglandin eingeführt. Die weitere Aufklärung des Cyclooxygenasewegs erfolgt hauptsächlich durch die Arbeitsgruppe um Bergström [5][6] in den 60er Jahren.

In den 70er Jahren erfolgt die Entdeckung des Lipoxygenasewegs durch Hamberg und Samuelsson [7][8] und die Strukturaufklärung der Leukotriene (LT) durch die Gruppe um Samuelsson 1979 [9].

Arachidonsäure (AA) ist die, mit einem Anteil von 10-40 %, häufigste C₂₀-Polyenfettsäure in den Phospholipiden von Säugetieren.

Im Säugerorganismus wird AA zum einen über die Nahrung aufgenommen und ist damit essentiell, zum anderen wird sie durch Elongation und Desaturierung aus der ebenfalls essentiellen Linolsäure gewonnen. Dieser Prozess findet nur in bestimmten Zellen statt, so z.B. in der Leber.

Die wichtigste physiologische Funktion der Phospholipide ist der Aufbau von Biomembranen. Durch die Veresterung in Position *sn*-2 der Phospholipide verfügt jede Zelle über einen eigenen AA-Pool.

Die freien Konzentrationen von Polyenfettsäuren sind im Normalfall sehr niedrig. Auf einen Stimulus hin kann AA jedoch sofort aus ihrem Speicher freigesetzt werden. Das Schlüsselenzym für diese Freisetzung stellt die Phospholipase A₂ (PLA₂) dar, welche die Phospholipide in der *sn*-2-Position spaltet. Solche Stimuli, wie z. B. Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Bradykinin, Calmodulin, Angiotensin II und

Thrombin führen zur Aktivierung der, normalerweise in inaktiver Form vorliegenden, PLA₂. Des weiteren ist eine AA-Freisetzung durch das gemeinsame Agieren von Phospholipase C (PLC), einer Diacylglycerol-Lipase und einer α-Monoacylglycerol-Lipase möglich.

Die nun freigesetzte AA ist das wichtigste Substrat für die Synthese von biologischen Mediatoren, die aufgrund ihrer C₂₀-Kohlenstoffkette traditionell Eicosanoide (IUPAC: Icosansäuren) genannt werden. Die wesentlichen an der enzymatischen Oxygenierung beteiligten Enzyme sind die Dioxygenasen Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und -2) sowie 5-, 12- und 15-Lipoxygenase (LO) (Abb. 1.1).

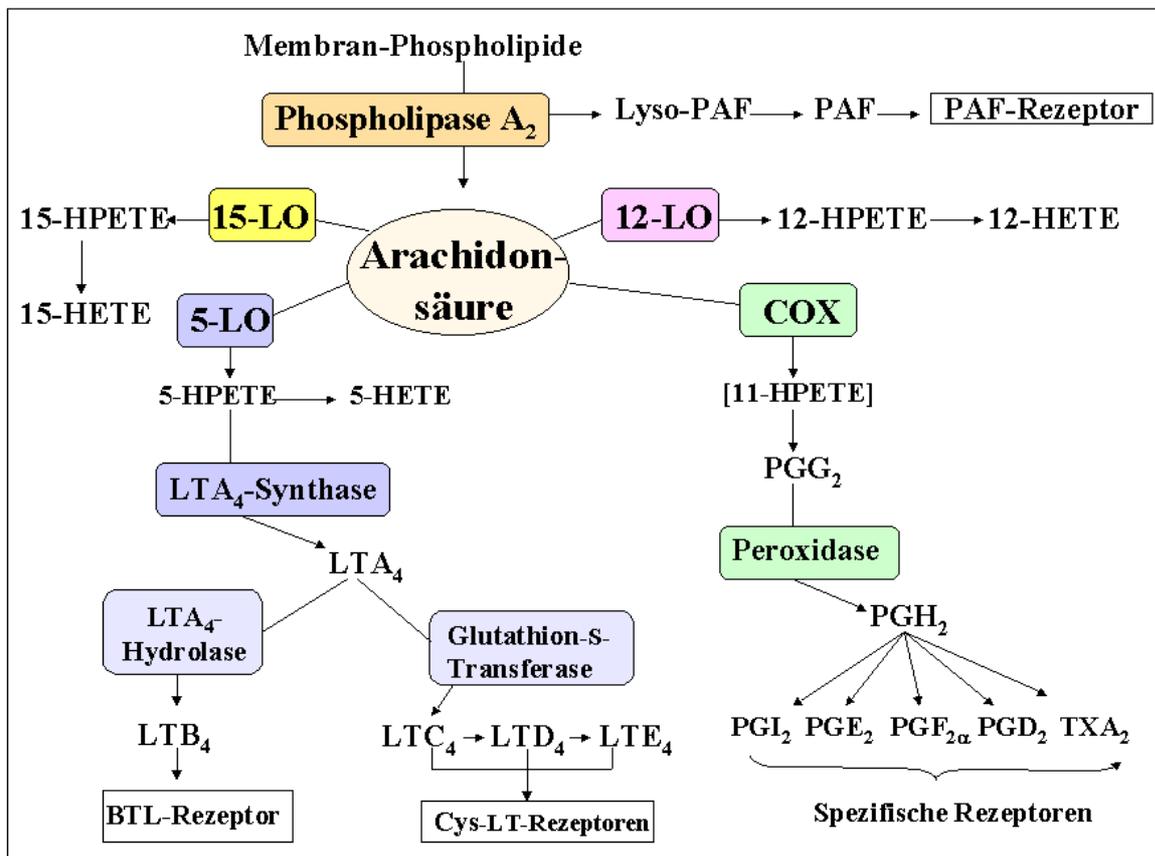


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Arachidonsäurekaskade.

1.2 Phospholipase A₂

1.2.1 Biologische und biochemische Grundlagen

Die Phospholipase A₂ (PLA₂) wurde in den 60er Jahren zunächst aus Schlangengift isoliert. Bis heute wurden zahlreiche Vertreter dieser Enzymsuperfamilie beschrieben, welche insbesondere in Säugerorganismen weit verbreitet sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei diversen Zellvorgängen wie z.B. Signaltransduktion und Phospholipidremodeling. Außerdem liefern sie Vorstufen für die Generierung von biologisch aktiven Metaboliten wie den Eicosanoiden und dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF).

Da die Überproduktion dieser Lipidmediatoren verschiedene Krankheiten und Gewebestörungen verursacht, ist es wichtig die Mechanismen zu verstehen, welche die Funktionen der PLA₂ regulieren.

Anhand ihrer Strukturen, enzymatischen Eigenschaften, Zellverteilung und Funktionen werden sie in verschiedene Gruppen eingeteilt: sekretorische PLA₂ (sPLA₂), cytosolische PLA₂ (cPLA₂), Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂) und PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) (Abb. 1.2).

<u>Gruppe</u>	<u>Quelle</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Größe (kDa)</u>	<u>Ca²⁺-Bedarf</u>
I A	Kobra	sekretorisch	13-15	mM
I B	Pankreas (Mensch, Schwein)	sekretorisch	13-15	mM
II A	Klapperschlange, Viper, humane Thrombozyten und Synovialflüssigkeit	sekretorisch	13-15	mM
II B	Garboonviper	sekretorisch	13-15	mM
II C	Testis (Ratte, Maus)	sekretorisch	15	mM
III	Biene, Eidechse	sekretorisch	16-18	mM
IV	Rattenniere, humane U937 und Thrombozyten	cytosolisch	85	< μM

<u>Gruppe</u>	<u>Quelle</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Größe (kDa)</u>	<u>Ca²⁺-Bedarf</u>
V	Herz, Lunge, P388D ₁ Makrophagen (Mensch, Ratte, Maus)	sekretorisch	14	mM
VI	P388D ₁ Makrophagen, CHO- Zellen	cytosolisch	80-85	-
VII	Humanes Plasma	sekretorisch	45	-
VIII	Rinderhirn	cytosolisch	29	-
IX	Meeresschnecke	sekretorisch	14	< mM

Abb. 1.2: Einteilung der PLA₂ in ihre Hauptgruppen [10].

1.2.2 sPLA₂

Die humane sPLA₂ wird in weitere Untergruppen unterteilt: IB, IIA, IIC, IID [11], IIE [12], IIF und V. Ihnen gemeinsam sind folgende Strukturmerkmale [13]:

- Ein α -helikaler N-Terminal mit lipophilen Resten in Position 2, 5 und 9
- Eine Ca²⁺-bindende Schleife mit einer typischen, glycerinreichen Sequenz bei Tyr²⁵-Pro³⁷ und Asp⁴⁹
- His⁴⁸, Tyr⁵², Tyr⁷³ und Asp⁹⁹ im Bereich des aktiven Zentrums
- 12-16 Cysteinreste, welche meist in denselben Positionen auftreten.

In ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden sie sich von anderen Serinesterasen wie z. B. cPLA₂, iPLA₂ und PAF-AH. Sie bilden kein klassisches Acyl-Enzym-Intermediat (**Abb. 1.3**) sondern benutzen das His⁴⁸ des aktiven Zentrums unter Zuhilfenahme von Asp⁴⁹ um das durch Koordination gebundene Wasser stärker zu polarisieren. Das koordinierte Wasser greift dann die Carbonylgruppe an. Das essentielle Ca²⁺, welches sich in der Ca²⁺-Bindungsschleife befindet, stabilisiert diesen Übergangszustand [14].

sPLA₂ unterscheiden dabei nicht zwischen den unterschiedlichen in *sn*-2 Position gebundenen Fettsäuren (FS), sind aber spezialisiert auf polarisierte Kopfgruppen [15][16].

Bei Verwendung von Phospholipidvesikeln bevorzugen sPLA₂ anionische Phospholipide wie Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) gegenüber ladungsneutralem Phosphatidylcholin (PC). Eine optimale Enzymreaktion findet unter neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen (pH~7-9) in Gegenwart millimolarer Ca²⁺-Konzentrationen statt.

Die wichtigste Bedeutung bei Entzündungsreaktionen kommt der sPLA₂-IIA zu. Sie wurde Ende der 80er Jahre aus Entzündungsexsudaten und Thrombozyten isoliert [17][18]. Sie wird als Vorstufe synthetisiert und während der Translokation von der cytosolischen zur luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das reife Enzym umgewandelt. Konstitutiv kommt sPLA₂-IIA in der Milz, im Thymus, in der Leber und im Knochenmark vor [16] sowie in Entzündungszellen wie Thrombozyten, Neutrophilen, Makrophagen und Mastzellen [17]. In den Entzündungszellen wird sPLA₂-IIA in Granula gespeichert und nach Zellaktivierung sofort in den Extrazellularraum abgegeben.

Des Weiteren ist die sPLA₂ auch induzierbar und wird auf verschiedene Zellstimuli hin synthetisiert. Zu diesen gehören bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Cytokine (IL-1, TNF_α, IL-6) und cAMP-erhöhende Stoffe. In induzierbarer Form kommt sie in Knorpelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Astrozyten, renalen Mesangiumzellen, Endothelzellen, Mastzellen, Makrophagen und Fibroblasten vor. Nach einer initialen lag-Phase von mehreren Stunden kommt es zu einem Anstieg an sPLA₂-IIA-Aktivität, welche begleitet ist durch einen Anstieg der PG-Produktion.

1.2.3 sPLA₂-Rezeptoren

Einige Studien weisen darauf hin, dass die pharmakologischen Eigenschaften der Schlangengift-sPLA₂ nicht unbedingt mit ihrer katalytischen Aktivität gekoppelt sein müssen [19]. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Effekte über spezifische, hochaffine Rezeptoren vermittelt werden, welche sich auf der Oberfläche der Zielzelle befinden. Es konnten zwei verschiedene sPLA₂-Rezeptoren identifiziert werden: der N- und der M-Typ-Rezeptor.

Für den M-Typ-Rezeptor, ein 180 kDa-Protein, konnte eine hohe Bindungsaffinität von Säugerphospholipasen (sPLA₂-IB und sPLA₂-IIA) gezeigt werden. Die Bindung erfolgt

über eine Carbohydrat-Erkennungsdomäne (CRD), die in der Nähe der Ca^{2+} -Schleife der sPLA₂ angreift. Durch die Rezeptorbindung werden verschiedene biologische Effekte vermittelt. Darunter befinden sich Zellproliferation, Zellmigration, Kontraktion und Eicosanoidgenerierung.

Eine lösliche Form des M-Typ-Rezeptors, welchem die transmembranäre Domäne fehlt, hemmt die sPLA₂-IIA-Aktivität und scheint als natürlicher sPLA₂-Hemmer zu fungieren. Der Rezeptor hat zudem gemeinsame Merkmale mit dem Surfactantprotein A, welches in der Lunge spezifisch die sPLA₂-IIA hemmt.

1.2.4 iPLA₂

Es gibt verschiedene Formen der intrazellulären iPLA₂, welche in Zellen und Geweben weit verbreitet sind und denen dieselben Funktionen und Lokalisationen innerhalb der unterschiedlichen Zellen zuzukommen scheint [20]. Den iPLA₂ kommt eine bedeutende Rolle beim Membranremodeling zu. Über ihre genauen Strukturen, ihre Regulierung und detaillierte Funktionen ist bis heute allerdings nur wenig bekannt.

Von den sPLA₂ und cPLA₂ unterscheiden sie sich durch ihre völlige Ca^{2+} -Unabhängigkeit. Nach ihrer Zelllokalisierung lassen sie sich in drei weitere Kategorien einteilen:

- lysosomale iPLA₂
- Membranaußenseiten-iPLA₂
- intrazelluläre iPLA₂ (cytosolisch oder membranär)

Ihre molekularen Massen variieren zwischen 28-80 kDa, was ihre Vielfalt nochmals unterstreicht. Der katalytische Mechanismus wird als identisch mit dem der cPLA₂ angenommen (**Abb. 1.3**).

1.2.5 cPLA₂

Die cPLA₂ zeigt keine Sequenzhomologie zu den sPLA₂. Ihre Molekülmasse ist mit 85 kDa deutlich höher als die der sPLA₂. Ihre Aminosäuresequenz beinhaltet einen Abschnitt mit 45 Resten in der N-terminalen Region, welche Homologien zu den Ca²⁺-abhängigen Formen der Proteinkinase C (PKC) und anderen Ca²⁺-abhängigen membranbindenden Proteinen aufweist. Sie ist weit verbreitet und kommt in den meisten Zelltypen konstitutiv vor. Ihre Expression wird durch IL-1, TNF und Thrombin induziert, für die Bindungsstellen in der Promoterregion ausgemacht werden konnten, und kann durch Glucocorticoide unterdrückt werden.

Ihre Bedeutung ist eng verknüpft mit ihrer zentralen Rolle für die Generierung von PG und LT. Sie dient außerdem als second messenger in TNF- und IL-1-Signalwegen und ist dabei auch an durch TNF ausgelösten cytotoxischen Effekten beteiligt [21]. Eine weitere wichtige Rolle kommt ihr bei der Plättchenaktivierung zu. Thrombin aktiviert hierbei die cPLA₂ und es kommt nachfolgend zur Produktion von Thromboxan A₂, welches eine zentrale Bedeutung bei hämostatischen und thrombotischen Ereignissen hat [22]. Des Weiteren weist vieles darauf hin, dass die cPLA₂ an der Zellproliferation beteiligt ist, da sie durch verschiedene Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, TGF_α) aktiviert werden kann.

Im Vergleich mit den sPLA₂ zeigt die cPLA₂ Selektivität gegenüber Arachidonylphospholipiden [23] und PC [24][25]. Die Verknüpfung der *sn*-1 Position ist dagegen unbedeutend. Es wurden keine Unterschiede zwischen Acyl-, Vinylether- und Alkyletherverbindungen ermittelt [26]. Gleichzeitig benötigt die cPLA₂ kein Ca²⁺ für ihre Aktivität. Ca²⁺-Spiegel spielen jedoch eine bedeutende Rolle für die Membranbindung. Diese wird durch die Ca²⁺-abhängige Lipid-Bindungs-Domäne (CaLB) [26] im N-Terminal vermittelt. Als Antwort auf einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wandert die cPLA₂ vom Cytosol zu intrazellulären Membranen, hauptsächlich der Kernmembran und der Membran des ER [27][28].

Die Hydrolyse der Membranphospholipide erfolgt nach dem für Serinesterasen typischen Mechanismus (**Abb. 1.3**): Ein einzelnes Phospholipidmolekül bindet an das aktive Zentrum der cPLA₂ und das Ser²²⁸ greift dann die *sn*-2 Fettsäure an. Das entstandene Acyl-Enzym-Intermediat wird dann durch Wasser hydrolysiert und das Enzym kann an das nächste Phospholipid binden oder von der Membran abdissoziieren.

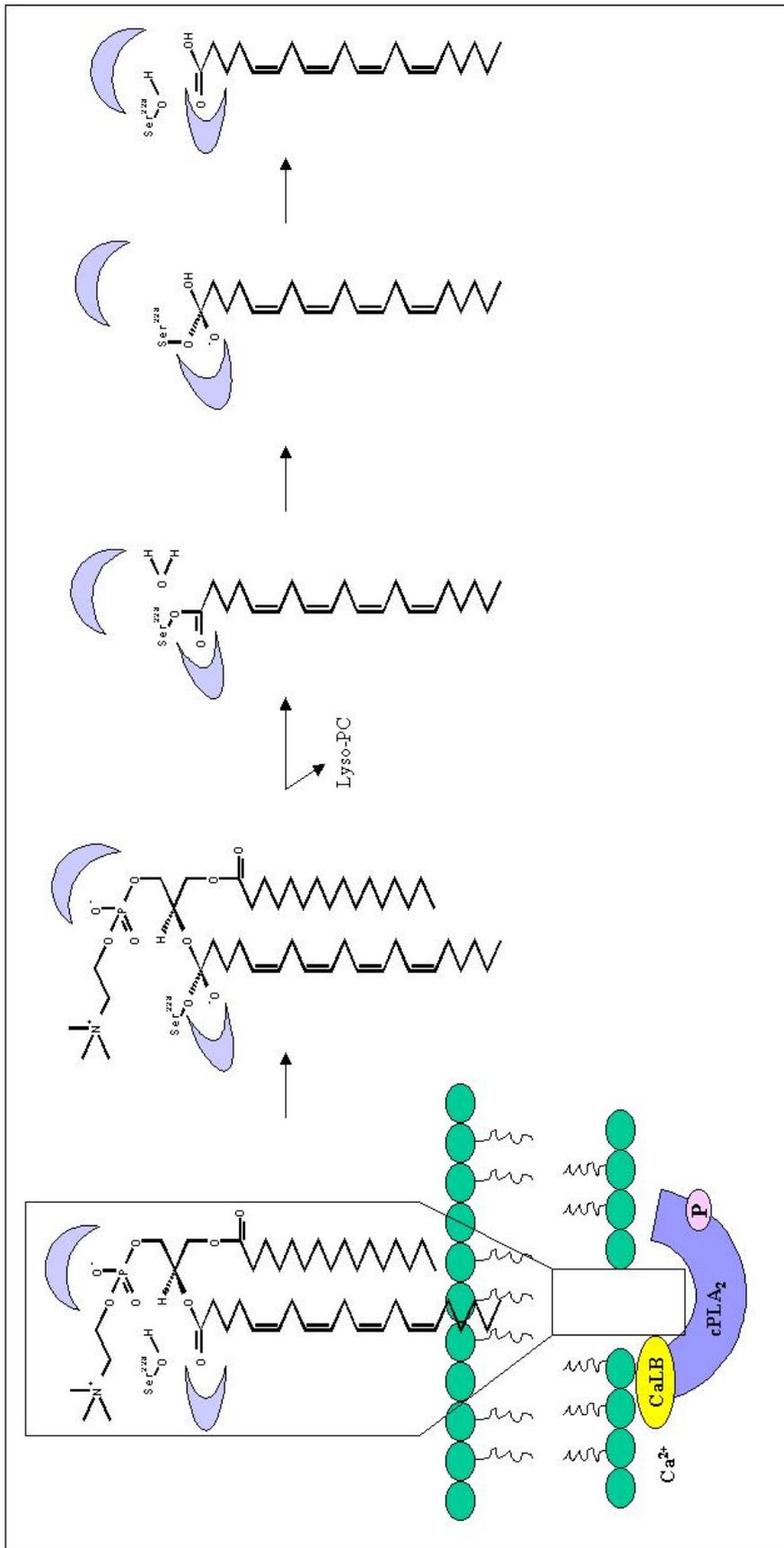


Abb. 1.3: Katalytischer Mechanismus der cPLA₂.

1.2.6 Hemmstoffe der cPLA₂

Da die cPLA₂-Expression mit einer erhöhten Eicosanoidsynthese verbunden ist, ist diese ein attraktives Target für neue anti-inflammatorische Substanzen. Der Vorteil liegt in der Hemmung der gesamten AA-Kaskade, durch die man sich eine erhöhte therapeutische Wirkung verspricht. Ihre Beteiligung an neurodegenerativen Erkrankungen eröffnet zusätzliche Therapieoptionen für die cPLA₂-Inhibitoren.

Aktiviert Ketone und Methylphosphonate:

Einer der ersten beschriebenen Hemmstoffe der cPLA₂ war das Trifluormethyl-Derivat (AACOCF₃) der AA (**Abb. 1.4**). Es hemmt die cPLA₂ mit einem IC₅₀ von 2 µM bzw. 11 µM in mit Calciumionophor A23187 stimulierten Thrombozyten. Allerdings zeigt es bereits im Bereich des IC₅₀ cytotoxische Effekte. Weniger cytotoxisch bei gleicher Wirksamkeit sind die Linol- und Linolensäurederivate.

Methylarachidonylfluorophosphonat (MAFP, **Abb. 1.4**) ist ein irreversibler cPLA₂-Hemmer mit IC₅₀-Werten von 0.6 µM bzw. 7 µM. Auch hier liegen die cytotoxischen Effekte nahe den IC₅₀-Werten.

Beide Substanzklassen stellen unselektive Hemmstoffe der cPLA₂ dar, da sie ebenfalls die iPLA₂-Aktivität beeinflussen.

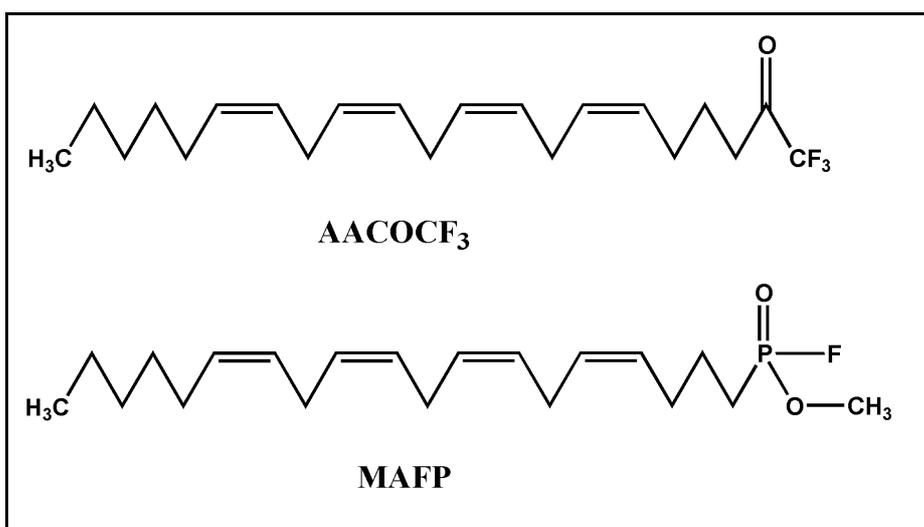


Abb. 1.4: Aktiviert Ketone und Methylphosphonate als Hemmstoffe der cPLA₂.

Naturstoffe:

12-*epi*-Scalaradial (**Abb. 1.5**), welches aus einem Schwamm gewonnen werden konnte, hemmt sowohl isolierte cPLA₂ (IC₅₀ = 28 µM) als auch rekombinante humane sPLA₂ (IC₅₀ = 5.4 µM).

Die marinen Sesquiterpene Manoalid und Luffariellolid sind potente Hemmstoffe verschiedener sPLA₂. Die cPLA₂ hemmen sie nicht, sondern sie scheinen sie vielmehr zu stimulieren.

Thielocin B3 (**Abb. 1.5**), ein Pilzprodukt, hemmt die cPLA₂ in Rattenthrombozyten mit einem IC₅₀ von 10 µM.

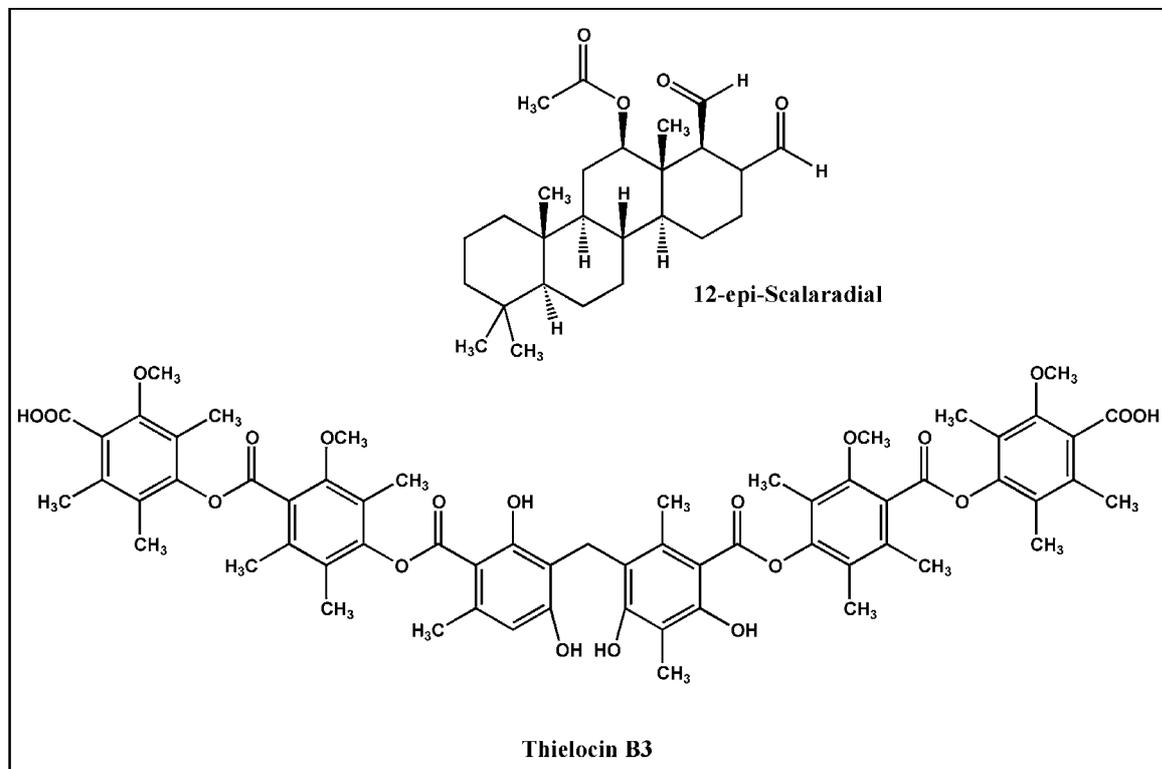


Abb. 1.5: Naturstoffe als Inhibitoren der cPLA₂.

Carbonsäurederivate:

ML-3116 und ML-3176 der Firma Merckle (**Abb. 1.6**) stellen Indol-2-carbonsäurederivate dar, welche die cPLA₂ in Rinderthrombozyten mit einem IC₅₀ von 1.6 µM hemmen. Topische *in vivo* Tests mit ML-3116 im Rattepfotenödem-Experiment führen zu einer Ödemreduktion von 82 % im Vergleich zur Kontrolle. ML-3176 wurde *in vivo* als

Inhalation verabreicht und verhinderte vollständig die hyperreaktive Reaktion auf inhalatives Carbachol.

Auch andere Firmen konnten Indolderivate mit ähnlichen *in vitro* und *in vivo* Aktivitäten entwickeln.

Carbonsäurederivate der 1,3-Bis-aryloxypropanone wurden zur Behandlung von Morbus Alzheimer entwickelt. Am isolierten Enzym zeigten sie eine deutlich höhere Hemmaktivität (AR-C73346XX: $IC_{50} = 0.08 \mu\text{M}$, **Abb. 1.6**) als AACOCF₃, ebenso in einem zellbasierten Assay mit HL60-Zellen ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{M}$). *In vivo* Daten liegen für diese Verbindungen nicht vor.

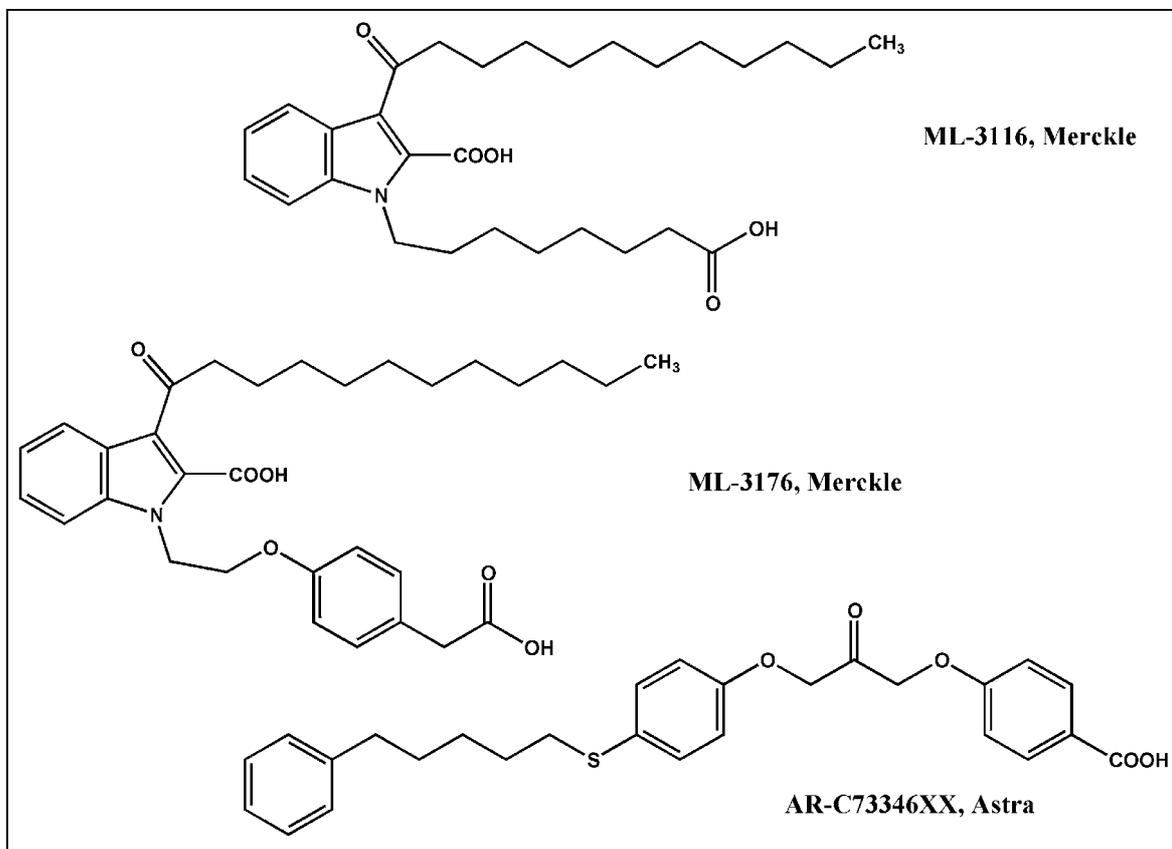


Abb. 1.6: Carbonsäurederivate als Hemmstoffe der cPLA₂.

Thiazolidindione:

Der Firma Shiongi gelang die Entwicklung der bislang potentesten cPLA₂-Inhibitoren vom Thiazolidindion-Typ, welche IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich besitzen (2.1 nM bzw. 2.2 nM) (**Abb. 1.7**).

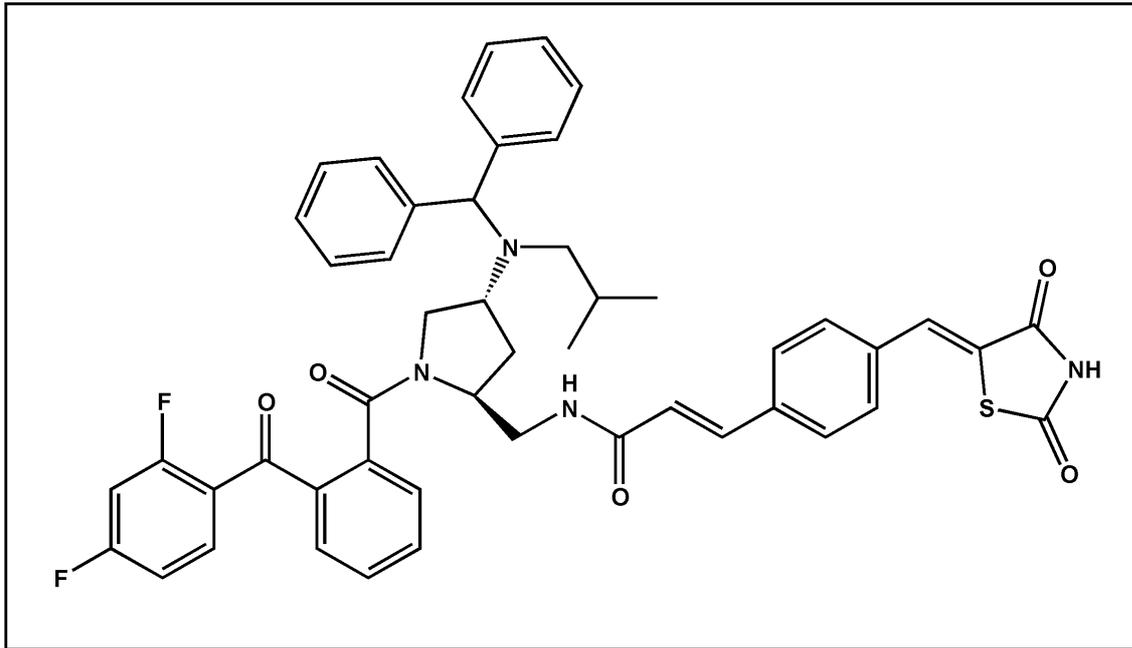


Abb. 1.7: Thiazolidindione als Hemmstoffe der cPLA₂.

1.2.7 PAF

PAF (1-*O*-Alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) wurde von Henson [29] als löslicher Faktor entdeckt, welcher, aus Leukozyten freigesetzt, zur Plättchenaggregation führt.

1-*O*-Alkyl-2-acylglycerophosphocholin, eine Vorstufe von PAF, wurde in hohen Konzentrationen in den Membranen vieler Zelltypen gefunden [30][31]. Diese Vorstufe wird durch aktivierte cPLA₂ in die inaktive Zwischenstufe *lyso*-PAF umgewandelt [32] und dann durch Acetyl-Coenzym A (CoA) transacetyliert. Die letztere Reaktion wird durch die PAF-Acetyltransferase katalysiert [33]. Beide Enzyme sind Ca²⁺-abhängig. Noch nicht geklärt sind alternative PAF-Synthesewege, wie eine CoA-unabhängige Transacetylierung und die *de novo* Synthese.

PAF besitzt pro-inflammatorische Eigenschaften, führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöht die Gefäßpermeabilität und spielt, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Plättchenaggregation [34]. Des weiteren stellt PAF einen neuen Angriffspunkt bei neurodegenerativen Erkrankungen dar [35]. Es konnte gezeigt werden, dass PAF in postsynaptischen Neuronen die Glutamatfreisetzung erhöht, welches dann

selbst die Mechanismen des Kurz- und Langzeitgedächtnisses reguliert. Exzessive PAF-Freisetzung führt zu Neurodegeneration [36] und kann durch vorbeugende Gabe des PAF-Antagonisten BN-52021, einem Ginkgolid aus *Ginkgo biloba*, verhindert werden [37]. Ein weiterer PAF-Antagonist, der sich zurzeit in Phase-II- und Phase-III-Studien für die Anwendung bei akuter Pankreatitis befindet, ist Lexifapant (ZacutexTM).

1.3 Cyclooxygenaseweg

1.3.1 Biologische und biochemische Grundlagen

Die Cyclooxygenase (COX), auch Prostaglandin-H-Synthase (PGH) genannt, ist das Schlüsselenzym der Prostaglandin- und Thromboxan-Biosynthese. Sie kann funktionell als 11,15-Lipoxygenase betrachtet werden [38]. COX kommt in fast allen menschlichen Zellen vor. Welche Produkte dabei bevorzugt bzw. ausschließlich gebildet werden, hängt von der weiteren Enzymausstattung der entsprechenden Zelle ab.

Durch die PGH-Synthase werden zwei verschiedene Reaktionen katalysiert: In der Cyclooxygenase-Reaktion entsteht aus AA über die instabile 11-Hydroxyeicosatetraensäure (11-HPETE) zunächst das zyklische Prostaglandinendoperoxid PGG₂. In der nachfolgenden Peroxidase-Reaktion wird PGG₂ zur entsprechenden alkoholischen Verbindung PGH₂ umgesetzt. Aus dieser hochreaktiven Substanz können dann in zahlreichen Geweben die Prostaglandine, in den Thrombozyten Thromboxan A₂ und im Gefäßendothel Prostacyclin gebildet werden. Die Effekte der genannten Mediatoren sind äußerst komplex. Die verschiedenen Substanzen wirken zum Teil synergistisch und zum Teil antagonistisch, was auf dem gleichzeitigen Vorkommen verschiedener Prostaglandin-Rezeptoren in demselben Organ und der simultanen Bildung verschiedener Prostanoiden beruht.

Prostaglandine sind an der Entstehung von Schmerz, Fieber und entzündlichen Reaktionen wesentlich beteiligt. Im einzelnen wurden z.B. die folgenden Effekte nachgewiesen:

- PGE_2 steigert die renale Durchblutung, wirkt auf die Magenschleimhaut zytoprotektiv, uteruskontrahierend und durch das Erschlaffen der Gefäßmuskulatur blutdrucksenkend.
- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ist ein Gegenspieler des PGE_2 in Bezug auf die Blutdrucksenkung, ist aber wie dieses uteruskontrahierend und zeigt zusätzlich bronchokonstriktorische Effekte.
- PGD_2 wirkt bronchokonstriktorisch.
- Thromboxan A_2 führt zu Plättchenaggregation und Gefäßverengungen.
- Prostacyclin (PGI_2) ist der natürliche Gegenspieler des Thromboxan A_2 .

Anfang der 90er Jahre wurde entdeckt, dass zwei Isoformen der Cyclooxygenase existieren [38]: Eine konstitutive Form (COX-1), die wichtige Aufgaben in der Unterhaltung physiologischer Prozesse übernimmt und in fast allen Zellen vorliegt, und eine induzierbare Form (COX-2), die auf diverse Faktoren hin in Zellen des Immunsystems gebildet wird. Zu diesen Stimuli zählen pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF α), LPS, Mitogene und Onkogene (Phorbol ester, v-src), Wachstumsfaktoren (FGF, PDGF, EGF), Hormone (LH) und Veränderungen des Wasser-Elektrolyt-Haushalts. Da sich die COX-2-Expression durch Glucocorticoide und anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-11, IL-13) hemmen lässt [39], wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass die COX-2 für die Bildung der an Schmerz, Entzündung und Fieber beteiligten Prostaglandine verantwortlich ist. Neue Forschungsergebnisse, nach denen es auch eine konstitutive Expression der COX-2 in Gehirn, Haut, Niere und Magenmukosa gibt, lassen die Funktionen der COX jedoch weitaus komplexer erscheinen [40][41][42].

Strukturell sind die beiden Isoenzyme sehr ähnlich. Bei der COX-2 sind im Vergleich zur COX-1 lediglich Ile⁴³⁴ und Ile⁵²³ jeweils durch Val und His⁵¹³ durch Arg ersetzt. Die COX-2 besitzt dadurch eine größere Bindungstasche. Diese geringen Unterschiede im aktiven Zentrum haben eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung selektiver Hemmstoffe.

1.3.2 Hemmstoffe der COX

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) gehören zu den ältesten durch chemische Synthese gewonnenen Arzneimitteln. Mechanistisch lassen sie sich in vier verschiedenen Gruppen unterteilen [43]:

COX-1-selektive Inhibitoren

In diese Gruppe gehört z.B. die Acetylsalicylsäure, welche in niedrigen Konzentrationen eine selektive, irreversible Hemmung der COX-1 bewirkt, was für die Thrombozytenaggregationshemmung ausgenutzt wird. Hochdosiert tritt eine unselektive Wirkung an beiden Isoenzymen auf.

Unselektive Inhibitoren der COX-1 und COX-2

Eine Hemmung beider Isoenzyme bewirken die Arylessigsäure- und die Arylpropionsäure-Derivate (z.B. Indometacin, Ibuprofen und Diclofenac), die Oxicame (z.B. Piroxicam), die Anthranilsäure-Derivate (z.B. Mefenaminsäure), die Pyrazol-Derivate (z.B. Metamazol und Phenazon) sowie Paracetamol.

COX-2-präferierende Inhibitoren

Eine bevorzugte Hemmung der COX-2 zeigt z.B. Meloxicam.

Selektive Hemmstoffe der COX-2

Es handelt sich hier hauptsächlich um Carbo- und Heterozyklen mit vicinaler Aryl-Substitution. Man nimmt an, dass der Carbo- bzw. Heterozyklus für eine entsprechende Orientierung der aromatischen Ringe im Raum verantwortlich ist, die wiederum wichtig für die Bindung am Enzym ist. Aus diesen Substanzklassen wurden in den letzten Jahren die Coxibe Celecoxib (1998) und Rofecoxib (2000) zugelassen (**Abb. 1.8**). Die Hoffnung auf ein günstigeres Nebenwirkungsprofil durch die selektive COX-2-Hemmung ließ sich in klinischen Studien jedoch nicht bestätigen.

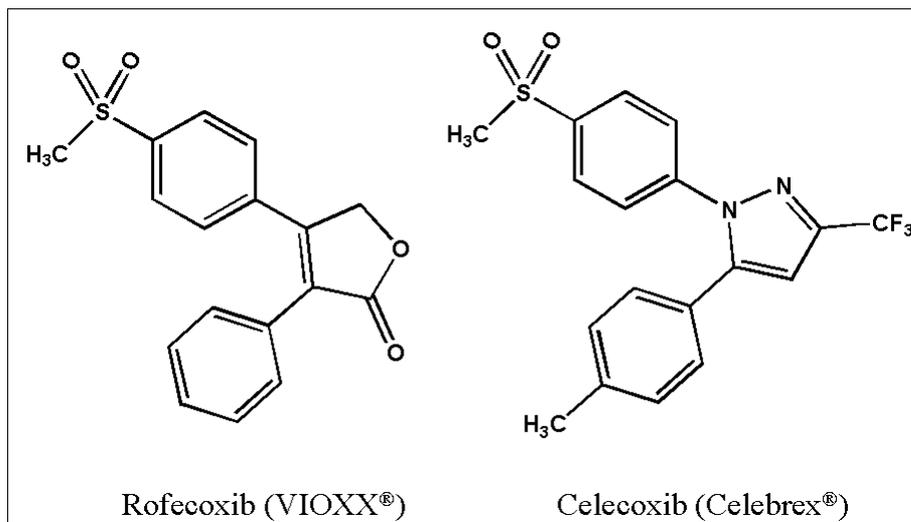


Abb. 1.8: Selektive COX-2-Hemmstoffe.

Duale COX/5-LO-Inhibitoren

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Entwicklung magenverträglicherer NSAR beruht auf der „Shunt-Hypothese“ [44]. Durch die Hemmung der COX wird AA vermehrt über den 5-LO-Weg metabolisiert. Die vermehrte Bildung von LT führt letztendlich zu den magenschädigenden Ereignissen. Duale COX-1/2- und 5-LO-Inhibitoren sollen diesen Toxizitätsmechanismus vermeiden.

Da es sich bei beiden Enzymsystemen um Redox-Systeme handelt, scheinen Redox-Inhibitoren für diese Aufgabe prädestiniert zu sein. Nordihydroguajaretsäure (NDGA) (**Abb. 1.9**) ist der am weitesten verbreitete Inhibitor dieser Klasse und wird v.a. in pharmakologischen Studien verwendet. Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes Lignan aus den Blättern von *Larrea shrubs* und wird auch als Antioxidans in der Lebensmittelindustrie verwendet. Außer S-2474 (**Abb. 1.9**), welches sich noch in der frühen Phase II-Entwicklung befindet, wurden alle anderen Entwicklungen eingestellt, da es auch zu Interaktionen mit Redox-Enzymen in der Leber kommt.

Ein weiterer aussichtsreicher Kandidat ist Licofelone (ML-3000) (**Abb. 1.9**). Hierbei handelt es sich um ein Substratanalogon, das in der Lage ist die Konformation der AA im aktiven Zentrum beider Enzyme nachzuahmen. Die Substanz befindet sich als erster COX/5-LO-Inhibitor in Phase III-Studien zur Behandlung der Arthrose. Erste Studienergebnisse wurden im Juni 2002 vorgestellt. Demnach entspricht die Wirksamkeit

von Licofelone der des Naproxens bei gleichzeitig guter allgemeiner und gastrointestinaler Verträglichkeit [45].

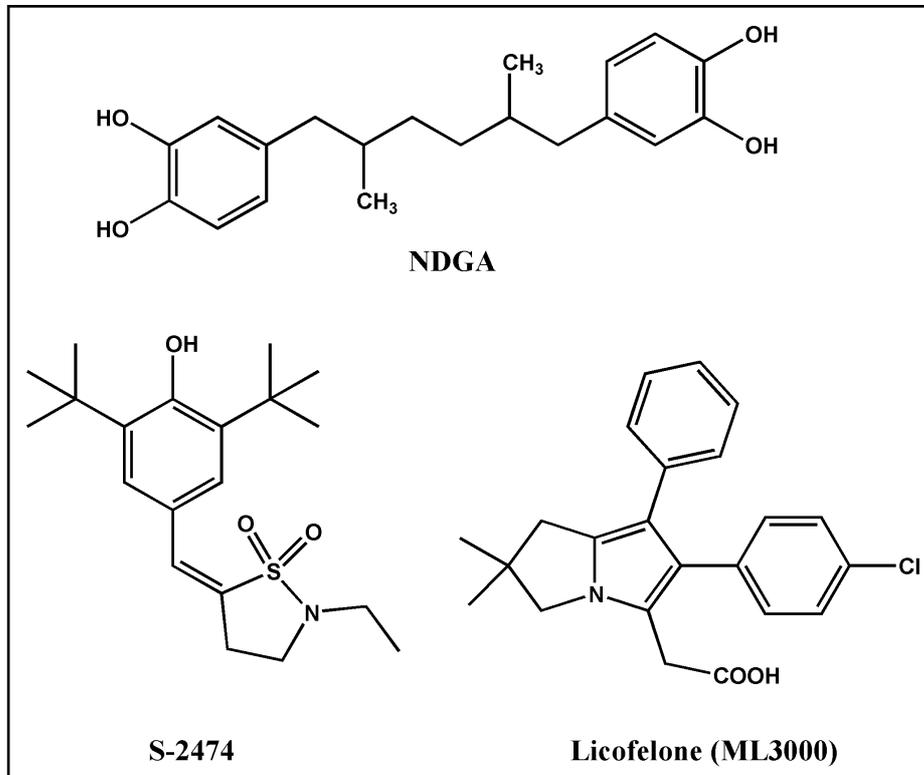


Abb. 1.9: COX/5-LO-Inhibitoren.

NO-NSAR

Für eine gute gastrointestinale Verträglichkeit ist eine intakte Mikrozirkulation essentiell. NO-NSAR unterstützen die Mikrozirkulation in der GI-Mukosa durch Freisetzung von vasodilatierendem NO. Dadurch soll der Wegfall gastroprotektiver PG während der COX-1-Hemmung kompensiert werden [46]. In der präklinischen und klinischen Entwicklung befinden sich verschiedenen Prodrugs (**Abb. 1.10**), welche nach der Resorption metabolisch unter NO-Freisetzung in das entsprechende NSAR transformiert werden.

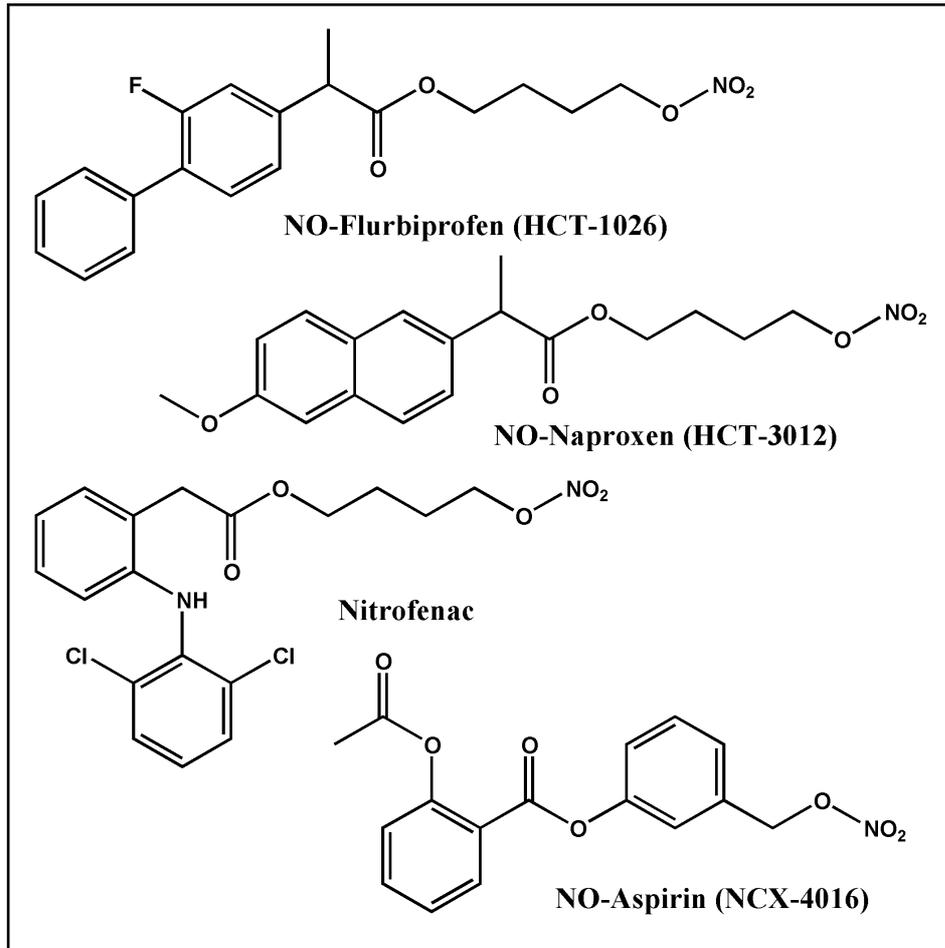


Abb. 1.10: NO-NSAR in klinischer Entwicklung.

1.4 Lipoxygenaseweg

1.4.1 Biologische und biochemische Grundlagen

Lipoxygenasen (LO) sind „non-Haem“ Eisenschwefelproteine, die etwa ein Äquivalent Fe^{3+} enthalten, welchem eine zentrale Rolle im katalytischen Mechanismus zukommt. Die Lipoxygenaseprodukte sind „sekundäre“ Mediatoren, d.h. sie werden erst auf einen Reiz hin neu gebildet und vorwiegend ins umliegende Gewebe sezerniert. Die Einteilung der Lipoxygenasen erfolgt anhand der Position, in der die Dioxygenierung der AA erfolgt, in

5-, 8-, 12- und 15-LO. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich des weiteren in ihrer Gewebeverteilung sowie ihrer Substratspezifität.

LO sind multifunktionelle Enzyme. Sie können die AA neben ihrem Hauptangriffsort auch an anderen Positionen dioxygenieren (z.B. C-15 durch 12-LO [47][48] oder C-12 durch 15-LO [49]). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass das primäre Hydroperoxyprodukt von demselben Enzym an einem zweiten C-Atom oxygeniert wird (z.B. 15-HPETE an C-8 oder C-14 durch 12-LO [47][48] und 15-LO [49], 5-HPETE an C-6 durch 5-LO [50]). Die HPETE-Produkte können durch die LO weiter in das entsprechende Epoxid überführt werden, welches dann über die Eliminierung eines H- und OH-Radikals zu den konjugierten Trienen, den Leukotrienen, führt. Physiologisch bedeutsam ist dies v.a. bei der 5-LO, da das gebildete LTA_4 Vorstufe hoch bioaktiver Mediatoren ist. Weitere Enzymaktivitäten wurden für die 12- und 15-LO beschrieben, welche zur Spaltung der C-C-Bindung neben der Hydroperoxygruppe führen [51][52].

1.4.2 Enzymstruktur

Die komplette Struktur der Säugerlipoxygenasen konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Aufgrund theoretischer Argumente aus dem Enzymmechanismus postulierte die Arbeitsgruppe um Summers [53] zunächst ein hypothetisches Modell über die Anordnung der AA im aktiven Zentrum (**Abb. 1.11**).

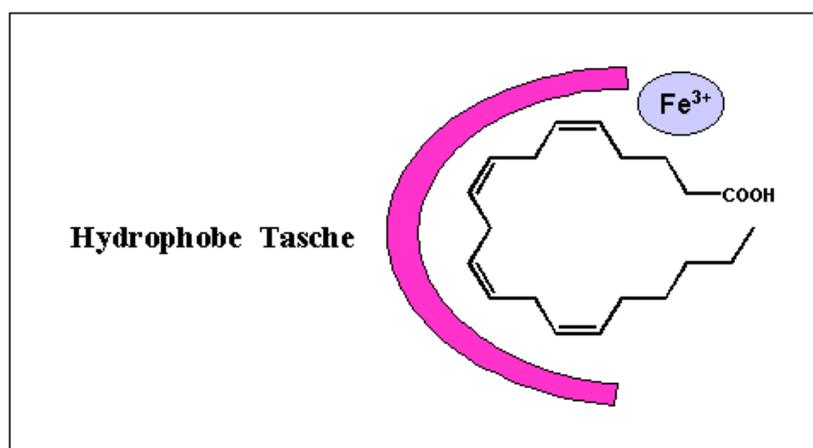


Abb. 1.11: Hypothetische Anordnung der AA im aktiven Zentrum der LO.

Aus diesen Überlegungen heraus konnte eine Optimierung der 5-LO-Hemmung der in dieser Arbeitsgruppe entwickelten Hydroxamsäuren erzielt werden.

Die Struktur der Sojabohnenlipoxygenase-1 (SB-1) konnte 1993 röntgenstrukturanalytisch aufgeklärt werden [54]. Die Ähnlichkeit mit den Säugerlipoxygenasen wurde für erste Modellierungen von drei humanen LO genutzt [55].

Mittels multiple isomorphous replacement (MIR) gelang Gillmor et al. [56] 1997 die erste Bestimmung einer Säugerlipoxygenase. Es handelte sich um die, an einen Inhibitor gebundene, Reticulocyten-15-LO des Kaninchens. Aus der gefundenen Struktur konnten aufgrund der Sequenzhomologien (35-80%) auch Rückschlüsse auf die Bindungsmechanismen von 5- und 12-LO gezogen werden. Demnach besitzen alle LO eine N-terminale β -Barrel-Domäne, welche der C-terminalen Domäne einiger Lipasen in Sequenz, Struktur und Größe ähnelt und an der Lipidbindung beteiligt ist. Die 5-LO enthält einen Teilbereich in dieser Domäne, der einzigartig ist und für die Translokation vom Zytosol an die Kernhüllenmembran essentiell zu sein scheint [57]. In diesem Bereich findet zudem die Ca^{2+} -Bindung statt, die zu einer Erhöhung der Lipophilie führt und für die Enzymaktivität benötigt wird [58]. Des weiteren besitzen die LO eine katalytische Domäne, die hauptsächlich aus α -Helices besteht und der β -Barrel-Domäne gegenüber angeordnet ist. Das Herz der katalytischen Domäne machen zwei lange, zentrale π -Helices aus, welche die vier Proteinliganden (His³⁶¹, His³⁶⁶, His⁵⁴¹ und His⁵⁴⁵) beinhalten, die das katalytische Eisen koordinieren. Der fünfte Eisenligand ist die Carboxylgruppe von Ile⁶⁶³ im C-terminalen Bereich, was zu einer octahedralen Geometrie führt [56] (**Abb. 1.12**).

Durch Molecular Modeling konnte anhand der Daten der katalytischen Domäne der 15-LO nun auch eine dreidimensionale Struktur derselben Domäne der humanen 5-LO entwickelt werden [59].

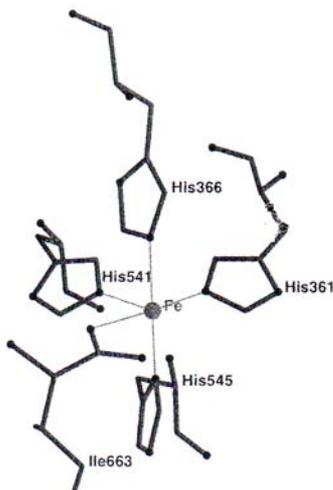


Abb. 1.12: Das katalytische Eisen mit seinen fünf Liganden.

1.4.3 Katalytischer Mechanismus

Die AA gleitet mit ihrem Methylene voran in die hydrophobe Tasche der LO und die Carboxylgruppe bindet an das positive Arg⁴⁰³ an der Außenseite der Tasche. Durch diese Bindung kommt das Substrat in die entsprechende Position, so dass C-13 bei der 15-LO, C-10 bei der 12-LO und C-7 bei der 5-LO dem katalytischen Eisen gegenüber liegt [56].

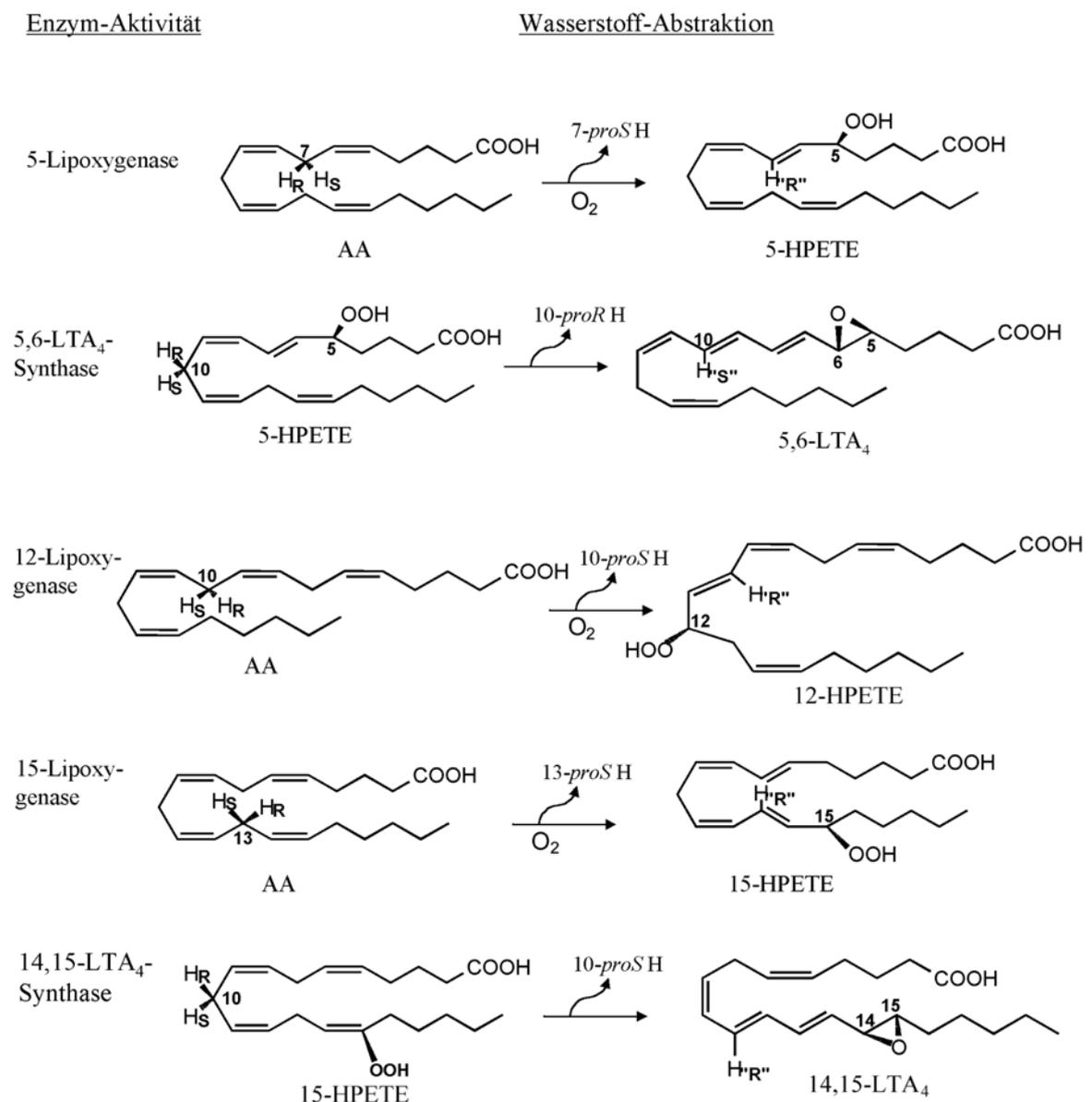


Abb. 1.13: Stereospezifische Wasserstoff-Eliminierung in Lipoxygenase- und LTA₄-Synthase-Reaktionen.

Das inaktive Eisen (Fe^{2+}) wird durch Lipidhydroperoxide aktiviert zum Fe^{3+} . Es benötigt nun einen sechsten Liganden, welcher durch ein gebundenes Hydroxidion gestellt wird. Dieses Hydroxidion fungiert als basischer Protonenakzeptor und abstrahiert stereospezifisch ein H-Radikal an der entsprechenden Methylengruppe (C-13, C-10 bzw. C-7). Gleichzeitig entsteht ein C-Radikal, welches mit herandiffundierendem $^3\text{O}_2$ in Position 15, 12 bzw. 5 zur entsprechenden Peroxyl-AA reagiert, auf die das Enzym dann das H-Radikal unter Bildung der HPETE überträgt (**Abb. 1.14**).

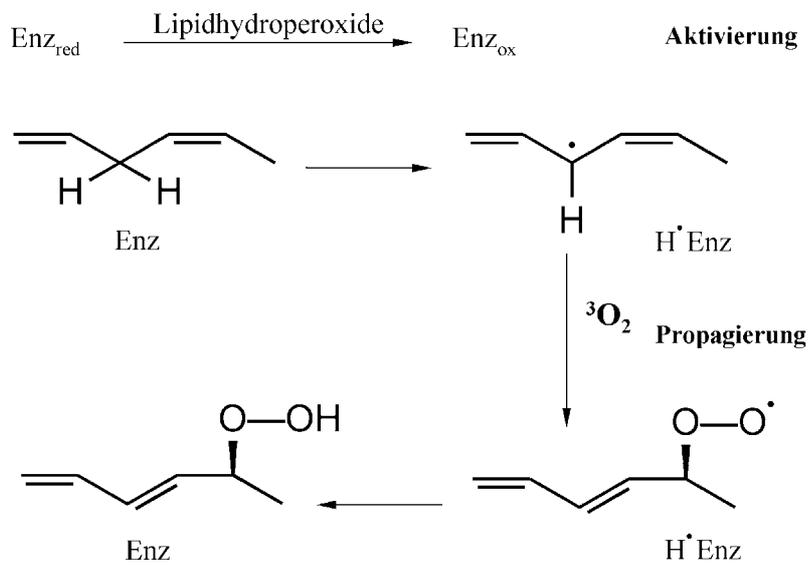


Abb. 1.14: Schematische Darstellung des radikalischen 5-LO-Mechanismus.

Die Position der Oxygenierung resultiert aus der Größe der hydrophoben Tasche (**Abb. 1.15**):

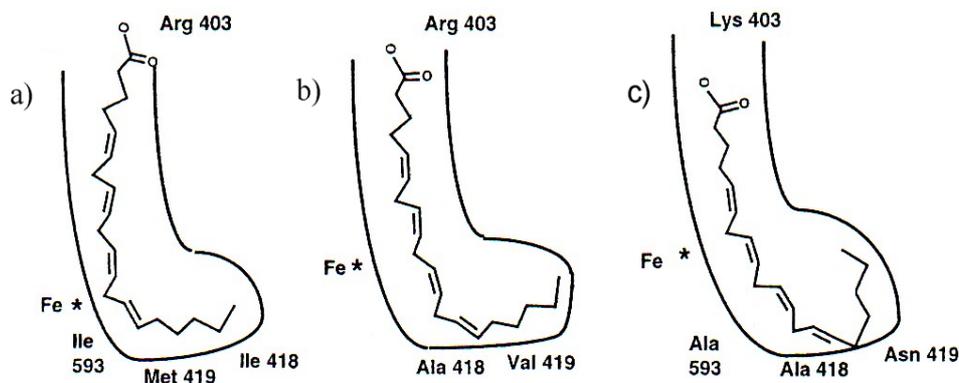


Abb. 1.15: Modell für die positionsspezifische Anordnung der AA im aktiven Zentrum der a) 15-LO, b) 12-LO (Volumen + 6%), c) 5-LO (Volumen + 20%).

Diese ist bei der 12-LO 6% größer im Vergleich zur 15-LO, so dass die AA tiefer in die Tasche gelangen kann, was erklärt, dass nun C-10 und nicht mehr C-13 dem katalytischen Eisen gegenüber liegt [56].

Für die 5-LO gibt es zwei verschiedene Theorien. Die eine geht davon aus, dass abermals die Größe der hydrophoben Tasche die Oxygenierungsposition bestimmt. Experimentelle Daten zeigen eine 20% größere Tasche im Vergleich zur 15-LO. Das Carboxylende könnte hier an Lysin statt an Arginin gebunden sein.

Kritisiert wird hieran, dass dieses Modell die (S)-Konfiguration nicht erklärt und es wird eine alternative Anordnung der AA in der Tasche vorgeschlagen, bei der die AA mit dem Carboxylende voran in die hydrophobe Tasche gleitet.

1.4.4 5-Lipoxygenase

Die Existenz der 5-LO wurde 1976 durch Borgeat und Mitarbeiter [60] durch die Entdeckung der Umwandlung von AA in 5-HETE postuliert. Ende der 70er Jahre gelang die Strukturaufklärung der wichtigsten Metabolite des 5-LO-Weges, der Leukotriene, durch Samuelsson et al. [61]. Wegen ihrer extremen Instabilität in reiner Form (humane 5-LO: HWZ 45 min bei 37°C [62]) gelang die Isolierung des Enzyms erst relativ spät Mitte der 80er Jahre [63].

Das komplexe kinetische Verhalten der 5-LO sowie ihre Regulation sind bislang nur ansatzweise geklärt [64]. Die humane 5-LO ist ein 78 kDa Protein, welches für seine Funktion Ca^{2+} und ATP benötigt. Weitere Co-Faktoren sind Phosphatidylcholin (PC) sowie kleinere Mengen an Fettsäure-Hydroperoxyden bzw. H_2O_2 [65]. Glutathion scheint durch seine Fähigkeit mit Hydroperoxyden zu reagieren eine wichtige Rolle bei der Regulierung der 5-LO-Aktivität zu spielen [66]. Analog zu anderen LO bewirkt das Produkt 5-HPETE eine Selbstinaktivierung des Enzyms im Sinne eines feedback-Mechanismus.

Die 5-LO wurde hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, aber auch in Eosinophilen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Basophilen, B-Lymphozyten sowie in Keratinozyten.

Biochemie des 5-LO-Weges

- (1) Bereitstellung der AA aus den Membranphospholipiden v.a. durch die cPLA₂ (siehe Kapitel 1.2)
- (2) Oxygenierung von AA durch oxidativ aktivierte 5-LO:
 - a) Bildung von 5-HPETE (siehe Kapitel 1.4)
 - b) Generierung von LTA₄
- (3) LTA₄ als zentrales Substrat für die LTA₄-Hydrolase und die LTC₄-Synthase
- (4) Spaltung von LTC₄ durch Peptidasen

Die Bereitstellung der AA sowie die Bildung von 5-HPETE wurden bereits in den vorangehenden Kapiteln besprochen.

Neben der Bildung von 5-HPETE ist die 5-LO auch für die Dehydratisierung derselben verantwortlich, welche zur Bildung von LTA₄ als reaktivem Schlüsselintermediat für die Bildung der weiteren LT führt.

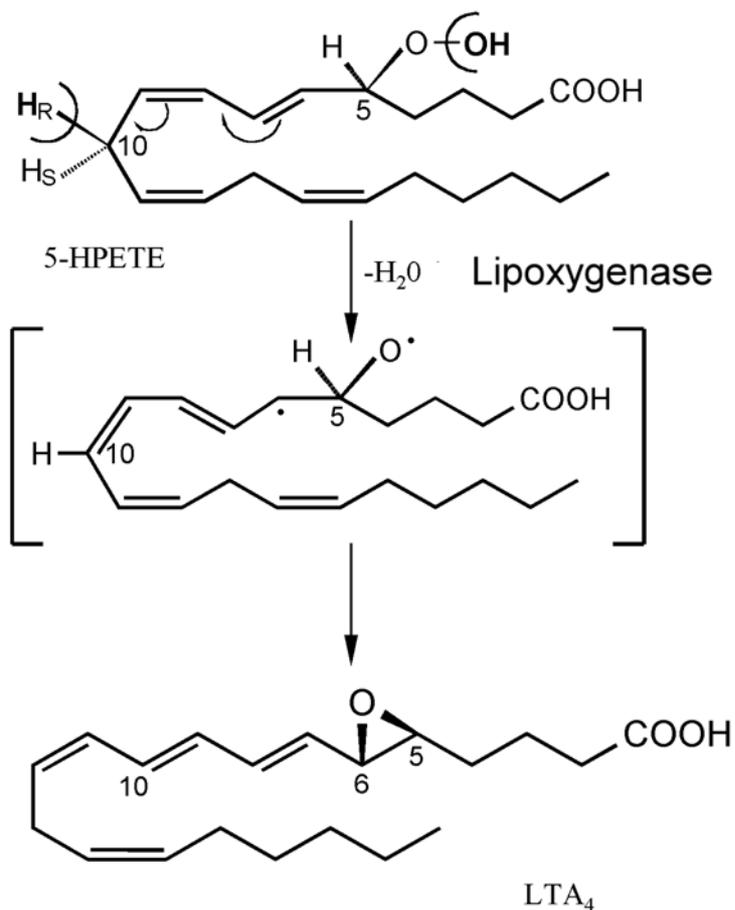


Abb. 1.16: Dehydratisierung von 5-HPETE zu LTA₄.

Der erste Schritt beinhaltet die enzymatische H-Abstraktion vom C-10 der 5-HPETE. Nachfolgend entstehen durch entsprechende Elektronenverschiebungen ein OH-Radikal und das konjugierte 5,6-Epoxid LTA₄ (**Abb. 1.16**).

FLAP und seine Bedeutung für die 5-LO-Reaktion auf zellulärer Ebene

Das 5-LO-aktivierende Protein (FLAP) wurde als Ergebnis von Studien zu MK-886 (**Abb. 1.22**) entdeckt. Diese Substanz zeigte eine potente Hemmung der LT-Synthese in intakten Zellen, vermochte aber die isolierte 5-LO nicht zu hemmen [67]. Es konnte gezeigt werden, dass MK-886 mit einem 18 kDa Membranprotein der humanen Neutrophilen interagiert [68]. In weiteren Studien an Osteosarkomzellen, welche 5-LO in Abwesenheit von FLAP exprimieren, konnte gezeigt werden, dass 5-LO alleine unzureichend für die LT-Synthese ist und diese erst in Anwesenheit von FLAP erfolgt [69].

Bei der Untersuchung der zellulären Verteilung von FLAP zeigte sich, dass in allen Zellen, die 5-LO exprimieren und gleichzeitig LT synthetisieren auch FLAP vorhanden ist. Daneben gibt es aber auch bestimmte Zellen (U-937 histiozytische Lymphomzellen [70][71], Caco-2 und HAT-29 Kolonepithelzellen [72], lymphoblastische T-Zelllinien [70]), die FLAP in Abwesenheit von 5-LO enthalten. Dieses lässt eine Beteiligung von FLAP an weiteren biologischen Prozessen vermuten, die aber bislang unbekannt sind.

Erkenntnisse, dass Stimuli, welche die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöhen, zu einer Translokation der 5-LO vom Zytosol in die Membranfraktion bewirken [73], und dass dieser Prozess durch FLAP-Hemmer konzentrationsabhängig unterbunden werden kann, führten zu der Hypothese, dass FLAP die Membranbindung der 5-LO reguliert. Man nahm an, dass FLAP und 5-LO Untereinheiten eines heterodimeren Proteins sind, welche bei erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen assoziieren.

Dieses Modell konnte durch weitere Forschungsbemühungen widerlegt werden, die den Prozess weitaus komplexer erscheinen lassen. Die 5-LO geht auch ohne FLAP eine Translokation und Membranassoziation ein [69], was darauf hindeutet, dass dem FLAP eine andere Funktion zukommen muss. Die Translokation lässt sich durch MAP-Kinase-Inhibitoren und Peptide mit einer SH3-Domäne blockieren, für die separate Bindungsstellen auf der 5-LO ausgemacht werden konnten [59].

Charleson et al. [74] zeigten, dass FLAP-Antagonisten mit AA um eine Bindungsstelle am FLAP konkurrieren. FLAP wurde daher die Funktion eines Transferproteins zugeordnet, welches der 5-LO die AA präsentiert (

Abb. 1.17).

FLAP, cPLA₂ und LTC₄-Synthase sind in der Kernhülle lokalisiert. In neutrophilen Granulozyten befindet sich die 5-LO im Zytosol und wandert auf einen Ca²⁺-Stimulus hin zur Kernhülle [75]. Die LT-Synthese erfolgt also an der Kernhülle.

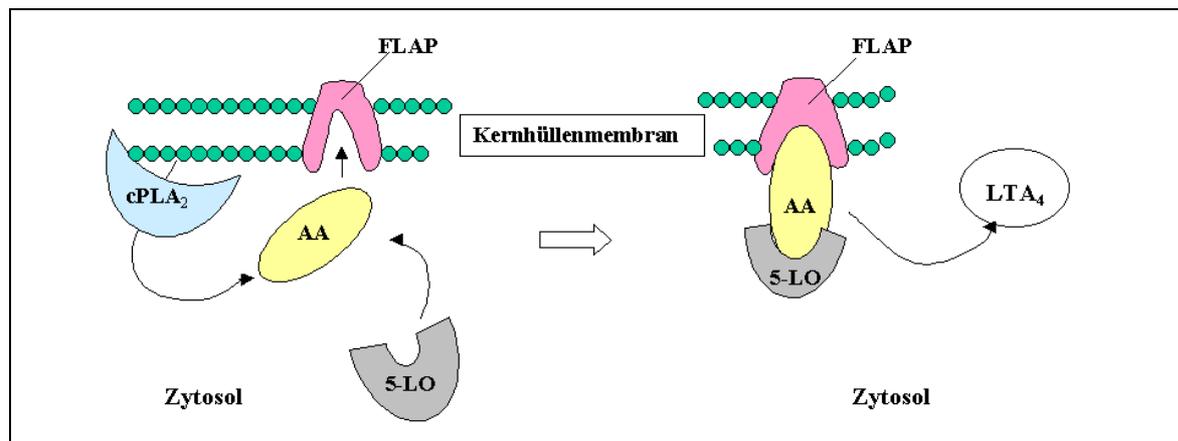


Abb. 1.17: Modell der 5-LO-Reaktion auf zellulärer Ebene.

In Alveolarmakrophagen und RBL-Zellen sind 5-LO-Pools sowohl im Zytosol als auch im Kern vorhanden, von denen aber nur ein Pool zur Kernhülle wandert und für die LT-Synthese verantwortlich ist. Die physiologische Bedeutung der verschiedenen 5-LO-Pools bleibt dabei aber zunächst ungeklärt.

Das gebildete LTA₄ kann dann zwischen verschiedenen Zellen transferiert werden. So erklärt sich, dass deutlich mehr Zellen LTA₄-Hydrolase besitzen als 5-LO. So können z.B. Erythrozyten und T-Zellen LTB₄ produzieren, wenn sie über Neutrophile oder Monozyten mit LTA₄ versorgt werden [76].

LT-Rezeptoren

Erste Hinweise zur Existenz von LT-Rezeptoren gab es bereits vor dem Auffinden ihrer Strukturen. FPL55712 wurde bereits als Antagonist von SRS-A entdeckt als man noch nicht wusste, dass diese sich hauptsächlich aus LT zusammensetzt [77]. Die Entdeckung strenger Strukturmerkmale für die LT-Aktivität [78][79], ihre hohe Potenz (im

nM-Bereich) und die Entwicklung von spezifischen Antagonisten [80] verdeutlichte, dass die LT ihre biologischen Funktionen über spezifische Rezeptoren entfalten.

Die beträchtlichen Unterschiede in der Struktur und biologischen Aktivität zwischen LTB_4 und den Peptido-LT deuten darauf hin, dass es für beide Klassen völlig unterschiedliche Rezeptoren gibt, zwischen denen keine cross-Reaktivität besteht. Die Einteilung erfolgt in den LTB_4 - bzw. BLT-Rezeptor und die Cys-LT-Rezeptoren.

Bislang konnte nur der BLT-Rezeptor geklont werden [81], von dem nur eine Klasse mit Gewissheit identifiziert werden konnte, von dem aber vermutet wird, dass weitere Subklassen existieren [82].

Für die Cys-LT-Rezeptoren (Cys-LT) ist mittlerweile die Existenz von drei Subklassen bekannt [83]. Ihre Einteilung erfolgt anhand ihrer Sensitivität gegenüber bestimmten Antagonisten (**Abb. 1.18**).

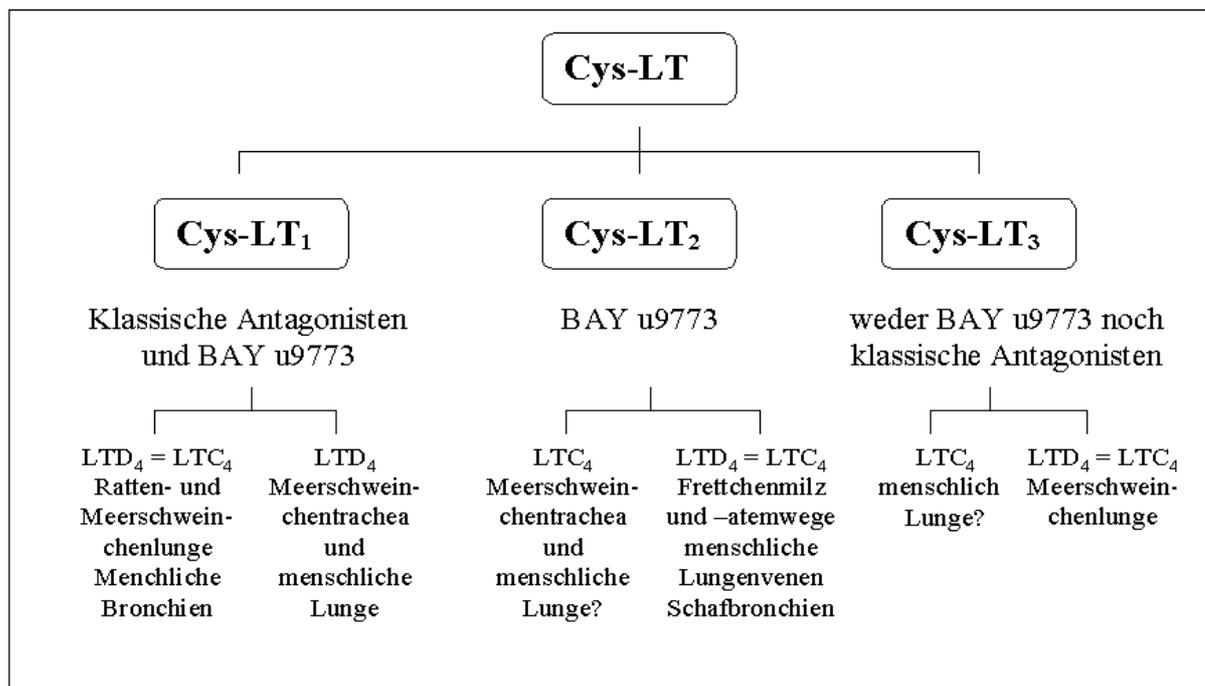


Abb. 1.18: Einteilung der Cys-LT-Rezeptoren; Antagonisten und endogene Agonisten.

Pathophysiologie der 5-LO-Produkte

Bisher ist keine essentielle physiologische Funktion der Leukotriene im gesunden Organismus bekannt. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich *knock-out* Mäuse normal entwickeln [84].

Samuelsson [85] und Corey identifizierten in Zusammenarbeit die seit langem bekannte „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) als ein Gemisch der LT C₄, D₄ und E₄. Diese sogenannten Peptido-LT entfalten eine starke spasmogene Wirkung an den Bronchiolen, welche etwa 1000 mal stärker ist als die von Histamin, jedoch wesentlich langsamer einsetzt. SRS-A wird als der eigentliche Verursacher des Bronchospasmus beim allergischen Asthma angesehen. Weiterhin bewirkt LTD₄ eine Hyperreaktivität in den Atemwegen bei Gesunden [86]. Bei Asthmatikern wurde eine länger dauernde Überempfindlichkeit beobachtet [87]. Sowohl LTD₄ als auch 5-HETE führen zu einer signifikanten Verdickung des Bronchialschleims [88].

Eine maßgebliche Rolle spielen LTC₄, LTD₄ sowie LTE₄ auch bei der Pathogenese des Endotoxinschocks, bei welchem ihre Konzentration im Blut deutlich erhöht ist. Sie bewirken dabei durch Steigerung der Gefäßpermeabilität einen intensiven Plasmaaustritt ins Gewebe [89].

Das nicht-peptidische LTB₄ wird vermehrt in entzündlichen Exsudaten gefunden. LTB₄-Effekte könnten teilweise für die Ödemkomponente im asthmatischen Krankheitsbild verantwortlich sein [90]. Für Leukozyten besitzt LTB₄ eine starke chemotaktische Wirkung und führt damit zu einer Konzentrierung dieser Zellen [91]. Außerdem ruft es Adhäsionen von Leukozyten an Gefäßwänden [92] sowie eine Freisetzung lysosomaler Enzyme [93] und die Bildung von Superoxid durch neutrophile Granulozyten [94] hervor.

Auch bei anderen Lungenkrankheiten sind sowohl Peptido-LT als auch LTB₄ beteiligt. Als Beispiele seien das akute Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), bronchopulmonale Fehlbildungen und zystische Fibrose genannt, wobei der Schweregrad der Erkrankung mit der Menge der Peptido-LT korreliert [95]. Eine Beteiligung der Peptido-LT am, durch PG-Synthesehemmer medikamentös ausgelöstem, Asthma bronchiale [96] gilt als sehr wahrscheinlich.

Weitere entzündliche Erkrankungen, bei denen bekanntermaßen Produkte des 5-LO-Weges eine Rolle spielen sind [97][98]:

- Psoriasis
- Colitis ulcerosa
- Morbus Crohn
- Rheumatoide Arthritis

Kontinuierlicher Antigenreiz führte bei Patienten mit atopischem Ekzem zu anhaltender Histamin- und LTB₄-Freisetzung. Leukotriene werden auch in Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Störungen gebracht, z.B. koronarer Gefäßspasmus und myokardiale Ischämie [99][100]. Peptido-LT gehören zu den potentesten Konstriktoren der Koronargefäße und scheinen als wichtige Mediatoren beim Schock und bei Reperfusionsschädigungen zu agieren. Speziell LTB₄ fördert die Leukozyten-Adhäsion am Gefäßendothel, was möglicherweise entscheidend bei den der Ischämie folgenden Reperfusionsschäden ist [101].

Die Effekte der 5-LO-Produkte auf das Immunsystem zeigen sich bei verschiedenen Krebs- und Autoimmunerkrankungen. Beispielsweise zeigt sich bei Gehirntumoren eine Korrelation zwischen steigender Malignität und LT-Synthese [102]. 5-LO-Inhibitoren steigern die Proliferation humaner B-Zellen und blockieren gleichzeitig das Wachstum von Mastozytomzellen der Maus sowie humaner Gliomzellen. 5-HETE stimuliert normales und malignes Zellwachstum, was durch einen 5-LO-Hemmer blockiert werden kann [103]. Auch die durch LTD₄ und LTB₄ stimulierte Proliferation von Leukämiezellen kann durch 5-LO-Inhibitoren unterbunden werden [104]. Andererseits können LT Makrophagen anregen Tumorzellen zu zerstören, was wiederum durch 5-LO-Hemmer verhindert werden kann.

LTB₄ verstärkt die IgE-Bindung an humanen Eosinophilen sowie deren IgE-abhängige Adhäsion und Zytotoxizität [106]. Die Synthese von LT ist auch assoziiert mit der Glomerulonephritis [107]. Peptido-LT reduzieren dabei den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate [108].

1.4.5 12-Lipoxygenase

Bereits 1974 entdeckten Hamberg und Samuelsson [8] die Produktion von 12-HETE während der Inkubation von humanen Thrombozyten mit AA. Die Präsenz einer 12-LO in den Blutplättchen konnte durch die Isolierung des Enzyms durch Nugteren [109] bestätigt werden.

Die 12-LO kommt, entsprechend ihrer Gewebeverteilung, in drei Isoformen vor: der Leukozyten-12-LO (*l*-12-LO), der Plättchen-12-LO (*p*-12-LO) und der Epithel-12-LO (*e*-12-LO). Eine neue Form der *p*-12-LO wurde in der glatten Gefäßmuskulatur gefunden [110]. Diese besitzt zwei zusätzliche Introns und wird durch LPS (10 µg/mL) downreguliert, während EGF (100 ng/mL) ihre Aktivität stimuliert.

12-(*S*)-HETE wird in vielen verschiedenen Zelltypen synthetisiert. Dazu gehören Thrombozyten, Neutrophile, Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen [112][113][114]. Die physiologischen Funktionen von 12-(*S*)-HETE sind noch nicht vollständig charakterisiert, aber eine beträchtliche Ansammlung von Daten lässt auf eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten, zu denen die Stimulierung der Insulinsekretion im Pankreas, die Suppression der Renin-Produktion, die Chemotaxis auf Leukozyten [112], die Reduzierung der Prostacyclin-Biosynthese im Gefäßendothel [115] sowie eine Bedeutung bei der Plättchenaktivierung und -aggregation [116] gehören, schließen. Experimente mit *knock-out* Mäusen, denen das *p*-12-LO-Gen fehlt lassen darauf schließen, dass der 12-LO auch eine Rolle bei der Regulierung des Wasserhaushaltes der Haut spielt [117]. Die *knock-out* Mäuse zeigen einen deutlich höheren Wasserverlust als die Kontrolltiere.

Pathophysiologie von 12-HETE

Pathophysiologisch deutlich erhöhte 12-HETE-Spiegel finden sich in der Haut von Psoriasispatienten [118]. Es stellte sich heraus, dass es sich dabei nicht um das bekannte (*S*)-Enantiomer handelt, welches man auch in gesunder Haut findet [119], sondern hauptsächlich um das (*R*)-Enantiomer [120]. Humane 12-(*R*)-LO konnte 1998 von Boeglin et al. [121] aus zentralen B-Lymphozyten isoliert und durch die Gruppe um Sun [122] kloniert werden. Des Weiteren konnte 12-(*R*)-LO aus humanen Tonsillen isoliert [123] und gezeigt werden, dass diese für die Bildung von 12-(*R*)-HETE verantwortlich ist.

12-LO-*mRNA*-Expression wurde in verschiedenen soliden Tumorzellen dokumentiert, wie z.B. Prostata- und Kolontumoren sowie Tumoren der Haut [124][125]. Die Produktion von 12-(*S*)-HETE konnte bei einigen Tumorzellen, darunter auch Prostatatumorzellen, mit ihrem metastatischen Potential korreliert werden [126][127]. 12-(*S*)-HETE ist ein intrazelluläres Signalmolekül, welches die PKC stimuliert, die biologischen Funktionen vieler Wachstumsfaktoren beeinflusst und die Induktion von Onkogenen hervorruft [128][129][130]. Über die Aktivierung der PKC kommt es außerdem zur Freisetzung und Sekretion von Cathepsin B, einer Cysteinprotease, die in die Tumormetastasierung und Invasion insbesondere bei Kolonkrebszellen involviert ist [131]. 12-(*S*)-HETE ist zudem für die Zunahme der Expression von Integrinrezeptoren an der Zelloberfläche verantwortlich und damit auch für die Zelladhäsion [132][133]. Untersuchungen mit 5-LO- und 12-LO-Inhibitoren an Pankreaskrebszellen zeigen eine Hemmung der Zellproliferation *in vitro*.

Biochemie des 12-LO-Weges

- (1) Bereitstellung der AA aus den Membranphospholipiden v.a. durch die cPLA₂ (siehe Kapitel 1.2)
- (2) Oxygenierung von AA durch oxidativ aktivierte 12-LO und Bildung von 12-HPETE (siehe Kapitel 1.4)

Reduktion von 12-HPETE zu 12-HETE

Die Entstehung von 12-HPETE wurde bereits in den vorangehenden Abschnitten beschrieben. Die Reduktion von 12-HPETE erfolgt durch eine spezielle Glutathionperoxidase. Das gleichzeitig oxidierte Glutathion wird durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH wieder in seine reduzierte Form zurückgeführt [134]. Dieser Mechanismus ist an den Glucosemetabolismus über die Hexosemonophosphatase (HMP) gekoppelt [135], welcher die benötigte Energie liefert (**Abb. 1.19**).

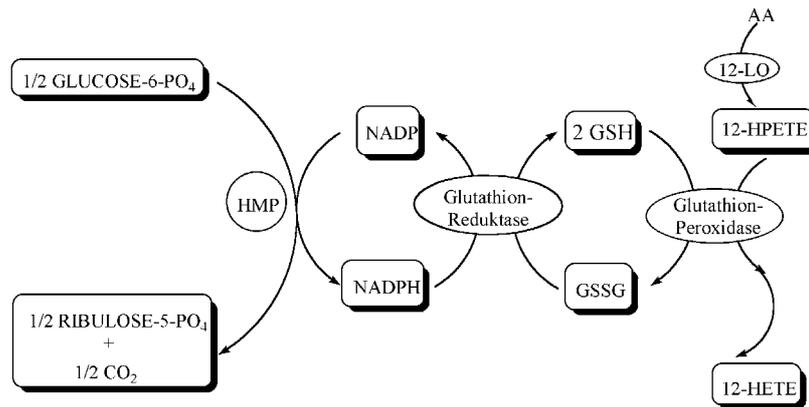


Abb. 1.19: 12-LO-Glutathionperoxidase-Kopplung.

1.4.6 Lipoxygenase-Hemmstoffe und Leukotrienrezeptor-Antagonisten

Auf der Grundlage der pathologischen Effekte der LT (siehe S.28) und 12-HETE (siehe S.30) ergibt sich die therapeutische Bedeutung für die Hemmung ihrer Synthesewege bzw. ihrer Signalweiterleitung. Für die folgenden Erkrankungen wird seit längerem an der Entwicklung entsprechender Wirkstoffe geforscht:

- Psoriasis
- Arthritis
- Asthma bronchiale
- ARDS
- Entzündung
- Rhinitis und Konjunktivitis
- Toxischer Schock und Glomerulonephritis
- Myokardischämie
- Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Neuere Forschungsansätze beschäftigen sich mit dem Einsatz dieser Wirkstoffe auch bei diversen Tumorerkrankungen.

In der Literatur befindet sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits eine Fülle von experimentell geprüften Verbindungen der unterschiedlichsten Stoffklassen. Im folgenden

sollen nur exemplarisch einige Wirkstoffe vorgestellt werden, wobei der Schwerpunkt auf Verbindungen beruht, für die auch klinische Prüfungsergebnisse vorliegen.

Selektive 5-LO-Inhibitoren

Inhibitoren vom Redox-Typ

Zu dieser Gruppe zählt die Mehrheit der Inhibitoren. Es handelt sich zumeist um milde Ein-Elektron-Reduktionsmittel, welche kompetitiv das aktive Eisenion reduktiv inaktivieren. Des Weiteren sind sie in der Lage Lipidperoxide bereits im Vorfeld abzufangen, so dass eine Aktivierung des Enzyms (**Abb. 1.14**) gar nicht erst stattfinden kann. Allerdings sind diese Substanzen nur selten selektiv. Prifelon (**Abb. 1.21**) ist der Prototyp für diese Gruppe der 5-LO-Inhibitoren, in welche der Radikalquencher 2,6-Di-*tert*-butylphenol eingebaut ist. Zahlreiche Analoga [136] wurden nach dem gleichen Prinzip entwickelt, indem der Radikalquencher an ein heterozyclisches System entweder direkt über eine Einfach- bzw. Doppelbindung oder über eine =CO, =NH oder –S-Funktion gekoppelt wurde.

Bedenklich bei dieser Gruppe der Inhibitoren ist jedoch deren Neigung unter entsprechenden Bedingungen auch pro-oxidative Eigenschaften zu entfalten.

Inhibitoren vom Non-Redox-Typ

Im Vergleich zu den Inhibitoren vom Redox-Typ zeigen die Non-Redox-Inhibitoren zwar eine geringere Wirksamkeit [137], sind aber gleichzeitig besser bioverfügbar und verträglich [138].

Der Non-Redox-Inhibitor Lonapalen (**Abb. 1.21**) wurde als Antipsoriatikum entwickelt und erst in der klinischen Phase III aus der Entwicklung genommen. Es handelt sich um ein, durch reduktive Acetylierung maskiertes, 2,3-Dimethoxynaphthochinon, welches aus dem Naturstoff Isonaphthazarin (2,3-Dihydroxy-1,4-naphthochinon) entwickelt wurde. Dieser rote Farbstoff wurde, wie auch Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon), in der Volksmedizin zur Psoriasisbehandlung genutzt. In der Arbeitsgruppe Wurm [139] wurde 1991 durch Kopplung von Lawson (2-Hydroxy-1,4-naphthochinon) mit 2,6-Di-*tert*-butylphenol und nachfolgende reduktive Acetylierung ein aryliertes Lonapalen-Analogon (**A**) als potentielles Antipsoriatikum synthetisiert. Dabei zeigte sich, dass das

Lonapalen-Derivat (**A**) als 5-LO-Inhibitor inaktiv ist, während seine chinoide Vorstufe (**1**) ein potenter Hemmstoff ($IC_{50} = 3.9 \mu\text{M}$) vom Redox-Typ ist (**Abb. 1.20**).

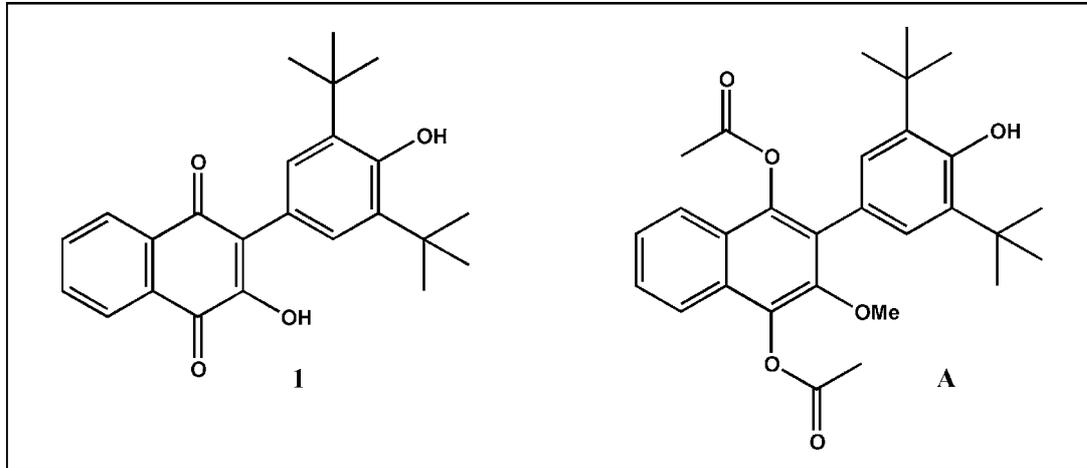


Abb. 1.20: Der selektive 5-LO-Inhibitor **1** und das inaktive Lonapalen-Analogon **A**.

Eisenchelatoren

Die Hydroxamsäuren sind schon seit langem für ihre eisenchelatisierenden Eigenschaften bekannt. Prominentester Vertreter ist das Hydroxyharnstoff-Derivat Zileuton (Zyflo[®]) (**Abb. 1.21**) als erster 5-LO-Inhibitor, welcher es bis zur Marktreife geschafft hat und seit Ende der 90er Jahre in den USA zugelassen ist.

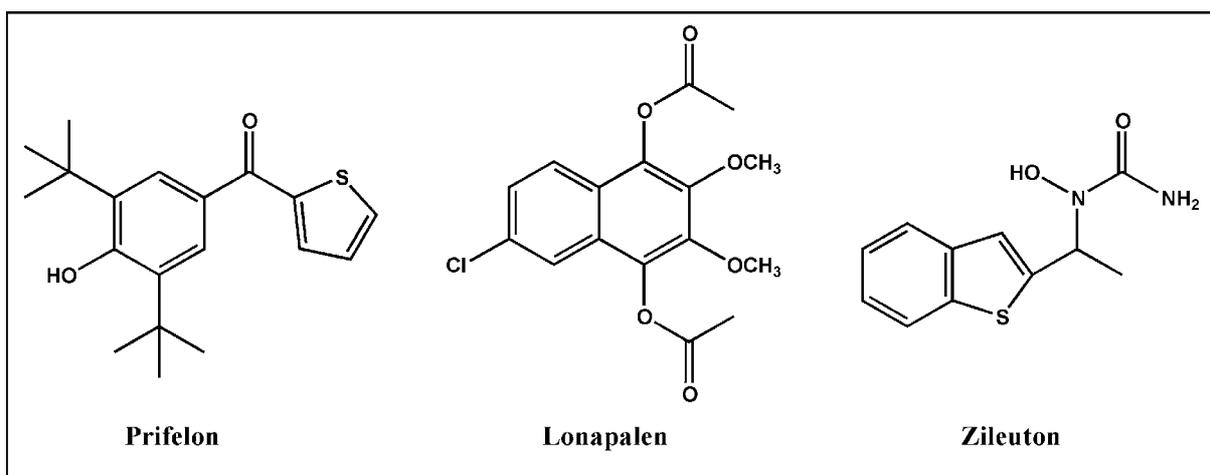
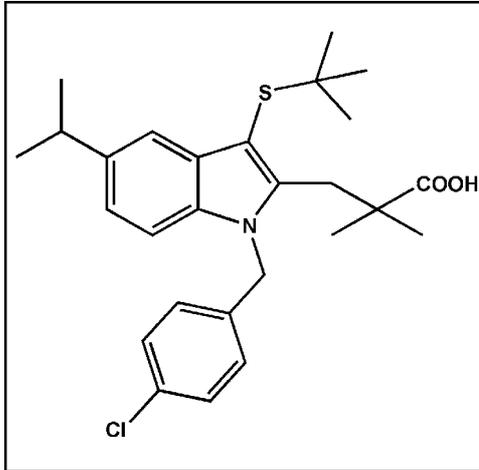
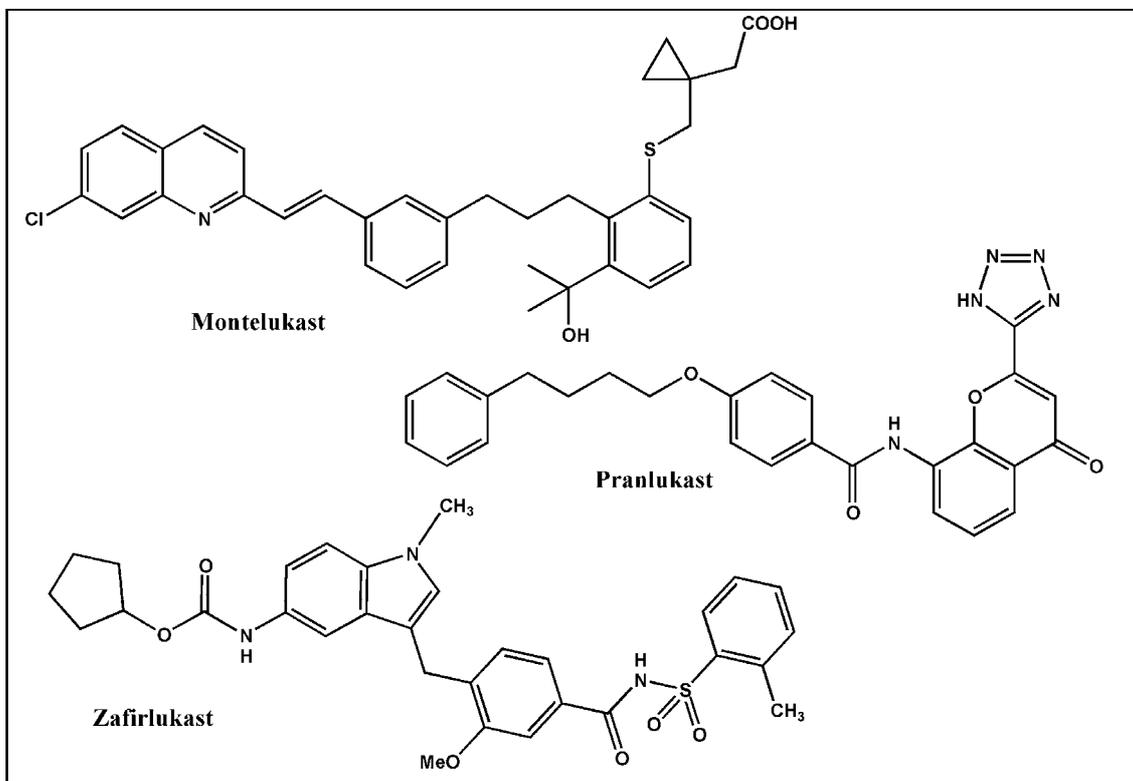


Abb. 1.21: Selektive 5-LO-Inhibitoren.

FLAP-Inhibitorenz.B MK-886 (**Abb. 1.22**).**Abb. 1.22:** Beispiel eines FLAP-Inhibitors.Leukotrienrezeptor-AntagonistenCys-LT₁-Rezeptor-Antagonisten**Abb. 1.23:** Cys-LT₁-Antagonisten.

Von den zahlreichen LTD₄-Antagonisten wurde Montelukast (Singulair®) in der Bundesrepublik Deutschland als Antiasthmatikum in die Therapie eingeführt. Ebenfalls in klinischen Studien befinden sich Pranlukast und Zafirlukast (Accolate®).

BLT-Rezeptor-Antagonisten

Auch für diesen Bereich wurde eine beträchtliche Zahl an Modellverbindungen mit ähnlichem Bauprinzip konzipiert (**Abb. 1.24**). Keine dieser Verbindungen hat bisher eine Zulassung als Arzneistoff erlangt. Im Jahre 1998 wurde eine Untersuchung zur Beeinflussung der stabilen Plaque-Psoriasis durch VML-295 [140] publiziert. Als Ergebnis konnte ein antiphlogistischer Effekt registriert werden.

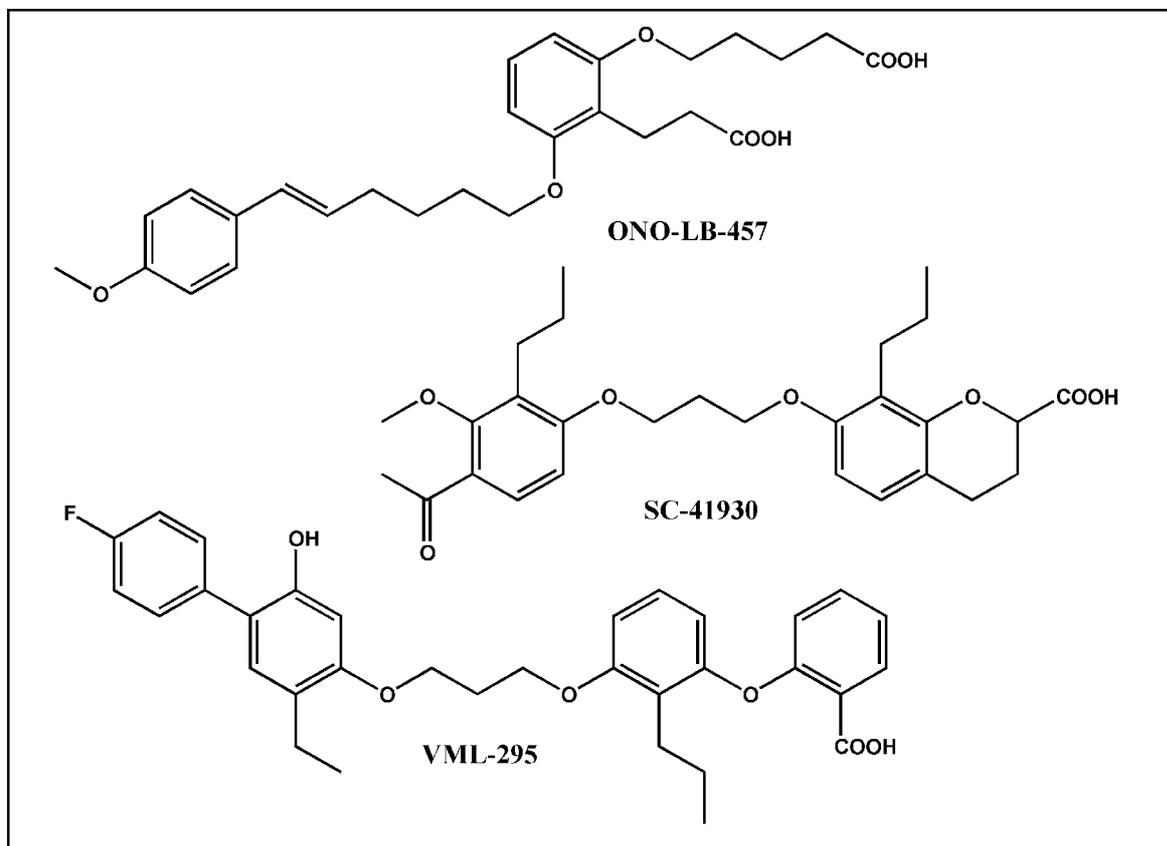


Abb. 1.24: BLT-Rezeptor-Antagonisten.

Duale 5-LO/COX-Inhibitoren (siehe S.16)

Unselektive LO-Inhibitoren

In diese Gruppe gehören hauptsächlich Substratanaloga, welche die LO zeitabhängig hemmen. Viele dieser Substanzen enthalten Acetylen-Gruppen, die für die irreversible Inaktivierung verantwortlich sind. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber man geht davon aus, dass hochreaktive Allylhydroperoxide gebildet werden, die dann kovalent an Methionin im aktiven Zentrum binden. Der Prototyp dieser Gruppe ist die 5,8,11,14-Eicosatetrainsäure (ETYA) [110].

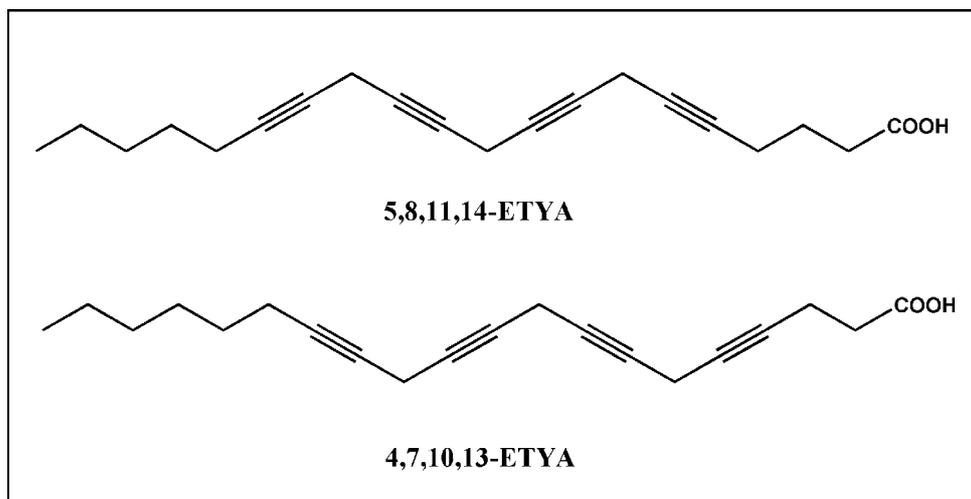


Abb. 1.25: Regioisomere der Eicosatetrainsäure als unselektive bzw. selektive Hemmstoffe der LO.

Selektive 12-LO-Inhibitoren

Die Entwicklung von selektiven 12-LO-Inhibitoren steht noch relativ am Anfang der Entwicklung. Unter den Flavonoiden mit Katecholstruktur wurden verschiedene natürliche LO-Inhibitoren mit antioxidativen Eigenschaften gefunden. Baicalein (**Abb. 1.26**) ist besonders interessant, da es eine relative Selektivität gegenüber der 12-LO aufweist [141] ($IC_{50} = 0.12 \mu M$).

Die Entwicklung von α -Cyan-Kaffeensäure-Derivaten führte ebenfalls zu potenten, relativ selektiven 12-LO-Inhibitoren [142] in der Größenordnung von Baicalein.

Weiter von Interesse sind die Tropolon-Derivate. Tropolon (**Abb. 1.26**) selbst ist nur wenig selektiv [143], jedoch bereits das aus *Streptovercillum hadanonense* isolierte 3-Methoxytropolon MY-469 ist ein potenter *p*-12-LO-Inhibitor [144]. Eine deutlich

potentere *p*-12-LO-Hemmung weist das aus der Japanischen Zypresse isolierte Tropolon-Derivat Hinokitiol auf [143] (**Abb. 1.26**).

Auch unter den Substratanaloga der AA findet sich ein selektiver Hemmstoff der *p*-12-LO. Es handelt sich um das 4,7,10,13-tetraen-Regioisomer der ETYA [145] (**Abb. 1.25**).

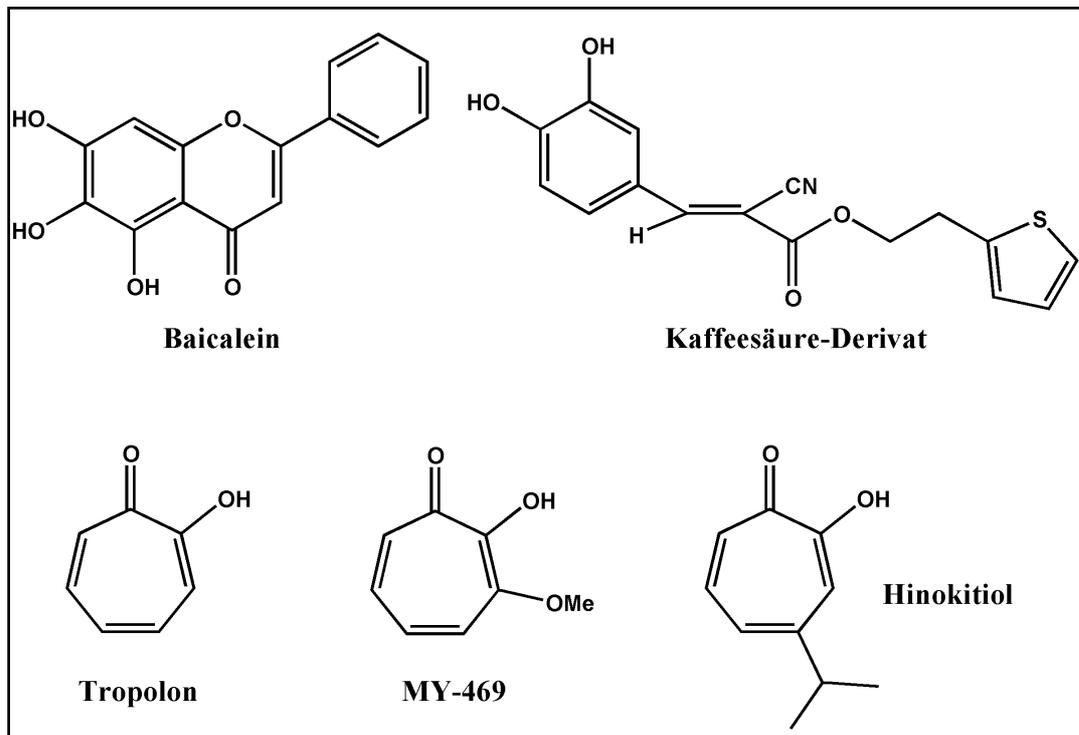


Abb. 1.26: Selektive 12-LO-Inhibitoren.