

Die humane 5-Lipoxygenase:
Synthese und Charakterisierung potentieller Inhibitoren und
Konformationsuntersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne nach
Ligandenbindung

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Pharm. Fabian Krauth,
geb. am 20.01.1978 in: Mannheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Andrea Sinz
2. Prof. Dr. habil. Hans-Hermann Rüttinger
3. Prof. Dr. habil. Dieter Steinhilber

Halle (Saale), 11.04.2012

verteidigt am: 08.08.2012

*Meinen lieben Eltern
und Oma Cilli*

Inhaltsverzeichnis

Liste der Symbole und Abkürzungen	I
Verzeichnis der Abbildungen, Schemata und Tabellen.....	V
Zusammenfassung	1
Summary.....	6
1 Einleitung und Zielstellung	10
2 Theoretischer Teil.....	13
2.1 Lipoxygenasen.....	13
2.1.1 Historie der Lipoxygenasen	13
2.1.2 Die Rolle der h5-LO in der Arachidonsäurekaskade	15
2.1.3 Pathophysiologie der h5-LO und Inhibitionsmechanismen	18
2.1.4 Die C2-ähnliche Domäne	24
2.1.5 Kleine Moleküle als Liganden an der C2-ähnlichen Domäne	26
2.2 Chemisches Cross-Linking zur Strukturuntersuchung von Proteinen	27
2.2.1 Isotopenmarkierte homobifunktionelle Cross-Linker mit aminreaktiver Estergruppe.....	28
2.2.2 Heterobifunktionelle Cross-Linker mit photoreaktiver Benzophenongruppe.....	29
2.3 Massenspektrometrie in der Bioanalytik.....	32
2.3.1 MALDI-TOF/TOF-MS/MS	32
2.3.2 Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS.....	35
2.3.3 Peptidsequenzierung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	36
3 Experimenteller Teil	38
3.1 Material	38
3.1.1 Chemikalien für die Synthese	38
3.1.2 Chemikalien für die Bioanalytik	38
3.1.3 Proteine und Peptide.....	40
3.1.4 Untersuchte C2-Liganden	41
3.1.5 Verschiedene Referenzen zur Substanzcharakterisierung.....	41
3.2 Methoden, verwendete Geräte und Software	42
3.2.1 Methoden zur Substanzcharakterisierung	42
3.2.1a Dünnschichtchromatographie.....	42
3.2.1b Schmelzpunktbestimmung	42
3.2.1c Elementaranalyse.....	42
3.2.1d NMR-Spektroskopie.....	42
3.2.1e IR-Spektroskopie	43
3.2.1f UV-Spektroskopie	43
3.2.1g Sektorfeld-Massenspektrometrie	43
3.2.2 Screening-Methoden vor der pharmakologischen Testung.....	43
3.2.2a Virtuelle Bestimmung der „Rule-of-five“-Deskriptoren nach Lipinski	43
3.2.2b RP-HPLC-Analyse zur log $P_{O/W}$ -Abschätzung	44
3.2.2c Berechnung und Abschätzung der Wasserlöslichkeit	45
3.2.2d Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mittels DPPH.....	45
3.2.2e Bestimmung von Redoxpotentialen mit zyklischer Voltammetrie.....	46
3.2.2f Spektrofluorimetrische Liganden-Affinitätsmessungen an Proteinen.....	47
3.2.3 Pharmakologische Testung	48
3.2.3a Testung auf h5-LO-Hemmung in intakten PMNG.....	48

3.2.3b	SB-LO-1-Inhibitionsassay	49
3.2.3c	Antiproliferations- und Zytotoxizitätsmessungen	49
3.2.4	Bioanalytische Methoden	50
3.2.4a	Herstellung PBS -Puffer (pH 7,4)	50
3.2.4b	UV-Durchlässigkeit der Reaktionsgefäße für das Photo-Cross-Linking	50
3.2.4c	Photoreaktivität von Benzophenon.....	51
3.2.4d	Bradford-Test zur Proteingehaltsbestimmung.....	52
3.2.4e	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	52
3.2.4f	Mikrodialyse	53
3.2.4g	TEV-Protease-Spaltung	53
3.2.4h	Chemische Quervernetzung mit homobifunktionellen aminreaktiven Cross- Linkern	53
3.2.4i	(Photo-)chemische Quervernetzung mit heterobifunktionellen Cross- Linkern	54
3.2.4j	Gelelektrophoretische Proteintrennung (SDS-PAGE)	55
3.2.4k	Färbung der Gele	56
3.2.4l	Geldokumentation	56
3.2.4m	Enzymatische Proteinspaltung im Gel.....	57
3.2.4n	Enzymatische Proteinspaltung in Lösung.....	58
3.2.4o	Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS	58
3.2.4p	Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS der proteolytisch gespaltenen Quervernetzungsprodukte.....	59
3.2.4q	Auswertung von MS- und MS/MS-Daten.....	60
3.2.4r	Untersuchungen zur Ligandenstabilität unter Photo-Cross-Linking- Bedingungen mit MEKC und fluorimetrischer Detektion	61
3.2.4s	Kopplung von BBI an Glutathion zur Bestimmung der Thiolreaktivität	61
3.3	Synthese und Charakterisierung der 1,2,4-Triazin-5-one	63
3.3.1	Allgemeine Darstellungsvorschrift für die Amidrazon-Ausgangsstoffe.....	63
3.3.1a	<i>N</i> -(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid (3c).....	63
3.3.1b	<i>N</i> -(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid (3d)	64
3.3.1c	<i>N</i> -(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(piperidin-1-yl)acetamid (3f)	64
3.3.1d	<i>N</i> -(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(morpholin-4-yl)acetamid (3h)	65
3.3.2	Allgemeine Darstellungsvorschrift für die 1,2,4-Triazin-5-one.....	65
3.3.2a	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-6-dimethylamino-2-phenyl-1,2,4- triazin-5-on (4a).....	66
3.3.2b	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-dimethylamino- 1,2,4-triazin-5-on (4b)	66
3.3.2c	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-phenyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,2,4- triazin-5-on (4c).....	67
3.3.2d	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)- 1,2,4-triazin-5-on (4d)	68
3.3.2e	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(piperidin-1-yl)- 1,2,4-triazin-5-on (4f)	68
3.3.2f	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-phenyl-6-(morpholin-4-yl)-1,2,4- triazin-5-on (4g).....	69
3.3.2g	2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(morpholin-4-yl)- 1,2,4-triazin-5-on (4h)	70

3.4	Synthese und Charakterisierung der Photo-Cross-Linker	71
3.4.1	Darstellung von Ketopropionsuccinimidylester (Keto-NHS, 5)	71
3.4.2	Darstellung von <i>N</i> -Succinimidyl- <i>p</i> -benzoyl-dihydro/dideuterocinnamat (SBC/ SBDC, 9) in vier Stufen	71
3.4.3	Darstellung von Brom-benzophenon-iodoacetamid (BBI, 14) in drei Stufen	73
4	Ergebnisse	76
4.1	Synthese und Charakterisierung neuer 1,2,4-Triazin-5-one	76
4.1.1	Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one	76
4.1.2	Charakterisierung der 1,2,4-Triazin-5-one	77
4.1.2a	Bestimmung der Bioverfügbarkeitsparameter nach Lipinski	77
4.1.2b	Indirekte $\log P_{O/W}$ -Bestimmung über den Retentionsfaktor (<i>k</i>)	78
4.1.2c	Berechnung und Abschätzung der Wasserlöslichkeiten	80
4.1.2d	Antioxidative Wirkung auf DPPH und Redoxpotentiale	81
4.1.2e	Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung	84
4.1.2f	Testung der 1,2,4-Triazin-5-one auf h5-LO-Hemmung in intakten PMNG ..	86
4.1.2g	Untersuchung der 1,2,4-Triazin-5-one auf hemmende Eigenschaften an der SB-LO-1	87
4.1.2h	Zytotoxizitäts- und Antiproliferationsevaluierung	88
4.2	Interaktionsstudien zwischen der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und niedermolekularen Liganden mittels chemischen Cross-Linkings und Massenspektrometrie	90
4.2.1	Synthese und Charakterisierung eines neuen aminreaktiven Photo-Cross-Linkers mit Isotopenmarkierung (SBDC)	91
4.2.1a	UV-Durchlässigkeit der Reaktionsgefäße	91
4.2.1b	Photoreaktivität von Benzophenon	91
4.2.1c	Quervernetzungsexperimente mit Keto-NHS und CaM	92
4.2.1d	Quervernetzungsexperimente mit aminreaktiven Photo-Cross-Linkern mit und ohne Isotopenmarkierung (SBC/SBDC) und CaM	93
4.2.2	Untersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO	99
4.2.2a	Überprüfung der Primärstruktur mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS	99
4.2.2b	Spektrofluorimetrische K_d -Wertbestimmung des Liganden B02 an der C2-ähnlichen Domäne	102
4.2.2c	Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der Quervernetzungsprodukte mit BS ³ - und BS ₂ G-D ₀ /D ₄	104
4.2.2d	Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS der Quervernetzungsprodukte mit SBC/SBDC (D ₀ /D ₂)	112
4.2.2e	Synthese und Charakterisierung eines neuen cysteinreaktiven Photo-Cross-Linkers (BBI) mit Massendefekt	115
5	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	121
5.1	1,2,4-Triazin-5-one als potentielle h5-LO-Inhibitoren?	121
5.1.1	Synthese und „ <i>Rule-of-five</i> “-Deskriptoren der 1,2,4-Triazin-5-one	121
5.1.2	Einfluss von Lipophilie und Redoxpotential auf die Hemmung der h5-LO und SB-LO-1	122
5.1.3	Ist ein Einsatz der 1,2,4-Triazin-5-one bei chronischer myeloischer Leukämie denkbar?	124
5.2	Interaktionsstudien niedermolekularer Liganden an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO mittels (photo-)chemischem Cross-Linking und Massenspektrometrie	127
5.2.1	Synthese und Charakterisierung des isotope-markierten Photo-Cross-Linkers SBDC	127

5.2.2	Untersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO.....	128
5.2.2a	Affinität des Liganden B02 an die C2-ähnliche Domäne	128
5.2.2b	Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der Quervernetzungsprodukte mit BS ³ - und BS ² G-D ₀ /D ₄	130
5.2.2c	Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS der Quervernetzungsprodukte mit SBC/SBDC	132
5.2.2d	Synthese und Charakterisierung eines cysteinreaktiven Photo-Cross-Linkers (BBI) mit Massendefekt	132
5.3	Ausblick.....	133
	Literaturverzeichnis	135
	ANHANG.....	IX

Liste der Symbole und Abkürzungen

AKBA	Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B02	<i>N</i> -Cyclopentyl-7-methyl-2- <i>p</i> -tosyl-H-imidazo[1,2 α]pyridin-3-amin
BBI	Brom-benzophenon-iodacetamid, <i>N</i> -{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-iodacetamid
BP	Benzophenon
BS ² G	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	bovines Serumalbumin
C2 _{alt}	C2-ähnliche Domäne aus ungereinigtem Spaltansatz von MBP-C2
C2 _{neu}	ohne Detergens (Brij-35) gereinigte C2-ähnliche Domäne
C2* _{neu}	mit Detergens (Brij-35) gereinigte C2-ähnliche Domäne
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC ₅₀	zytotoxische Substanzkonzentration für 50% der Zellen
CDC	Cinnamyl-3,4-dihydroxy- α -cyanocinnamat
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
CID	stoßaktivierter Zerfall (<i>collision-induced dissociation</i>)
CLP	Coactosin-ähnliches Protein
CML	chronische myeloische Leukämie
cPLA ₂ α	zytosolische Phospholipase A ₂ α
hCOX	humane Cyclooxygenase
D ₀ /D ₂	nicht deuteriert/zweifach deuteriert
D ₀ /D ₄	nicht deuteriert/vierfach deuteriert
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2'-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl
DTT	Dithiothreitol
E _{1/2}	Halbstufenpotential

EC ₅₀	effektive Substanzkonzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt zu verzeichnen ist
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FLAP	<i>5-lipoxygenase activating protein</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GI ₅₀	Substanzkonzentration für eine 50%ige Wachstumshemmung
GPMAW	Software: <i>general protein mass analysis for windows</i>
GSH (red.)	Glutathion (reduziert)
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
H ₂ O-MQ	Reinstwasser (MilliQ-Wasser)
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
5-HEDH	5-Hydroxy-eicosanoid-dehydrogenase
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]ethansulfonsäure
5-HETE	5S-Hydroxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
His ₆ -tag	Hexahistidin-Affinitätsmarkierung
h5-LO	humane 5-Lipoxygenase
5-HPETE	5S-Hydroperoxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure
(HP)LC	<i>(high performance) liquid chromatography</i>
HSA	humanes Serumalbumin
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt ist
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
LIFT	Laser-induzierte Fragmentierungstechnik
LO	Lipoxygenase
LP ₁₂₁	2-(4-Chlor-6-(chinolin-6-ylamino)pyrimidin-2-yl-thio)octansäure
LT	Leukotrien(e)
LTQ	<i>linear trap quadrupol</i> (Thermo Fisher Scientific)
LX	Lipoxin(e)
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung
MAPEG	<i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>

MBP	Maltose-bindendes Protein
MBP-C2	Fusionsprotein aus der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und MBP
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
MS/MS	Fragmentationen-Massenspektrometrie / Tandem-MS
M_w	Molekulargewicht
n.d.	nicht bestimmt
NDGA	Nordihydroguaiaretsäure
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	kernmagnetische Resonanz
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OAG	1-Oleyl-2-acetyl-glycerol
OECD	<i>organization for economic cooperation and development</i>
$P_{O/W}$	Verteilungskoeffizient (Octanol/Wasser)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	isotonische phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PDB	Proteindatenbank
PE-HD	<i>polyethylene-high density</i>
PFF	<i>peptide fragment fingerprinting</i>
PGB ₁	Prostaglandin B ₁
PHAST	Software: <i>pharmacophore alignment search tool</i>
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipid
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i>
PMNG	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP	Polypropylen
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	<i>parts per million</i>
RP	Umkehrphase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SA	Sinapinsäure
SBC	<i>N</i> -Succinimidyl- <i>p</i> -benzoyldihydrocinnamat
SBDC	<i>N</i> -Succinimidyl- <i>p</i> -benzoyldideuterocinnamat
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat

SNAP	<i>sophisticated numerical annotation procedure</i> (Bruker Daltonik)
S/N	Signal-/Rauschverhältnis
Tandem-MS	Fragmentationen-Massenspektrometrie / MS/MS
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Flugzeit (<i>time-of-flight</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Reaktionsgeschwindigkeit
V ₀	Reaktionsgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion

Proteinogene Aminosäuren

Alanin	A	Lysin	K
Arginin	R	Methionin	M
Asparagin	N	Phenylalanin	F
Asparaginsäure	D	Prolin	P
Cystein	C	Pyrrolysin	O
Glutamin	Q	Selenocystein	U
Glutaminsäure	E	Serin	S
Glycin	G	Threonin	T
Histidin	H	Tryptophan	W
Isoleucin	I	Tyrosin	Y
Leucin	L	Valin	V

Verzeichnis der Abbildungen, Schemata und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Röntgenstruktur der stabilen h5-LO mit einer Auflösung von 2,4 Å	15
Abbildung 2: Eisenchelatierender Redoxinhibitor A-46077 (Zileuton [®])	20
Abbildung 3: Redoxaktive Lipoxygenase-Inhibitoren	20
Abbildung 4: Lipoxygenase-Inhibitoren vom Nicht-Redox-Typ	21
Abbildung 5: FLAP-Inhibitoren	22
Abbildung 6: Leukotrien-Rezeptorenblocker Montelukast (Singulair [®])	22
Abbildung 7: Mechanismus-orientierte Inhibitoren	23
Abbildung 8: Der Selen-organische h5-LO-Inhibitor Ebselen	24
Abbildung 9: Die C2-ähnliche Domäne der stabilen h5-LO im Vergleich zur C2-Domäne der cPLA ₂ α	25
Abbildung 10: Strukturformeln der untersuchten Liganden der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO	27
Abbildung 11: Auswahl an Benzophenon enthaltenden heterobifunktionellen Cross-Linkern	31
Abbildung 12: Strukturformel von pBpa	31
Abbildung 13: Prinzipieller Aufbau eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS)	34
Abbildung 14: Aufbau eines ESI-LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers	35
Abbildung 15: Fragmentierung von Peptiden	36
Abbildung 16: Bevorzugte Spaltstellen innerhalb eines Octapeptides bei einer stoßaktivierten Fragmentierung in einem Massenanalysator	37
Abbildung 17: Kalibriergerade zur Bestimmung der log P_{exp} -Werte der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	79
Abbildung 18: Kalibriergeraden zur EC ₅₀ -Bestimmung der Antioxidantien Ascorbinsäure und NDGA	82
Abbildung 19: Kalibrierkurve zur Bestimmung der antioxidativen Potenz von BW755C	83
Abbildung 20: Kalibrierkurven zur Bestimmung der antioxidativen Potenz der 1,2,4-Triazin-5-one 4c und 4d	83
Abbildung 21: Zyklovoltammetrie am Beispiel des 1,2,4-Triazin-5-ons 4c	84
Abbildung 22: Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung des 1,2,4-Triazin-5-ons 4c	85
Abbildung 23: Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung des Kinase-Inhibitors Imatinib	86
Abbildung 24: Hemmkurven für die inhibitorische Aktivität von NDGA und 4d an der SB-LO-1	88
Abbildung 25: UV-Durchlässigkeit der zum Photo-Cross-Linking verwendeten Reaktionsgefäße	91
Abbildung 26: MALDI-TOF/TOF-MS/MS von photochemisch modifizierter Substanz P	92

Abbildung 27: MALDI-TOF-MS der Cross-Linking-Reaktionsmischung aus CaM und SBC/SBDC	94
Abbildung 28: MALDI-TOF-MS einer Nano-HPLC-Fraktion nach tryptischer Spaltung eines SBC/SBDC-Reaktionsansatzes mit zwei modifizierten CaM-Peptiden	95
Abbildung 29: MALDI-TOF/TOF-Fragmentionen-Massenspektrum des modifizierten CaM-Peptides 91-106 (VFDKDG DGYISAAELR)	95
Abbildung 30: ESI-LTQ-Orbitrap-MS einer Nano-HPLC-Fraktion nach tryptischer Spaltung eines CaM-Reaktionsansatzes mit SBC/SBDC	97
Abbildung 31: ESI-LTQ-Orbitrap-Fragmentionenspektrum einer vierfach geladenen Spezies aus einem CaM-Reaktionsansatz mit SBC/SBDC	98
Abbildung 32: Kristallstruktur von holo-CaM aus Rinderhirn	98
Abbildung 33: SDS-PAGE des mittels TEV-Protease gespaltenen und mikrodialysierten Fusionsproteins MBP-C2	100
Abbildung 34: MALDI-TOF-MS von C2 _{neu}	102
Abbildung 35: Spektrofluorimetrische K _d -Wertbestimmung von B02 an C2 _{neu} in Anwesenheit von 100 μM Ca ²⁺	103
Abbildung 36: Spektrofluorimetrische K _d -Wertbestimmung von B02 an C2 _{neu} in Anwesenheit von 10 μM Ca ²⁺	103
Abbildung 37: Anregungs- und Emissionsspektren von B02 und C2 _{neu} in HEPES-Puffer pH 7,4 in Anwesenheit von 100 μM Ca ²⁺	104
Abbildung 38: SDS-PAGE eines Cross-Linking-Ansatzes mit TEV-gespaltenem Fusionsprotein MBP-C2 und BS ³ -D ₀ /D ₄ oder BS ² G-D ₀ /D ₄ in Anwesenheit des Liganden LP ₁₂₁	105
Abbildung 39: MALDI-TOF-MS von unmodifizierten und mit BS ³ -D ₀ /D ₄ modifizierten tryptischen Spaltpeptiden in Anwesenheit des Liganden LP ₁₂₁	105
Abbildung 40: MALDI-TOF/TOF-Fragmentionenspektrum eines mit BS ³ -D ₀ /D ₄ einfach modifizierten Spaltpeptides in Anwesenheit des Liganden LP ₁₂₁	106
Abbildung 41: Darstellung der Lysin-Seitenkettenmodifizierungen in der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO aus drei Perspektiven	106
Abbildung 42: SDS-PAGE eines Cross-Linking-Ansatzes mit C2* _{neu} und BS ² G- und BS ₃ -D ₀ /D ₄ in An- und Abwesenheit des Liganden B02	107
Abbildung 43: MALDI-TOF-MS von C2* _{neu} nach Modifizierung mit BS ² G-D ₀ /D ₄ in Anwesenheit des Liganden B02	107
Abbildung 44: MALDI-TOF-MS von mit BS ³ -D ₀ /D ₄ modifizierten und quervernetzten Spaltpeptiden in Anwesenheit des Liganden B02	108
Abbildung 45: MALDI-TOF/TOF-Fragmentionenspektrum eines mit BS ³ -D ₀ /D ₄ modifizierten Spaltpeptides	108

Abbildung 46: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum einer mit BS ³ -D ₀ /D ₄ quervernetzten Spezies	110
Abbildung 47: Ergebnisse der Cross-Linking-Experimente an der C2-ähnlichen Domäne (C2* _{neu}) der h5-LO	111
Abbildung 48: Photo-Cross-Linking-Ansatz mit TEV-gespaltenem Fusionsprotein MBP-C2 und SBC/SBDC	112
Abbildung 49: MALDI-TOF-MS der Cross-Linking-Reaktionsmischung aus C2* _{neu} und SBC/SBDC	113
Abbildung 50: MALDI-TOF-MS von mit SBC/SBDC modifizierten Spaltpeptiden in Anwesenheit des Liganden B02	114
Abbildung 51: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit SBC/SBDC modifizierten Peptides	114
Abbildung 52: Mizellare elektrokinetische Chromatographie einer methanolischen B02-Lösung nach Bestrahlung mit Fluoreszenzdetektion	115
Abbildung 53: SDS-PAGE eines Cross-Linking-Ansatzes mit C2 _{neu} und Keto-NHS in Abwesenheit des Liganden B02	116
Abbildung 54: Mit Ninhydrin angefärbtes Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsmischung aus BBI und GSH und der jeweiligen Einzelverbindungen	118
Abbildung 55: SDS-PAGE eines Photo-Cross-Linking-Ansatzes mit C2 _{neu} und BBI sowohl in An- als auch Abwesenheit von B02	118
Abbildung 56: MALDI-TOF-MS einer mit Trypsin/Glu-C gespaltenen Peptidfraktion von C2 _{neu} nach Modifizierung mit BBI und anschließender UV-A-Bestrahlung	119
Abbildung 57: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit BBI an C104 modifizierten Spaltpeptides von C2 _{neu}	119

Schemata

Schema 1: Der h5-LO-Weg der Arachidonsäurekaskade	18
Schema 2: Darstellung der unterschiedlichen Topologien für C2-Domänen am Beispiel von Synaptotagmin I und PLCδ1	25
Schema 3: Reaktionsmechanismus für die Umsetzung eines homobifunktionellen NHS-Esters mit Amino- oder Hydroxylgruppen aus Aminosäureseitenketten eines Proteins	29
Schema 4: Photochemie von Benzophenon	30
Schema 5: Allgemeiner Reaktionsmechanismus zwischen einem Radikalfänger und dem stabilen Radikal DPPH	46
Schema 6: Reduktion von Disulfidbrücken und Modifizierung der freien Thiol-Gruppen in Proteinen	57
Schema 7: Reaktionsmechanismus für die thiolreaktive Kopplung von BBI an GSH	62

Schema 8: Geplante Zyklisierungsreaktion zur Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one	76
Schema 9: Darstellung der α -Carbonyl-carbonsäurearyldiazonoylchloride 2a-b	76
Schema 10: Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h aus den entsprechenden Amidrazonen 3a-h	77
Schema 11: Chronologie der (bio-)chemischen und massenspektrometrischen Experimente zwischen der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und verschiedenen niedermolekularen Liganden	90
Schema 12: Synthese von Ketopropionsuccinimidylester 5 (Keto-NHS)	92
Schema 13: Aminosäuresequenz von bovinem Calmodulin	93
Schema 14: Synthese von <i>N</i> -Succinimidyl- <i>p</i> -benzoyldihydro(dideutero)cinnamat 9 (SBC/SBDC)	94
Schema 15: Schematische Darstellung des Fusionsproteins MBP-C2	99
Schema 16: Aminosäuresequenz von MBP mit His ₆ -Markierung	100
Schema 17: Aminosäuresequenz der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO	101
Schema 18: Synthese von <i>N</i> -{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-iodoacetamid 14 (BBI)	117
Schema 19: Bildung von Glutamatsemialdehyd nach Oxidation der Argininseitenkette	120

Tabellen

Tabelle 1: Humane LO-Gene und bevorzugte Verbreitung der entsprechenden LO-Isoform	14
Tabelle 2: Verwendete isotopenmarkierte homobifunktionelle Cross-Linker	28
Tabelle 3: Auswahl gängiger Matrices in der MALDI-MS	33
Tabelle 4: Referenzpeptide zur Kalibrierung für die MALDI-TOF/TOF-MS	51
Tabelle 5: Referenzproteine zur Kalibrierung für die MALDI-TOF-MS	52
Tabelle 6: Reaktionsansätze für ein Quervernetzungsexperiment mit homobifunktionellen aminreaktiven Cross-Linkern und der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO	54
Tabelle 7: Reaktionsansätze für ein Quervernetzungsexperiment mit heterobifunktionellen amin- und photoreaktiven Cross-Linkern und der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO	55
Tabelle 8: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels	56
Tabelle 9: Substitutionsmuster der α -Carbonyl-carbonsäurearyldiazonoylchloride 2a-h	76
Tabelle 10: Substitutionsmuster der Amidrazone 3a-h und 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	77
Tabelle 11: Lipinskis „ <i>Rule-of-five</i> “-Deskriptoren der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	78
Tabelle 12: RP-HPLC-Daten der Referenzverbindungen für die indirekte $\log P_{O/W}$ -Bestimmung	79
Tabelle 13: RP-HPLC-Daten und ermittelte $\log P_{\text{exp}}$ -Werte für die 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	80
Tabelle 14: Berechnete Wasserlöslichkeiten der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	81
Tabelle 15: Antioxidatives Potential der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h anhand der DPPH-Entfärbung und gemessener Redoxpotentiale	82
Tabelle 16: Spektrofluorimetrische K_d -Werte ausgewählter 1,2,4-Triazin-5-one 4a-d für die Bindung an humanes Serumalbumin (HSA)	85
Tabelle 17: Einfluss der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h auf die Restaktivität (%) der h5-LO in intakten PMNG	87

Tabelle 18: Hemmdaten (IC_{50} -Werte) der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h an der SB-LO-1	88
Tabelle 19: Antiproliferativer Effekt (GI_{50}) und Zytotoxizität (CC_{50}) der 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	89
Tabelle 20: Mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte intramolekulare Vernetzungen in CaM	96
Tabelle 21: Mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS identifizierte intramolekulare Vernetzungen in CaM	97
Tabelle 22: Intramolekulare Cross-Links mit BS^2G - und BS^3-D_0/D_4 in Anwesenheit von B02	109
Tabelle 23: Intramolekulare Cross-Links mit BS^2G - und BS^3-D_0/D_4 in Abwesenheit von B02	110
Tabelle 24: Modifizierung von $C2_{neu}$ mit Keto-NHS und Iodacetamid	116
Tabelle 25: Übersicht der Untersuchungsergebnisse für die 1,2,4-Triazin-5-one 4a-h	126

Zusammenfassung

Synthese und Charakterisierung potentieller h5-LO-Inhibitoren

Unter den sechs identifizierten humanen Lipoxygenasen (h-LOs) besitzt die 5-Lipoxygenase (h5-LO) durch ihre zentrale Rolle in der Leukotrien-Biosynthese eine besondere pathophysiologische Bedeutung. Diese aus Arachidonsäure gebildeten Lipidmediatoren sind, wie seit Langem bekannt ist, nicht nur an der Immunabwehr, sondern auch an der Entstehung von Schmerz, chronischen Entzündungen und allergischen Reaktionen beteiligt. Ein Einfluss auf die Tumorentstehung gilt als wahrscheinlich und ist Gegenstand zahlreicher Studien [Radmark 2010, Haeggström & Funk 2011].

Seit Mitte der 1980er Jahre wurde am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg versucht, die Wirkung von Inhibitoren der Arachidonsäurekaskade mit Amidrazonestruktur zu optimieren. Dabei dienten bekannte LO-Hemmer, wie Benzaldehydphenylhydrazon bzw. Hexanalphenylhydrazon [Galey 1988] aus der Klasse der irreversiblen Mechanismus-basierten Suizidinhibitoren und BW755C bzw. Phenidon [Mansuy 1988] aus der Klasse der Redoxinhibitoren als Leitstrukturen. Zahlreiche offenkettige und zyklische Verbindungen mit teilweise hochpotenter inhibitorischer Aktivität an der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 (SB-LO-1), der h5-LO und der humanen Cyclooxygenase (hCOX) wurden erhalten. Die Entdeckung der Triazoline als zyklische Amidrazone mit guter inhibitorischer Wirksamkeit an der SB-LO-1 und der h5-LO und wesentlich verbesserter Licht- und Sauerstoffstabilität führte schließlich zur Abkehr von den offenkettigen Verbindungen [Drutkowski 2003]. Eine zweifelsfreie Zuordnung der Amidrazone zu einer bestimmten Inhibitoriklasse gelang bisher nicht [Clemens 2001, Klietsch 2003].

In Fortsetzung dieser Arbeiten wurde mit der Synthese der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** eine weitere Klasse zyklischer Amidrazone mit potentieller h5-LO-Hemmung erschlossen. 1,2,4-Triazin-3-one waren bereits 1996 als potente h5-LO-Inhibitoren mit günstigem Nebenwirkungsprofil beschrieben worden [Bhatia 1996]. In einem Mausmodell für chronische myeloische Leukämie (CML) führte die kombinierte Anwendung eines Kinase-Inhibitors (Imatinib) mit einem h5-LO-Inhibitor (Zileuton) zu einem besseren therapeutischen Erfolg als die Monotherapie mit Imatinib [Chen 2009]. Aus diesen Erkenntnissen heraus sollten die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen neben der *in-vitro*-Testung auf h5-LO-Hemmung in intakten polymorphkernigen Granulozyten (PMNG) auch an der CML-Krebszelllinie K-562 auf Antiangiogenese-Aktivität getestet werden. Unerwarteterweise zeigten alle Verbindungen nur schwache bis keine antileukotriene Wirksamkeit im

Granulozytenassay. Der früher für mechanistische Studien und zur Vorauswahl potentieller h5-LO-Inhibitoren verwendete Sojabohnen-Lipoxygenase-1(SB-LO-1)-Assay wurde parallel durchgeführt. Dieser lieferte für die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** - ähnlich wie für ihre offenkettigen Amidrazonausgangsstoffen - IC₅₀-Werte im mikro- und submikromolaren Bereich (IC₅₀: 0,015-1,1 µM) und erwies sich damit als ungeeignet für die Suche nach Inhibitoren der h5-LO in dieser Substanzklasse. Die Testung der Substanzen **4a-d** auf antiangiogenetische Wirkung lieferte dagegen, verglichen mit Imatinib, moderate Hemmaktivitäten an K-562-Zellen. Eine antiangiogene Wirkung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** aufgrund zytotoxischer Eigenschaften konnte mittels eines entsprechenden Assays an HeLa-Zellen ausgeschlossen werden.

Die aus pharmakokinetischer Sicht interessanten Parameter wie Löslichkeit, Lipophilie und Serumalbuminbindung wurden ebenfalls bestimmt. Dabei zeigte sich, dass alle 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** gemäß der „rule-of-five“ von Lipinski, trotz hoher Lipophilie (log P_{O/W}: 3-5), theoretisch als oral bioverfügbare Wirkstoffe in Frage kommen, wegen ihrer mäßigen Löslichkeit aber wahrscheinlich einer besonderen galenischen Formulierung bedürfen. Ihre aufgrund der Lipophilie erwartete Bindung an humanes Serumalbumin war spektrofluorimetrisch (K_d: 2-10 µM) nachweisbar. Da sowohl bei den Suizidinhibitoren als auch bei den Redoxhemmern die Oxidierbarkeit bzw. das elektrochemische Verhalten für die Einschätzung ihrer inhibitorischen Potenz interessant ist, wurden die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** mittels Zyklovoltammetrie und eines Radikalfängertests mit 2,2'-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) auf diese Eigenschaften untersucht. Dabei offenbarte sich eine mit den Triazolinen vergleichbare Neigung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**, nach elektrochemischer Oxidation kinetisch stabile (persistente) Radikale zu bilden, welche sich reversibel zu ihren Ausgangsverbindungen reduzieren lassen [Krauth 2005, ¹Krauth 2009]. Im DPPH-Assay wurde, verglichen mit den Referenzverbindungen, nur ein schwacher antioxidativer Effekt festgestellt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Weiterentwicklung der offenkettigen Amidrazone zu Verbindungen vom 1,2,4-Triazin-5-on-Typ führte nicht zum Erhalt neuer h5-LO-Hemmer. Eine gute inhibitorische Aktivität einiger der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen an der SB-LO-1, welche wahrscheinlich nicht ausschließlich auf eine Redoxaktivität zurückzuführen ist, ließ sich nicht auf das humane Enzym übertragen, was die pflanzliche LO zur Charakterisierung potentieller h5-LO-Inhibitoren ungeeignet macht. Die Ergebnisse der Antiangiogenese-Untersuchungen an der Leukämie-Zelllinie K-562, die überraschenderweise in keinem Zusammenhang mit einer h5-LO-Hemmung oder Zytotoxizität stehen, weisen

jedoch auf eine mögliche bislang unbekannte Zielstruktur dieser Verbindungen hin. Das Ziel zukünftiger Arbeiten könnte neben einer weiteren Strukturoptimierung der 1,2,4-Triazin-5-one, unter Berücksichtigung der „*Rule-of-five*“-Kriterien, die Untersuchung dieser Verbindungen auf Hemmung der für die CML verantwortlichen BCR-ABL-Kinase sein.

Konformationsuntersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne nach Ligandenbindung

Auf der Suche nach Inhibitoren der h5-LO erfuhr deren C2-ähnliche regulatorische β -Faltblatt-domäne (Reste 1-114) in den letzten Jahren als potentielle Zielstruktur zunehmende Beachtung. Durch Verwendung homo- und heterobifunktioneller amin- und photoreaktiver Quervernetzungsreagenzien (*Cross-Linker*) in Kombination mit Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie waren Konformationsuntersuchungen an der rekombinanten C2-ähnlichen Domäne (Reste 1-133) in Lösung sowohl in An- als auch Abwesenheit der niedermolekularen Liganden LP₁₂₁ und B02 möglich. Zu diesem Zweck wurden zwei neue, von bekannten Photoaffinitätsmarkierungsreagenzien abgeleitete Cross-Linker mit Benzophenonrest und stabiler Isotopenmarkierung (SBDC, BBI) synthetisiert und mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS und ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS an Calmodulin (CaM) und der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO charakterisiert. Die Identifizierung der intramolekularen Quervernetzungsprodukte in der C2-ähnlichen Domäne sowie der (chemisch modifizierten) oberflächenexponierten Aminosäuren erfolgte mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS und lieferte wertvolle Informationen über die mögliche Ligandenbindungsregion und die, mittels Röntgenstrukturanalyse schwer abschätzbare, dynamische Flexibilität des Proteins in Lösung. So ermöglichten die ersten Cross-Linking-Versuche die Zugänglichkeit bestimmter Lysine (K44, 78, 88, 93, 122, 133) in der rekombinanten C2-ähnlichen Domäne durch deren chemische Modifizierung und massenspektrometrische Analyse mit der h5-LO-Röntgenkristallstruktur (pdb: 3O8Y) [Gilbert 2011] zu vergleichen und zu bestätigen. Diese Experimente wurden mit einer ungereinigten Charge des Proteins (C2_{alt}), dem Liganden LP₁₂₁ und unter Verwendung homobifunktioneller aminreaktiver Quervernetzungsreagenzien (BS²G-D₀/D₄, BS³-D₀/D₄) durchgeführt. Im Lysin-Modifizierungsmuster von C2_{alt} zeigte sich keine Veränderung in Abhängigkeit des Liganden LP₁₂₁. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion wahrscheinlich nicht in der Nähe der an der Proteinoberfläche lokalisierten Lysinseitenketten (K44, 78, 88, 93, 122, 133) stattfindet. Intramolekulare Quervernetzungen waren mit C2_{alt} und LP₁₂₁ nicht nachweisbar.

Eine weiterentwickelte Proteinreinigungsmethode unter Zuhilfenahme des Detergenzes Brij-35 und hydrophober Interaktionschromatographie ermöglichte die Durchführung weiterer

Experimente mit einer Charge gereinigten Proteins ($C2^*_{\text{neu}}$). Ebenfalls unter Verwendung der Cross-Linker BS^2G - und BS^3-D_0/D_4 gelang es, Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne zu erhalten und über die Auswertung der, in Abhängigkeit des Liganden B02, unterschiedlichen Fragmentationsspektren Konformationsänderungen zu beobachten. So schienen sich in Anwesenheit des Liganden die Aminosäurereste von Y99 und Y105 stärker an der Proteinoberfläche zu präsentieren, während K93 offenbar abgeschirmt wurde. Unter der Voraussetzung einer größeren dynamischen Flexibilität des C-terminalen Bereiches (Reste 117-133) in Lösung und nativer Faltung des Proteins nach Reinigung mit Brij-35 sind die Ergebnisse der Quervernetzungsexperimente plausibel. Mit den heterobifunktionellen amin- und photoreaktiven Cross-Linkern (SBC/SBDC und BBI) konnten keine Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne gefunden werden. Im Muster der modifizierten Reste (vorwiegend Lysinseitenketten) ergaben sich keine Unterschiede in Abhängigkeit des Liganden B02. Mit dem neu synthetisierten cystein- und photoreaktiven Cross-Linker BBI konnte ein Cystein (C104) der C2-ähnlichen Domäne erfolgreich modifiziert werden. Dies war zuvor mit dem thiol- und photoreaktiven Maleidobenzophenon (Mal-BP) nicht gelungen. Inwieweit das Detergenz Brij-35, welches häufig bei der Reinigung von Membranproteinen zum Einsatz kommt [Corin 2011], die native Konformation des Proteins beeinflusst, konnte nicht abschließend geklärt werden. Circular dichroismus-Spektren der in HEPES-Puffer (0,1 M und 1 M; pH 7,4) gelösten C2-ähnlichen Domäne waren nur bedingt auswertbar.

Aufgrund der festgestellten Photoreaktivität des Liganden B02 wurden weitere Untersuchungen mit photoreaktiven Quervernetzungsreagenzien wie SBC/SBDC unterlassen. Photo-Addukte zwischen B02 und der C2-ähnlichen Domäne waren nicht nachweisbar. Während der spektrofluorimetrischen Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) von B02 an einer ohne Detergenz gereinigten C2-ähnlichen Domäne ($C2_{\text{neu}}$, K_d : 8-16 μM) wurde ein Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen Ligand und Protein beobachtet, der aufgrund der geringen Ressourcen an B02 und C2-ähnlicher Domäne jedoch nicht weiter verfolgt wurde. Die im ersten Teil dieser Arbeit synthetisierten 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** wurden aufgrund ihrer Unwirksamkeit an der h5-LO in PMNG nicht an der C2-ähnlichen Domäne untersucht.

(Photo-)chemisches Cross-Linking mit MALDI-TOF/TOF-MS/MS ermöglichte, auf der Grundlage der h5-LO-Röntgenkristallstruktur plausible Strukturdaten der C2-ähnlichen Domäne in Lösung zu erhalten und erste Aussagen über konformative Veränderungen der regulatorischen Domäne nach Ligandenbindung zu treffen. Für weitergehende

Interaktionsuntersuchungen mit potentiellen Liganden der C2-ähnlichen Domäne, insbesondere der spektrofluorimetrischen K_d -Wert-Bestimmung und einer Fortsetzung der FRET-Experimente, müsste die Proteinreinigung weiter optimiert werden.

Summary

Synthesis and characterization of potential h5-LO inhibitors

Among the six human lipoxygenases (h-LOs) known to date, the human h5-LO is of outstanding pathophysiological importance due to its pivotal role in leukotriene biosynthesis. These lipid mediators are arachidonic acid metabolites, and are well known for their involvement in immune defense processes, in pain development, chronic inflammation and anaphylactic reactions. An influence on tumorigenesis is likely and has been topic of numerous studies [Radmark 2010, Haeggström & Funk 2011].

Since the mid-1980s, the optimization of arachidonic acid cascade inhibitors with amidrazone structure has been a goal of research at the Institute of Pharmacy, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Established LO-inhibitors, such as benzaldehyde phenylhydrazone and hexanal phenylhydrazone, belonging to the class of irreversible mechanism-based suicide inhibitors as well as BW755C and phenidone belonging to the class of redox inhibitors served as lead structures. A number of open-chain and cyclic compounds with partially highly potent inhibitory activities towards the soybean-lipoxygenase-1 (SB-LO-1), h5-LO and the human cyclooxygenase (hCOX) were synthesized. The discovery of the triazolines as cyclic amidrazones exhibiting high inhibitory potencies towards both the SB-LO-1 and the h5-LO together with improved light- and oxygen-stabilities led to a decline of the open-chain compounds [Drutkowski 2003]. A clear classification of the amidrazones within a well-defined group of inhibitors has not been accomplished yet [Clemens 2001, Klietsch 2003].

In order to extend these previous research efforts, 1,2,4-triazin-5-ones **4a-h** were synthesized, opening a new class of cyclic amidrazones with potential h5-LO-inhibition. In 1996, 1,2,4-triazine-3-ones were described as potent h5-LO-inhibitors with favorable side effects [Bhatia 1996]. In a recent study, mice suffering from chronic myeloid leukemia (CML) were treated with a mixture of a kinase inhibitor (imatinib) and a h5-LO-inhibitor (zileuton) resulting in improved therapeutic results compared to treatment with imatinib alone [Chen 2009]. From these findings, the compounds synthesized in this work should be tested for their antiangiogenic activity towards the CML-cancer cell line K-562 in addition to h5-LO-inhibition in polymorphonuclear neutrophil granulocytes (PMNG). Unexpectedly, all 1,2,4-triazine-5-ones **4a-h** showed only weak to no anti-leukotriene activity in PMNG assays. The soybean lipoxygenase-1(SB-LO-1)-assay that had been used in the early days for mechanistic studies and for screening of potential h5-LO-inhibitors was conducted in parallel yielding IC_{50} values in the micro- and submicromolar range (IC_{50} : 0,015-1,1 μ M), which were comparable

to these of open-chain amidrazones. Thus, the SB-LO-1 assay proved to be inappropriate for screening h5-LO inhibitors. For compounds **4a-d**, moderate inhibitory activities towards K-562 were observed. An anti-angiogenic effect of the 1,2,4-triazin-5-ones **4a-d** due to cytotoxic properties was excluded by an HeLa cell based assay.

Relevant pharmacokinetic parameters such as solubility, lipophilicity, and serum albumin binding were additionally determined. 1,2,4-triazine-5-ones **4a-h** are potentially orally bioavailable agents according to Lipinski's "rule-of-five" despite their high lipophilicities ($\log P_{O/W}$: 3-5). Nevertheless, special pharmaceutical formulation will be mandatory due to the modest solubilities of these compounds. Binding to human serum albumin was spectrofluorimetrically analyzed and resulted in dissociation constants in the low micromolar range (K_d : 2-10 μ M) presumably, due to the compounds' high lipophilicities. Both for the suicide inhibitors and the redox inhibitors, redox potential and electrochemical behavior have to be considered to evaluate their inhibitory properties. Therefore the 1,2,4-triazine-5-ones **4a-h** were investigated by cyclic voltammetry and by a radical scavenger test with diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH). Compared to triazolines a similar behavior was observed for 1,2,4-triazine-5-ones **4a-h** resulting in the formation of persistent radicals after electrochemical oxidation, which could be reversibly reduced [Krauth 2005, ¹Krauth 2009]. In the DPPH assay, only a weak antioxidative effect was observed compared to the reference compounds. Conclusively, the aim to expand the class of open-chain amidrazones into 1,2,4-triazine-5-ones did not result in novel h5-LO inhibitors. A remarkable inhibitory effect of several of the novel substances described herein towards the SB-LO-1, which is presumably not simply explained by antioxidative properties, was not found for the human enzyme, rendering the plant lipoxygenase inappropriate to screen for h5-LO inhibitors. The antiangiogenic properties towards leukemia cell line K-562 that are surprisingly not related to h5-LO inhibition or cytotoxicity, pointing to a potential novel target for these compounds. For future studies structural optimization of the 1,2,4-triazine-5-ones, in respect to inhibition of the CML specific BCR-ABL kinase could be envisioned.

Conformational Studies of the C2-like Domain upon Ligand Binding

During the past years of searching for h5-LO inhibitors, the C2-like regulatory β -barrel domain (residues 1-114) of h5-LO has attracted increasing attention as potential drug target. Homo- and heterobifunctional amine- and photoreactive cross-linkers combined with nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF mass spectrometry were employed to conduct conformational studies *in-solution* of recombinant C2-like domain (residues 1-133) alone as well as in the

ligand (LP₁₂₁ or B02)-bound form. For that purpose, two novel cross-linkers derived from known photoaffinity reagents were synthesized containing a benzophenone residue and a stable isotope label (SBDC, BBI). Both cross-linkers were characterized by MALDI-TOF/TOF-MS/MS and ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS using calmodulin and the C2-like domain of h5-LO. *In-depth* MS analysis of intramolecular cross-links within the C2-like domain and determination of exposed amino acids was performed by nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS and yielded valuable information on the putative ligand binding region and the dynamic *in-solution* flexibility of the protein, which is difficult to predict from the X-ray crystal structure. Initial cross-linking experiments confirmed specific solvent-exposed lysines (K44, 78, 88, 93, 122, 133) in the recombinant C2-like domain as suggested by the X-ray structure of h5-LO [Gilbert 2011] (pdb: 3O8Y). These experiments were conducted using a batch of protein (C2_{alt}, mixture of protein components after TEV cleavage of fusion protein (MBP-C2)), the ligand LP₁₂₁, and the homobifunctional amine-reactive cross-linkers (BS²G-D₀/D₄, BS³-D₀/D₄). The lysine modification pattern of C2_{alt} was not changed upon addition of LP₁₂₁ ligand. Therefore, we assume that protein-ligand interaction does not occur in the regions surrounding these lysines that are localized on the protein surface (K44, 78, 88, 93, 122, 133). Neither intermolecular cross-links between C2_{alt} and LP₁₂₁ nor intramolecular cross-links within the C2-like domain were detected.

An improved purification strategy relying on the detergent Brij-35 and hydrophobic interaction chromatography allowed conducting further cross-linking experiments with purified protein (C2*_{neu}, purified C2-like domain after TEV-cleavage). Several intramolecular cross-linked products were detected within ligand-bound C2-like domain using BS²G- and BS³-D₀/D₄. In the presence of B02, tyrosines Y99 and Y105 were found to be solvent accessible, while K93 was apparently shielded. Assuming that the C-terminus possesses a higher dynamic flexibility (amino acids 117-133) in solution and that the protein is still correctly folded after purification with Brij-35, the results of the cross-linking experiments are plausible. With the heterobifunctional amine- and photoreactive cross-linkers (SBC/SBDC and BBI) no intramolecular cross-links were found within the C2-like domain. Modification patterns of amino acids (mainly lysines) did not show any differences between ligand-bound and free protein. In contrast to the cysteine- and photoreactive cross-linker maleidobenzophenone (Mal-BP), the novel reagent BBI allowed to modify a cysteine residue (C104) in the C2-like domain. So far, it remains unclear to which extent the detergent Brij-35, which is frequently used for purification of membrane proteins [Corin 2011], influences the

native conformation of the C2-like domain. Circular dichroism spectra of the C2-like domain in HEPES buffer (0.1 M and 1 M; pH 7,4) were only of limited value.

Further investigations with photo-reactive cross-linkers, such as SBC/SBDC, were omitted owing to the photoreactivity of B02. Searching for photo-adducts between B02 and the C2-like domain did not yield any results. Interestingly, a Förster resonance energy transfer (FRET) between ligand and protein was observed during spectrofluorimetric binding studies between C2-like domain (C2_{neu}) and B02 (K_d : 8-16 μ M). Yet, this effect was not investigated in more detail due to the limited resources of B02 and C2-like domain. The, 1,2,4-triazine-5-ones **4a-h** described in the first part of this work were not investigated for their inhibitory activities towards the C2-like domain due to their lack of activity towards the h5-LO from PMNG.

Based on the X-ray crystal structure of h5-LO (photo-)chemical cross-linking experiments combined with MALDI-TOF/TOF-MS/MS allowed obtaining structural data on the C2-like domain in solution as well as gaining insights into conformational changes within the regulatory domain after ligand binding. Yet, protein purification strategies have to be optimized for further interaction studies between the C2-like domain and potential ligands, namely spectrofluorimetric K_d measurements and follow-up FRET studies.

1 Einleitung und Zielstellung

Mit der Identifizierung der humanen 5-Lipoxygenase (h5-LO, Arachidonat-5-Lipoxygenase, EC 1.13.11.34) als Schlüsselenzym in der Biosynthese pro-inflammatorischer und -allergischer Leukotriene (LTB₄, Cysteinyl-LTs: LTC₄-E₄) begann Anfang der 1980er Jahre [Samuelsson 1983] die intensive Erforschung des LO-Regelkreises. Zum Greifen nah erschien das Ziel, neue therapeutische Optionen für die Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis, allergische Rhinitis und auch Krebs zu erhalten. Doch während die Eicosanoid-Biosynthese auf dem humanen Cyclooxygenase(hCOX)-Weg (Prostaglandine, Thromboxane) durch die Isoformen hCOX-1 und hCOX-2 (Prostaglandin G/H synthase 1/2, EC 1.14.99.1) relativ früh verstanden und therapeutisch beeinflusst werden konnte (z.B. durch nichtsteroidale Antirheumatika, NSAR), gibt die h5-LO nach mehr als 25 Jahren intensiver Forschungsarbeit weiterhin Rätsel auf. Zwar konnten zahlreiche Entdeckungen zum besseren Verständnis der Enzymaktivierung und der pathologischen LT-Wirkung beitragen. Die Entwicklung hochpotenter und für den Menschen verträglicher Wirkstoffe blieb jedoch weit hinter den Erwartungen zurück. Die Kompliziertheit des Systems zeigt sich auch in der Tatsache, dass es erst Anfang 2011 gelang, durch die Identifizierung und den anschließenden Austausch einer destabilisierenden Aminosäuresequenz (K653E, K654N, K655L) innerhalb der h5-LO, eine Röntgenkristallstruktur des menschlichen Enzyms zu erhalten [Gilbert 2011]. Davor diente ein Homologie-Modell, basierend auf den Strukturinformationen der 1997 von Gillmor erhaltenen Röntgenkristallstruktur der Retikulozyten-15-LO vom Kaninchen, als Forschungsgrundlage [Gillmor 1997, Hammarberg 2000].

Für mechanistische Studien und die Suche nach potentiellen LO-Inhibitoren behalf man sich über längere Zeit vorrangig mit der bereits intensiv erforschten LO-1 aus der Sojabohne *Glycine max.* (SB-LO-1, seed lipoxygenase-1, EC 1.13.11.12), von der schon frühzeitig Strukturinformationen zur Verfügung standen [Shibata 1987, Boyington 1993, Minor 1993, Minor 1996]. Bezogen auf das Substrat Arachidonsäure stellt dieses Enzym eine 15-LO dar. Die gute Handhabbarkeit und Stabilität verbunden mit einer hohen Konservierung der Aminosäuren im aktiven Zentrum der SB-LO-1 im Vergleich zu den Säuger-LOs (h5-LO, Kaninchen-Retikulozyten-15-LO) [Prigge 1996] dienten, trotz einer geringen Gesamtsequenzhomologie von nur ~27%, als Rechtfertigung für die Verwendung des pflanzlichen Enzyms als Testsystem. Daneben etablierten sich zahlreiche *in-vitro*-Inhibitionsassays unter Verwendung von intakten oder lysierten 5-LO-produzierenden Zellen,

wie z.B. polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNG) tierischen oder menschlichen Ursprungs [Radmark 1980, Steinhilber 1986, Kupfer 1996, Schneider 2005] und Testverfahren auf der Basis von humanem Vollblut [Larsson 1998, Frohberg 2006, Sud'ina 2008, Masferrer 2010].

Unter den unzähligen Wirkstoffkandidaten, die über die Jahre entwickelt und untersucht wurden, sind die Verbindungen mit Hydrazon- und Säureamidhydrazonstruktur seit Langem als potente LO-Inhibitoren bekannt [Baumann 1982, Ghiglieri-Bertez 1987, Frohberg 1995]. Ausgehend von den Leitstrukturen 1-Phenyl-3-Pyrazolidon (Phenidon) [Blackwell 1978], 3-Amino-1-[3-(trifluormethyl)phenyl]-2-pyrazolin (BW755C) [Radmark 1980, Mansuy 1988, Cucurou 1991] und verschiedenen Phenylhydrazonen, v.a. Benzaldehydphenylhydrazon [Sun 1980, Wallach 1981, Galey 1988, Bombard 1993], wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Säureamidhydrazonderivate in offener (kurz: Amidrazone) und zyklischer Form (Triazoline, Triazole, Benzotriazepine) als COX- und LO-Hemmer synthetisiert und getestet [Harenberg 1987, Nuhn 1993, Frohberg 1995, Clemens 2001, Drutkowski 2003]. Dabei konnte für einige Amidrazone durch die Zyklisierung eine erhöhte Stabilität gegenüber Licht und Sauerstoff bei gleichbleibender Wirksamkeit erreicht werden. Eine Korrelation der mittels Zykl voltammetrie bestimmten Redoxaktivität der Amidrazone und deren Derivaten mit der inhibitorischen Wirksamkeit an der SB-LO-1 konnte nicht beobachtet werden. Auffällig war jedoch die erhöhte Persistenz der durch elektrochemische Oxidation intermediär gebildeten Radikalkationen bei den zyklischen Amidrazonen [Krauth 2005, ¹Krauth 2009]. Zur Theorie stabiler und persistenter Radikale sei auf die Übersichtsarbeit von Hicks verwiesen [Hicks 2007].

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten zwei Ziele verfolgt werden:

1.) Ausgehend von offenkettigen Amidrazonen als Synthesebausteine sollte über einen Ringschluss die neue Substanzklasse der 1,2,4-Triazin-5-one erschlossen und charakterisiert werden. Dabei sollte vor der pharmakologischen Testung auf h5-LO-Inhibition eine Abschätzung der potentiellen oralen Bioverfügbarkeit gemäß der „*Rule-of-five*“-Deskriptoren vorausgehen. Ein bekannter Synergie-Effekt zwischen h5-LO- und BCR-ABL-Kinasehemmern bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) sollte durch Testung der neuen Verbindungen an der Leukämie-Zell-Linie K-562 überprüft werden [Chen 2009].

2.) In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Steinhilber (Institut für Pharmazeutische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.) sollten mittels (photo-) chemischer Quervernetzung und hochauflösender Massenspektrometrie Konformationsänderungen innerhalb der rekombinanten *N*-terminalen C2-ähnlichen Domäne der h5-LO nach Inkubation mit zwei niedermolekularen Liganden (LP₁₂₁, B02) untersucht werden. Das Ziel sollte die Identifizierung einer neuen Bindungsstelle für h5-LO-Inhibitoren an der C2-ähnlichen Domäne sein.

2 Theoretischer Teil

2.1 Lipoxygenasen

2.1.1 Historie der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOs) katalysieren den positions- und stereospezifischen Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäure-Ester mit einer cis, cis-1,4-Pentadien-Grundstruktur, wie z.B. Arachidonsäure (C₂₀-Fettsäure, Säugetier) oder Linol- und α -Linolensäure (C₁₈-Fettsäuren, Pflanzen) [Ivanov 2005]. Die erste Erwähnung einer LO - aus dem Samen der Sojabohne *Glycine max.* - stammt aus dem Jahr 1932. Damals wurde sie noch als Lipoxidase bezeichnet [Andre 1932]. Nach erfolgreicher Isolierung und Kristallisierung des Enzyms im Jahre 1947 [Theorell 1947] dauerte es noch weitere 46 Jahre, bis die ersten Röntgenstrukturdaten der beiden Isoformen LO-1 und LO-3 vorlagen [Boyington 1993, Minor 1993, Minor 1996, Skrzypczak-Jankun 1997]. Zu den nachgewiesenen Aufgaben pflanzlicher LOs zählt die Mitwirkung an der Synthese von Aroma-, Abwehr- und Signalstoffen. Die zur Gruppe der Oxylipine zählende Jasmonsäure, ein Derivat der α -Linolensäure, ist beispielsweise neben der Abwehr von Pflanzenpathogenen an der Wachstumsregulierung und der Seneszenz beteiligt [Heldt 2003, Liavonchanka 2006]. Hamberg, Samuelsson und Nugteren entdeckten Mitte der 1970er Jahre eine Säuger-LO, welche die Arachidonsäure am Kohlenstoffatom 12 oxidiert (Arachidonat-12-Lipoxygenase, EC 1.13.11.31) [Hamberg 1974, Nugteren 1975]. Man war bisher davon ausgegangen, dass es sich bei LOs ausschließlich um pflanzliche Enzyme handelt. In den folgenden Jahren gelang es der Arbeitsgruppe Samuelsson (Karolinska Institut Stockholm, Schweden), eine Arachidonat-5-LO in PMNG des Kaninchens zu identifizieren [Borgeat 1976] und deren Bedeutung in der Biosynthese pro-inflammatorischer und –allergischer Leukotriene (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) nachzuweisen. 1982 erhielt Samuelsson zusammen mit Sune K. Bergström (Karolinska Institut Stockholm, Schweden) und John R. Vane (The Wellcome Research Laboratories, Beckenham, United Kingdom) den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin „for their discoveries concerning prostaglandins and related biologically active substances” [Samuelsson 1983].

Nur fünf Jahre später konnte Samuelsson von der Entdeckung einer weiteren Gruppe von h5-LO-Metaboliten, den sogenannten Lipoxinen (LX, *lipoxygenase interaction products*) berichten [Samuelsson 1987]. Diese Trihydroxyeicosatetraensäuren (LXA₄, LXB₄) entstehen durch eine Interaktionsreaktion zwischen 15- oder 12-LO mit 5-LO und besitzen, wie man heute weiß, sowohl anti-inflammatorische als auch LT-antagonistische Wirkungen [Serhan

2005]. Die kürzlich entdeckten sogenannten Aspirin-getriggerten Lipoxine (15-epi-LXA₄, 15-epi-LXB₄) werden durch das Zusammenwirken von h5-LO und durch Acetylsalicylsäure acetylierter hCOX-2 gebildet [Serhan 2005].

Die erste Röntgenkristallstruktur einer Säuger-LO publizierten Gillmor und Kollegen im Jahr 1997 mit der 15-LO aus Kaninchenretikulozyten, welche einen gebundenen Inhibitor enthielt [Gillmor 1997]. 2005 gelang Oldham die Kristallisierung einer 8-LO (Arachidonat-8-Lipoxygenase, EC 1.13.11.40) aus der karibischen Koralle *Plexaura homomalla*, welche die außergewöhnliche Eigenschaft hat, an Stelle von *S*-stereoisomeren Hydroperoxyfettsäuren die Bildung von *R*-Stereoisomeren zu katalysieren [Oldham 2005, Neau 2009]. 2008 wurde der Mechanismus des anti-inflammatorischen Effektes einer mit essentiellen ω -3-Fettsäuren hochdosierten Ernährung aufgeklärt. Verantwortlich sind die unter Beteiligung der h5-LO aus Eicosapentaen- (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA) gebildeten Resolvine (Resolvin D1, Resolvin E1) und Protectine (Protectin D1) [Serhan 2008]. Seit Abschluss des Humangenomprojektes im Jahr 2003 sind die Gene für alle LO-Isoformen identifiziert (Tab. 1).

Tab. 1: Humane LO-Gene und bevorzugte Verbreitung der entsprechenden LO-Isoform [modifiziert nach Walther 2003].

Gen-Bezeichnung	LO-Isoform	Hauptsächliches Vorkommen ¹⁾
ALOX15	15-LO-1	Retikulozyten, eosinophile Granulozyten, Bronchial-epithelzellen
ALOX15B	15-LO-2	Haarwurzeln, Haut, Prostata, Cornea, Bronchialepithelzellen
ALOX12	Plättchen-Typ 12-LO	Thrombozyten, Epidermis
ALOX12B	12R-LO	Haut, Tonsillen
ALOXE3	Epidermis-Typ LO-3	Haut
ALOX5	5-LO	Leukozyten, dendritische Zellen

¹⁾ Literatur, siehe Walther 2003 und Haeggström & Funk 2011

Mit der ersten röntgenkristallographischen Strukturaufklärung einer humanen LO, der h5-LO im Jahr 2011 durch Gilbert und Kollegen hat die LO-Forschung einen weiteren Höhepunkt erreicht [Gilbert 2011]. Das bisher etablierte h5-LO-Modell auf der Grundlage der Retikulozyten-15-LO vom Kaninchen konnte schließlich abgelöst werden. In den überlagerten Strukturmodellen der Säuger-LOs h5-LO, Kaninchen-Retikulozyten-15-LO und

der 8R-LO aus der Koralle erkennt man eine hohe Konservierung der Sekundärstrukturen mit Ausnahme einer einzigartig verkürzten Helix $\alpha 2$ in der katalytischen Domäne der h5-LO (Abb. 1).

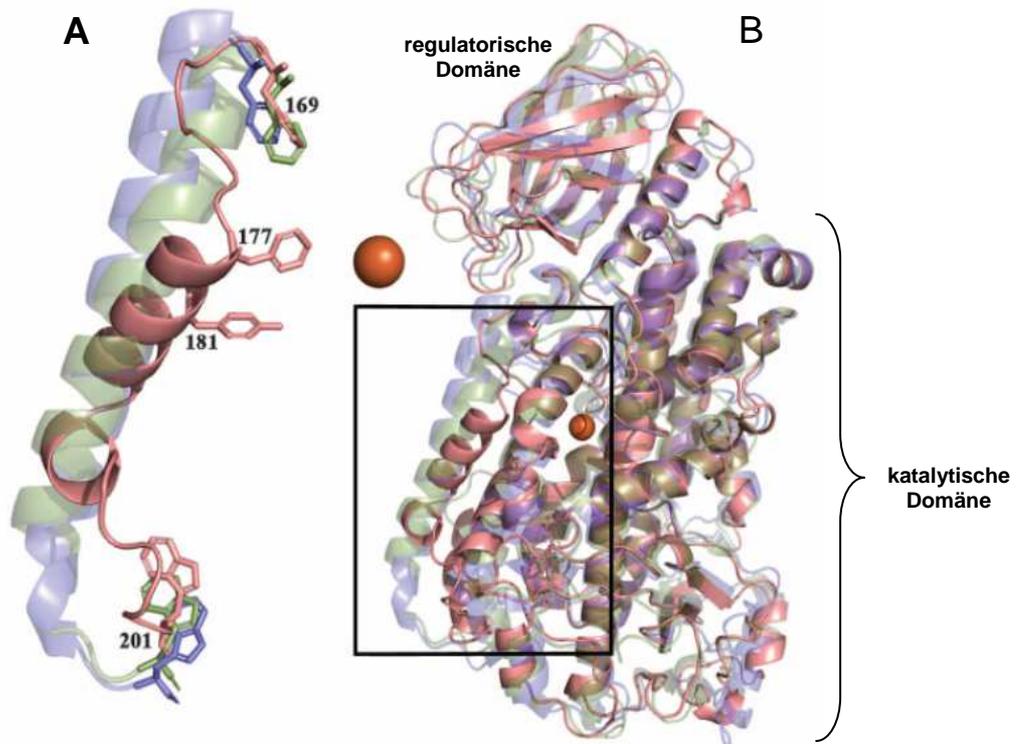


Abb. 1: Röntgenstruktur der stabilen h5-LO mit einer Auflösung von 2,4 Å (rosa, pdb: 3O8Y). (A) Einzigartige Faltung in der Helix $\alpha 2$ der katalytischen Domäne der h5-LO (rosa). (B) Hohe Konservierung der Sekundärstrukturen zwischen den LOs. Die Sequenzidentität zwischen h5-LO und der Retikulozyten-15-LO vom Kaninchen (blau) und der 8R-LO aus *Plexaura homomalla* (grün) beträgt jeweils ~ 40%. Das katalytische Eisenion ist in orange dargestellt [modifiziert nach Gilbert 2011].

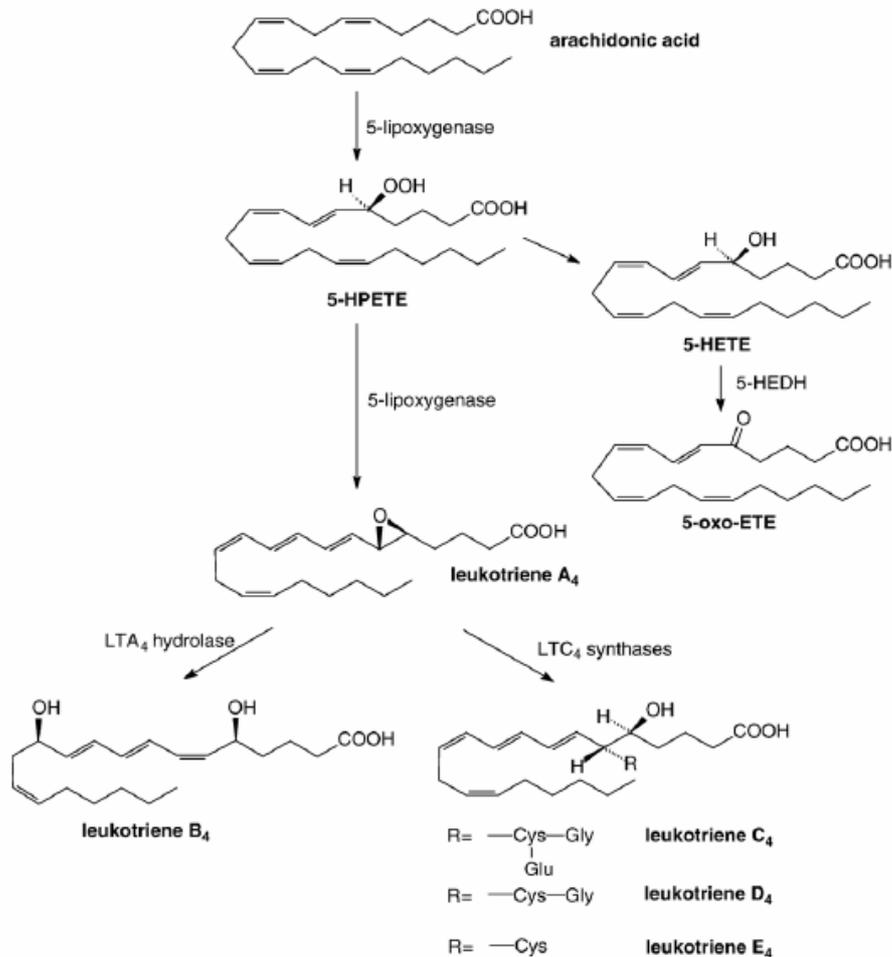
2.1.2 Die Rolle der h5-LO in der Arachidonsäurekaskade

Die h5-LO wird vorwiegend in Zellen der Pathogenabwehr, wie PMNG, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, B-Lymphozyten und in Schaumzellen aus atherosklerotischem Gewebe exprimiert. Es handelt sich um ein monomeres Enzym aus 672 oder 673 Aminosäuren (~ 78 kD). In der Tertiärstruktur lassen sich zwei voneinander differenzierbare Domänen unterscheiden. Eine N-terminale C2-ähnliche regulatorische β -Faltblattdomäne (AS 1-114) und eine größere C-terminale α -helikale katalytische Domäne (AS 121-673), welche in ihrem Zentrum ein prosthetisch gebundenes Eisenion ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) enthält (Abb. 1) [Radmark 2010]. Untersuchungen an der Ligand-freien 15-LO aus Kaninchenretikulozyten in Lösung deuten auf eine erhöhte Bewegungsfreiheit der beiden Domänen gegeneinander über einen hochflexiblen, sekundärstrukturfreien Aminosäureabschnitt (*random coil*) hin [Hammel 2004].

Der stimulatorische Reiz zur Bildung der LTs durch h5-LO kann auf vielfältige Art stattfinden. Der am längsten bekannte Aktivierungsweg zur h5-LO-katalysierten LT-Synthese führt über einen Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration. In mehreren Studien konnte eine Bindungsstöchiometrie von 2:1 (2 Mol Ca^{2+} : 1 Mol h5-LO) mit einer Dissoziationskonstanten (K_d) von $\sim 6 \mu\text{M}$ ermittelt werden [Hammarberg 1999, Kulkarni 2002]. Interessanterweise konnte *in-vitro* bei erhöhten Phosphatidylcholin (PC)- oder Arachidonsäurespiegeln eine h5-LO-Aktivierung unabhängig von einer Ca^{2+} -Stimulierung beobachtet werden [Skorey 1998]. Nucleotide, insbesondere ATP, wirken in Anwesenheit von Ca^{2+} an einer bisher unbekanntenen Bindungsstelle kostimulierend auf h5-LO [Okamoto 2005]. Diese Interaktion macht man sich auch bei der Proteinreinigung der h5-LO mittels ATP-Affinitätschromatographie zunutze [Zhang 2000]. Zellstress (Natriumarsenit, osmotischer Stress, Hitzeschock) induziert insbesondere in Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren eine gesteigerte LT-Synthese durch Aktivierung stimulierender Kinasen (MK2 phosphoryliert S271 und ERK2 phosphoryliert S663). Ein cAMP-Anstieg in der Zelle mobilisiert stattdessen die inhibierende Proteinkinase A (PKA phosphoryliert S523) [Werz 2001, ¹Werz & Steinhilber 2005, Radmark 2010]. Gemeinsam mit der ebenfalls aktivierten zytosolischen Phospholipase $A_2\alpha$ (cPLA $_2\alpha$), welche auch eine Ca^{2+} -sensitive regulatorische β -Faltblattdomäne enthält, assoziiert die h5-LO an der Kernmembran der Zelle. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Interaktion mit den zwitterionischen Phospholipiden (PL) der Kernmembran (v.a. Phosphatidylcholin) von Seiten der regulatorischen β -Faltblattdomäne über eine mögliche PL-Bindungsstelle vollzogen wird. Das humane Coactosin-ähnliche Protein (CLP, 142 Aminosäuren), ein weiterer stimulierender Kofaktor von h5-LO, der möglicherweise als eine Art Chaperon agiert, besitzt eine vergleichbar starke Affinität zu dieser Bindungsstelle [Provost 1999, Provost 2001, Rakonjac 2006]. Glyceride, wie 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) stimulieren h5-LO an derselben Bindungsstelle, allerdings nur in Abwesenheit von Ca^{2+} [Hörnig 2005]. Die cPLA $_2\alpha$ hydrolysiert die PL der Kernmembran und setzt dadurch Arachidonsäure frei. Diese wird vom membranständigen 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP, Monomer: ~ 18 kD), einem Protein aus der Familie der MAPEGs (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*) der h5-LO „präsentiert“. FLAP liegt als Homotrimer vor und ist homolog zur humanen LTC $_4$ -Synthase mit 33% Sequenzidentität [Ferguson 2007, Haeggström & Funk 2011]. Ein ausreichend hoher Fettsäurehydroperoxid(LOOH)-Tonus sorgt schließlich dafür, dass das prosthetisch gebundene Eisenion in seiner aktiven Form (Fe^{3+}) vorliegt. Eine durch

Calciumionen erhöhte Affinität von LOOH an eine vermutete regulatorische Fettsäurebindungsstelle wird diskutiert [Bürkert 2003].

In einer von h5-LO katalysierten Dioxygenase-Reaktion kommt es zur Insertion eines Moleküls Sauerstoff an Position 5 der Arachidonsäure und damit zur Bildung von 5S-Hydroperoxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure (5-HPETE) (Schema 1). Die anschließende Umwandlung von 5-HPETE zu LTA₄ wird ebenfalls über h5-LO (LTA₄-Synthase-Aktivität) katalysiert. Auf einer alternativen Route kann aus 5-HPETE durch Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)-Aktivität 5S-Hydroxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure (5-HETE) entstehen, aus der sich durch 5-HEDH (5-Hydroxy-eicosanoid-dehydrogenase) 5-Oxo-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure (5-oxo-ETE), ein starkes Chemotaktikum für Eosinophile und Monozyten, bilden kann [Powell 2005, Grant 2009]. Aus dem instabilen LTA₄ erhält man mittels LTA₄-Hydrolase (Neutrophile, Monozyten) das gleichfalls stark chemotaktisch aktive LTB₄ oder durch LTC₄-Synthase (Mastzellen, Eosinophile) die stark bronchokonstriktorisches Peptidoleukotriene (Cys-LT) LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Für die verschiedenen h5-LO-Metabolite konnte eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als Zielstruktur identifiziert werden: Die BLT₁- und BLT₂-Rezeptoren für LTB₄ [Yokomizo 1997, Yokomizo 2000], die CysLT₁- und CysLT₂-Rezeptoren für die Peptidoleukotriene (intrinsische Aktivität am Cys-LT₁-Rezeptor: LTD₄ > LTC₄ > LTE₄ bzw. am Cys-LT₂-Rezeptor: LTD₄ = LTC₄ > LTE₄) [Lynch 1999, Heise 2000, Evans 2002, Singh 2010] und der OXE-Rezeptor für 5-oxo-ETE [Hosoi 2002, Jones 2003, Powell 2005].



Schema 1: Der h5-LO-Weg der Arachidonsäurekaskade. 5-HPETE: 5S-Hydroperoxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure, 5-HETE: 5S-Hydroxy-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure, 5-HEDH: 5-Hydroxy-eicosanoid-dehydrogenase, 5-oxo-ETE: 5-Oxo-eicosa-6,8,11,14-tetraensäure [nach Werz 2006].

2.1.3 Pathophysiologie der h5-LO und Inhibitionsmechanismen

Eine Vielzahl allergischer und entzündlicher Reaktionen werden durch eine vermehrte Ausschüttung von h5-LO-Metaboliten, v.a. LTs, ausgelöst [Werz 2006]. Beim Bronchialasthma spielt ein erhöhter Spiegel der Cys-LTs eine entscheidende Rolle [Samuelsson 1987, Lewis 1990]. Diese Mischung (LTC₄, LTD₄, LTE₄), früher auch als „*slow reacting substance of anaphylaxis*“ [Feldberg & Kellaway 1938, Murphy 1979] bezeichnet, wirkt stark bronchokonstriktorisch, hypersensibilisierend und etwa 1000mal stärker als Histamin [Dahlén 1981]. Diese Effekte werden v.a. über den CysLT₁-Rezeptor vermittelt. Bei entzündlichen Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis und Psoriasis ist die Beteiligung der LTs am Krankheitsgeschehen noch uneindeutig. Während die Gabe des direkten h5-LO-Hemmers Zileuton (Abb. 2) in einer Studie zu einer signifikanten Verbesserung bei Patienten mit atopischer Dermatitis und chronischer Urtikaria führte [Woodmansee & Simon 1999],

konnte dieses Ergebnis bei mit an Psoriasis Erkrankten nicht reproduziert werden [Degreef 1990, van de Kerkhof 1996]. Ähnlich zwiespältig ist die Bedeutung der LTs bei entzündlichen Darmerkrankungen und rheumatoider Arthritis. Obwohl in frühen Studien der 1980er Jahre erhöhte LT-Spiegel in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis [Klickstein 1980, Davidson 1983] und in der Darmmukosa von Patienten mit entzündlicher Darmerkrankung [Sharon & Stenson 1984, Lobos 1987] gemessen wurden, konnte die Gabe von Zileuton keinen lindernden therapeutischen Effekt erzielen [Weinblatt 1992, Hawkey 1997, Roberts 1997]. Neuere Studien belegen einen möglichen Nutzen von Antileukotrienen bei kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich Atherosklerose, Schlaganfall, Myokardinfarkt und Aortenaneurysma [Werz 2006]. Die Wirkungen von LTs auf das kardiovaskuläre System, wie Koronararterienverengung und die Erhöhung der Kapillardurchlässigkeit für Plasma, sind seit den frühen 1980er Jahren bekannt [Feuerstein 1984, Letts 1987]. Bei der Osteoporose scheint die Mehrzahl der h5-LO-Metaboliten (Cys-LTs, LTB₄, 5-HETE) die Aktivität der Knochen abbauenden Osteoklasten zu verstärken [Werz 2006].

Eine wachsende Anzahl an Studiendaten legt eine funktionelle Beteiligung des h5-LO-Regelkreises an der Proliferation und Metastasierung verschiedener Krebszellen, wie z.B. Prostata- und Pankreaskrebs [Ghosh 1998, Fischer 2010], Neuroblastom [van Rossum 2002] und Leukämie [Chen 2009] nahe.

Auf dem Weg zur Entwicklung potenter antileukotriener Verbindungen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Strategien verfolgt. Dabei lassen sich bis heute fünf Inhibitorklassen unterscheiden, die im Folgenden beschrieben werden:

1.) Eisenchelatoren

Hierzu zählen Hydroxamsäure- und *N*-Hydroxyharnstoff-Derivate. Neben ihrer Eigenschaft, das Eisenion des aktiven Zentrums der h5-LO zu chelatisieren, besitzen sie auch schwache Redoxeigenschaften [²Werz & Steinhilber 2005]. Die Substanz A-46077 (Zileuton, Zylflo[®], IC₅₀: 0,5-1 µM, Abb. 2) ist der bisher einzige und nur in den USA für die Behandlung von Asthma bronchiale zugelassene direkte reversible h5-LO-Hemmer aus dieser Wirkstoffklasse. Bei anderen pathologischen Zuständen, wie rheumatoider Arthritis oder entzündlichen Darmerkrankungen, die mit einer vermehrten LT-Bildung in Zusammenhang gebracht werden, konnte Zileuton nicht überzeugen [Carter 1991, Werz 2006].

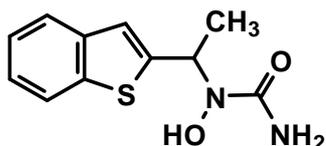


Abb. 2: Eisenchelatierender Redoxinhibitor A-46077 (Zileuton®).

2.) Redoxaktive Verbindungen

In diese Gruppe fallen hauptsächlich lipophile aromatische Verbindungen mit unspezifischer antioxidativer Wirkung, die neben der Reduktion des katalytischen Eisens (Fe^{3+}) der h5-LO auch andere Redoxprozesse in der Zelle beeinflussen können (Abb. 3). Prominente Vertreter sind Pflanzeninhaltsstoffe, wie z.B. Flavonoide [Baumann 1980], Cumarine, Derivate der Kaffeesäure wie Cinnamyl-3,4-dihydroxy- α -cyano-cinnamat (CDC) [Pergola 2011] und Polyphenole wie die Nordihydroguaiaretsäure (NDGA) aus dem Kreosotbusch *Larrea tridentata* oder 3,5,4'-Trihydroxystilben (Resveratrol) aus der Weinbeere *Vitis vinifera* [Jang 1997, Pinto 1999]. CDC und NDGA besitzen aufgrund ihres Katecholcharakters auch einen chelatierenden Effekt auf Eisenionen [Pergola 2011]. Die Verbindung AA-861 fällt aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu natürlichen Chinonen, wie z.B. dem Ubichinon-10 ins Auge [Ford-Hutchinson 1994]. Bei den artifiziellen Verbindungen, wie z.B. Phenidon und BW755C [Radmark 1980, Cucurou 1991], handelt es sich vorwiegend um instabile Moleküle, die zum Teil erhebliche Nebenwirkungen (z.B. Methämoglobinbildung) aufweisen [Fort 1984, Bruneau 1991, Lau 1992, Ford-Hutchinson 1994].

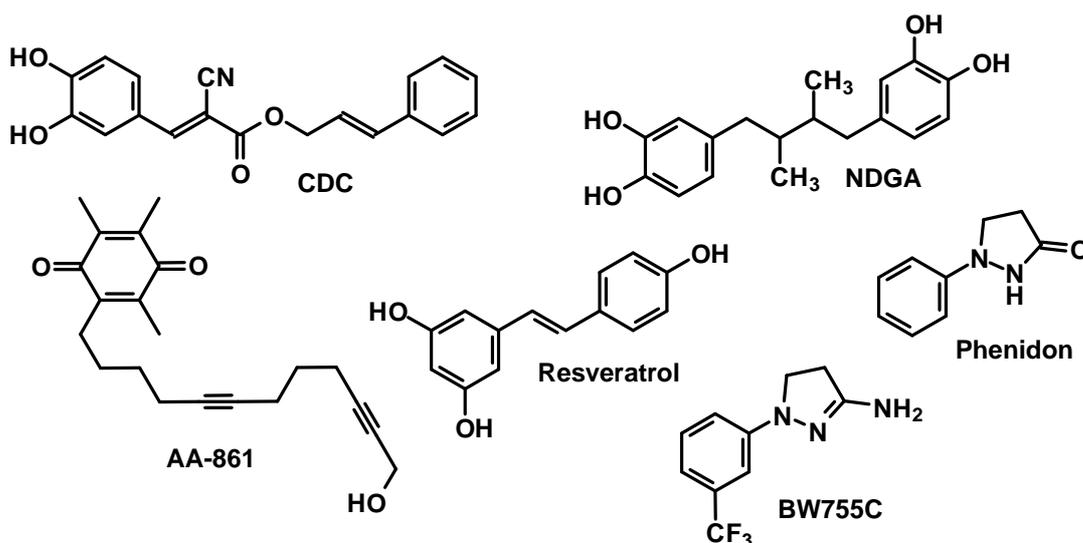


Abb. 3: Redoxaktive Lipoxygenase-Inhibitoren.

3.) Nicht-redoxaktive Inhibitoren

Der unspezifischen und unselektiven Wirkung der redoxaktiven Verbindungen geschuldet, begann früh die Suche nach sogenannten Hemmern vom Nicht-Redox-Typ [Falgueyret 1993, Ford-Hutchinson 1994]. Doch während die meisten Verbindungen dieser Sorte, wie z.B. ZD2138 (Abb. 4) an intakten PMNG und im Vollblut eine gute Wirksamkeit zeigten, waren die Hemmaktivitäten im Zell-Homogenat eher mäßig [Crawley 1992, Werz 1998, Werz 2006]. Untersuchungen konnten nachweisen, dass bei einem hohen Spiegel an Fettsäureperoxiden – wie im Zell-Homogenat festgestellt – die Wirkung dieser Nicht-Redox-Hemmer an einer regulatorischen Arachidonsäure-Bindungsstelle kompetitiv antagonisiert werden kann [Wertz 1998, Bürkert 2003].

Für Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA, Abb. 4), ein Naturstoff aus dem indischen Weihrauch, scheint dagegen der Peroxidtonus in der Zelle keine Rolle für ihre inhibitorische Aktivität zu spielen [Wertz 1998]. Eine Ca^{2+} -abhängige, nicht-kompetitive Wirkung an der regulatorischen Arachidonsäure-Bindungsstelle wird für AKBA diskutiert [Safayhi 1995, Sailer 1998].

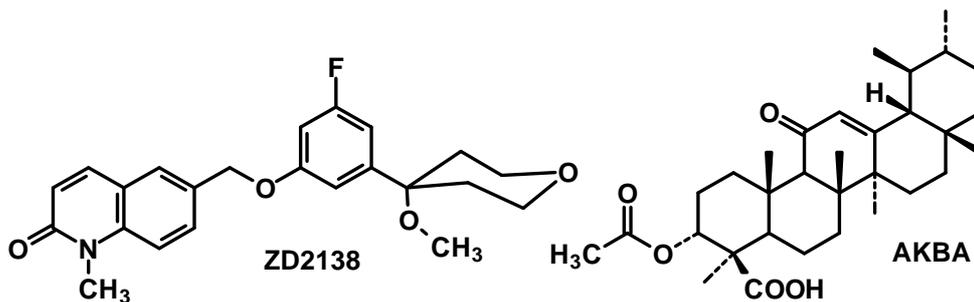


Abb. 4: Lipoxygenase-Inhibitoren vom Nicht-Redox-Typ.

4.) FLAP-Inhibitoren

Durch Hemmung des in der Kernmembran lokalisierten Substrat-Transportproteins FLAP kommt es zu einer eingeschränkten Bereitstellung von Arachidonsäure für h5-LO und damit zu einer verminderten LT-Synthese. Potente Hemmer im Granulozytenassay sind z.B. MK-886 und Bay-X1005 (Abb. 5), die jedoch im humanen Vollblutassay nicht überzeugen konnten [Wertz & Steinhilber 2005]. Neueste Studien legen eine FLAP-Inhibition als antileukotrienen Wirkmechanismus des dualen hCOX/h5-LO-Hemmers Licofelone (ML-3000) nahe [Fischer 2007].

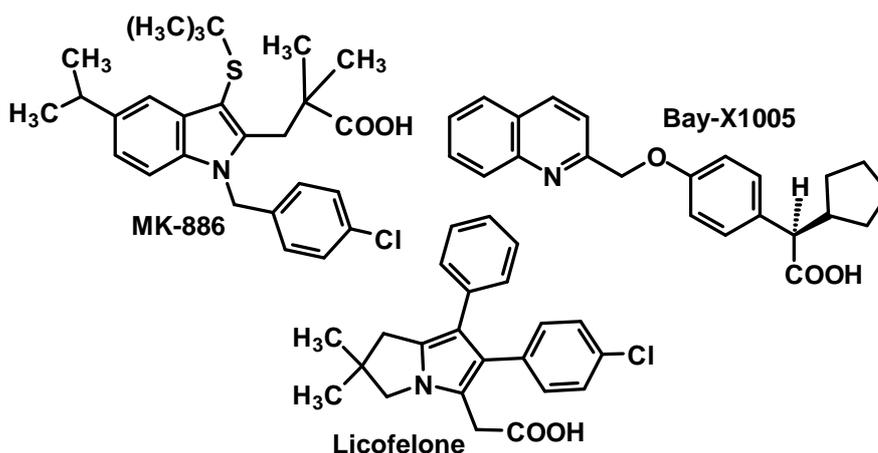


Abb. 5: FLAP-Inhibitoren.

5.) Leukotrien-Rezeptorenblocker

Trotz intensiver Forschung ist der Cys-LT₁-Rezeptor-Inhibitor Montelukast (Singulair[®], Abb. 6) der einzige in Deutschland zugelassene Wirkstoff aus dieser Gruppe. Montelukast ist indiziert als Zusatzbehandlung bei Patienten ab 6 Monaten, die unter einem leichten bis mittelgradigen persistierenden Asthma leiden, das mit einem inhalativen Kortikoid nicht ausreichend behandelt und durch die bedarfsweise Anwendung von kurzwirksamen β -Sympathomimetika nicht ausreichend unter Kontrolle gebracht werden kann. Weitere Indikationen sind die saisonale allergische Rhinitis und Belastungsasthma (Fachinfo-Service, Rote Liste Service GmbH, Stand: Mai 2011). Nur im Ausland zugelassene Analogpräparate sind Pranlukast (Onon[®], Ultair[®]) und Zafirlukast (Accolate[®]). Inhibitoren am Cys-LT₂- oder BLT₁-/BLT₂-Rezeptor befinden sich noch in frühen Entwicklungsstadien.

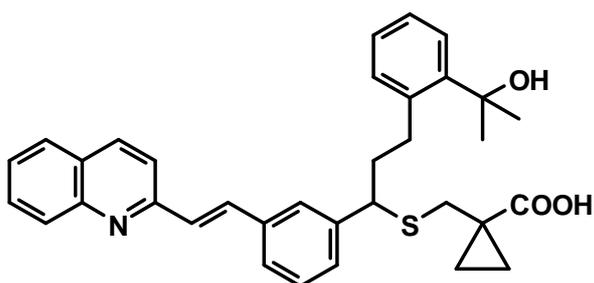


Abb. 6: Leukotrien-Rezeptorenblocker Montelukast (Singulair[®]).

6.) Sonstige Inhibitoren

6.a) Mechanismus-orientierte Inhibitoren

In diese Gruppe fallen Verbindungen, die als Substratanaloga von LOs umgesetzt werden und diese dadurch inhibieren. Zu dieser Gruppe zählen die sog. *irreversiblen Suizid-Inhibitoren* wie C₂₀-Acetylenfettsäuren (beschrieben für Eicosa-5,8,11,14-tetrainsäure an SB-LO-1 und

15-Retikulozyten-LO [Kühn 1984]), Phenylhydrazonen (beschrieben für humane PMNG [Steinhilber 1986] und für SB-LO-1 [Galey 1988]) (Abb. 7) und das durch h5-LO erzeugte Arachidonsäurederivat 5-HPETE (Schema 1, beschrieben für Meerschweinchen-PMNG [Aharony 1987]). Die in der Arachidonsäure-Kaskade durch Reduktion von 5-HPETE gebildete 5-HETE (Schema 1) wirkt an der h5-LO nur noch als kompetitiver, reversibler Hemmer [Aharony 1987].

Während die inhibitorische Wirksamkeit der, verglichen mit den Phenylhydrazonen, strukturell ähnlichen offenkettigen Säureamidhydrazone (Amidrazone) mit hoher Wahrscheinlichkeit auch einem Suizidmechanismus unterliegt, hemmen die zyklischen Amidrazone (z.B. Triazoline) (Abb. 7) kompetitiv und reversibel [Nuhn 1993, Froberg 1995, Clemens 2001].

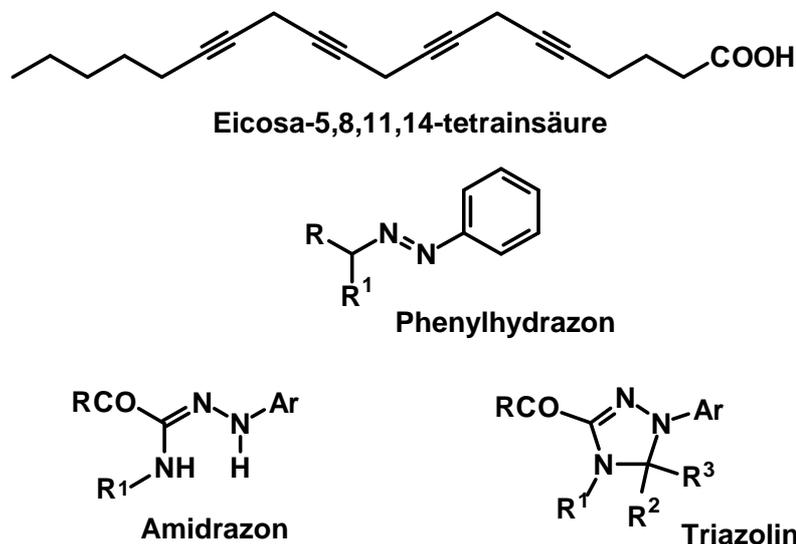


Abb. 7: Mechanismus-orientierte Inhibitoren.

6.b) Selen-organische Verbindungen

Die am weitesten entwickelte Verbindung aus dieser Gruppe ist der lipophile und wenig toxische Multi-Enzymhemmer Ebselen (PZ 51, 2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on) (Abb. 8), welcher in niedriger Konzentration eine Vielzahl inflammatorischer Enzyme (15-LO, 5-LO, Prostaglandin-H-Synthase-1, NO-Synthase, NADPH-Oxidase, Proteinkinase C, H⁺/K⁺-ATPase, Papain) inhibiert [Schewe 1995] und sich gegenwärtig in mehreren klinischen Studien der Phase III zur Erprobung als Wirkstoff befindet [Sarma 2008]. Ausschlaggebend für die antileukotriene Wirkung an der h5-LO und 15-Retikulozyten-LO ist zum einen eine Veränderung der Eisenligandensphäre im aktiven Zentrum des Enzyms durch Interaktion mit benachbarten Thiolgruppen aus Aminosäureseitenketten. Dabei ist der Mechanismus nicht-kompetitiv und irreversibel, wenn sich die LO im Grundzustand (Fe²⁺) befindet und

kompetitiv im aktiven Zustand (Fe^{3+}) [Walther 2003]. Zusätzlich senkt Ebselen durch eine Glutathion-Peroxidase(GSH-Px)-ähnliche Aktivität den Hydroperoxidtonus in der Zelle [Schewe 1994].

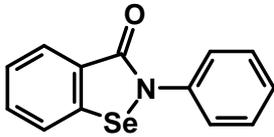
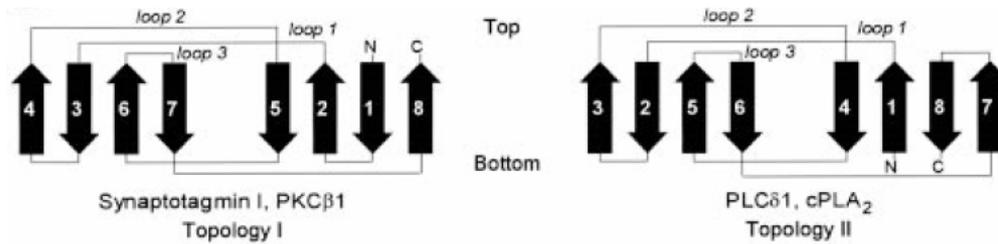


Abb. 8: Der Selen-organische h5-LO-Inhibitor Ebselen.

2.1.4 Die C2-ähnliche Domäne

C2-Domänen sind regulatorische Untereinheiten von Proteinen aus durchschnittlich 130 Aminosäuren. Die Sekundärstruktur ist durch zwei jeweils viersträngige antiparallele β -Faltblätter gekennzeichnet, die über insgesamt sieben Schleifen (*loops*) miteinander verbunden sind. Funktionell sind sie an Signaltransduktionsvorgängen und Membraninteraktionen beteiligt. Neben den EF-Hand-Motiven handelt es sich um die am weitesten verbreiteten Ca^{2+} -abhängigen Domänen. Die meisten Informationen über Struktur und Funktion von C2-Domänen stammen aus Studien mit Phospholipase C δ 1 (PLC δ 1, EC 3.1.4.11, 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat phosphodiesterase delta-1), Proteinkinase C (PKC, EC 2.7.11.13, ATP: Protein-phospho-transferase), zytosolischer Phospholipase A $_2\alpha$ (cPLA $_2\alpha$, EC 3.1.1.4, Phosphatidylcholin-2-acylhydrolase) und Synaptotagmin I [Rizo 1998]. PLC δ 1 hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-triphosphat [Lee 1995]. PKC, in der die erste C2-Domäne identifiziert wurde, gehört zu einer Familie von Proteinkinasen, die durch Diacylglycerol und andere Lipide reguliert werden [Nishizuka 1988, Newton 1997]. Die cPLA $_2\alpha$ hydrolysiert PLs in der Kernmembran und setzt dabei Arachidonsäure, den Vorläufer pro-inflammatorischer Eicosanoide, wie die Prostaglandine und LTs, frei [Clark 1995, Dessen 1999]. Synaptotagmin I ist ein transmembranäres Protein in der Zytoplasmamembran synaptischer Speichervesikel und gilt als Calciumionensensor für die Exozytose vesikulärer Neurotransmitter [Brose 1992, Geppert 1994]. Es besitzt zwei C2-Domänen (C $_2$ A, C $_2$ B).

Die erste räumliche Struktur einer C2-Domäne stammt aus NMR- und Röntgenstrukturdaten der C $_2$ A-Domäne des Synaptotagmin I [Sutton, 1995]. Strukturanalysen weiterer C2-Domänen offenbarten topologische Orientierungen in zwei möglichen Ausprägungen (Topologie I: Synaptotagmin I [C $_2$ A-Domäne] und PKC β ; Topologie II: PLC δ 1 und cPLA $_2\alpha$) (Schema 2). C2-Domänen der Topologie II finden sich normalerweise am N-Terminus eines Proteins, am C-Terminus können beide Topologien auftreten.



Schema 2: Darstellung der unterschiedlichen Topologien für C2-Domänen am Beispiel von Synaptotagmin I (Topologie I, links) und PLC δ 1 (Topologie II, rechts). Die drei Schleifen (*loops*), an denen die Ca²⁺-Bindung erfolgt, sind hervorgehoben (loop 1, 2, 3). N: N-Terminus, C: C-Terminus. [Rizo 1998].

Die der cPLA₂ α ähnliche Aktivierung der h5-LO durch Calciumionen (K_d (cPLA₂ α): ~10 μ M; K_d (h5-LO): ~6 μ M) und die vergleichbar hohe Affinität zu neutralen PLs, wie dem vorwiegend in der Kernmembran lokalisierten Phosphatidylcholin (PC), war Anlass für Hammarberg und Kollegen, die regulatorische N-terminale Domäne der h5-LO strukturanalytisch zu untersuchen. Dies führte 2000 zu einem ersten räumlichen Modell auf Grundlage der Kristallstruktur der 15-Retikulozyten-LO vom Kaninchen und zur Lokalisierung eines Ca²⁺-Bindungsmotivs innerhalb der Schleife 2 (*loop 2*) an den Aminosäuren N43, D44 und E46 (Abb. 9) [Hammarberg 2000]. Inzwischen existieren Daten, die auf zwei getrennte Ca²⁺-Bindungsmotive um die Aminosäuren F14, A15, G16 (*loop 1*), D79 (*loop 3*) und D18, D19 (*loop 1*), L76 (*loop 3*) hindeuten (Abb. 9) [Bindu 2004]. Trotz fehlender C2-Topologie und einer auffälligen, um 45° gekreuzten Orientierung der beiden viersträngigen antiparallelen β -Faltblätter in der regulatorischen Domäne der h5-LO gegenüber einer weitgehend parallelen Anordnung in der cPLA₂ α [Dessen 1999] (Abb. 9) kann bei der N-terminalen Domäne der h5-LO anhand ihrer strukturellen u.v.a. funktionellen Ähnlichkeit von einer C2-ähnlichen Domäne gesprochen werden [Hammarberg 2000].

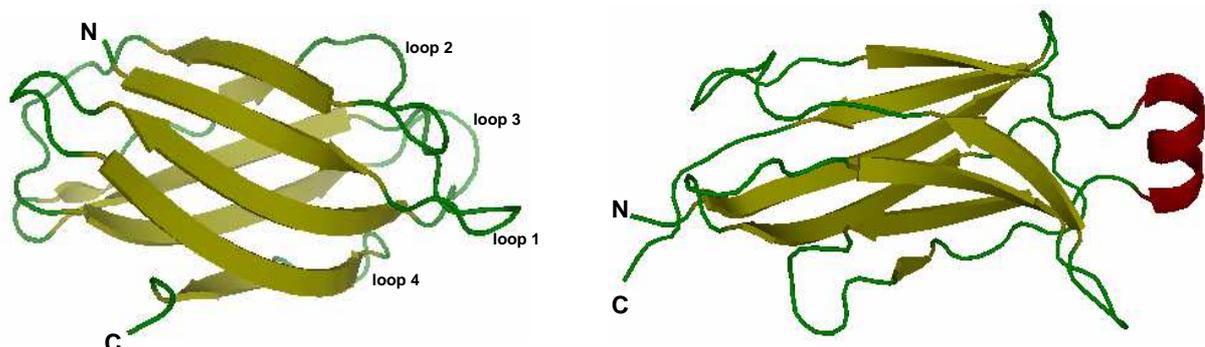


Abb. 9: Die C2-ähnliche Domäne der stabilen h5-LO (pdb: 3O8Y) (links) im Vergleich zur C2-Domäne der cPLA₂ α (pdb: 1CJY) (rechts). Die für die Ca²⁺-Bindung und Membraninteraktion bedeutenden Schleifenregionen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne (*loop1-4*) sind gekennzeichnet. (Abb. erstellt mit Pymol v0.99).

Übereinstimmungen in der Sequenz und Topologie zwischen den regulatorischen Domänen von Polycystin-1, Lipoxygenase und α -Toxin führten schließlich zur Einführung einer C2-Unterklasse, den PLAT-Domänen [Radmark 2005].

Interaktionsstudien mit isolierter C2-ähnlicher Domäne von h5-LO und die Erstellung eines Homologiemodells auf Grundlage der C2-Domäne von *Clostridium perfringens* α -Toxin (einer Phospholipase C, pdb: 1qmd) konnten 2002 eine Ca^{2+} -abhängige selektive Bindung an zwitterionisches, in der Kernmembran lokalisiertes PC über die Aminosäuren W13 (*loop 1*), W75 (*loop 3*), W102 (*loop 4*) (Abb. 9) zeigen, wie sie schon für die cPLA₂ α beschrieben wurde [Bittova 1999, Cho 2001]. Es wird vermutet, dass die Ca^{2+} -Bindung zu konformativen Veränderungen in der PL-Bindungsregion der regulatorischen Domäne (W13, W75, W102) führt und damit eine Annäherung an die hydrophobe Kernmembran erleichtert [Kulkarni 2002]. Weitere, die Aktivität der h5-LO beeinflussende Kofaktoren, welche vermutlich mit der PL-Bindungsstelle interagieren, sind Glyceride wie 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG) [Hörnig 2005] und das Coactosin-ähnliche Protein (CLP), von dem eine Chaperon-artige Stabilisierungsfunktion für die h5-LO angenommen wird [Provost 2001, Rakonjac 2006, Esser 2010].

Für mechanistische und strukturelle Untersuchungen an isolierter C2-ähnlicher Domäne der h5-LO exprimierte Michel (Arbeitsgruppe Prof. Steinhilber, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.) diese in *E. coli* als Fusionsprotein (MBP-C2) mit dem löslichkeits-vermittelnden Affinitätsmarker Maltose-Bindungsprotein (MBP) N-terminal, getrennt durch eine TEV-Spaltstelle (ENLYFQ/G). Die Reinigung der C2-ähnlichen Domäne nach der Amylose-Affinitätschromatographie und der TEV-Protease-Spaltung von MBP-C2 konnte mit Hilfe hydrophober Interaktions-chromatographie (HIC) erreicht werden [Michel 2008].

2.1.5 Kleine Moleküle als Liganden an der C2-ähnlichen Domäne

Das ursprünglich als dualer PPAR _{α/γ} -Agonist synthetisierte Pirinixinsäure-Derivat LP₁₂₁ [Popescu 2007] zeigte in einem zellfreien Assay mit dem 100.000g-Überstand eines h5-LO überexprimierenden *E. coli*-Lysates eine moderate Hemmaktivität (IC₅₀: 34 μM) [Werz 2008], welche durch die dosisabhängige Zugabe von PC, dessen Bindungsmotiv sich innerhalb der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO befindet (2.1.4), aufgehoben werden konnte [Michel 2008] (Abb. 10). Die in den 1990er Jahren entdeckten Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) [Issemann & Green 1990] sind intrazelluläre nukleäre Rezeptoren, welche bei der Regulierung des Lipoproteinstoffwechsels (PPAR _{α}) und des

Blutzuckerspiegels (PPAR γ) eine wichtige Rolle spielen. Vor Kurzem konnte eine antientzündliche Wirkung durch PPAR-Aktivierung gezeigt werden [Devchand 1996, Varga 2011]. Durch Liganden-basierte Pharmakophorsuche nach dualen hCOX/h5-LO-Inhibitoren mit der Alignment-Software PHAST (*pharmacophore alignment search tool*) wurde mit B02 (Abb. 10) eine Verbindung gefunden, die sowohl an intakten PMNG, als auch im zellfreien 100.000g-Überstand des h5-LO überexprimierenden *E.coli*-Lysates vielversprechende Hemmaktivitäten zeigte (IC₅₀: 0,9 μ M bzw. IC₅₀: 0,65 μ M) [Hofmann 2008, Rödl 2011], allerdings ohne sich in eine bekannte Inhibitor-Klasse einordnen zu lassen. Daten, die mit Hilfe eines Kompetitionssassays an der h5-LO gewonnen wurden, weisen auf eine Interaktion der beiden Verbindungen mit der regulatorischen C2-ähnlichen Domäne hin [Michel 2008].

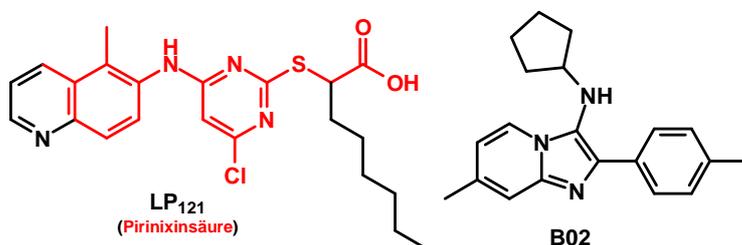


Abb. 10: Strukturformeln der untersuchten Liganden der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO.

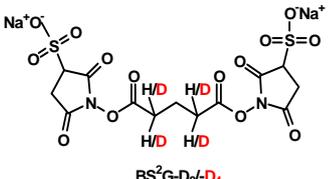
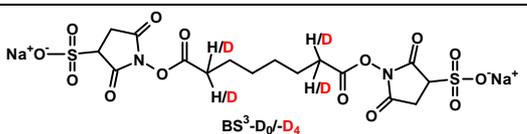
2.2 Chemisches Cross-Linking zur Strukturuntersuchung von Proteinen

Beim chemischen Cross-Linking¹ werden zwei Moleküle (intermolekular) oder Abschnitte innerhalb eines Moleküls (intramolekular) kovalent mit einem Vernetzungsreagenz einer definierten Länge (*Cross-Linker*) miteinander verknüpft. Diese Reaktion funktioniert je nach Reaktivität der Kopfgruppen des Cross-Linkers mit Peptiden, Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden, Zelloberflächen oder Wirkstoffen [Back 2003]. Voraussetzung für das Gelingen einer Quervernetzung ist zum einen die Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen der Reaktionspartner und zum anderen die für eine Distanzüberbrückung notwendige Länge des Cross-Linkers. Nach der erfolgreichen Verknüpfung werden durch enzymatische Spaltung des vernetzten Proteins stabile Cross-Linking-Produkte zwischen einzelnen Peptiden erhalten, die nach ihrer Isolation und chromatographischen Reinigung massenspektrometrisch analysiert werden können. Nach Auswertung der Fragmentionen-Massenspektren (MS/MS) können die Bindungspartner, d.h. die vernetzten Aminosäuren zweier Peptide, eindeutig identifiziert werden. Das chemische Cross-Linking stellt damit eine Technik dar, um in Verbindung mit der Massenspektrometrie niederaufgelöste dreidimensionale Strukturen von Proteinen und deren Komplexen zu ermitteln.

2.2.1 Isotopenmarkierte homobifunktionelle Cross-Linker mit aminreaktiver Estergruppe

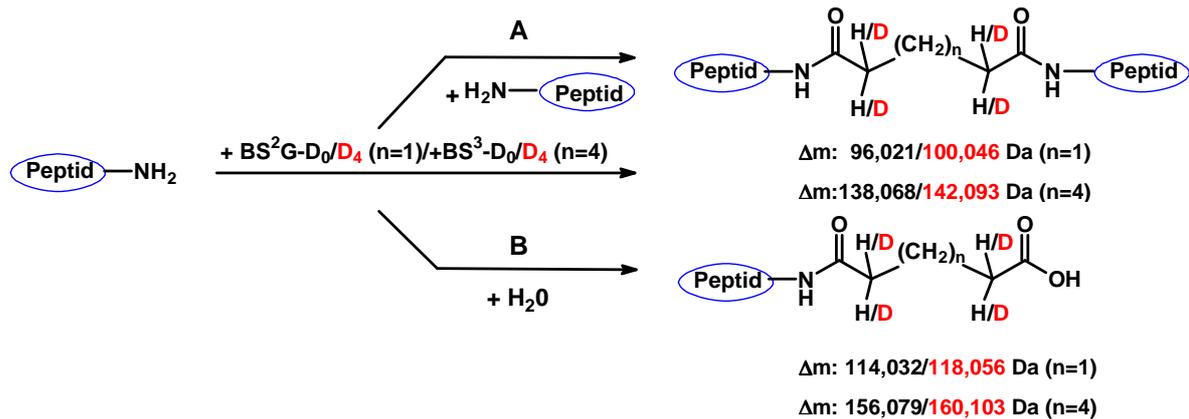
Die am häufigsten eingesetzten Quervernetzungsreagenzien mit beidseitiger aminreaktiver Funktionalität sind die homobifunktionellen *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester). Kommerziell sind eine Vielzahl solcher Verbindungen erhältlich bei denen beispielsweise durch Variation der Kohlenwasserstoffkettenlänge (*Spacerlänge*) innerhalb der Moleküle die Reichweite der möglichen Distanzüberbrückung vergrößert oder verkleinert werden kann (www.piercenet.com). Die Verwendung von 1:1-Mischungen aus isotopenmarkierten (D_4) und unmarkierten (D_0) Quervernetzungsreagenzien vereinfacht die analytische Auswertung und das Erkennen markierter oder vernetzter Peptide durch die Präsenz zweier identischer Massenspektren, welche eine charakteristische Massenverschiebung, z.B. 4 amu (Schema 3) besitzen. Limitierungen aufgrund geringer Wasserlöslichkeit lassen sich durch die Verwendung der entsprechenden sulfo-NHS-Derivate umgehen [Sinz 2006] (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete isotopenmarkierte homobifunktionelle Cross-Linker.

Strukturformel	<i>Spacerlänge</i> (Å)	Spezifität
 <p style="text-align: center;">BS²G-D₀/⁻D₄</p>	7,7	primäre Amine (Hydroxylgruppen)
 <p style="text-align: center;">BS³-D₀/⁻D₄</p>	11,4	primäre Amine (Hydroxylgruppen)

NHS-Ester besitzen als Nukleophile eine besondere Reaktionsaffinität zu primären aliphatischen Aminen, mit denen sie unter Ausbildung von Säureamidbindungen eine kovalente Verknüpfung eingehen können (Schema 3) [Sinz 2003]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass neben der bekannten Bevorzugung von primären Aminogruppen, wie sie z.B. in den Seitenketten von Lysinen zu finden sind, auch Hydroxylgruppen, wie in den Seitenketten von Serin, Tyrosin und Threonin, als Bindungspartner in Frage kommen [Kalkhof & Sinz 2008]. Dabei hat neben dem pH-Wert der Lösung auch die Nachbarschaft zu bestimmten Aminosäuren einen Einfluss auf die Reaktivität [Mädler 2009].

¹ Es wird der englische Ausdruck „*Cross-Linking*“ anstatt „Quervernetzung“ verwendet, da sich dieser in der Literatur durchgesetzt hat.



Schema 3: Reaktionsmechanismus für die Umsetzung eines homobifunktionellen NHS-Esters ($\text{BS}^2\text{G-D}_0/\text{D}_4$, $n=1$ oder $\text{BS}^3\text{-D}_0/\text{D}_4$, $n=4$) mit Amino- oder Hydroxylgruppen aus Aminosäureseitenketten (Lysin, Serin, Threonin, Tyrosin) eines Proteins. (A) Als Produkte entstehen bei erfolgreicher Reaktion beider aktivierter Estergruppen Quervernetzungsprodukte (*Cross-Links*) innerhalb des Proteins (intraeptidal oder intereptidal). (B) Nach hydrolytischer Spaltung einer NHS-Esterfunktion werden nur einfach modifizierte Peptidspezies erhalten. In der praktischen Durchführung der Experimente wurden die jeweiligen NHS-Ester in ihrer undeutierten (D_0) und vierfach deuterierten (D_4) Form in einem molaren Verhältnis 1:1 eingesetzt, um die massenspektrometrische Identifizierung der Cross-Linking-Spezies zu erleichtern.

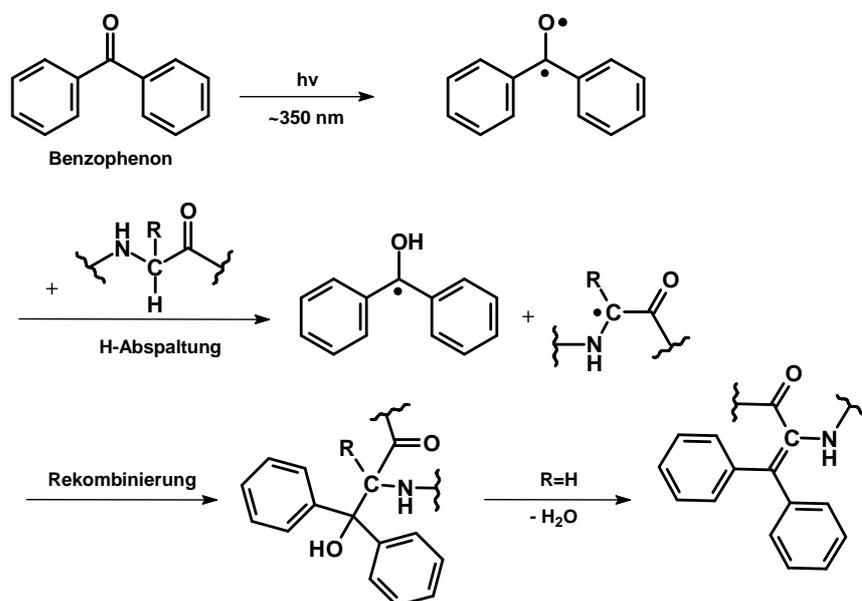
2.2.2 Heterobifunktionelle Cross-Linker mit photoreaktiver Benzophenongruppe

Das photoreaktive Diarylketon Benzophenon (BP) besitzt in der biochemischen Forschung, z.B. zur Untersuchung von Proteinkonformationen, mehrere klare Vorteile gegenüber anderen Photovernetzungsreagenzien [Prestwich 1997]:

- höhere chemische Stabilität als Diazoester, Arylazide und Diazirine
- stabil bei Raumlicht
- Aktivierungswellenlänge (330-360 nm) liegt in einem für Proteine unschädlichen Bereich
- keine Photodissoziation nach Aktivierung
- bevorzugte Reaktion mit C-H-Gruppen selbst in Anwesenheit von Wasser und freien Nucleophilen

Bei der Absorption von langwelligem UV-Licht durch das Photophor BP kommt es zur Bildung eines diradikalischen Tripletzustandes (Schema 4). Der Elektronenmangel am Carbonylsauerstoff ermöglicht einen elektrophilen Angriff an schwachen C-H $_{\alpha}$ -Bindungen, was zu einer Wasserstoffabspaltung führt. Über einen radikalischen Übergangszustand bildet sich durch Rekombination der beiden Spezies eine neue C-C-verknüpfte Verbindung. Hat die Reaktion mit der Aminosäure Glycin (R=H) stattgefunden, kann es durch die Anwesenheit

eines weiteren Wasserstoffatoms am C_α zu einer anschließenden Dehydratisierung kommen [Dorman 1994] (Schema 4).



Schema 4: Photochemie von Benzophenon [modifiziert nach Dorman 1994].

In biologischen Systemen sind die der Photoreaktion zugänglichsten Wasserstoffdonoren die C-H-Bindungen des Proteinrückgrates. Eine Übersicht über die Photoalkylierungspräferenz einzelner Aminosäuren findet sich bei Deseke [Deseke 1998]. Methylengruppen von Lipiden und Aminosäureseitenketten liefern ebenfalls abspaltbare Wasserstoffe. Unabhängig von der räumlichen Orientierung kann man eine Reihenfolge der Reaktivitäten für C-H-Gruppen aufstellen:

$$> -NCH_x > -SCH_x > \text{Methin} > C=CCH_2 > -CH_2 > -CH_3$$

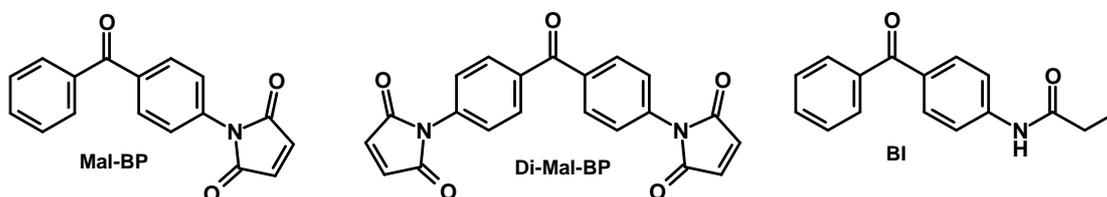
Besondere Reaktivität zeigen C-H-Gruppen an tertiären Kohlenstoffatomen, wie sie beim C_γ -H von Leucin und C_β -H von Valin zu finden sind. Heteroatome wie Stickstoff oder Schwefel in Nachbarschaft zu CH_2 -Gruppen wie z.B. bei Lysin, Arginin oder Methionin begünstigen ebenfalls eine Photoreaktion [O'Neil 1989, Wittelsberger 2006].

Abbildung 11 zeigt eine Auswahl heterobifunktionaler Cross-Linker mit photoreaktiver BP-Gruppe. Der thiolreaktive Photo-Cross-Linker 4-Maleimido-benzophenon (Mal-BP) wurde erstmals für Konformationsuntersuchungen zur Differenzierung zwischen monomerem und polymerem Aktin eingesetzt [Tao 1985]. 1988 führte Wang Photo-Cross-Linking-Experimente zwischen Calmodulin bzw. Aktin mit Caldesmon durch [Wang 1988].

Auf der Grundlage von durch Photo-Cross-Linking erhaltenen Daten konnte ein Modell für den MutH-MutL-Komplex in *E. coli* erstellt werden [Giron-Monzon 2004]. Auch gelang die Photovernetzung von humanem Galectin-1 mit den Modell-Glykoprotein-Liganden Asialofetuin und Laminin [Tamura 2009].

4,4'-Dimaleimido-benzophenon (Di-Mal-BP), ein trifunktionaler Cross-Linker, und 4-(2-Iodoacetamido)-benzophenon (BI) dienten zur Untersuchung konformativer Veränderungen des Myosins SF1 [Rajasekharan 1987, Lu & Wong 1989]. Mit Benzophenon-4-isothiocyanat (BP-ITC) als aminreaktivem Photo-Cross-Linker konnte die Interaktion zwischen Gelsolin und Tropomyosin studiert werden [Koeppf & Burtnick 1992]. Das Benzophenon-imidat (BP-IMD) und *N*-Succinimidyl-*p*-benzoyldihydro-/ditritylcinnamat (SBC/SBTC) wurden bisher ausschließlich für Proteinmarkierungen verwendet [Mariano 1976, Mourey 1993]. SBC und sein zweifach deuteriertes Analogon SBDC sollten in dieser Arbeit zum ersten Mal als Photovernetzungsreagenzien verwendet werden.

Thiol-reaktive Cross-Linker



Amin-reaktive Cross-Linker

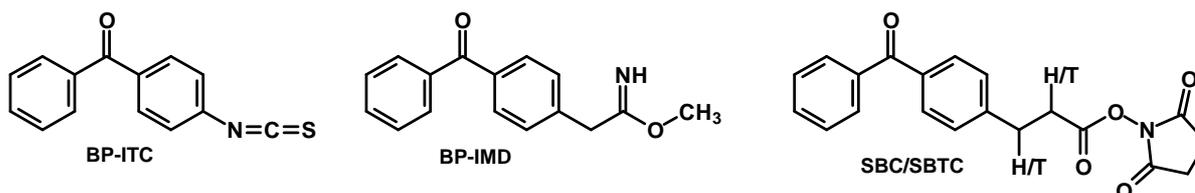


Abb. 11: Auswahl an Benzophenon enthaltenden heterobifunktionalen Cross-Linkern; Bezeichnungen im Text.

Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit BP-Rest, z.B. *p*-Benzoyl-*L*-Phenylalanin (*p*Bpa) [Kauer 1986] (Abb. 12) ist ein relativ junges Gebiet, um Photo-Cross-Linking-Experimente durchzuführen. Der Vorteil ist eine erleichterte Auswertung der massenspektrometrischen Daten durch das Vorhandensein einer definierten Ausgangs-Aminosäure, um die in einem festen Radius Vernetzungen gesucht werden können. Dazu sei an dieser Stelle auf verschiedene Übersichtsarbeiten verwiesen [Chin 2002, Chin 2003, Hino 2005, Lee 2009].

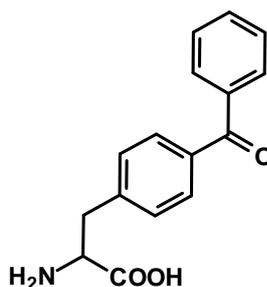


Abb. 12: Strukturformel von *p*Bpa.

Während Photoaffinitätsreagenzien schon zu Beginn der 60er Jahre des 20. Jh. Einzug in die Biochemie gefunden haben [Singh 1962], ist es erst seit den 1980er Jahren durch die Entwicklung der sanften Ionisierungstechniken MALDI und ESI in der Massenspektrometrie möglich geworden, Strukturinformationen aus Interaktionsstudien zu erhalten, welche zur Erstellung räumlicher Modelle herangezogen werden können. Die Anwendung von Photoaffinitätsreagenzien zusammen mit der Massenspektrometrie ist für die Strukturanalyse von Proteinen inzwischen ein etabliertes Verfahren [Robinette 2006].

2.3 Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Das grundlegende Prinzip der Massenspektrometrie ist die Erzeugung ionisierter Atome oder Moleküle in der Gasphase aus organischen oder anorganischen Verbindungen mit einer geeigneten Methode und die anschließende Trennung und Identifizierung der geladenen Teilchen über ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) [Lehmann 1996, Lottspeich & Engels 2006, Gross 2010].

In den letzten Jahren nahm die Massenspektrometrie zur Analyse biologischer Makromoleküle immer mehr an Bedeutung zu. Vor allem die Entwicklung der „weichen“ Ionisierungstechniken MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung) [Karas & Hillenkamp 1988, Tanaka 1988] und ESI (Elektrospray-Ionisierung) [Fenn 1989] gegen Ende der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts machte diese Technik für bioanalytische Fragestellungen nutzbar. Durch diese Entwicklungen hat die Massenspektrometrie inzwischen in den meisten Bereichen der biochemischen Forschung eine unentbehrliche Stellung erreicht. Im Folgenden werden nur die Techniken behandelt, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Der Inhalt der Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 wurde in leicht abgewandelter Form einschlägigen Lehrbüchern der Bioanalytik und der Massenspektrometrie entnommen [Lehmann 1996, Lottspeich & Engels 2006, Gross 2010].

2.3.1 MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Die MALDI-Ionisierungstechnik beruht auf einer Laser-induzierten Verdampfung und Ionisierung eines Kokristallisates (Durchmesser: 0,05-0,2 mm) aus dem zu untersuchenden Analyten und einer organischen Matrixverbindung. Dazu werden wenige Mikroliter der Analysenlösung mit einem bis zu zehntausendfachen molaren Überschuss an Matrix gemischt und auf einem metallischen Probenhalter kokristallisiert. Die Matrix-Verbindung muss im Wellenlängenbereich des verwendeten UV-Lasers (meist Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm oder Nd:YAG-Feststofflaser mit 355 nm) eine ausreichende

Energie-Absorption haben. Je nach Analyteigenschaften werden unterschiedliche aromatische Säuren als Matrices verwendet (Tab. 3).

Tab. 3: Auswahl gängiger Matrices in der MALDI-MS.

Matrix	geeignet für
➤ Nicotinsäure	Peptide, Proteine
➤ Picolinsäure und -derivate	Oligonucleotide, DNA
➤ 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB, Gentisinsäure)	Peptide, Proteine
➤ α -Cyano-4-hydroxymizsäure (α -CHCA)	Peptide
➤ 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizsäure (Sinapinsäure)	Proteine

Nach der erfolgreichen Kokristallisierung wird die Probe im Hochvakuum mit kurzen hochenergetischen Laserpulsen (3-10 ns) angeregt. Die anschließende Relaxation im Kristallgitter führt zu einer explosionsartigen Teilchenablösung an der Festkörperoberfläche. Dabei gehen neben Matrixmolekülen auch Analytteilchen in die Gasphase über.

Der exakte Mechanismus der Ionenbildung im MALDI-Prozess ist nach wie vor Gegenstand laufender Forschungsprojekte [Zenobi & Knochenmuss 1998, Karas 2000, Karas & Krüger 2003, Jaskolla & Karas 2011].

Der erzeugte Ionenstrahl gelangt in den Flugzeitmassenanalysator (TOF-Analysator, *time-of-flight*), in dem die Ionenflugzeit zwischen der Quelle und dem Detektor bestimmt wird.

Der Puls des UV-Lasers startet die Zeitmessung. Da die Flugzeit proportional der Wurzel aus der Ionenmasse ist, lässt sich die gemessene Zeitdifferenz direkt in die Masse umrechnen

(Formel I).
$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2 \quad (I)$$

m = Masse des Ions

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

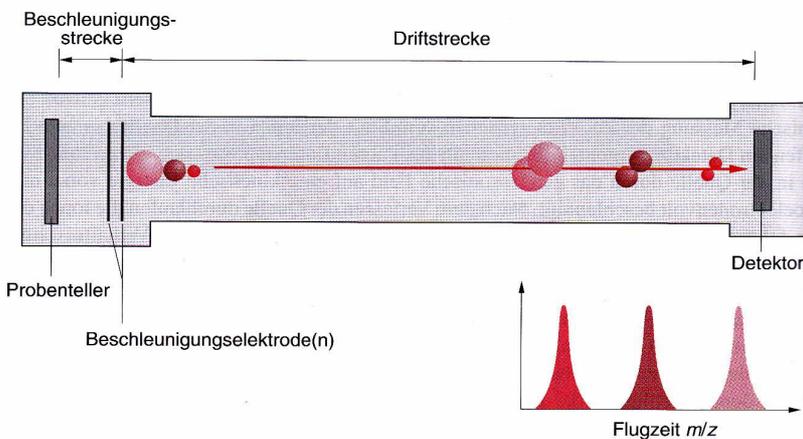
U = Beschleunigungsspannung

L = Länge der Flugstrecke

t = Flugzeit

TOF-Analysatoren gibt es in zwei unterschiedlichen Ausführungen (Abb. 13). In linearen TOF-Instrumenten durchlaufen die erzeugten Ionen nach ihrer Beschleunigung mit einer konstanten Geschwindigkeit eine feldfreie Driftstrecke von der Quelle bis zum Detektor. Bei einem Reflektor-Instrument werden die beschleunigten Ionen am Ende des Flugrohres an einem „Ionenspiegel“ (Reflektor) auf den in der Nähe der Ionenquelle lokalisierten Detektor reflektiert. Durch die Verlängerung der Flugstrecke und die Kompensation der Flugzeitunterschiede der Ionen mit gleichem m/z , aber unterschiedlicher kinetischer Energie, geht diese Technik mit einer beträchtlichen Steigerung der Massenauflösung einher. Moderne TOF-Analysatoren sind mittlerweile mit einem Reflektor und zwei Detektoren ausgestattet, sodass der Messbetrieb wahlweise im Linear- oder Reflektor-Modus erfolgen kann.

Lineares Flugrohr



Reflektor-Flugrohr

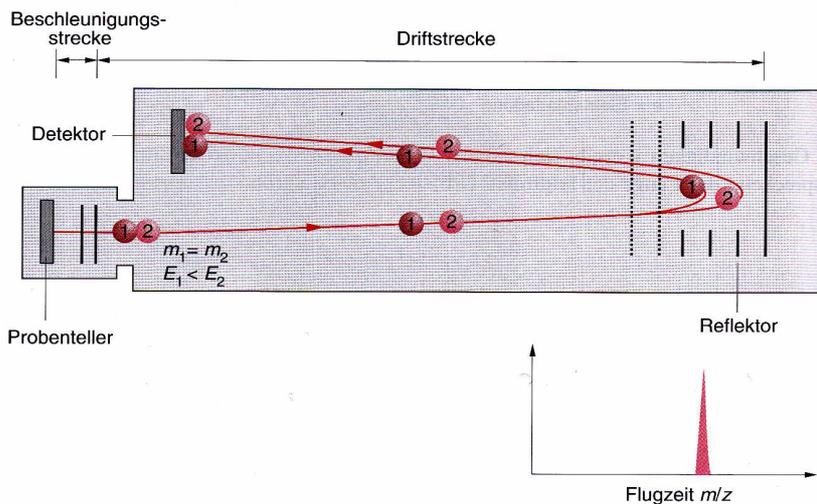


Abb. 13: Prinzipieller Aufbau eines Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS). Oben: Lineare Anordnung, unten: Reflektor-Flugrohr [modifiziert nach Lottspeich & Engels 2006].

2.3.2 Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Bei der ESI-Technik wird kontinuierlich eine flüssige Probe bei Atmosphärendruck in einem elektrischen Feld zwischen der Spitze einer LC-Kapillare und einer wenige Millimeter entfernten Gegenelektrode versprüht und ionisiert. Durch eine Öffnung im Zentrum dieser Gegenelektrode gelangen die gebildeten Ionen in das Hochvakuum des Massenanalysators. Je nach Polarität der an das Ende der Kapillare angelegten Hochspannung bilden sich Flüssigkeitströpfchen mit positiver oder negativer Überschussladung. Bei der Nano-ESI-Technik befindet sich am Ende der LC-Kapillare eine Metall-bedampfte Glaskapillare mit einer Öffnung von ca. 1-2 μm . Das führt zu einer Flussrate von 50-100 nl/min und damit zu einem sehr viel geringeren Probenvolumenverbrauch als bei einer konventionellen ESI-Technik. Ein weiterer Vorteil der Nano-ESI-Technik ist die sehr geringe erforderliche Menge an Probenmaterial (einige 100 fmol). Bei der ESI bilden sich häufig mehrfach geladene Ionen. Tryptische Peptidionen tragen z.B. oft zwei positive Ladungen ($[M+2H]^{2+}$). Bestehen die Peptidionen aus mehr als 15 Aminosäuren oder besitzen sie mehrere basische Reste, wie etwa bei den Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin, können sie auch drei und mehr Ladungen tragen. Zur einfachen Interpretation mehrfach geladener Ionen wurde von Mann und Kollegen ein Dekonvolutionsalgorithmus entwickelt [Mann 1989].

Der LTQ-Orbitrap-Massenanalysator ist ein Hybridsystem, welches die Vorteile einer linearen Ionenfalle (LTQ) mit der einer elektrostatischen Ionenfalle (Orbitrap) kombiniert (Abb. 14).

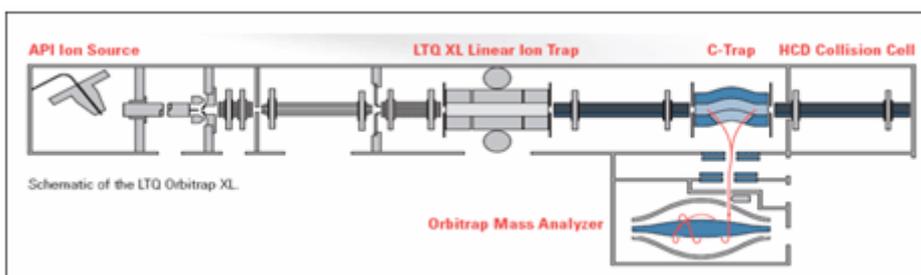


Abb. 14: Aufbau eines ESI-LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers (Thermo Fisher Scientific). API: Atmospheric pressure ionization, HCD: Higher-energy C-trap dissociation.

In der Orbitrap [Makarov 2000, Makarov 2006] werden Ionen durch elektrostatische Kräfte gespeichert, während sie um die zentrale spindelförmige Elektrode rotieren und axial oszillieren. Dabei induzieren die oszillierenden Ionen in den zwei äußeren Hälften der Orbitrap einen Strom, der mit Hilfe eines Verstärkers aufgezeichnet werden kann. Die Frequenz der Oszillation (ω), welche umgekehrt proportional zum Masse/Ladungsverhältnis (m/z) eines Ions ist (Formel II), wird schließlich mittels Fourier-Transformation aus dem

Induktionsstrom berechnet [Wanner 2007]. Die lineare Ionenfalle (LTQ) dient als Massenfilter und zur Fragmentierung.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad (\text{II})$$

ω = axiale Frequenz der Oszillation

k = Gerätekonstante

m/z = Masse- zu Ladungs-Verhältnis

2.3.3 Peptidsequenzierung mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Während man noch vor etwa 20 Jahren für eine Peptidsequenzierung nach Edman viel Zeit (Stunden bis Tage) und picomolare Mengen gereinigten Proteins benötigte, konnte Anfang der 1990er Jahre durch den Einzug der Massenspektrometrie in die Bioanalytik die Effizienz der Peptidsequenzierung bahnbrechend gesteigert werden.

In einer sogenannten „*Bottom-up*“-Analyse werden große Biomoleküle, z.B. Proteine, durch Einwirkung selektiver Proteasen, wie Trypsin, Asp-N oder Glu-C, in Peptide definierter Länge gespalten. Nach der sanften Ionisierung der erhaltenen Peptidmischungen in der Probenquelle des MALDI- oder ESI-Massenspektrometers erfolgt die induzierte Peptidfragmentierung (MS/MS oder Tandem-MS) in Quadrupolanalysatoren oder Ionenfallen durch Einleitung eines Stoßgases wie Stickstoff, Argon oder Helium (*collision-induced dissociation*, CID). Die durch die Gasmoleküle übertragene Energie bewirkt, dass vorwiegend Peptidbindungen gespalten werden. Je nach dem, an welchem der beiden Bruchstücke die Ladung verbleibt, entstehen *N*- oder *C*-terminale Peptidfragmente. Die zurückbleibenden neutralen Fragmente sind der direkten massenspektrometrischen Detektion nicht zugänglich. Die geladenen Fragmente, bei denen der *N*-Terminus des gespaltenen Peptides vollständig erhalten ist, werden als *a*-, *b*- oder *c*-Typ-Ionen, die mit vollständigem *C*-Terminus als *x*-, *y*- oder *z*-Typ-Ionen bezeichnet [Steen 2004] (Abb. 15).

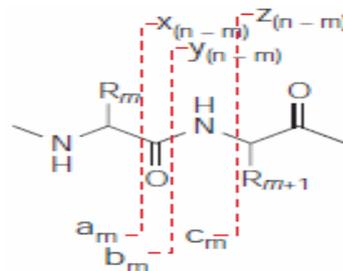


Abb. 15: Fragmentierung von Peptiden [Nomenklatur nach Roepstorff & Fohlmann 1984 und Biemann 1992, Abb. nach Steen 2004].

Die im CID-Tandem-Massenspektrum dominierenden Fragmentationen gehören dem b- und dem y-Typ an. Je nach der Anzahl der verbliebenen Aminosäuren spricht man *N*-terminal von b_1^- , b_2^- , b_3^- , ... und *C*-terminal von y_1^- , y_2^- , y_3^- , ... Fragmentationen (Abb. 16).

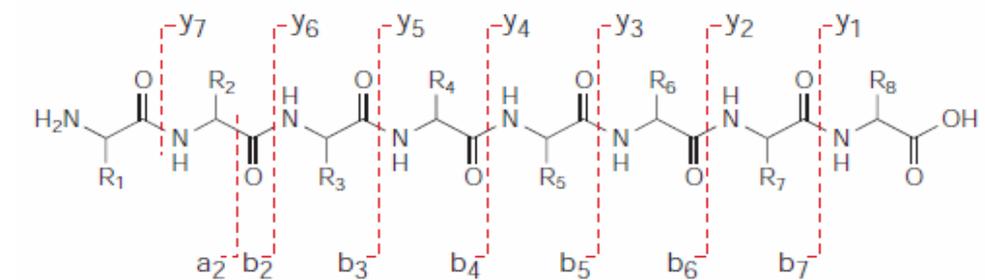


Abb. 16: Bevorzugte Spaltstellen (---) innerhalb eines Octapeptides bei einer stoßaktivierten Fragmentierung in einem Massenanalysator [Abb. nach Steen 2004].

Die in Sekundenschnelle erhaltenen hochgenauen Peptidfragmentmassen werden abschließend durch die Verwendung von Suchmaschinen, wie *Peptide Search*, *Sequest* oder *Mascot* unter Beachtung der zuvor verwendeten Spaltungsprotease(n) mit Informationen aus Proteinsequenzdatenbanken verglichen und identifiziert.

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien für die Synthese

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylsäure, 99%, stab. mit 0,02%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrochinonmonomethylether	
Aluminiumchlorid, wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt
4-Aminobenzophenon, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brombenzen, puriss. $\geq 99,5\%$ (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloracetylchlorid zur Synthese	Merck KGaA, Darmstadt
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), (puriss. $> 99,0\%$ (GC))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid- d_6 (DMSO- d_6), 99,9 atom % D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS), 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumcarbonat, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumiodid, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) für die Säulenchromatographie	Merck KGaA, Darmstadt
Kieselgur für die Säulenchromatographie	Merck KGaA, Darmstadt
Kupfer(I)bromid, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumsulfat, 98%, wasserfrei	Grüssing GmbH, Filsum
4-Nitrobenzoylchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Zinn(II)-chlorid, $\geq 99,99\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.2 Chemikalien für die Bioanalytik

Acetonitril, für die Spektroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Acrylamid-Bis 40%-Fertiglösung (37,5 ml Acrylamid, 2,5 ml Bisacrylamid, 60 ml H ₂ O-MQ)	Merck KGaA, Darmstadt

α -Cyano-4-hydroxycimtsäure (α -CHCA)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Ameisensäure (FA), puriss, p.a. (für die Massenspektrometrie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumhydrogencarbonat (<i>ReagentPlus</i> TM , $\geq 99,0\%$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat, $\geq 98\%$ (für die Elektrophorese)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biorad-Protein Assay <i>Dye Reagent</i> Concentrate	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Bibenzyl, 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat-D ₀ /D ₄ (BS ² G -D ₀ /D ₄)	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford (USA)
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat-D ₀ /D ₄ (BS ³ -D ₀ /D ₄)	Perbio Science, Bonn
Butylbenzol, 99+%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid-dihydrat, $\sim 99\%$ (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie-Brillantblau R250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO), minimum 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Dinatriumsalz,-dihydrat), 99+% (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA), $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2,2'-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT), $> 99\%$, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure, 100%, Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]ethan- sulfonsäure (HEPES), minimum 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Iodacetamid, SigmaUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol für die Spektroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Laemmli-Probenpuffer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

(62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 25% Glycerol, 0,01% Bromphenol- blau (pH 6,8))	
2-Mercaptoethanol, 98+% (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol für die Spektroskopie	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat-Lsg. 10% (SDS 10%)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trifluoressigsäure für die Spektroskopie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan („Tris-Puffer“), > 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese [®] 10fach konz.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Laufpuffer (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1% SDS in H ₂ O bidest.	

3.1.3 Proteine und Peptide

C2-ähnliche Domäne von h5-LO, ungereinigt (C2 _{alt})	Angela Michel, AG Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt
C2-ähnliche Domäne von h5-LO, gereinigt (C2 _{neu} , C2* _{neu})	Mirjam Schröder, AG Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt
Calmodulin, höchste Reinheit (Rinderhirn), (Reinheit SDS-PAGE > 99%) (CaM)	Calbiochem/ Merck KGaA, Darmstadt
Endoproteinase Asp-N, <i>sequencing grade</i> (aus <i>Pseudomonas fragi</i> -Mutante, 27 kDa, 2 µg je Röhrchen)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Endoproteinase Glu-C, <i>sequencing grade</i> (aus Staph. aureus V8, 30 kDa, 1 Aliquot enthält 1µg Gluc-C in 2 µl H ₂ O-MQ)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Page Ruler™ unstained protein ladder</i> (62,5 mM Tris-H ₃ PO ₄ , 1 mM EDTA, 2% SDS, 0,1 M DTT, 1 mM NaN ₃ , 0,01% Bromphenolblau, 33% Glycerol (pH 7,5))	Fermentas International Inc.

<i>Peptide Calibration Standard II</i> (Bradykinin, Angiotensin I/II, Substanz P, Bombesin, ACTH, Somatostatin)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
<i>Protein Standard II</i> (Trypsinogen, Protein A, bovines Serum- albumin (BSA))	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Serumalbumin, bovines (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Serumalbumin, humanes (HSA), 96-99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Substanz P Acetat, $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEV-Protease, rekombinant	Angela Michel, AG Prof. Steinhilber, Institut für Pharm. Chemie, Universität Frankfurt
Trypsin, <i>sequencing grade</i> (bovin) (23,5 kDa, 1 Aliquot enthält 1 μg Trypsin in 2 μl 1 mM HCl)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

3.1.4 Untersuchte C2-Liganden

2-(4-Chlor-6-(chinolin-6-ylamino)pyrimi- din-2-ylthio)octansäure (LP ₁₂₁)	AG Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt
<i>N</i> -Cyclopentyl-7-methyl-2- <i>p</i> -tosyl- <i>H</i> - imidazo[1,2 α]pyridin-3-amin (B02)	AG Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt

3.1.5 Verschiedene Referenzen zur Substanzcharakterisierung

Ascorbinsäure	Caesar & Lorentz GmbH, Hilden
4,5-Dihydro-1-(3-(trifluormethyl)phenyl)- 1 <i>H</i> -pyrazol-3-amin (BW755C)	Petra Froberg, AG Sinz, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
Diazepam	Arzneimittelwerk Dresden (AWD)
Imatinib(-mesylat)	Novartis AG
Nordihydroguaiarensäure (NDGA), $\geq 95\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Warfarin, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.2 Methoden, verwendete Geräte und Software

3.2.1 Methoden zur Substanzcharakterisierung

Die Ergebnisse der Substanzcharakterisierung sind bei den entsprechenden Verbindungen im Syntheseabschnitt (3.3, 3.4) aufgeführt.

3.2.1a Dünnschichtchromatographie

Zur Verfolgung der präparativen Umsetzung und der Reinheitsbestimmung der isolierten Produkte dienten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete DC-Aluminiumplatten (5 x 10 cm) von der Firma Merck KGaA, Darmstadt. Als Elutionsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, A: Chloroform/Ether (7/3; v/v), B: Heptan/Ethylacetat (3/1; v/v) oder C: Heptan/Ethylacetat/Dichlormethan (3/1/1; v/v/v, +1% Essigsäure) herangezogen. Die UV-Detektion erfolgte nach dem Trocknen der Platten bei 254 nm und 366 nm.

3.2.1b Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Heitztischmikroskop nach *Boëtius* (VEB Analytik Dresden) bestimmt.

3.2.1c Elementaranalyse

Die Bestimmung des Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehaltes der synthetisierten Verbindungen wurde im automatischen Mikroverfahren mit dem Elementaranalysegerät *CHNS-932* (Leco corp., St. Joseph, MI, USA) durchgeführt. Der Halogengehalt ließ sich im Halbmikroverfahren nach Schöniger-Aufschluss mit Quecksilber(II)nitrat gegen Diphenylcarbazon titrieren.

3.2.1d NMR-Spektroskopie

Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 27°C an einem *Varian Gemini 2000* (Varian, Inc., Palo Alto, USA) NMR-Spektrometer bei einer Arbeitsfrequenz von 399.96 MHz und 100,58 MHz aufgenommen. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel dienten gleichzeitig als innere Standards zur Kalibrierung. Bei der Angabe der NMR-Daten wird zuerst in Klammern die Arbeitsfrequenz in MHz und anschließend das verwendete deuterierte Lösungsmittel angegeben. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die Symmetrieachse der Signale. In Klammern folgt für jedes Signal im ¹H-NMR-Spektrum die Multiplizität (s –

Singulett, d – Dublett, t – Triplett, q – Quartett, m – Multiplett), die Kopplungskonstante J [Hz], die integrierte Protonenzahl sowie die chemische Zuordnung.

3.2.1e IR-Spektroskopie

Die Substanzen wurden als KBr-Presslinge an einem *Spectrum BX-FT-IR-Spektrometer* (Perkin-Elmer, Waltham, USA) vermessen. Für jedes Spektrum wurden insgesamt drei Messungen gemittelt. Vor jeder Messung wurde ein Hintergrundspektrum des Gasraumes im Gerät aufgenommen und automatisch subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software *v2.00 1998* (Perkin-Elmer, Waltham, USA). Die Lage der IR-Banden wird durch die Wellenzahl ν [cm^{-1}] beschrieben. Die Intensitäten der Banden werden durch den Zusatz *s* (strong), *m* (medium) oder *w* (weak) näher charakterisiert.

3.2.1f UV-Spektroskopie

UV-Messungen wurden entweder mit den Einstrahlgeräten *Spekol 1200* (Analytik Jena GmbH, Deutschland) und *Ultrospec 1100 pro* (GE Healthcare) oder dem Zweistrahlgerät *U-2000 Spectrophotometer* (Hitachi) vorgenommen. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, in ethanolischer oder methanolischer Lösung in Standard-Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen. Als Blindwert diente das entsprechende reine Lösungsmittel.

3.2.1g Sektorfeld-Massenspektrometrie

Die Massenspektren der synthetisierten Verbindungen wurden an einem *AMD 402* Sektorfeld-Massenspektrometer (AMD Intectra GmbH Harpstedt, Deutschland) mit einer Elektronenstoßionisierungsquelle (70 eV) aufgenommen.

3.2.2 Screening-Methoden vor der pharmakologischen Testung

3.2.2a Virtuelle Bestimmung der „Rule-of-five“-Deskriptoren nach Lipinski

Zur Ermittlung der „Rule-of-five“-Parameter nach Lipinski [Lipinski 1997] wurde das frei zugängliche Java-Programm „*Molinspiration Property Calculator*“ (Molinspiration property engine v2009.01, Molinspiration Cheminformatics, Slovak Republik; www.molinspiration.com) verwendet (4.1.2a). Die Eingabe der Strukturformeln erfolgte interaktiv über den JME Molecular Editor[®] v.2008.01 (Peter Ertl, Novartis). Die Methode zur Vorhersage der $\log P_{O/W}$ -Werte beruht auf Fragmentgruppenbeiträgen von pharmakophor-ähnlichen Molekülen [Lipinski 1997, Ertl 2000, Veber 2002].

3.2.2b RP-HPLC-Analyse zur $\log P_{O/W}$ -Abschätzung

Der Logarithmus der Verteilungskoeffizienten ($\log P_{O/W}$) der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** wurde indirekt über den Logarithmus der Kapazitätsfaktoren ($\log k$) der Einzelverbindungen abgeschätzt (4.1.2b). Da in der Literatur für diese Verbindungsklasse bisher keine vergleichbaren Lipophilie-Daten existierten, wurde eine allgemeine Kalibrierung nach einer etablierten flüssigkeitschromatographischen OECD-Methode durchgeführt [OECD: HPLC Method 1996]. Dabei wurden mit Benzophenon ($\log P_{O/W}$: 3,2), Diphenylamin ($\log P_{O/W}$: 3,4), Benzylbenzoat ($\log P_{O/W}$: 4,0), Diphenylether ($\log P_{O/W}$: 4,2), n-Butylbenzen ($\log P_{O/W}$: 4,6) und Bibenzyl ($\log P_{O/W}$: 4,8) Kalibranden ausgewählt, welche einerseits den Bereich der berechneten $\log P_{O/W}$ -Werte ($\log P_{calc}$) der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** abdeckten und andererseits auch ein pH-unabhängiges Verteilungsverhalten zeigten.

Die Totzeit (t_0) der unretinierten Substanz Formamid ($n=6$) und die Retentionszeiten (t_R) der Kalibranden ($n=3$) wurden bestimmt und die Kapazitätsfaktoren (k) anhand der Formel III

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad \text{(III)}$$

berechnet. Mit Hilfe der erhaltenen Kalibriergeraden ließen sich anschließend aus den Retentionszeiten der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** die $\log P_{O/W}$ -Werte berechnen (4.1.2b).

Das HPLC-System für die Bestimmung der Retentionszeiten der Kalibranden und der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** bestand aus einem 851-AS Intelligent Autosampler (Jasco, Groß-Umstadt) zur automatischen Probennahme, einer Pu-980 Intelligent HPLC Pumpe (Jasco, Groß-Umstadt), und einem UV-975 Intelligent UV/VIS-Detektor (Jasco, Groß-Umstadt) mit einer eingestellten Messwellenlänge von 210 nm. Bei der analytischen Chromatographiesäule handelte es sich um eine LiChroCART[®]-Kartusche (4 mm x 125 mm) gefüllt mit LiChrospher[®] 100 RP-18 endcapped Material (5 μ m) (Merck KGaA, Darmstadt). Als Elutionsmittel für die isokratische Trennung wurde Methanol/PBS-Puffer (pH 7,4) (75/25; v/v) eingesetzt. Die Flussrate war bei allen Messungen 1 ml/min. Pro Trennung wurden jeweils 15 μ l Probe (~ 3 μ M) injiziert. Die Signalaufzeichnung und Integration der Peakflächen erfolgten mit Hilfe der Gerätesoftware BORWIN 1.21.07 (JMBS Developpements, Grenoble, Frankreich).

3.2.2c Berechnung und Abschätzung der Wasserlöslichkeit

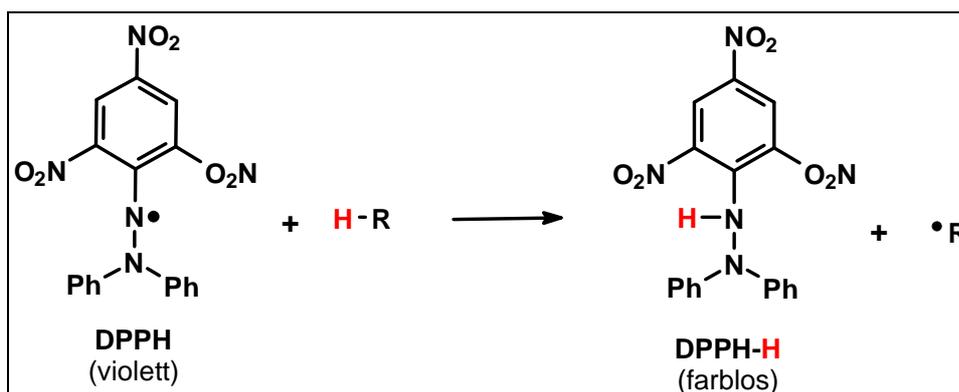
Die Löslichkeiten der synthetisierten 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** in wässrigem Medium wurden mit Hilfe der allgemeinen Löslichkeitsgleichung (Formel IV) nach Jain und Yalkowsky

$$\log S = 0,5 - \log P - 0,01 (\text{Smp.} - 25) \quad (\text{IV})$$

aus den experimentellen $\log P_{\text{exp}}$ -Werten und den Schmelzpunkten (Smp.) der Verbindungen berechnet [Ran 2001] (4.1.2c). Anschließend wurde zum Vergleich mit Hilfe der frei zugänglichen Online-Software *ALOGPS 2.1* (www.vcclab.org) der $\log S$ -Wert abgeschätzt. Hierzu wurde das Molekül im SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System)-Format in die Software eingegeben und automatisch an mehrere Rechenprogramme (*ALOGPS 2.1* [Tetko 2001], *AC_log S* (Actelion Property Calculator, 2001, Actelion Pharmaceuticals Ltd, Basel), *AB/log S* (Advanced Chemistry Development Inc., Canada) geschickt. Der in dieser Arbeit angegebene virtuelle Wasserlöslichkeitswert ($\log S_{\text{virt}}$) ist das arithmetische Mittel aus diesen drei Berechnungen.

3.2.2d Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mittels DPPH

Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in Methanol zu einer Konzentration von 1 mM gelöst, auf DC-Platten aufgetragen und mit MeOH/CHCl₃ (1/19; v/v) eluiert. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese mit methanolischer 2,2'-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)-Lösung (15 mg/50 ml) besprüht und die Reaktion der Verbindungen mit dem stabilen freien Radikal über 15 min beobachtet [Prabhakar 2006] (4.1.2d). Das aus der ESR-Spektroskopie bekannte paramagnetische stabile Radikal DPPH zeigt in methanolischer Lösung eine tiefviolette Färbung (λ_{Abs} : 516 nm). Durch Oxidation wird die Substanz diamagnetisch und es kommt zu einer hypsochromen Verschiebung was eine Entfärbung zur Folge hat [Blois 1958] (Schema 5). Von den Verbindungen, bei denen sich, verglichen mit den Referenzen (Ascorbinsäure, NDGA, BW755C), am schnellsten ein weißer Fleck auf violettem Grund abzeichnete, wurden photometrisch EC₅₀-Werte bestimmt.



Schema 5: Allgemeiner Reaktionsmechanismus zwischen einem Radikalfänger (R-H) und dem stabilen Radikal DPPH. Das Ausmaß der antioxidativen Wirkung des Radikalfängers kann kolorimetrisch bestimmt werden.

Die Messungen zur Bestimmung der EC₅₀-Werte wurden in Ethanol (60%; v/v) durchgeführt. In fünf Reagenzgläsern mit Stopfen wurde jeweils 1 ml DPPH-Lösung (0,5 mM) vorgelegt und dazu 4 ml der jeweiligen Verbindung (4.1.2d) in vier unterschiedlichen Verdünnungen (Endkonz. zwischen 6 µM und 0,1 mM) zugegeben. Nach dem Verschließen des Reagenzglases wurde für drei Sekunden kräftig geschüttelt und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Absorptionmessungen erfolgten mit dem in Kapitel 3.2.1f beschriebenen Zweistrahlphotometer bei 516 nm. Aus den fünf Werten wurde eine Kalibriergerade erstellt und der EC₅₀-Wert ermittelt [Fujinami 2001].

3.2.2e Bestimmung von Redoxpotentialen mit zyklischer Voltammetrie

Alle Messungen wurden in dem aprotischen Lösungsmittel Acetonitril durchgeführt (4.1.2d). Als Leitelektrolyt diente eine Lithiumperchlorat-Lösung (0,05 M), welche ebenfalls in Acetonitril hergestellt wurde. Als innerer Standard wurde das Metallocen Ferrocen verwendet [Beck 1974, Buchberger 1998]. Die Messlösungen wurden vor jedem Experiment für fünf Minuten mit Argon gespült, um den gelösten Sauerstoff zu entfernen. Eine Platinmikroelektrode (Bioanalytical Systems, Durchmesser: 0,01 mm) und eine Platinmakroelektrode (Durchmesser: 0,15 mm) wurden abwechselnd als Arbeitselektrode eingesetzt. Bezugselektrode war eine Ag/AgNO₃-Elektrode (10 mM in Acetonitril) [Kratochvil 1969, Kratochvil 1980, Bond 2000], Hilfselektrode ein Platindraht. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, mussten zu Beginn jeder Messung die Arbeitselektroden mit einem angefeuchteten Silicium-Carbid-Feinschmiergelpapier blank geschliffen werden. Die zyklischen Voltammogramme der Substanzen wurden bei RT als

1 mM Lösung (100% Acetonitril) in einem Potentialbereich von -200 bis 1200 mV und bei einer Spannungsgeschwindigkeit von 40 mV s^{-1} aufgezeichnet.

Mit Hilfe des Datenanalyseprogrammes *Origin 6.0* (Microcal Software Inc, USA) wurden aus den Zyklovoltammogrammen die Halbstufenpotentiale ($E_{1/2}$) der Verbindungen über die erste Ableitung berechnet und anschließend gegen das der Referenzverbindung Ferrocen ($E_{1/2}$ vs. Ag/AgNO₃: 246 mV [Kratochvil 1980]) korrigiert.

3.2.2f Spektrofluorimetrische Liganden-Affinitätsmessungen an Proteinen

Alle Fluoreszenzmessungen wurden bei RT an einem *MPF-44* (Perkin-Elmer, Waltham, USA) Fluoreszenz-Spektrophotometer durchgeführt, welches mit einer *Xenon Power Supply 150* Xenon-Lampe (Perkin-Elmer, Waltham, USA) ausgestattet war (4.1.2e). Die Spaltbreite lag jeweils für die Anregung und Emission bei 4 nm. Die Messungen der Emissionsspektren im Bereich von 300-400 nm erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm unter Ausnutzung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz. Für die Messungen mit humanem Serumalbumin (HSA) wurde eine Stammlösung aus der Festsubstanz (1,3 mg/10 ml; 5 μM in PBS-Puffer, pH 7,4) hergestellt. Von den zu messenden 1,2,4-Triazin-5-onen wurden je drei Stammlösungen (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) in DMSO hergestellt und zu der HSA-Stammlösung in aufsteigender Konzentration titriert. Hierbei war die HSA-Konzentration nach der Verdünnung konstant 2 μM (P_T). Nach dreißigminütiger Inkubationszeit bei RT wurden Fluoreszenzemissionsspektren aufgezeichnet. Die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des HSA (% Quenching) wurde gegen die Gesamtkonzentration an zugegebenem 1,2,4-Triazin-5-on (D_T) aufgetragen. Die Verlässlichkeit der Bindungsuntersuchungen wurde zuvor mit den bekannten K_d -Werten der HSA/Warfarin- und HSA/Diazepam-Komplexe abgesichert. Die Affinitätsuntersuchungen mit der C2-ähnlichen Domäne wurden mit unverdünnter Proteinstammlösung analog der HSA-Untersuchungen durchgeführt. Da unter den experimentellen Bedingungen die ungebundene Ligandenkonzentration (D_f) nicht zugänglich war, wurde zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) an Stelle der Michaelis-Menten-Gleichung die quadratische Bindungsgleichung, welche sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableitet, verwendet:

$$D_b = \frac{S - \sqrt{S^2 - 4 D_T P_T}}{2} \quad (\text{V})$$

D_b = Konzentration des Liganden-Proteinkomplexes

$$S = D_T + P_T + K_d$$

D_T = totale Ligandenkonzentration P_T = totale Proteinkonzentration

K_d = Dissoziationskonstante

Die gemessene Fluoreszenzemission (F) kann mit der molaren Konzentration des Liganden-Proteinkomplexes (D_b), der freien Ligandenkonzentration (D_f) und der freien Proteinkonzentration (P_f) ins Verhältnis gesetzt werden (Formeln VI-VIII):

$$F = f_1 D_b + f_2 D_f + f_3 P_f \quad (\text{VI})$$

$$F = f_1 D_b + f_2 (D_T - D_b) + f_3 (P_T - D_b) \quad (\text{VII})$$

$$F = (f_1 - f_2 - f_3) D_b + f_2 D_T + f_3 P_T \quad (\text{VIII}) \quad f_1, f_2, f_3 = \text{spezifische Fluoreszenz}$$

Unter der Annahme, dass $f_3 P_T = F_0$ (intrinsische Fluoreszenz von HSA in Abwesenheit des Liganden) ist, erhält man:

$$\% \text{Quenching} = \frac{(f_2 + f_3 - f_1) D_b}{f_3 P_T} - \frac{f_2 D_T}{f_3 P_T} \quad (\text{IX})$$

Wenn man die konstanten Terme $\frac{(f_2 + f_3 - f_1)}{f_3}$ und $\frac{f_2}{f_3}$ mit der unter den experimentellen Bedingungen ebenfalls konstanten Proteinkonzentration P_T zusammenfasst (C_1, C_2), vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$\% \text{Quenching} = C_1 \left(\frac{S - \sqrt{S^2 - 4 D_T P_T}}{2} \right) - C_2 D_T \quad (\text{X})$$

Formel X wurde anschließend unter Verwendung des Marquardt-Algorithmus in Verbindung mit einer nicht-linearen Regression verwendet, um aus den experimentell erhaltenen Daten die besten Näherungswerte für die drei Unbekannten C_1, C_2 , und K_d zu erhalten. Hierbei kam die Software *Origin 6.0* (Microcal Software Inc, USA) zum Einsatz.

3.2.3 Pharmakologische Testung

3.2.3a Testung auf h5-LO-Hemmung in intakten PMNG

Die Untersuchungen wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt a. M. von Dr. Thorsten Maier, AG Steinhilber durchgeführt (4.1.2f). Es wurden 7×10^6 intakte PMNG mit Pufferlösung (Glucose (1 mg/ml) in PBS-Puffer, pH 7,4) auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach der Zugabe von CaCl_2 -Lsg. (Endkonz. 1 mM) wurde sofort kräftig geschüttelt um Präzipitationen vorzubeugen. Anschließend wurden die in DMSO gelösten Inhibitoren zupipettiert (Endkonz. 3, 10, 30 μM) und die Ansätze für zehn Minuten bei 37°C auf dem Wasserbad vorinkubiert. Durch Zugabe von in Methanol gelöstem Calcium-Ionophor A23187/Arachidonsäure (Endkonz. 2,5 μM bzw. 20 μM) wurde die Reaktion gestartet und die Reaktionsmischung für weitere zehn Minuten auf dem Wasserbad

bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 ml Methanol abgestoppt und die 5-LO-Metabolite nach einer bekannten Methode über eine Festphasensäule extrahiert, mit RP-HPLC getrennt und UV-photometrisch detektiert [Wertz 1996]. Die 5-LO-Restaktivität (%) bezieht sich auf die Menge an gebildetem LTB₄ im Verhältnis zur Blindprobe (DMSO, 3 µl). Als interner Standard für die HPLC diente PGB₁.

3.2.3b SB-LO-1-Inhibitionsassay

Die Aktivität der Verbindungen an der SB-LO-1 wurde an Hand des Sauerstoffverbrauches der ablaufenden Linolsäure-Oxidation bestimmt (4.1.2g). Die Messung wurde mit einem WTW Oxi 538 Laborsauerstoffmessgerät (WTW GmbH Weinheim) realisiert. Dabei ragte eine Clark-Elektrode [Clark 1953] in die mit Luft gesättigte, auf 37°C thermostatierte Pufferlösung (0,2 M Tris/HCl, pH 8,5; 0,1 mM EDTA; Endvolumen: 3,5 ml). Die Konzentration an DMF, welches als Lösungsmittel für die Inhibitorstammlösungen verwendet wurde, lag in den Messlösungen stets unter 1% (v/v) und trug nicht zur Enzymhemmung bei. Die IC₅₀-Werte wurden mit wenigstens fünf bis acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, mit einer Enzymhemmung zwischen 20 und 80%, bestimmt. Dazu wurde zuerst die SB-LO-1 in ihrer Fe²⁺-Form (finale Konz.: 20 nM) mit den Inhibitorlösungen für drei Minuten vorinkubiert und anschließend die Enzymreaktion durch Zugabe von 200 µM Linolsäure gestartet. Die Datenauswertung erfolgte über eine nichtlineare Regression. Die Reinigung der Messzelle nach jeder Einzelmessung erfolgte mit demineralisiertem Wasser und bei Bedarf mit demineralisiertem Wasser/Ethanol (50/50; v/v) [Clemens 1998, Clemens 2001, Klietsch 2004].

3.2.3c Antiproliferations- und Zytotoxizitätsmessungen

Die Untersuchungen wurden am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut (HKI) in Jena von Dr. Hans-Martin Dahse, Abteilung Infektionsbiologie, durchgeführt (4.1.2h).

Die Antiproliferationsmessungen erfolgten an der K-562- (DSM ACC 10) und HUVEC-Zell-Linie (ATCC CRL-1730), die Zytotoxizitätsmessungen an der HeLa-Zell-Linie (DSM ACC 57). Um den Einfluss der Testsubstanzen auf die Proliferation der K-562-Zellen abzuschätzen, wurde die Anzahl lebensfähiger Zellen auf einer Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) über CellTiter-Blue1-Assay bestimmt. Je Kavität der Mikrotiterplatte wurden etwa 10 000 Zellen in 0,1 ml RPMI-1640-Nährlösung ausgesät und mit zehn verschiedenen Verdünnungen der Testverbindungen über 72 Stunden bei 37°C in einer feuchten, kohlendioxidhaltigen

Atmosphäre (5%; v/v) inkubiert. Zur Bestimmung der metabolischen Kapazität der Zellen, welche als Indikator für die Lebensfähigkeit der Zelle dient, kam der Indikatorfarbstoff Resazurin zum Einsatz. Nicht lebensfähige Zellen verlieren sehr schnell ihre metabolische Kapazität und können dadurch den Indikatorfarbstoff nicht mehr reduzieren, wodurch kein Fluoreszenzsignal mehr beobachtet wird. Unter den experimentellen Bedingungen war das Signal des CellTiter-Blue1-Reagenz proportional zu der Anzahl lebensfähiger Zellen.

Um den antiproliferativen Einfluss auf HUVEC- und die Zytotoxizität auf HeLa-Zellen nachzuweisen, wurden für den HUVEC-Test je Kavität der Mikrotiterplatte etwa 10 000 Zellen in 0,1 ml DMEM-Nährlösung und für den HeLa-Test in RPMI-1640 ausgesät. Danach wurde analog zur K-562-Zell-Linie (bei den HeLa-Zellen nach 48stündiger Vorinkubation ohne Testsubstanzen) mit zehn verschiedenen Verdünnungen der Testverbindungen inkubiert. Die anhaftenden HUVEC- und HeLa-Zellen wurden mit Glutardialdehyd fixiert und mit einer Methylenblau-Lösung (0,05%; v/v) für 15 Minuten angefärbt. Nach vorsichtigem Waschen wurde der Farbstoff mit 0,2 ml einer 0,33 N Salzsäure in die Kavitäten eluiert. Die optischen Dichten wurden bei 660 nm in einem *SUNRISE Mikrotiterplatten-Lesegerät* (TECAN, Schweiz) gemessen. Die GI_{50} - und CC_{50} -Werte wurden als die Schnittpunkte der Dosis-Wirkungs-Kurve mit der 50%-Linie definiert und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die in der Tabelle 19 (4.1.2h) angegebenen GI_{50} - und CC_{50} -Werte sind Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Messungen.

3.2.4 Bioanalytische Methoden

3.2.4a Herstellung PBS -Puffer (pH 7,4)

Zur Herstellung wurde zuerst eine zehnfach konzentrierte PBS-Lösung (10xPBS) aus 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 und 2,4 g KH_2PO_4 angefertigt. Diese wurde anschließend membranfiltriert, 1:10 (v/v) verdünnt und mit 10 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Der PBS-Puffer wurde bei der flüssigkeitschromatographischen $\log P_{O/W}$ -Bestimmung (3.2.2b) und der spektrofluorimetrischen K_d -Wert-Messung (3.2.2f) verwendet.

3.2.4b UV-Durchlässigkeit der Reaktionsgefäße für das Photo-Cross-Linking

Die UV-A-Durchlässigkeit der Reaktionsgefäße wurde im laufenden Betrieb der Bestrahlungskammer [Skizze bei Radschuweit 2002] bestimmt. Strahlungsquellen waren vier parallel angeordnete CLEO Performance R UV-A-Leuchtstoffröhren (je 40 Watt) mit einem Emissionsspektrum von 305 nm bis 420 nm. Der Abstand zwischen den UV-Lampen und der bestrahlten Probenlösung betrug bei allen Untersuchungen ca. 8 cm. Zur Bestimmung der

UV-Durchlässigkeit wurde über eine Glasfasersonde, welche sich im Inneren der Reaktionsgefäße befand, das Licht an einen Diodenarray-Detektor (Setronic) weitergeleitet und die Intensität gemessen.

3.2.4c Photoreaktivität von Benzophenon

Eine Lösung (Gesamtvolumen: 1000 μl) von Substanz P (10 μM) in HEPES (20 mM, pH 7,4) wurde nach Zugabe eines zehnfach molaren Überschusses an Benzophenon mit steigender Bestrahlungsdosis (2, 4, 6, 8, 10, 12 J/cm^2) UV-A-Licht ausgesetzt. Um eine Überhitzung der Polypropylen-Reaktionsgefäße zu vermeiden, erfolgte die Photoreaktion auf Eis in waagrechter Lage der Gefäße. Aus dem Ansatz wurde sowohl vor als auch nach der Photoreaktion bei jeder der sechs Bestrahlungsdosen ein Volumen von 140 μl entnommen, in einem 1:1(v/v)-Verhältnis mit einer gesättigten α -CHCA-Matrixlösung (ACN/TFA, 50%/0,1%; v/v) auf einem MALDI-Edelstahl-Probenteller kokristallisiert und mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS untersucht. Die Überführung des Probentellers in das *MALDI-TOF/TOF-MS Ultraflex III* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)-Massenspektrometer wurde manuell ausgeführt. Für die MS- und MS/MS-Messungen der Peptide wurden der positive Ionisierungs- und Reflektor-Modus genutzt. Für ein Massenspektrum im m/z -Bereich von 800-5000 wurden 2200 Laserschüsse pro Probenplatz zu einem Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung erfolgte extern mit dem Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) (Tab. 4). Die MS-Datenaufnahme erfolgte mit der Software *FlexControl 1.3*, die manuelle Spektrenauswertung mit der Software *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

Tab. 4: Referenzpeptide zur Kalibrierung für die MALDI-TOF/TOF-MS/MS.

Peptid	Monoisotopische Masse $[\text{M}+\text{H}]^+$
Bradykinin (1-7)	757,399 Da
Angiotensin II	1046,542 Da
Angiotensin I	1296,685 Da
Substanz P	1347,735 Da
Bombesin	1619,822 Da
ACTH Spaltpeptid (1-17)	2093,086 Da
ACTH Spaltpeptid (18-39)	2465,198 Da
Somatostatin	3147,471 Da

3.2.4d Bradford-Test zur Proteingehaltsbestimmung

Die Konzentration der Proteinlösungen wurde mit Hilfe einer linearen Regressionsgeraden, welche aus BSA-Standardproben erstellt wurde, überprüft. Dabei wurde der BSA-Standard (1,37 mg/ml, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in vier Verdünnungen (0,34 mg/ml, 0,69 mg/ml, 1,03 mg/ml, 1,37 mg/ml; jeweils mit H₂O-MQ) eingesetzt. Die Proteinlösung wurde mit H₂O-MQ verdünnt. Kalibrierstandards und Proteinlösungen wurden mit Bradford-Reagens (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 1:50 (v/v) verdünnt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsmessung am Spektralphotometer *Ultrospec 100 pro* (GE Healthcare) in *Einmal-Kunststoffküvetten, Halbmikro PS* (VWR) bei einer Wellenlänge von 595 nm [Bradford 1976].

3.2.4e MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die C2-ähnliche Domäne der h5-LO wurde zur Identitäts- und Reinheitsuntersuchung mittels MALDI-TOF-MS im linearen Messmodus mit einem *Ultraflex III MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert. Dafür wurde zuerst eine gesättigte ethanolische Sinapinsäure-Lösung (SA1) hergestellt, um anschließend mit wenigen Mikrolitern (~ 5µl) die erste Dünnschicht auf einen MALDI-Edelstahl-Probenteller aufzutragen. Die zu messende Proteinlösung (1 M HEPES pH 7,4, < 0,1% Brij-35) wurde mit 0,1% (v/v) TFA verdünnt, mit einer gesättigten Sinapinsäure-Lösung in ACN/TFA, 33%/0,1% (v/v) (SA2) im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und sofort auf die erste Dünnschicht aufgetragen. Die Aufnahme der Massenspektren wurde durch die Software *FlexControl 1.3.0.101.1* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) koordiniert. Die Kalibrierung erfolgte mit dem Protein Standard II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) (Tab. 5).

Tab. 5: Referenzproteine zur Kalibrierung für die MALDI-TOF-MS.

Protein	Relative Masse
Trypsinogen [M+H] ⁺	23982 Da
Protein A [M+H] ⁺	44613 Da
Bovines Serumalbumin (BSA) [M+H] ⁺	~ 66,5 kDa
Protein A [M+H] ²⁺	22307 Da
Bovines Serumalbumin (BSA) [M+H] ²⁺	~ 33,3 kDa

3.2.4f Mikrodialyse

Aufgrund der Inkompatibilität des Tris-HCl-Puffers mit aminreaktiven Vernetzungsreagenzien musste bei dem Fusionsprotein MBP-C2 ein Pufferwechsel durchgeführt werden. Der Austausch wurde mit *Slide-A-Lyzer[®] Minidialyse-Einheiten* (molekulare Größengrenze der Dialysierbarkeit: 10 000 Da) (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) realisiert. Dabei wurde unter Berücksichtigung der gewünschten Proteinkonzentration und Anzahl an Einzelexperimenten ein entsprechendes Volumen an Proteinlösung (MBP-C2) über Nacht gegen 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4; 1 mM CaCl₂) unter Eiskühlung dialysiert. Am nächsten Tag schlossen sich die enzymatische Spaltung mittels TEV-Protease und die Cross-Linking-Experimente an.

3.2.4g TEV-Protease-Spaltung

Die Abspaltung des MBP vom Fusionsprotein MBP-C2 erfolgte im direkten Anschluss an die Mikrodialyse mittels TEV-Protease. Bei der TEV-Protease handelt es sich um die katalytische Domäne des Nuclear Inclusion a (Nia) Proteins (27 kDa), welches vom *tobacco etch virus* (TEV) kodiert wird. Die Protease erkennt ein lineares Epitop der allgemeinen Form E-X_{aa}-X_{aa}-Y-X_{aa}-Q-(G/S) mit der Spaltung zwischen Q und G oder Q und S. Die im MBP-C2-Fusionsprotein vorliegende Erkennungssequenz ist ENLYFQG [Kapust 2002]. Das Verhältnis Protease/Fusionsprotein betrug 1:70 (m/m) bei einer Inkubationszeit von 30 min bei RT.

3.2.4h Chemische Quervernetzung mit homobifunktionellen aminreaktiven Cross-Linkern

Nach der Proteingehaltsbestimmung, ggf. Mikrodialyse und TEV-Protease-Spaltung wurden sechs Ansätze zu je 600 µl für die Quervernetzungsreaktion vorbereitet (Tab. 6). Als erstes wurde ein entsprechendes Volumen an Proteinlösung für eine gewünschte Endkonzentration von 10 µM in 600 µl vorgelegt. Danach wurde nacheinander mit den berechneten Volumina H₂O-MQ und CaCl₂-Lösung (für eine Ca²⁺-Endkonz. von 1 mM) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der in DMSO gelöste Ligand LP₁₂₁ oder B02 (Endkonz. 10 µM) oder reines DMSO (Blindprobe) zupipettiert und weitere 20 min bei RT inkubiert. Von den aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien BS²G und BS³ wurde jeweils eine 1:1-Mischung ihrer undeutierten/vierfach deutierten Form (D₀/D₄) als 100 mM Stammlösung in DMSO vorbereitet und in hundertfach molarem Überschuss zu jeweils zwei Ansätzen zugegeben (Tab. 6). Nach 30 und 60 min wurden je Ansatz 300 µl entnommen und mit 6 µl wässriger 1 M NH₄HCO₃ (Endkonz. 20 mM) die Reaktion abgestoppt. Anschließend

erfolgte die enzymatische Spaltung der Ansätze entweder in Lösung oder nach gelelektrophoretischer Trennung.

Tab. 6: Reaktionsansätze für ein Quervernetzungsexperiment mit homobifunktionellen aminreaktiven Cross-Linkern und der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO.

	1	2	3	4	5	6	Endkonz.
C2 [80 µM]	72 µl	72 µl	72 µl	72 µl	72 µl	72 µl	10 µM
CaCl₂ [50 mM]	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl	1 mM
LP₁₂₁/B02 [1mM]	6 µl	DMSO (6 µl)	6 µl	DMSO (6 µl)	6 µl	DMSO (6 µl)	10 µM
BS²G-D₀/D₄ [100 mM]	6 µl	6 µl	-----	-----	DMSO (6 µl)	DMSO (6 µl)	1 mM
BS³-D₀/D₄ [100 mM]	-----	-----	6 µl	6 µl			1 mM
H₂O-MQ	504 µl	504 µl	504 µl	504 µl	504 µl	504 µl	

3.2.4i (Photo-)chemische Quervernetzung mit heterobifunktionellen Cross-Linkern

Die Probenvorbereitung erfolgte analog der Cross-Linking-Reaktion mit den homobifunktionellen aminreaktiven Reagenzien (3.2.4h). Die Reaktion wurde, aufgrund der weniger guten Wasserlöslichkeit der Photo-Cross-Linker, (Keto-NHS (3.4.1), BBI (3.4.3) oder SBC/SBDC (D₀/D₂, im 1:1-Verhältnis) (3.4.2)) nur mit einem zehnfachen Überschuss an Quervernetzungsreagenz gestartet (Tab. 7). Die finale Proteinkonzentration betrug jeweils 10 µM und die Ca²⁺-Konzentration 1 mM. Nach einer Inkubationszeit von 120 min wurden die Reaktionsansätze mit je 6 µl NH₄HCO₃ (1 M) abgestoppt. Zur anschließenden Abtrennung von überschüssigem Quervernetzungsreagenz wurden *Microcon YM-10* (Ausschluss 10 000 Da) Zentrifugenfilter (Millipore) verwendet.

Tab. 7: Reaktionsansätze für ein Quervernetzungsexperiment mit heterobifunktionellen amin- und photoreaktiven Cross-Linkern und der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO (die Experimente mit Calmodulin wurden in analoger Weise durchgeführt).

	1	2	3	4	5	6	Endkonz.
C2 [29 μ M]	172 μ l	172 μ l	10 μ M				
CaCl₂ [50 mM]	10 μ l	10 μ l	1 mM				
B02 [1 mM]	5 μ l	DMSO	5 μ l	DMSO	5 μ l	DMSO	10 μ M
SBC/SBDC [10 mM]	----	----	5 μ l	5 μ l	DMSO (5 μ l)	DMSO (5 μ l)	100 μ M
BBI [10 mM]	5 μ l	5 μ l	----	----			
H₂O-MQ	308 μ l	308 μ l					

Den Reaktionsansätzen wurde nach der Modifizierungsreaktion und der anschließenden Microcon-Filtration ein Blindwert entnommen und anschließend im Probengefäß (Eppendorf, 1,5 ml) waagrecht auf Eis in der Bestrahlungskammer (3.2.4b) bei 1-12 J/cm² mit UV-A-Licht bestrahlt. Für die Bestimmung der UV-Dosen wurde ein UV-A-Sensor (Kühnast Strahlungstechnik; Wächtersbach, Deutschland) eingesetzt. Als Standarddosen für spätere Photo-Cross-Linking-Experimente wurden 4 oder 8 J/cm² gewählt.

3.2.4j Gelelektrophoretische Proteintrennung (SDS-PAGE)

Um die Bildung von Di- und Oligomeren während der Cross-Linking-Experimente zu erkennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer vertikalen, für vier Trenngele (8 x 10 cm) ausgelegten Plattenelektrophoresekammer *Mini-Protean*[®] 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vorgenommen. Die verwendeten Gele wurden stets frisch hergestellt und bestanden aus einem 15%igen Trenn- und einem 5%igen Sammelgel (Tab. 8). Die Reaktionsgemische wurden unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli [Laemmli 1970] getrennt. Für ein Gel mit zehn Taschen wurden zuerst 3-4 μ l der Reaktionsmischung (mindestens 100-200 pm Protein) mit dem doppelten Volumen an Probenpuffer (Laemmli-Puffer/ β -Mercaptoethanol, 19/1; v/v) gemischt. Anschließend wurden die zentrifugierten Ansätze im Trockenschrank bei 95°C für max. 5 Minuten inkubiert. Nach dem Abkühlen auf RT wurden in die erste und letzte Proben tasche des SDS-Gels jeweils 5 μ l

des Proteinmarkers *Precision Plus Protein unstained standard* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und dazwischen die zu trennenden Proteinmischungen pipettiert. Vor der elektrophoretischen Trennung erfolgte zuerst eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel durch fünfminütiges Anlegen einer Spannung von 100 V. Die anschließende Trennung lief in einem Zeitfenster von ca. 50 min bei einer Spannung von 200 V ab. Hatte der im Laemmli-Puffer enthaltene Indikatorfarbstoff das SDS-Gel verlassen, wurde die Elektrophorese beendet.

Tab. 8: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels (15%).

Chemikalien	Trenngel (15%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid-Bis 40%	1875 µl	325 µl
Tris/HCl-Lsg. (1,5 M), pH 8,8	1250 µl	-
Tris/HCl-Lsg. (0,5 M), pH 6,8	-	625 µl
H ₂ O-MQ	1795 µl	1500 µl
SDS-Lsg. (10%; m/v)	50 µl	25 µl
APS-Lsg. (10%; m/v)	25 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	5 µl

3.2.4k Färbung der Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten abgelöst und dreimal mit H₂O-MQ gewaschen, um den SDS-Probenpuffer zu entfernen. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie BB R250-Lösung (1 g Coomassie-Brillantblau R250, 100 ml Essigsäure, 400 ml Methanol, 500 ml H₂O-MQ) bedeckt und für 30 Sekunden in einem Mikrowellenofen erhitzt. Nach zehnminütigem Schwenken auf dem Schütteltisch waren die Gele ausreichend gefärbt. Nach Abgießen der Färbelösung wurde erneut dreimal mit H₂O-MQ gewaschen und danach in der Entfärbelösung (Methanol/Essigsäure/H₂O-MQ, 25%/10%/65%; v/v/v) für 30 Sekunden in einem Mikrowellenofen erhitzt. Die Gele wurden anschließend so lange auf dem Schütteltisch geschwenkt, bis sich der Gelhintergrund ausreichend kontrastreich entfärbt hatte. Im Anschluss wurde die Lösung abgegossen und das Gel mehrfach mit H₂O-MQ gewaschen, um es dem Geldokumentationssystem zuzuführen.

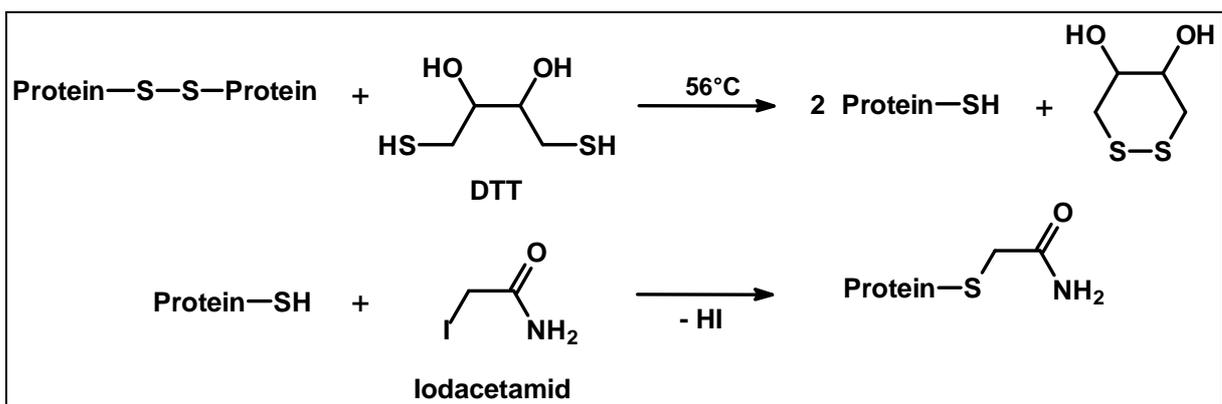
3.2.4l Geldokumentation

Die Auswertung und Dokumentation der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte mit dem *Molecular Imager Gel Doc XR System* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Die Software war *Quantity One 4.6.2 1D-Analysis Software* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.2.4m Enzymatische Proteinspaltung im Gel

Alle folgenden Arbeitsschritte für die Proteinspaltung wurden an der *Vertical Laminar Airflow Polaris* (Steril) Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Keratin-Kontaminierungen zu vermeiden. Die einzelnen Waschschrte erfolgten bei RT auf dem *Kühlthermomixer MKR 13* (HLC Biotech, Bovenden).

- (1) Die gewünschten Gelbanden wurden mit einer angeschnittenen 1000 μ l-Pipettenspitze ausgestanzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt.
- (2) Es wurde einmal mit 100 μ l H₂O-MQ und zweimal mit Acetonitril (50%; v/v) für jeweils 10 min gewaschen. Es schloss sich ein fünfminütiger Waschschrte mit 80 μ l Acetonitril (100%) an, bei dem sich die Gelstückchen weitestgehend entfärbten und durch die Dehydratisierung zusammenklebten.
- (3) Mit 80 μ l 100 mM NH₄HCO₃ wurden die Gelstücke rehydratisiert und nach fünf Minuten mit zusätzlich 80 μ l Acetonitril (100%) weitere zehn Minuten geschüttelt. Der gesamte Überstand wurde verworfen und die Gelstücke für 30 Minuten in der Vakuumzentrifuge *miVac DuoConcentrator* (Genevac Inc., USA) bei 30°C getrocknet.
- (4) Für Cystein-haltige Proteine schloss sich ein Reduktions- und Alkylierungsschrte an (Schema 6). Dabei wurde zuerst mit 80 μ l 10 mM DTT-Lösung (in 100 mM NH₄HCO₃ gelöst) über 45 min bei 56°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde der komplette Überstand verworfen und durch 80 μ l einer 55 mM Iodacetamid-Lösung (in 100 mM NH₄HCO₃) ersetzt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei RT über 30 min (Schema 6). Die Zugabe der Iodacetamid-Lösung erfolgte zügig, um eine erneute Oxidation der Thiolgruppen zu vermeiden. Danach wurde wie unter (3) beschrieben verfahren.



Schema 6: Reduktion von Disulfidbrücken und Modifizierung der freien Thiol-Gruppen in Proteinen.

- (5) Für die proteolytische Spaltung wurde das entsprechende Enzym im Massenverhältnis 1:50 (m/m, Enzym/Protein) eingesetzt. Sowohl bei der Spaltung mit Trypsin als auch mit einer Trypsin-/AspN-Mischung wurde zuerst auf Eis die erforderliche Menge Trypsin zu den

getrockneten Gelstücken zupipettiert und nach einer Wartezeit von ca. 15 min gegebenenfalls die zweite Protease zugegeben. Danach wurde so viel 50 mM NH_4HCO_3 zugegeben, bis die Gelstücken vollständig bedeckt waren und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

(6) Die Inkubation wurde durch Zugabe von 50 μl der Extraktionslösung (ACN/TFA/ H_2O -MQ, 47,5%/5%/47,5%; v/v/v) gestoppt und die Mischung für zehn Minuten geschüttelt. Die Lösung wurde entnommen und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) gesammelt. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal wiederholt. Das Gesamtextraktvolumen wurde an der Vakuumzentrifuge *miVac DuoConcentrator* (Genevac Inc., USA) auf ein Volumen von 5-10 μl eingengt und für die MS-Analyse mit wässriger TFA 1% (v/v) auf einen pH-Wert von ~ 2 eingestellt.

3.2.4n Enzymatische Proteinspaltung in Lösung

Um die Ausbeute an proteolytischen Spaltpeptiden zu erhöhen, wurde bei vernachlässigbarer Di-/Oligomerbildung nach der Cross-Linking-Reaktion eine Proteinspaltung in Lösung durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden dabei auf ca. 3 μl eingengt und mit 5 μl 8 M Harnstoff und 20 μl einer 0,4 M NH_4HCO_3 -Lösung versetzt. Danach wurde bei Cystein-haltigen Proteinen eine Reduktion mit anschließender Alkylierung durchgeführt (Schema 6). Dazu wurde zuerst 15 min mit 5 μl 45 mM DTT- Lösung (in 0,4 M NH_4HCO_3) bei 56°C und danach mit 5 μl 100 mM Iodacetamid- Lösung (in 0,4 M NH_4HCO_3) bei RT für 15 min im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde mit 60 μl H_2O -MQ aufgefüllt und die entsprechende Protease im Verhältnis 1/59 (m/m, Enzym/Protein) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei 37°C durchgeführt.

3.2.4o Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Die proteolytisch gespaltenen Peptidmischungen wurden mittels eines *Ultimate™ 3000 Nano-HPLC*-Systems (Dionex) aufgetrennt. Dazu wurden die Proben zuerst über einen automatischen Probengeber auf eine *Acclaim PepMap C18-Vorsäule* (300 μm x 5 mm, 5 μm , 100 Å; Dionex, Germany) geladen und für 15 min mit einer 0,1%igen (v/v) TFA-Waschlösung entsalzt. Danach erfolgte die chromatographische Trennung mittels einer *Acclaim PepMap C18-Trennsäule* (75 μm x 150 mm, 3 μm , 100 Å; Dionex), welche vorher mit 95% (v/v) Fließmittel A (A: Acetonitril/TFA, 5%/0,05%; v/v) äquilibriert wurde. Die Peptide wurden mit einem Gradienten (0-25 min: 5-50% B, 25-30 min: 50-100% B, 30-40 min: 100% B, 40-45 min: 5% B; Fließmittel B: Acetonitril/TFA, 80%/0,04%; v/v) bei einer Flussrate von 300 nl/min eluiert und bei Wellenlängen von 214 und 280 nm detektiert. Nach

Passieren des UV-Detektors wurden 24-Sekunden-Fractionen mit Hilfe des *ProteinExpert fraction collector* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) zuerst mit 1,1 µl α-CHCA-Matrix (0,7 µg/µl α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in ACN/TFA (90%/0,1% v/v), 1 mM NH₄H₂PO₄) gemischt und sofort auf ein 384 MTP 800 µm AnchorChip-Target (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) aufgetragen. Die Überführung des Probenhalters in das *MALDI-TOF/TOF-MS Ultraflex III* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) wurde manuell ausgeführt (*offline-Kopplung*). Für die MS- und MS/MS-Messungen der Peptide wurde der positive Ionisierungs- und Reflektor-Modus genutzt. Für ein Massenspektrum im *m/z*-Bereich von 800-5000 wurden 2200 Laserschüsse pro Probenplatz zu einem Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung erfolgte extern mit dem Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) (Tab. 4). Monoisotopische Signale mit einem Signal/Rauschverhältnis (S/N) > 15 wurden mit Hilfe des *SNAP-Algorithmus* (Sophisticated Numerical Annotation Procedure) ausgewählt und für die anschließende laserinduzierte Fragmentierung (LIFT) in einer Massenliste (*compound list*) zusammengefasst. Basierend auf dieser Liste wurde die automatische MS/MS-Messung durchgeführt. Die Spektrenakquisition erfolgte vollautomatisch unter der Steuerung der *WarpLC 1.1* Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen), welche die MS-Datenaufnahme-Software *FlexControl 1.3* und die Datenauswertungs-Software *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) koordinierte.

3.2.4p Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS der proteolytisch gespaltenen Quervernetzungsprodukte

Die proteolytisch gespaltenen Peptidmischungen wurden mittels eines *Ultimate™ plus Nano-HPLC-Systems* mit Famos-Probengeber und Switchos-Säulenschaltmodul (LC Packings/Dionex) aufgetrennt. Die Peptide wurden mit einem Gradienten (0-90 min: 5-50% B, 90-91 min: 50-100% B, 91-96 min: 100% B; Fließmittel A: ACN/FA, 5%/0,1%; v/v; Fließmittel B: ACN/FA, 80%/0,1%; v/v) bei einer Flussrate von 300 nl/min eluiert und bei Wellenlängen von 214 und 280 nm detektiert. Nach Passieren des UV-Detektors wurden die einzelnen Fractionen direkt in die nano-ESI-Ionenquelle (Proxeon, Odense, Dänemark) des LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers (ThermoFisher Scientific, Bremen) geleitet (*online-Kopplung*).

Die MS-Daten wurden über 122 min im hochaufgelösten *full scan Modus* (*m/z* 300 bis 2000, Auflösung von 60 000) im Orbitrap-Analysator aufgezeichnet. Aus jedem Massenspektrum wurden die drei intensivsten Signale ausgewählt (Isolationsfenster 2 u) und in der linearen Ionenfalle (LTQ) mittels CID fragmentiert. Die erhaltenen Fragmentionen wurden in der

Orbitrap mit einer Auflösung von 15 000 analysiert. Die Datenaufnahme wurde von *Xcalibur 2.0.7* (ThermoFisher Scientific, Bremen) in Verbindung mit *DCMS link 2.0* (Dionex) bewerkstelligt.

3.2.4q Auswertung von MS- und MS/MS-Daten

Die Identität der Proteine wurde anhand der Masse ihrer charakteristischen Spaltpeptide (je nach verwendeter Protease) über MS- und MS/MS-Datenabgleich mit der Suchmaschine *Mascot 2.2.06* (MatrixScience Inc., Boston USA) bestimmt und abgesichert (*peptide fragment fingerprinting*, PFF). Die Suche nach mit Cross-Linkern modifizierten Peptiden erfolgte, indem die durch den Cross-Linker erzeugte theoretische Massenabweichung als variable Modifikation an der jeweiligen Aminosäure definiert wurde. Die PFF-Methode besitzt eine hohe Zuverlässigkeit für Proteine mit bekannter Primärstruktur und bei Verwendung von Proteasen mit hoher Spezifität.

Zur Identifizierung und Unterscheidung zwischen modifizierten und quervernetzten Peptiden (*cross-links*) wurde eine von *Biotoools 3.1* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) erstellte Liste der gemessenen Massen in die Software *GPMAW 8.20* (Lighthouse Data, Odense, DK) importiert. Hier erfolgte der Abgleich zwischen einer berechneten Massenliste, welche alle theoretisch möglichen Produkte einer Cross-Linking-Reaktion enthielt, mit den experimentell ermittelten Daten. Dabei musste beachtet werden, dass die Software *GPMAW 8.20* nur eine begrenzte Anzahl an Massendaten gleichzeitig verarbeiten kann (500 Einträge). Bei der Massenberechnung der theoretischen Spaltpeptide wurden, unter Berücksichtigung einer unvollständigen Proteolyse, maximal sechs übergangene Spaltstellen pro Peptid zugelassen. Tryptische Peptide mit einem C-terminal modifizierten Lysin wurden ausgeschlossen. Die tolerierte Massenabweichung der Signale im MALDI-Massenspektrum von den berechneten Massen betrug 50 ppm, im Fragmentationenspektrum (MS/MS) 1 u.

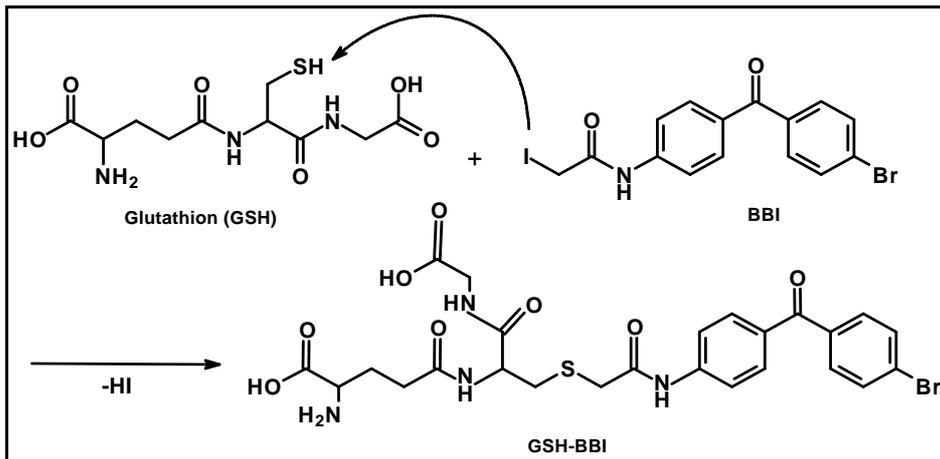
Die MS/MS-Daten der erhaltenen Kandidaten wurden nun gezielt nach den berechneten b- und y-Fragmentationen (2.3.3, Abb. 15, 16) durchsucht. Hierbei bestand einmal die Möglichkeit, mit einer durch *GPMAW 8.20* erstellten Fragmentationenliste manuell die MS/MS-Daten zu evaluieren oder mit dem *Biotoools*-Unterprogramm *Sequence-Editor* die Fragmentierung des Cross-Linking-Produktes zu simulieren und mit den MS/MS-Daten automatisch abzugleichen. Beide Methoden wurden komplementär eingesetzt.

3.2.4r Untersuchungen zur Ligandenstabilität unter Photo-Cross-Linking-Bedingungen mit MEKC und fluorimetrischer Detektion

Eine B02-Stammlösung (1 mM in DMSO) wurde mit H₂O-MQ auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt und unter den Bedingungen einer Photo-Cross-Linking-Reaktion (3.2.4i) verschiedenen UV-A-Bestrahlungsmengen (2, 4, 6 J/cm²) ausgesetzt. Da es sich bei dem Liganden um eine fluoreszierende Neutralverbindung handelt (Emission bei ~ 465 nm), sollte zur Untersuchung der bestrahlten Proben eine mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) als Trennverfahren mit anschließender spektrofluorimetrischer Detektion zum Einsatz kommen. Die verwendete unbeschichtete *fused-silica*-Trennkapillare (Supelco, Deisenhofen) hatte eine Gesamtlänge von 100 cm und einen Innendurchmesser von 75 µm. Die Strecke vom Anfang der Kapillare bis zum Fenster für den *Argos 250B Fluoreszenzdetektor* (Flux Instruments, Basel, Schweiz – Anregungsfilter: 350-400 nm, Emissionsfilter: 495 nm) betrug 77 cm. Die Trennung wurde mit dem Kapillarelektrophorese-System *PrinCE 450* (Prince Technologies B.V. Clinical Systems Division, Emmen, Niederlande) und einem Elektrophoresepuffer aus SDS/Borax (20 mM/10 mM, pH 9,2) realisiert. Vor jeder Messung wurde die *fused-silica*-Kapillare mit 0,1 M NaOH-Lösung gespült und anschließend mit dem Elektrophoresepuffer äquilibriert (jeweils 1000 mbar, 1 min). Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit einem Druck von 10 mbar injiziert und bei einer Spannung von 25 kV getrennt. Die Messzeit betrug 14 Minuten. Zur Datenerfassung diente die Gerätesoftware *BORWIN 1.21.07* (JMBS Developpements, Grenoble, Frankreich).

3.2.4s Kopplung von BBI an Glutathion zur Bestimmung der Thiolreaktivität

Von einer 10 mM Stammlösung BBI in DMSO und einer äquimolaren Stammlösung von reduziertem Glutathion (GSH) in H₂O-MQ wurde eine 1:1-Mischung (1 mM/1 mM) in Acetonitril/Wasser (70/30; v/v) hergestellt und in einem braunen Reaktionsgefäß über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz zusammen mit den Referenzsubstanzen (BBI, GSH) auf eine DC-Platte aufgetragen und mit *n*-Butanol/Essigsäure/H₂O-MQ (12/3/5; v/v/v) eluiert. Nach dem Trocknen der Platte wurde diese mit Ninhydrin-Lösung (70 mg Ninhydrin in 20 ml *n*-Butanol und 0,8 ml Eisessig) besprüht und so lange im Trockenschrank bei 80°C erhitzt, bis die Flecke für das Tripeptid GSH und sein Kopplungsprodukt (Schema 7) deutlich zu erkennen waren.



Schema 7: Reaktionsmechanismus für die thiolreaktive Kopplung von BBI an GSH.

3.3 Synthese und Charakterisierung der 1,2,4-Triazin-5-one

3.3.1 Allgemeine Darstellungsvorschrift für die Amidrazon-Ausgangsstoffe

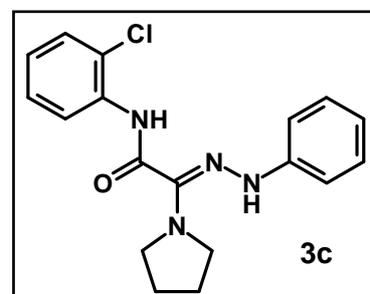
Eine Lösung des Hydrazonoylchlorids (3,0 g, 10 mmol) in 40 ml getrocknetem Dioxan wurde tropfenweise zu einer Lösung des entsprechenden Amins (1,4 g, 20 mmol) in wenig Dioxan gegeben. Da Ammoniak und aliphatische Amine eine ausreichende Basizität besitzen, um als Protonenakzeptor zu fungieren, wurden diese Reaktionspartner in doppelt molarer Menge eingesetzt und auf den Zusatz von Triethylamin verzichtet. Nach zwölfstündigem Rühren bei RT wurde der Ansatz in ca. 300 ml eiskaltes Wasser gestürzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Calciumchlorid im Membranpumpenvakuum getrocknet. Die Verbindungen konnten ohne weitere Reinigungsschritte der Triazinon-Synthese zugeführt werden.

Die Darstellung der Amidrazone **3a-b**, **3e** und **3g** (4.1.1) ist bereits in der Literatur beschrieben [Frohberg & Sippl 2006].

3.3.1a *N*-(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid (**3c**)

Als Ausgangsstoffe wurden (*Z*)-2-(2-Phenylhydrazono)-2-chlor-*N*-(2-chlorphenyl)acetamid **2a** (4.1.1, Tab. 9) sowie destilliertes Pyrrolidin eingesetzt.

Ausbeute:	2,5 g (81%)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄ O
Exakte Masse:	342,1247 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,59; B: 0,46
Smp.:	101-106°C



¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 9,66 (1 H, s, CO-NH), 9,47 (1 H, s, N-NH), 8,22-6,83 (9 H, m, Ar-H), 3,29 (4H, t, *J* = 6 Hz, CH₂-N-CH₂), 1,86 (4 H, m, *J* = 6 Hz, 2 CH₂)

¹³C-NMR: δ_C (100 MHz, DMSO-d₆) = 160,5 (1 C, C=O), 138,9 (1 C, C=N), 145,1-113,9 (12 C, Ar-C), 49,2 (2 C, CH₂-N-CH₂), 25,9 (2 C, 2 CH₂)

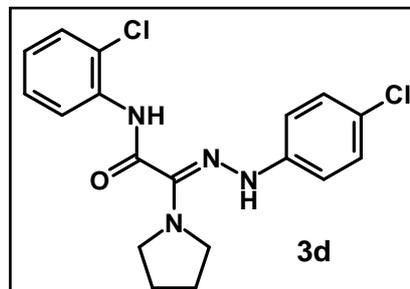
EI-MS, *m/z* (%): 342 (M⁺, 100)

Elementaranalyse: ber.: C 63,06%; H 5,59%; N 16,34%; Cl 10,34%
gef.: C 63,00%; H 5,51%; N 15,88%; Cl 10,22%

3.3.1b *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid (3d)

Als Ausgangsstoffe wurden (*Z*)-2-[2-(4-Chlorphenyl)hydrazono]-2-chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-acetamid **2b** (4.1.1, Tab. 9) sowie destilliertes Pyrrolidin eingesetzt.

Ausbeute: 2,6 g (86%)
 Summenformel: C₁₈H₁₈Cl₂N₄O
 Exakte Masse: 376,0858 g/mol
 DC-Rf-Wert: A: 0,58; B: 0,42
 Smp.: 113-115°C



¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 9,63 (1 H, s, CO-NH), 9,49 (1 H, s, N-NH), 8,13-6,87 (8 H, m, Ar-H), 3,28 (4 H, t, *J* = 6 Hz, CH₂-N-CH₂), 1,86 (4 H, m, *J* = 6 Hz, 2 CH₂)

¹³C-NMR: δ_C (100 MHz, DMSO-d₆) = 159,9 (1 C, C=O), 138,9 (1 C, C=N), 143,7-113,9 (12 C, Ar-C), 48,6 (2 C, CH₂-N-CH₂), 25,2 (2 C; 2 CH₂).

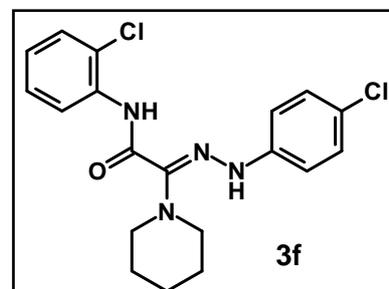
EI-MS, *m/z* (%): 376 (M⁺, 100), 221 (41)

Elementaranalyse: ber.: C 57,30%; H 4,81%; N 14,85%; Cl 18,79%
 gef.: C 57,47%; H 4,70%; N 14,51%; Cl 17,75%

3.3.1c *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(piperidin-1-yl)acetamid (3f)

Als Ausgangsstoffe wurden (*Z*)-2-[2-(4-chlorphenyl)hydrazono]-2-chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-acetamid **2b** (4.1.1, Tab. 9) sowie destilliertes Piperidin eingesetzt.

Ausbeute: 3,5 g (92%)
 Summenformel: C₁₉H₂₀Cl₂N₄O
 Exakte Masse: 390,1014 g/mol
 DC-Rf-Wert: A: 0,75; B: 0,51
 Smp.: 137-140°C



¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 9,51 (1 H, s, CO-NH), 9,34 (1 H, s, N-NH), 8,12-7,10 (8 H, m, Ar-H), 3,00 (4 H, t, *J* = 6 Hz, CH₂-N-CH₂), 1,65 (4 H, m, *J* = 6 Hz, 2 CH₂), 1,52 (2 H, m, *J* = 6 Hz, CH₂)

^{13}C -NMR: δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) = 159,9 (1 C, C=O), 138,9 (1 C, C=N), 142,7-115,1 (12 C, Ar-C), 48,4 (2 C, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$), 25,2 (2 C; 2 CH_2), 23,9 (1 C, CH_2)

EI-MS, m/z (%): 390 (M^+ , 100), 84 (89), 235 (49)

Elementaranalyse: ber.: C 58,32%; H 5,15%; N 14,32%; Cl 18,12%
gef.: C 58,42%; H 5,07%; N 14,18%; Cl 17,88%

3.3.1d *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)hydrazono-2-(morpholin-4-yl)acetamid (3h)

Als Ausgangsstoffe wurden (*Z*)-2-[2-(4-Chlorphenyl)hydrazono]-2-chlor-*N*-(2-chlorphenyl)-acetamid **2b** (4.1.1, Tab. 9) sowie destilliertes Morpholin eingesetzt.

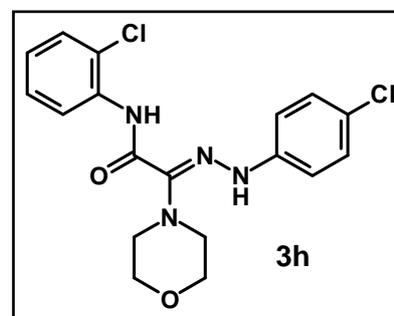
Ausbeute: 3,2 g (81%)

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$

Exakte Masse: 392,0807 g/mol

DC-Rf-Wert: A: 0,47; B: 0,17

Smp.: 135-142°C



^1H -NMR: δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) = 9,64 (1 H, s, N-NH), 9,56 (1 H, s, CO-NH), 8,14-7,07 (8 H, m, Ar-H), 3,77 (4 H, t, $J = 4.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 3,08 (4 H, t, $J = 4,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$)

^{13}C -NMR: δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) = 159,9 (1 C, C=O), 137,3 (1 C, C=N), 142,7-115,4 (12 C, Ar-C), 66,0 (2 C; $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$), 47,5 (2 C, $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2$)

EI-MS, m/z (%): 392 (M^+ , 25), 237 (100), 125 (51), 266 (48)

Elementaranalyse: ber.: C 54,97%; H 4,61%; N 14,25%; Cl 18,03%
gef.: C 55,29%; H 4,48%; N 14,14%; Cl 17,80%

3.3.2 Allgemeine Darstellungsvorschrift für die 1,2,4-Triazin-5-one

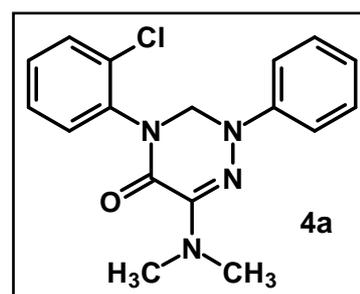
Das entsprechende Amidrazon (10 mM) wurde in 50 ml Ethanol suspendiert und mit 1,5 ml Formaldehydlösung 37% (v/v) und 0,1 g *p*-Toluensulfonsäure (0,6 mM) unter Rückfluss erhitzt, bis sich das Edukt vollständig umgesetzt hatte. War die Reaktion nach zwei Stunden noch nicht abgeschlossen, wurde ein weiteres Mal Formaldehyd und Katalysatorsäure zugegeben und eine weitere Stunde erhitzt. Danach wurde die Mischung auf RT abgekühlt,

das Lösungsmittel abdestilliert und mit Ethanol oder Methanol umkristallisiert. Vor der analytischen Charakterisierung erfolgte noch eine Nachtrocknung der Substanzen über P_2O_5 im Vakuumtrocknungsapparat nach Abderhalden („Trockenpistole“) bei 78°C .

3.3.2a 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-6-dimethylamino-2-phenyl-1,2,4-triazin-5-on (4a)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-(dimethylamino)acetamid **3a** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute:	1,4 g (42%)
Summenformel:	$C_{17}H_{17}ClN_4O$
Exakte Masse:	328,1091 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,68; B: 0,26
Smp.:	108-110°C (EtOH)
λ_{max} (ϵ):	262 nm (11224), 375 nm (4490) in Methanol

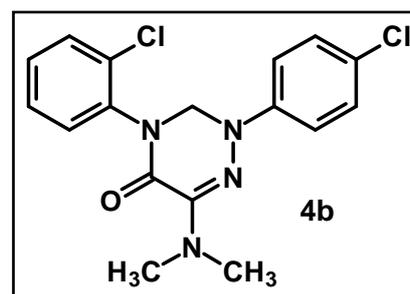


$^1\text{H-NMR}$:	δ_{H} (400 MHz, DMSO-d_6) = 7,63-6,86 (9 H, m, Ar-H), 5,21 (2 H, s, N- CH_2 -N), 2,90 (6 H, s, 2 CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ_{C} (100 MHz, DMSO-d_6) = 152,4 (1 C, C=O), 147,6 (1 C, C=N), 145,0-114,5 (12 C, Ar-C), 63,5 (1 C, N- CH_2 -N), 39,5 (2 C, 2 CH_3)
FT-IR (KBr):	ν (cm^{-1}) = 2950w (CH_3); 1678s (C=O); 1598s, 1499s (C=C, Aromat)
EI-MS, m/z (%):	328 (M^+ , 100), 161 (78), 118 (74)
Elementaranalyse:	ber.: C 62,10%; H 5,21%; N 17,04%; Cl 10,78% gef.: C 62,18%; H 5,21%; N 17,23%; Cl 10,89%

3.3.2b 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-dimethylamino-1,2,4-triazin-5-on (4b)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-hydrazono-2-(dimethylamino)acetamid **3b** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute:	1,3 g (37%)
Summenformel:	$C_{17}H_{16}Cl_2N_4O$
Exakte Masse:	362,0701 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,68; B: 0,25

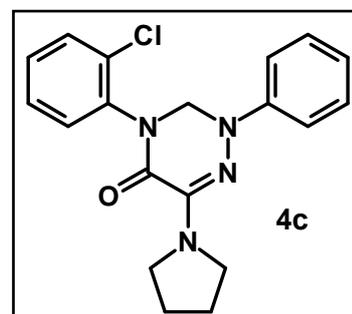


Smp.:	125-128°C (MeOH)
λ_{\max} (ϵ):	262 nm (12500), 375 nm (5000) in Methanol
$^1\text{H-NMR}$:	δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) = 7,63-7,28 (8 H, m, Ar-H), 5,23 (2 H, s, N-CH ₂ -N), 2,91 (6 H, s, 2 CH ₃)
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) = 152,3 (1 C, C=O), 147,9 (1 C, C=N), 143,9-115,9 (12 C, Ar-C), 63,3 (1 C, N-CH ₂ -N), 39,4 (2 C, 2 CH ₃)
FT-IR (KBr):	ν (cm ⁻¹) = 2954w (CH ₃); 1678s (C=O); 1594s, 1493s (C=C, Aromat)
EI-MS, m/z (%):	362 (M ⁺ , 100), 195 (99), 125 (91)
Elementaranalyse:	ber.: C 56,21%; H 4,44%; N 15,42%; Cl 19,52% gef.: C 56,06%; H 4,37%; N 15,45%; Cl 19,43%

3.3.2c 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-phenyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,2,4-triazin-5-on (4c)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid **3c** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute:	2,1 g (61%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₄ O
Exakte Masse:	354,1247 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,70; B: 0,33
Smp.:	119-123°C (EtOH)
λ_{\max} (ϵ):	262 nm (1222), 375 nm (4889) in Methanol

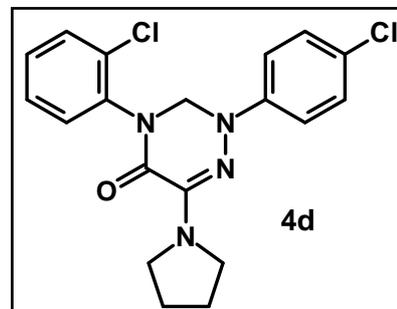


$^1\text{H-NMR}$:	δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) = 7,62-6,82 (9 H, m, Ar-H), 5,21 (2 H, s, N-CH ₂ -N), 3,49 (4 H, t, J = 6 Hz, CH ₂ -N-CH ₂), 1,86 (4 H, m, J = 6 Hz, 2 CH ₂)
$^{13}\text{C-NMR}$:	δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) = 153,1 (1 C, C=O), 145,4 (1 C, C=N), 145,4-114,4 (12 C, Ar-C), 63,9 (1 C, N-CH ₂ -N), 48,1 (2 C, CH ₂ -N-CH ₂), 24,6 (2 C, 2 CH ₂)
FT-IR (KBr):	ν (cm ⁻¹) = 2967w (CH ₃); 1683s (C=O); 1598s, 1500s (C=C, Aromat)
EI-MS, m/z (%):	354 (M ⁺ , 100)
Elementaranalyse:	ber.: C 64,31%; H 5,40%; N 15,79%; Cl 9,99% gef.: C 64,41%; H 5,38%; N 15,74%; Cl 10,22%

3.3.2d 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(pyrrolidin-1-yl)-1,2,4-triazin-5-on (4d)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-hydrazono-2-(pyrrolidin-1-yl)acetamid **3d** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute:	2,2 g (58%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O
Exakte Masse:	388,0858 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,70; B: 0,30
Smp.:	134-136°C (EtOH)
λ _{max} (ε):	262 nm (13350), 375 nm (5340) in Methanol

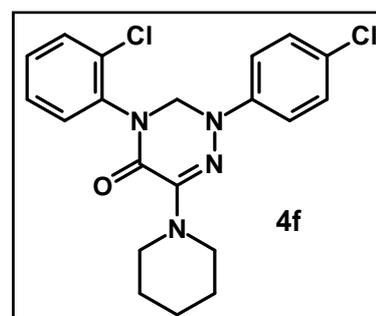


¹ H-NMR:	δ _H (400 MHz, DMSO-d ₆) = 7,62-7,25 (8 H, m, Ar-H), 5,23 (2 H, s, N-CH ₂ -N), 3,49 (4 H, t, <i>J</i> = 6 Hz, CH ₂ -N-CH ₂), 1,85 (4 H, s (br), 2 CH ₂)
¹³ C-NMR:	δ _C (100 MHz, DMSO-d ₆) = 153,7 (1 C, C=O), 146,2 (1 C, C=N), 144,9-116,4 (12 C, Ar-C), 64,3 (1 C, N-CH ₂ -N), 48,9 (2 C, CH ₂ -N-CH ₂), 25,3 (2 C, 2CH ₂)
FT-IR (KBr):	ν (cm ⁻¹) = 2970w (CH ₃); 1683s (C=O); 1592m, 1494s (C=C, Aromat)
EI-MS, <i>m/z</i> (%):	388 (M ⁺ , 100), 221 (64)
Elementaranalyse:	ber.: C 58,62%; H 4,66%; N 14,39%; Cl 18,21% gef.: C 58,77%; H 4,62%; N 14,39%; Cl 18,14%

3.3.2e 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(piperidin-1-yl)-1,2,4-triazin-5-on (4f)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-hydrazono-2-(piperidin-1-yl)acetamid **3f** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute:	2,5 g (63%)
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O
Exakte Masse:	402,1014 g/mol
DC-Rf-Wert:	A: 0,69; B: 0,31
Smp.:	197-198°C (EtOH)
λ _{max} (ε):	262 nm (13819), 375 nm (5528) in Methanol



¹H-NMR: δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,60-7,26 (8 H, m, Ar-H), 5,21 (2 H, s, N-CH₂-N), 3,25 (4 H, t, J = 6 Hz, CH₂-N-CH₂), 1,57 (4 H, m, J = 5 Hz, 2 CH₂)

¹³C-NMR: δ_{C} (100 MHz, DMSO-d₆) = 152,1 (1 C, C=O), 147,4 (1 C, C=N), 143,7-116,0 (12 C, Ar-C), 63,0 (1 C, N-CH₂-N), 48,0 (2 C, CH₂-N-CH₂), 24,6 (2C, 2CH₂), 23,9 (1C, CH₂).

FT-IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2935m (CH₃); 1678s (C=O); 1594m, 1494s (C=C, Aromat)

EI-MS, m/z (%): 402 (M⁺, 100), 235 (74)

Elementaranalyse: ber.: C 59,56%; H 5,00%; N 13,89%
gef.: C 59,70%; H 4,74%; N 13,94%

3.3.2f 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-phenyl-6-(morpholin-4-yl)-1,2,4-triazin-5-on (4g)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-phenylhydrazono-2-(morpholin-4-yl)acetamid **3g** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute: 2,3 g (62%)

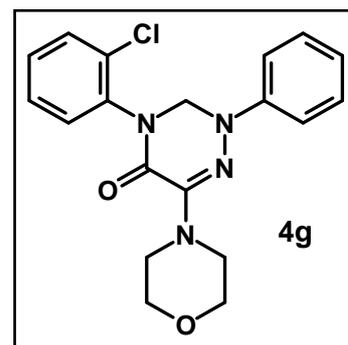
Summenformel: C₁₉H₁₉ClN₄O₂

Exakte Masse: 370,1196 g/mol

DC-Rf-Wert: A: 0,55; B: 0,13

Smp.: 153-155°C (EtOH)

λ_{max} (ε): 262 nm (13889), 375 nm (5556) in Methanol



¹H-NMR: δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,64-6,88 (9 H, m, Ar-H), 5,26 (2 H, s, N-CH₂-N), 3,72 (4 H, t, J = 4,7 Hz, CH₂-O-CH₂), 3,27 (4 H, s (br), CH₂-N-CH₂)

¹³C-NMR: δ_{C} (100 MHz, DMSO-d₆) = 152,0 (1 C, C=O), 145,9 (1 C, C=N), 144,7-114,6 (12 C, Ar-C), 66,4 (2 C, CH₂-O-CH₂), 63,1 (1 C, N-CH₂-N), 47,6 (2 C, CH₂-N-CH₂).

FT-IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2964w (CH₃); 1677s (C=O); 1598s, 1500s (C=C, Aromat), 1120s (C-O-C)

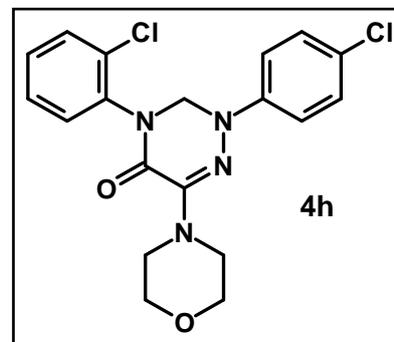
EI-MS, m/z (%): 370 (M⁺, 100)

Elementaranalyse: ber.: C 61,54%; H 5,16%; N 15,11%; Cl 9,56%
gef.: C 61,55%; H 5,27%; N 15,15%; Cl 9,50%

3.3.2g 2,3,4,5-Tetrahydro-4-(2-chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-6-(morpholin-4-yl)-1,2,4-triazin-5-on (4h)

Als Ausgangstoff wurde das offenkettige Amidrazon *N*-(2-Chlorphenyl)-2-(4-chlorphenyl)-hydrazono-2-(morpholin-4-yl)acetamid **3h** (4.1.1, Tab. 10) eingesetzt.

Ausbeute: 1,6 g (39%)
 Summenformel: C₁₉H₁₈Cl₂N₄O₂
 Exakte Masse: 404,0807 g/mol
 DC-Rf-Wert: A: 0,55; B: 0,11
 Smp.: 186-188°C (EtOH)
 λ_{\max} (ϵ): 262 nm (11224), 375 nm (4490) in Methanol



¹H-NMR: δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,63-7,30 (8 H, m, Ar-H), 5,27 (2 H, s, N-CH₂-N), 3,71 (4 H, t, $J = 4,7$ Hz, CH₂-O-CH₂), 3,28 (4 H, s (br), CH₂-N-CH₂)

¹³C-NMR: δ_{C} (100 MHz, DMSO-d₆) = 151,9 (1 C, C=O), 146,3 (1 C, C=N), 143,6-116,1 (12 C, Ar-C), 65,4 (2 C, CH₂-O-CH₂), 62,9 (1 C, N-CH₂-N), 47,5 (2 C, CH₂-N-CH₂)

FT-IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 2966w (CH₃); 1675s (C=O); 1594m, 1494s (C=C, Aromat), 1120s (C-O-C)

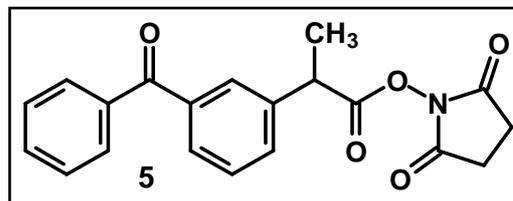
EI-MS, m/z (%): 404 (M⁺, 100), 237 (59)

Elementaranalyse: ber.: C 56,31%; H 4,48%; N 13,82%; Cl 17,50%
 gef.: C 56,28%; H 4,45%; N 14,07%; Cl 17,57%

3.4 Synthese und Charakterisierung der Photo-Cross-Linker

3.4.1 Darstellung von Ketoprofensuccinimidylester (Keto-NHS, **5**)

3,0 g (~ 12 mM) Ketoprofen wurden in einem Dreihalskolben mit Thermometer und Trockenrohr (gefüllt mit Orangegel) in 50 ml trockenem Dioxan gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 1,15 g



(~ 12 mM) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) unter Rühren. Nach Abkühlen auf 20°C wurden 2,47 g (~ 12 mM) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zu der milchig-weißen Suspension gegeben und die Mischung wurde für acht Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde abfiltriert, am Rotationsverdampfer eingengt, mit Dichlormethan aufgenommen, erneut filtriert und endgültig eingedampft [Singh 1990]. Das halbfeste Produkt wandelte sich nach mehreren Monaten im Kühlschrank zu einem kristallinen, farblosen Feststoff **5** um (4.2.1c). Die Substanz wurde ohne weitere Reinigungsschritte zum photochemischen Cross-Linking eingesetzt (4.2.1c).

Ausbeute: 3,1 g (75%)

Summenformel: C₂₀H₁₇NO₅

Exakte Masse: 351,1107 g/mol

DC-Rf-Wert: A: 0,33; B: 0,05; C: 0,07

Smp.: 73-75°C

¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,73-7,51 (9 H, m, Ar-H), 4,45-4,40 (1 H, -CH-), 2,76 (4 H, CH₂-CH₂), 1,52-1,50 (3 H, CH₃)

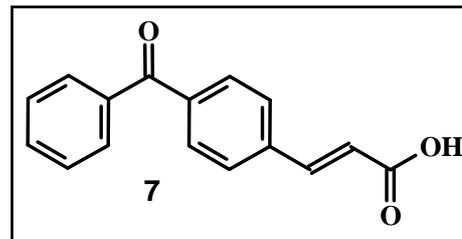
¹³C-NMR: δ_C (100 MHz, DMSO-d₆) = 195,7 (1 C, (Ar)₂C=O), 170,39 (2 C, CO-N-CO), 170,20 (R-CO-O), 139,4-128,9 (12 C, Ar-C), 42,2 (1 C, CH), 26,1 (2 C, CH₂-CH₂), 19,2 (1 C, CH₃)

EI-MS, *m/z* (%): 351 (M⁺, 27), 237 (16), 209 (100), 105 (51), 77 (29)

3.4.2 Darstellung von *N*-Succinimidyl-*p*-benzoyl-dihydro/dideuterocinnamat (SBC/SBDC, **9**) in vier Stufen

Stufen 1 + 2: *p*-Benzoylzimtsäure **7** aus *p*-Aminobenzophenon **6** und Acrylsäure nach einer Meerwein-Schuster-Reaktion und anschließender alkalischer Dehydrobromierung (4.2.1d).

Die Umsetzung von 800 mg (4,06 mM) *p*-Aminobenzophenon mit 8,34 ml (121,8 mM) Acrylsäure zur gewünschten *p*-Benzoylzimtsäure **7** erfolgte in einer *Meerwein-Schuster-Reaktion* in Anwesenheit von 12 mg (0,08 mM) Kupfer(I)bromid als Katalysator und anschließender alkalischer Dehydrobromierung nach einer bekannten Literaturvorschrift [Olszewski 1995, Mourey 1993].



Ausbeute: 400 mg (39%)
 Summenformel: C₁₆H₁₂O₃
 Exakte Masse: 252,0786 g/mol
 DC-Rf-Wert: 0,74 (CHCl₃/MeOH; 1/1; v/v)
 Smp.: 230°C [Lit.: 229-230°C]

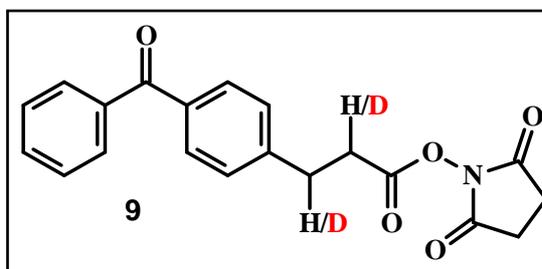
¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,84-7,51 (9 H, m, Ar-H), 6,66-6,62 (2 H, C₂H₂)

¹³C-NMR: δ_C (100 MHz, DMSO-d₆) = 195,5 (1 C, (Ar)₂C=O), 167,6 (1 C, COOH), 142,9/122,3 (2 C, C=C), 138,6-128,6 (12 C, Ar-C)

EI-MS, *m/z* (%): 252 (M⁺, 64), 175 (100), 147 (14), 105 (59), 77 (38)

Stufen 3+4:*N*-Succinimidyl-*p*-benzoyl-dihydrocinnamat (SBC) und *N*-Succinimidyl-*p*-benzoyl-dideuterocinnamat (SBDC) **9** aus *p*-Benzoylzimtsäure **7** durch katalytische Hydrierung/Deuterierung mit Wasserstoff-/Deuteriumgas **8** und anschließender Veresterung mit NHS (4.2.1d).

Die Hydrierung/Deuterierung von jeweils 400 mg *p*-Benzoylzimtsäure **7** (1,6 mM) mit Wasserstoff-/Deuteriumgas erfolgte in Anwesenheit von 28 mg eines 5%igen Pd/C-Katalysators in einem *Compact Reactor 5500* (Parr Instruments, Illinois,



USA) nach einer bekannten Literaturvorschrift [Olszewski 1995, Mourey 1993]. Als Lösungsmittel diente absolutes Ethanol, im Fall der Deuterierung Ethanol-d₁. Die Reinigung wurde, wie bei Olszewski beschrieben, durchgeführt [Olszewski 1995].

Etwa 130 mg des gereinigten Produktes (0,5 mM) wurden in ~ 5 ml getrocknetem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 58 mg (0,5 mM) *N*-Hydroxysuccinimid und 103 mg Dicyclohexylcarbodiimid (0,5 mM) wurde über Nacht bei RT gerührt. Umkristallisierung mit Ether/Heptan führte zum gewünschten Produkt.

Ausbeute: 90 mg (51%) / 120 mg (48%)
 Summenformel: C₂₀H₁₇NO₅ / C₂₀H₁₅D₂NO₅
 Exakte Masse: 351,1107 g/mol / 353,1232 g/mol
 DC-Rf-Wert: A: 0,28/0,28; B: 0,04/0,04; C: 0,06/0,06
 Smp.: 112-114°C / 112-114°C

¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 7,70-7,45 (9 H, m, Ar-H), 3,04-2,99 (2 H, dd, CHD-CHD), 2,77 (4 H, s, C₂H₄)

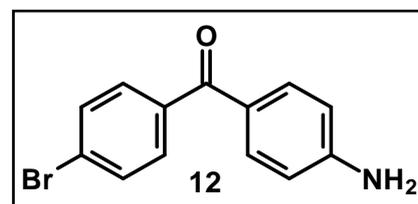
EI-MS, *m/z* (%): 351 (M⁺, 57), 237 (51), 195 (60), 105 (100), 77 (51)
 353 (M⁺, 41), 239 (39), 196 (43), 105 (100), 77 (32)

3.4.3 Darstellung von Brom-benzophenon-iodacetamid (BBI, 14) in drei Stufen

Stufe 1: 4-Brom-4'-aminobenzophenon (**12**)

Eine Mischung von 11,8 ml (76 mM) Brombenzol **10**, 10 g (54 mM) Nitrobenzoylchlorid **11** und 8 g (60 mM) AlCl₃ wurden im Ölbad auf 75-85°C erhitzt. Nach Beendigung der Chlorwasserstoff-Entwicklung und Reinigung des Reaktionsansatzes wurden 10 g (33 mM) 4-Brom-4'-nitro-benzophenon erhalten, welches mit SnCl₂/HCl zum gewünschten Produkt **12** reduziert werden konnte (4.2.2d) [Montagne 1916].

Ausbeute: 6,5 g (71%)
 Summenformel: C₁₃H₁₀BrNO
 Exakte Masse: 274,9946 g/mol
 DC-Rf-Wert: A: 0,36; B: 0,12
 Smp.: 196-198°C [Lit.: 196,5°C]
 EI-MS, *m/z* (%): 275 (M⁺, 44), 120 (100), 92 (27)



Stufe 2: *N*-{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-chloracetamid (**13**)

0,6 ml (8 mM) Chloracetylchlorid wurden tropfenweise bei RT zu einer Mischung von 1,9 g (7 mM) 4-Brom-4'-aminobenzophenon **12** und 1,1 g (8 mM) K₂CO₃ in 50 ml Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wurde vier Stunden lang unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlung auf RT langsam in 100 ml Eiswasser gegossen. Nach zweimaliger Extraktion mit Dichlormethan (2x 100 ml) wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Produkt **15** wie beschrieben gereinigt (4.2.2d) [Baraldi 2007].

Ausbeute: 1,8 g (72%)

Summenformel: C₁₅H₁₁BrClNO₂

Exakte Masse: 350,9662 g/mol

DC-Rf-Wert: A: 0,42; B: 0,14

Smp.: 180-184°C

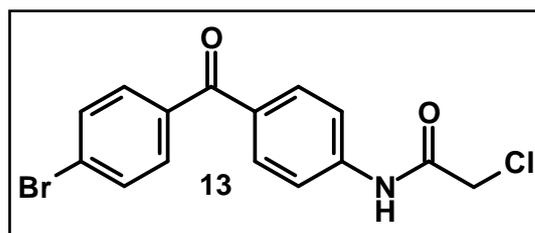
¹H-NMR: δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) = 10,64 (1 H, N-H), 7,76-7,54 (8 H, m, Ar-H), 4,28 (2 H, s, CH₂)

¹³C-NMR: δ_C (100 MHz, DMSO-d₆) = 193,2 (1 C, (Ar)₂C=O), 165,0 (1 C, C=O), 142,6-118,6 (12 C, Ar-C), 43,6 (1 C, CH₂)

EI-MS, *m/z* (%): 351 (M⁺, 58), 275 (13), 196 (100), 183 (24), 155 (18), 120 (84)

Elementaranalyse: ber.: C 51,09%; H 3,14%; N 3,97%

gef.: C 51,12%; H 3,17%; N 3,81%

Stufe 3: Synthese von *N*-{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-iodacetamid (**14**)

Der Halogenaustausch vom Chloracetamid **13** zum Iodacetamid **14** konnte analog einer Finkelsteinreaktion durchgeführt werden. Dabei wurden 4,2 g (25 mM) pulverisiertes KI zu 1,8 g (5 mM) in trockenem Aceton gelösten Chloracetamid **13** hinzugefügt. Nach achtstündigem Erhitzen unter Rückfluss konnte nach abschließender Filtration das gewünschte Produkt **14** erhalten werden (4.2.2d) [Gonzalez-Rosende 2008].

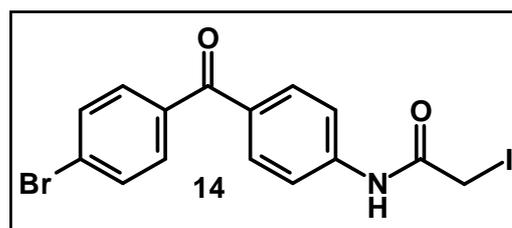
Ausbeute: 410 mg (33%)

Summenformel: C₁₅H₁₁BrINO₂

Exakte Masse: 442,9018 g/mol

DC-Rf-Wert: A: 0,38; B: 0,12

Smp.: 189-193°C



$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) = 10,65 (1 H, N-H), 7,73-7,60 (8 H, m, Ar-H),
3,83 (2 H, s, CH₂)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ_{C} (100 MHz, DMSO- d_6) = 193,4 (1 C, (Ar)₂C=O), 167,1 (1 C, C=O),
143,0-118,3 (12 C, Ar-C), 1,2 (1 C, CH₂)

EI-MS, m/z (%): 443 (M⁺, 58), 288 (18), 275 (56), 183 (28), 157 (21), 120 (100)

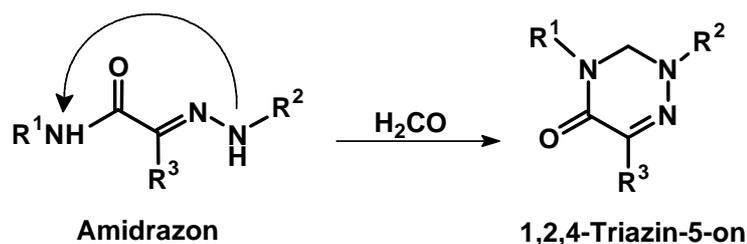
Elementaranalyse: ber.: C 40,57%; H 2,50%; N 3,15%
gef.: C 41,11%; H 2,56%; N 3,33%

4 Ergebnisse

4.1 Synthese und Charakterisierung neuer 1,2,4-Triazin-5-one

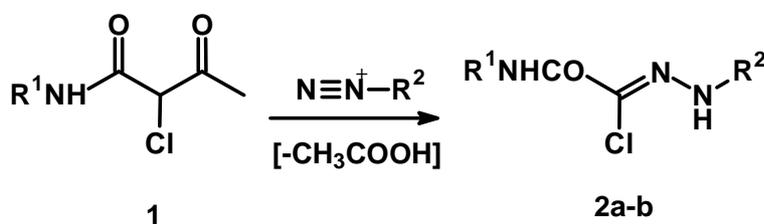
4.1.1 Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one

Der Zielstellung, aus Amidrazonen über einen Ringschluss zwischen dem Hydrazon- und dem Anilidstickstoff stabilere Heterozyklen vom 1,2,4-Triazin-5-on-Typ zu erhalten (siehe Schema 8), wurde folgendermaßen Rechnung getragen:



Schema 8: Geplante Zyklisierungsreaktion zur Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one.

Durch Japp-Klingemann-Spaltung wurde aus der 2-Chlor-1,3-dicarbonylverbindung **1** mit diazotierten Anilinen die α -Carbonyl-carbonsäurearylhyaazonoylchloride **2a-b** erhalten (Schema 9, Tab. 9). Der Reaktionsmechanismus dieser Umsetzung ist in der Literatur beschrieben [Philipps 1959].



Schema 9: Darstellung der α -Carbonyl-carbonsäurearylhyaazonoylchloride **2a-b** (Japp-Klingemann-Spaltung).

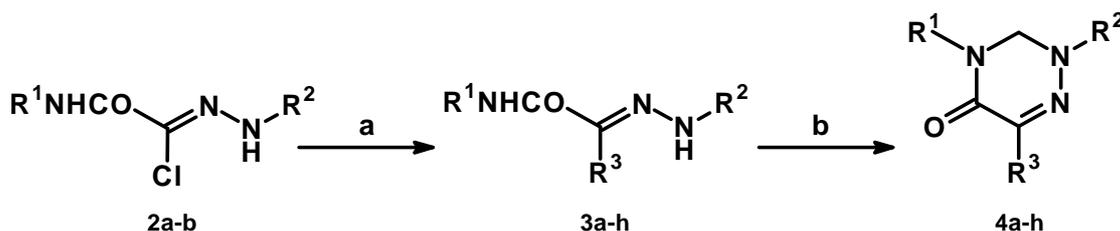
Tab. 9: Substitutionsmuster der α -Carbonyl-carbonsäurearylhyaazonoylchloride **2a-b**.

Verbindung	R ¹	R ²
2a	2-Cl-C ₆ H ₄	C ₆ H ₅
2b	2-Cl-C ₆ H ₄	4-Cl-C ₆ H ₄

Die nucleophile Substitution des Chloratoms gegen Dimethylamin, Pyrrolidin, Piperidin oder Morpholin führte zu den entsprechenden Amidrazonen **3a-h** (Schema 10, Tab. 10) (3.3.1).

Für die abschließende Zyklisierungsreaktion wurden die Amidrazone **3a-h** mit der doppelt molaren Menge an Formaldehyd und unter Zugabe katalytischer Mengen *para*-Toluensulfonsäure (TsOH) in Ethanol unter Rückfluss erhitzt. Nach Umkristallisierung mit

Methanol oder Ethanol lagen die Ausbeuten der erhaltenen 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** zwischen 37% und 63% (Schema 10, Tab. 10) (3.3.2).



Schema 10: Darstellung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** aus den entsprechenden Amidrazonen **3a-h**. (a) Dimethylamin für **3a-b**, Pyrrolidin für **3c-d**, Piperidin für **3e-f**, Morpholin für **3g-h**. (b) H_2CO , TsOH , EtOH [Krauth 2010].

Tab. 10: Substitutionsmuster der Amidrazone **3a-h** und 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**.

Verbindung	R^1	R^2	R^3
3a/4a	2-Cl- C_6H_4	C_6H_5	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$
3b/4b	2-Cl- C_6H_4	4-Cl- C_6H_4	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$
3c/4c	2-Cl- C_6H_4	C_6H_5	Pyrrolidin
3d/4d	2-Cl- C_6H_4	4-Cl- C_6H_4	Pyrrolidin
3e/4e	2-Cl- C_6H_4	C_6H_5	Piperidin
3f/4f	2-Cl- C_6H_4	4-Cl- C_6H_4	Piperidin
3g/4g	2-Cl- C_6H_4	C_6H_5	Morpholin
3h/4h	2-Cl- C_6H_4	4-Cl- C_6H_4	Morpholin

Alle 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** wurden als hellgelbe Kristalle erhalten, welche in alkoholischer Lösung eine Eigenfluoreszenz bei ca. 530 nm zeigen.

Die einfachen Reaktionsbedingungen, die unkomplizierte Produktisolierung ohne chromatographische Reinigung, die Verwendung leicht und preiswert verfügbarer Reagenzien und eines unproblematischen Lösungsmediums erlauben die Einstufung dieser Heterozyklensynthese in die Gruppe der „Click-Chemie“ [Kolb 2001]. Die Synthesen wurden nicht auf hohe Ausbeuten optimiert und besitzen weiteres Potential zur Effizienzsteigerung.

4.1.2 Charakterisierung der 1,2,4-Triazin-5-one

4.1.2a Bestimmung der Bioverfügbarkeitsparameter nach Lipinski

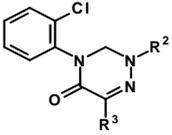
Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit der Triazinonverbindungen **4a-h** wurden die vier „Rule-of-five“-Deskriptoren nach Christopher A. Lipinski [Lipinski 1997] mit Hilfe der frei zugänglichen Software „Molinspiration Property Calculator“ (Molinspiration property engine v2011.04) berechnet (3.2.2a, Tab. 11).

Die „*rule-of-five*“ nach Lipinski basiert auf Erfahrungswerten und besagt, dass ein oral bioverfügbare Arzneistoff im günstigsten Fall nicht mehr als

1. ein Molekulargewicht von **500 Da**,
2. **zehn** (zwei mal **fünf**) Wasserstoffbrückenakzeptoren,
3. **fünf** Wasserstoffbrückendonatoren und
4. einen Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P_{O/W}$) von **fünf** besitzen sollte.

Bei Verletzung von mehr als zwei dieser Regeln ist eine schwache Absorption bzw. Permeation wahrscheinlich. Aufgrund ihrer Einfachheit werden diese Regeln heutzutage als Eingangsfilter für potentielle Wirkstoffe angewendet [Klebe 2009].

Tab. 11: Lipinskis „*Rule-of-five*“-Deskriptoren der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** [Krauth 2010].

	R²	R³	M_w^a	nON^a	nOHNH^a	log P_{calc}^a
4a	C ₆ H ₅	N(CH ₃) ₂	328,80	5	0	3,5
4b	4-Cl-C ₆ H ₄	N(CH ₃) ₂	363,25	5	0	4,2
4c	C ₆ H ₅	Pyrrolidin	354,84	5	0	3,9
4d	4-Cl-C ₆ H ₄	Pyrrolidin	389,29	5	0	4,6
4e	C ₆ H ₅	Piperidin	368,87	5	0	4,4
4f	4-Cl-C ₆ H ₄	Piperidin	403,31	5	0	5,1
4g	C ₆ H ₅	Morpholin	370,84	6	0	3,3
4h	4-Cl-C ₆ H ₄	Morpholin	405,28	6	0	4,0
BW755C	-	-	229,20	3	2	2,4

^a Lipinski-Deskriptoren; M_w: Molekulargewicht, nON: Anzahl Wasserstoffbrückenakzeptoren, nOHNH: Anzahl Wasserstoffbrückendonatoren, log P_{calc}: von *Molinspiration Property Calculator* für die jeweilige Neutralverbindung berechneter log P-Wert.

Nachdem alle 1,2,4-Triazin-5-one, außer **4f** ($\log P_{\text{calc}} > 5$), die „*Rule-of-five*“-Kriterien erfüllten, sollte mit experimentellen log P-Daten die Brauchbarkeit der berechneten Werte überprüft werden (4.1.2b).

4.1.2b Indirekte log P_{O/W}-Bestimmung über den Retentionsfaktor (*k*)

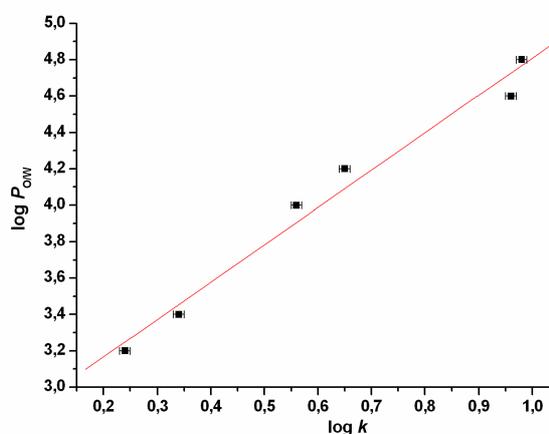
Der logarithmische Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P_{O/W}$) ist eine wichtige physikochemische Größe, um die Aufnahmefähigkeit von Substanzen von einem hydrophilen in ein lipophiles Medium abzuschätzen. Log P_{O/W}-Werte im Bereich von -2 bis 4 werden klassischerweise mit der Schüttelflaschenmethode [OECD: Shake Flask Method 1996]

bestimmt. Um die zuvor berechneten $\log P_{\text{calc}}$ -Daten (Tab. 11) zu überprüfen, wurde aufgrund der höheren Lipophilie der Verbindungen und des hohen Zeitaufwandes der Schüttelflaschenmethode auf eine RP-HPLC-Methode [OECD: HPLC Method 1996] (3.2.2b) ausgewichen. Bei diesem Verfahren macht man sich die direkte Proportionalität zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten $\log P_{\text{O/W}}$ und dem chromatographisch erhaltenen Kapazitätsfaktor k zunutze: $\log P_{\text{O/W}} = a + b \cdot \log k$ (XI)

a, b = lineare Regressionskoeffizienten

Aus den $\log P_{\text{O/W}}$ - und $\log k$ -Werten der Vergleichssubstanzen (Tab. 12) wurde mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 17).

Referenz-substanz	t_{R} [min \pm SD]	$\log k$	$\log P_{\text{O/W}}$
Benzophenon	2,99 \pm 0,02	0,25	3,2
Diphenylamin	3,46 \pm 0,04	0,34	3,4
Benzylbenzoat	4,96 \pm 0,07	0,56	4,0
Diphenylether	5,87 \pm 0,08	0,65	4,2
n-Butylbenzol	10,82 \pm 0,18	0,96	4,6
Bibenzyl	11,34 \pm 0,20	0,98	4,8
Formamid (t_0)	1,08 \pm 0,01	-	-



Tab. 12: RP-HPLC-Daten der Referenzverbindungen für die indirekte $\log P_{\text{O/W}}$ -Bestimmung. Mittlere Retentionszeiten aus drei Messungen (t_{R} , $n=3$), berechnete logarithmische Kapazitätsfaktoren ($\log k$) und Literaturverteilungskoeffizienten ($\log P_{\text{O/W}}$), SD: Standardabweichung [Krauth 2010].

Abb. 17: Kalibriergerade zur Bestimmung der $\log P_{\text{exp}}$ -Werte der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**. Auftragung experimenteller $\log P_{\text{O/W}}$ -Werte ausgewählter Standardverbindungen gegen deren berechnete $\log k$ -Werte (Tab. 12); $y = 2,77 + 2,05x$; $r = 0,98929$ [Krauth 2010].

Durch Einsetzen der $\log k$ -Werte der Triazinonverbindungen **4a-h** in die Geradengleichung (siehe Abb. 17) konnten deren $\log P$ -Werte ($\log P_{\text{exp}}$) erhalten werden. Diese zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den zuvor berechneten Werten ($\log P_{\text{calc}}$) und damit die Anwendbarkeit der virtuellen Methode auf diese Substanzklasse (Tab. 13).

Tab. 13: RP-HPLC-Daten und ermittelte $\log P_{\text{exp}}$ -Werte für die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**. Mittlere Retentionszeiten aus drei Messungen (t_{R} , $n=3$), berechnete logarithmische Kapazitätsfaktoren ($\log k$) und daraus ermittelte $\log P_{\text{exp}}$ -Werte. $\log P_{\text{cal}}$: berechnete $\log P$ -Werte; SD: Standardabweichung.

Verbindung	t_{R} [min \pm SD]	$\log k$	$\log P_{\text{exp}}/\log P_{\text{cal}}$
4a	3,97 \pm 0	0,43	3,6/3,5
4b	6,09 \pm 0,01	0,34	4,1/4,2
4c	5,80 \pm 0,02	0,64	4,0/3,9
4d	9,82 \pm 0,02	0,91	4,6/4,6
4e	8,87 \pm 0,01	0,86	4,5/4,4
4f	14,41 \pm 0,01	1,09	5,0/5,1
4g	3,53 \pm 0	0,36	3,5/3,3
4h	5,21 \pm 0,01	0,58	3,9/4,0
BW755C	-	-	2,8 ^{a)} /2,4

^{a)} siehe Kupfer 1996; 2,56 [Kim 1990]

4.1.2c Berechnung und Abschätzung der Wasserlöslichkeiten

Die Ermittlung der Wasserlöslichkeit zu einem frühen Zeitpunkt der Wirkstoffentwicklung ist sinnvoll, um rechtzeitig schwerlösliche Arzneistoffkandidaten aufzuspüren und diesem Sachverhalt in der Synthesekonzeption Rechnung zu tragen. Die Berechnung der Löslichkeiten ($\log S_{\text{exp}}$) erfolgte basierend auf der Formel von Jain und Yalkowsky (3.2.2c, Formel IV), in welche der experimentell bestimmte Schmelzpunkt (S_{mp}) und der $\log P_{\text{exp}}$ -Wert eingehen [Ran 2001]. Die Abschätzung der Löslichkeiten ($\log S_{\text{virt}}$) ohne experimentelle Daten beruhte auf einer Fragmentmethode, welche aus der Struktur den $\log P$ -Wert und die intrinsische Wasserlöslichkeit abschätzt und für die Berechnung verwendet (3.2.2c).

In der Gegenüberstellung der Wasserlöslichkeiten ($\log S_{\text{exp}}$, $\log S_{\text{virt}}$) für die Substanzgruppe der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** (Tab. 14) sieht man eine deutliche Diskrepanz zwischen beiden Bestimmungsverfahren.

Tab. 14: Berechnete Wasserlöslichkeiten der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**. Experimentelle Schmelzpunkte (Smp.) (3.3.2), aus log *k*-Daten ermittelte log *P*-Werte (log *P*_{exp}) (4.1.2b), aus Smp. und log *P*_{exp} berechnete Wasserlöslichkeiten (log *S*_{exp}) (3.2.2c, Formel IV), geschätzte Wasserlöslichkeiten nach der Fragmentmethode (log *S*_{virt}) (3.2.2c) und die jeweils umgerechneten Löslichkeiten in µg/ml; *M*_W: Molekulargewicht.

Verbindung	Smp. [°C]	log <i>P</i> _{exp}	log <i>S</i> _{exp}	log <i>S</i> _{virt}	Wasserlöslichkeit [µg/ml] (<i>S</i> _{exp} * <i>M</i> _W / <i>S</i> _{virt} * <i>M</i> _W)
4a	109	3,6	- 3,94	- 3,39	38/134
4b	126	4,1	- 4,61	- 4,06	8,9/32
4c	121	4,0	- 4,46	- 3,74	12/64
4d	135	4,6	- 5,20	- 4,35	2,4/17
4e	129	4,5	- 5,04	- 3,93	3,4/44
4f	197	5,0	- 6,22	- 4,57	0,24/11
4g	154	3,5	- 4,29	- 3,41	19/140
4h	187	3,9	- 5,02	- 4,01	3,9/40
BW755C	111-112 ^{a)}	2,8 ^{b)}	-3,17	-2,58	155/603

^{a)} siehe Frigola 1989, ^{b)} siehe Kupfer 1996

Die ohne Berücksichtigung experimenteller Daten ermittelten log *S*_{virt}-Werte suggerieren verglichen mit den aus der Jain-Yalkowsky-Gleichung (3.2.2c, Formel IV) erhaltenen log *S*_{exp}-Werte auffällig bessere Löslichkeiten (11-140 µg/ml vs. 0,24-38 µg/ml).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine mäßige bis schlechte Löslichkeit der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**, was aufgrund der ermittelten log *P*-Werte nicht überrascht. Zur abschließenden Beurteilung der berechneten Wasserlöslichkeiten (log *S*_{exp}, log *S*_{virt}) und der jeweils zu Grunde liegenden Methoden kann für die Substanzklasse der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** auf experimentelle Untersuchungen nicht verzichtet werden.

4.1.2d Antioxidative Wirkung auf DPPH und Redoxpotentiale

Alle 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** wurden einer Voruntersuchung auf antioxidative Eigenschaften mittels eines Sprühversuches mit methanolischer DPPH-Lösung unterzogen (3.2.2d).

Während die Vergleichssubstanzen BW755C, NDGA und Ascorbinsäure unmittelbar nach dem Besprühen einen weißen Fleck auf der sonst violett gefärbten DC-Platte zeigten (Tab. 15, ++++), kam es bei den 1,2,4-Triazin-5-onen nur langsam zu einer Entfärbung. Die Verbindungen **4c** und **4d** zeigten die schnellste Entfärbung aller Triazinone (Tab. 15, ++), **4a**, **4b**, **4e** eine schwache (Tab. 15, +) und **4f**, **4h** praktisch gar keine Reaktion (Tab. 15, -).

Tab. 15: Antioxidatives Potential der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** anhand der DPPH-Entfärbung auf der DC-Platte (- keine Entfärbung, ++++ unmittelbare Entfärbung) und gemessener Redoxpotentiale ($E_{1/2}$ vs. Ag/AgNO₃ in mV). Die $E_{1/2}$ wurden mit Hilfe der Referenzverbindung Ferrocen ($E_{1/2}$ vs. Ag/AgNO₃: 246 mV [Kratochvil 1980]) korrigiert.

Verbindung	DPPH-Entfärbung	$E_{1/2}$ (mV)
4a	+	350
4b	+	290
4c	++	300
4d	++	350
4e	+	360
4f	-	340
4g	+	400
4h	-	420
Ascorbinsäure	++++	1100
NDGA	++++	940
BW755C	++++	220 ^{a)}

^{a)} $E_{1/2}$: 310 mV [Bruneau 1991]

Von **4c** und **4d**, welche moderate Radikalfängereigenschaften gezeigt hatten, wurden UV-photometrisch, im Vergleich zu den Referenzradikalfängern, EC_{50} -Werte bestimmt (Abb. 18-20) (3.2.2d). Ascorbinsäure und NDGA zeigten im Experiment einen linearen Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirkung und der zugegebenen Menge an Inhibitor und mit der Literatur gut vergleichbare EC_{50} -Werte (Ascorbinsäure: 22 μ M [Fujinami 2001], NDGA: 7,7 μ M [Dupont 2001]).

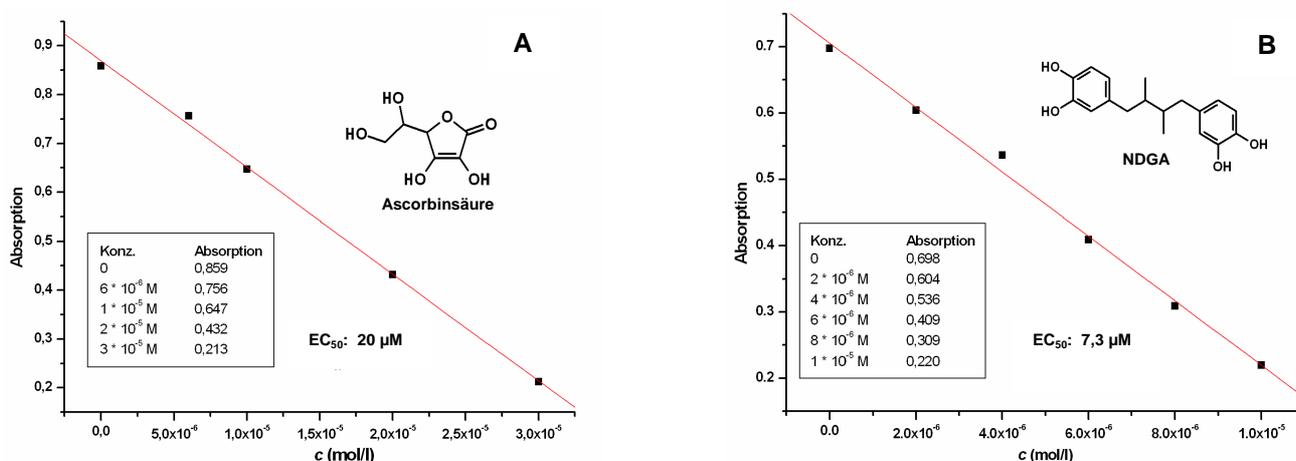


Abb. 18: Kalibriergeraden zur EC_{50} -Bestimmung der Antioxidantien Ascorbinsäure und NDGA. Abnahme der DPPH-Absorption bei 516 nm in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebener (A) Ascorbinsäure, $y = 0,87 - 21.842x$, $r = -0,99919$ und (B) NDGA, $y = 0,70 - 48600x$, $r = -0,99766$.

Der redoxaktive LO-Inhibitor BW755C zeigte einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Radikalinaktivierung und der zugegebenen Menge an Hemmer mit einem EC_{50} -Wert von $\sim 20 \mu\text{M}$.

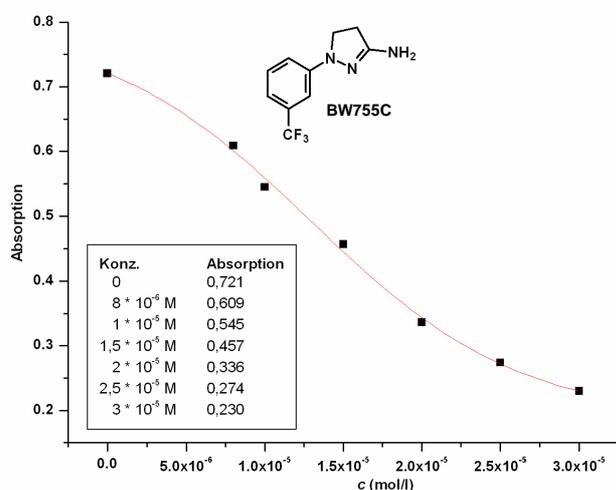


Abb. 19: Kalibrierkurve zur Bestimmung der antioxidativen Potenz von BW755C. Abnahme der DPPH-Absorption bei 516 nm in Abhängigkeit von der Konzentration an BW755C.

Die beiden 1,2,4-Triazin-5-one **4c** und **4d**, die im vorangegangenen Sprühversuch am besten abgeschnitten hatten, zeigten verglichen mit den Referenzsubstanzen eine wesentlich schwächere antioxidative Wirkung und einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der DPPH-Entfärbung und der eingesetzten Substanzkonzentration (Abb. 20). Dieser Effekt, welcher mit der mäßigen Löslichkeit der Verbindungen im Zusammenhang stehen könnte (4.1.2c), erlaubte keine Bestimmung verlässlicher EC_{50} -Werte.

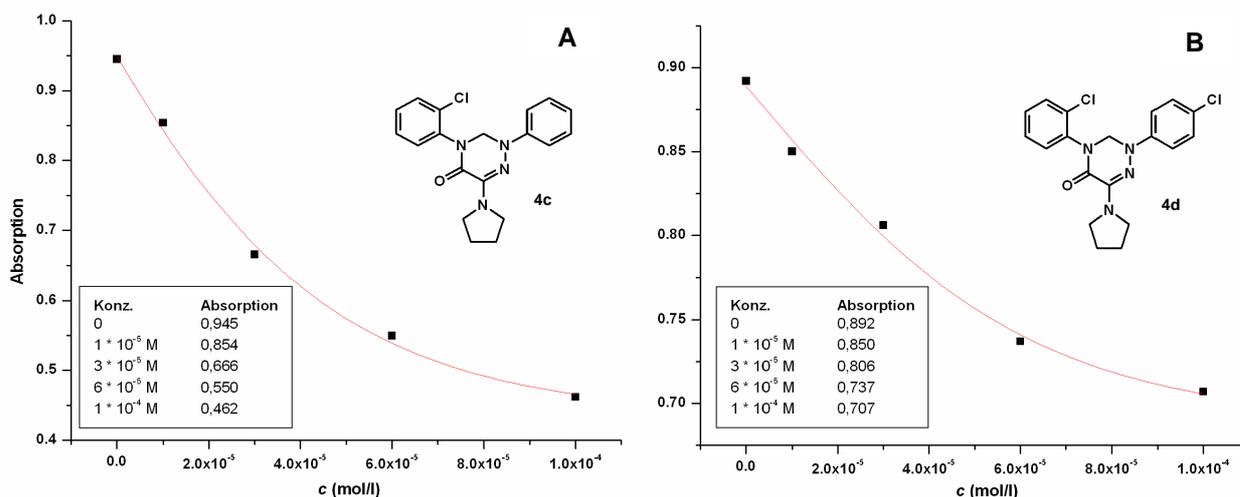


Abb. 20: Kalibrierkurven zur Bestimmung der antioxidativen Potenz der 1,2,4-Triazin-5-one (A) **4c** und (B) **4d**. Abnahme der DPPH-Absorption bei 516 nm in Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebener Inhibitorverbindung.

Bei den zykl voltammetrischen Untersuchungen [Heinze 1984, Hamann & Vielstich 2005] zeigten alle 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** neben Redoxpotentialen zwischen 290 und 420 mV (Abb. 21 (A), Tab. 15) ein reversibles Redoxverhalten (Abb. 21 (B)) und die Eigenschaft, intermediär persistente Radikale zu bilden (3.2.2e). Ascorbinsäure, NDGA und BW755C ließen sich nach elektrochemischer Oxidation voltammetrisch nicht wieder in die reduzierte Form überführen.

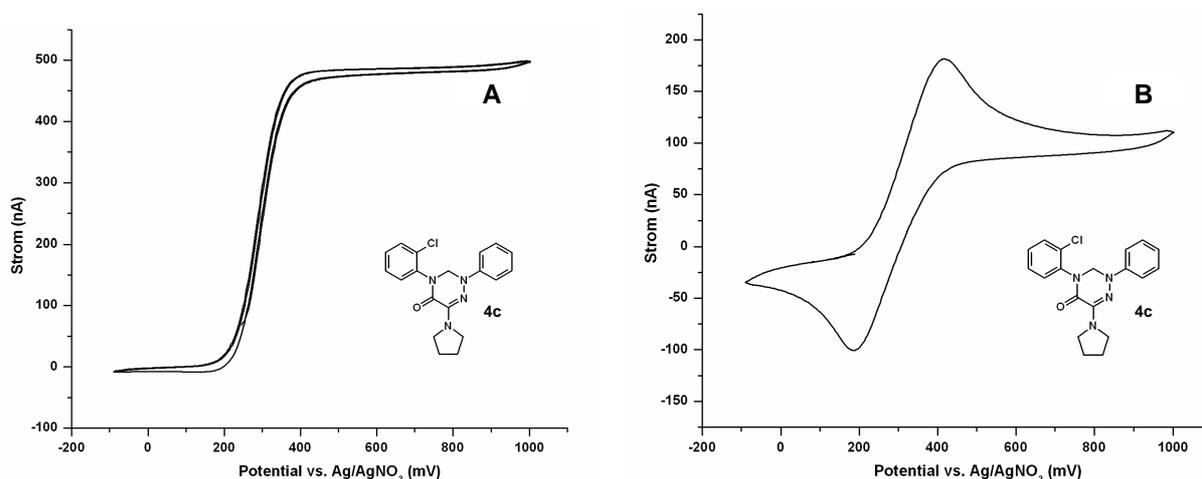


Abb. 21: Zyklovoltammetrie am Beispiel des 1,2,4-Triazin-5-ons **4c**. (A) Zyklisches Voltammogramm an einer Platinmikroelektrode zur Bestimmung des Redoxpotentials ($E_{1/2}$: 300 mV, Tab. 15) (B) Zyklisches Voltammogramm einer reversiblen Redoxreaktion an einer Platinmakroelektrode.

4.1.2e Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung

Die Adsorption potentieller Pharmaka an Serumproteine, wie z.B. das humane Serumalbumin (HSA) oder das α_1 -saure Glycoprotein sind wichtige Eigenschaften für deren klinisch-therapeutische Verwendbarkeit [Parikh 2000]. Die spektrofluorimetrische Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_d) *in-vitro* unter Ausnutzung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz des HSA ($\lambda_{exc} = 280$ nm) ist eine im Vergleich zur isothermen Titrationskalorimetrie (ITC), der Affinitätschromatographie, der Ultrafiltration oder der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) eine schnelle und weniger störanfällige Methode, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (3.2.2f) [Parikh 2000]. Die Methode wurde mit den beiden Arzneistoffen Warfarin (Coumadin[®]) und Diazepam (Valium[®]) überprüft. Die erhaltenen K_d -Werte (Warfarin = 1,2 μ M; Diazepam = 44 μ M) bewegten sich in vergleichbaren Größenordnungen wie die Literaturwerte (Warfarin = 1,1 μ M [Sudlow 1975] bzw. 3,4 μ M [Epps 1995]; Diazepam = 28 μ M [Parikh 2000]). Die Bestimmung der Serumalbuminaffinität wurde für die in den Antiproliferationsassays (4.1.2h, Tab. 19) wirksamsten 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** als Einzelbestimmung durchgeführt und ergab K_d -Werte im niederen mikromolaren Bereich (Tab. 16). Bei den Untersuchungen konnte gezeigt

werden, dass alle 1,2,4-Triazin-5-one eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm aufweisen, welche unter den Bedingungen für die K_d -Wertbestimmung ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm) keine Störquelle darstellte. Als Vergleich wurde von dem nicht fluoreszierenden Imatinib (Glivec[®]) ebenfalls ein K_d -Wert für die HSA-Bindung bestimmt. Der ermittelte K_d -Wert von 78,6 μM war in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert ($\sim 33 \mu\text{M}$ [Fitos 2006]).

Tab. 16: Spektrofluorimetrische K_d -Werte ausgewählter 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** für die Bindung an humanes Serumalbumin (HSA), Imatinib (Referenz).

Verbindung	Dissoziationskonstante (K_d) [μM]
4a	7,96 [$\pm 5,7$] ^a
4b	10,2 [$\pm 5,5$] ^a
4c	2,46 [$\pm 0,51$] ^a
4d	2,77 [$\pm 2,1$] ^a
Imatinib	78,6 [$\pm 6,7$] ^a

^a Näherungsfehler in der nichtlinearen Regression

In den Abbildungen 22 und 23 sind die für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) verwendeten Fluoreszenzemissionsspektren (A) und die nichtlinearen Regressionskurven (B) für **4c** und Imatinib dargestellt.

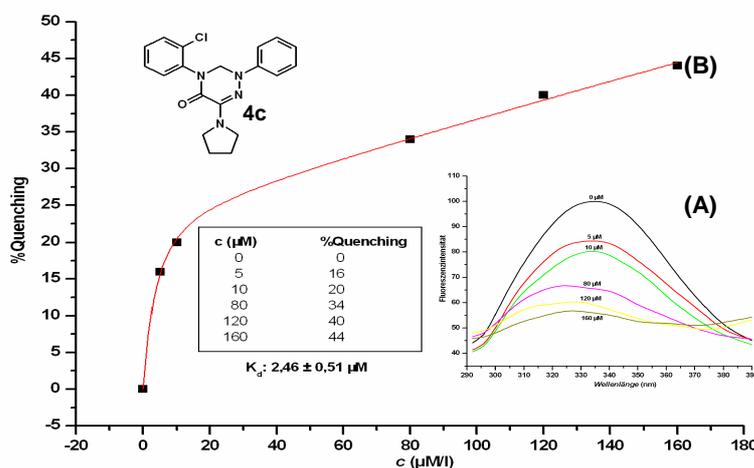


Abb. 22: Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung des 1,2,4-Triazin-5-ons **4c**. (A) Fluoreszenz-Emissionsspektren von HSA in Abhängigkeit von der **4c**-Konzentration. (B) Prozentuale Fluoreszenzlöschung (Quenching) der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von HSA in Abhängigkeit von der **4c**-Konzentration. Der Graph für die nichtlineare Regression wurde nach Anwendung des Marquardt-Algorithmus auf die quadratische Bindungsgleichung erhalten (3.2.2f, Formel X) [Krauth 2010].

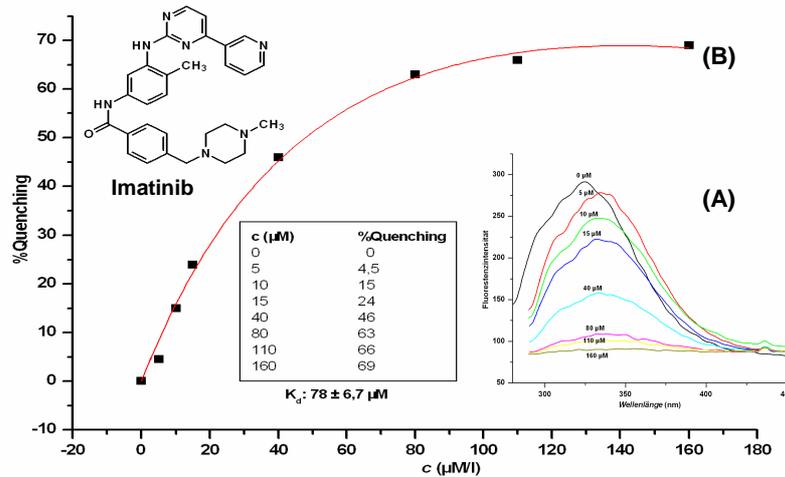


Abb. 23: Spektrofluorimetrische Untersuchung der Serumalbuminbindung des Kinase-Inhibitors Imatinib. (A) Fluoreszenz-Emissionsspektren von HSA in Abhängigkeit von der Imatinib-Konzentration. (B) Prozentuale Fluoreszenzlöschung (Quenching) der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von HSA in Abhängigkeit von der Imatinib-Konzentration. Der Graph für die nichtlineare Regression wurde nach Anwendung des Marquardt-Algorithmus auf die quadratische Bindungsgleichung erhalten (3.2.2f, Formel X).

4.1.2f Testung der 1,2,4-Triazin-5-one auf h5-LO-Hemmung in intakten PMNG

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** auf die h5-LO wurde an intakten humanen PMNG in einer *in-vitro*-Untersuchung durchgeführt (3.2.3a). Dazu wurde die Menge an gebildeten h5-LO-Metaboliten, vornehmlich 5-HETE, LTB₄ und deren trans- und epi-trans-Isomeren gemessen. Die Zellen (PBS-Puffer, pH 7,4, Ca²⁺ 1 mM) wurden mit den Verbindungen **4a-h** vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Calcium-Ionophor A23187 gestartet. Die exogene Zugabe von Arachidonsäure ersetzte die endogene durch cPLA₂α katalysierte Arachidonsäure-Bereitstellung. Wie der Tabelle 17 zu entnehmen ist, zeigten die 1,2,4-Triazin-5-one an den intakten neutrophilen Granulozyten keine herausragende Hemmung der h5-LO-Aktivität.

Tab. 17: Einfluss der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** auf die Restaktivität (%) der h5-LO in intakten PMNG. Die h5-LO-Restaktivität bezieht sich auf die Menge an gebildetem LTB₄ im Verhältnis zur Blindprobe (DMSO).

Verbindung	Konzentration [μM]	h5-LO-Restaktivität [%]
Blindwert (DMSO 3 μl)	–	100,0
4a	3/10/30	103,6/99,3/56,9
4b	3/10/30	95,5/64,2/19,9
4c	3/10/30	97,6/79,7/28,5
4d	3/10/30	88,6/61,4/53,0
4e	3/10/30	103,0/68,9/29,4
4f	3/10/30	80,4/61,4/53,1
4g	3/10/30	n.d. ^{a)} /n.d./n.d.
4h	3/10/30	94,0/80,4/63,2
NDGA	10	0 ^{b)}
BW755C	10	13 ^{b)}

^{a)} Überlagerung mit dem Signal des internen Standards

^{b)} siehe Steinhilber 1987

4.1.2g Untersuchung der 1,2,4-Triazin-5-one auf hemmende Eigenschaften an der SB-LO-1

In den Anfängen der Entwicklung von h5-LO-Inhibitoren mit Amidrazongrundstruktur, diente ein Inhibitionsassay an der isolierten LO-1 der Sojabohne (SB-LO-1) zur schnellen Sichtung möglicher Wirkstoff-Kandidaten. Nachdem sich bei den Untersuchungen der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** an intakten humanen PMNG keine inhibitorische Aktivität zeigte, wurden diese am, inzwischen auf mechanistische Studien beschränkten, SB-LO-1-Inhibitionsassay (3.2.3b) untersucht. Nach drei Minuten Inkubationszeit zeigten alle Verbindungen **4a-h** eine bessere Hemmaktivität als die Referenzsubstanz NDGA. Mit **4c** und **4d** lagen zwei Verbindungen sogar mit einem vergleichbaren und mit **4b** eine Verbindung mit einem niedrigeren IC₅₀-Wert als die Literaturwerte der Referenzsubstanz BW755C vor (Tab. 18, Abb. 24).

Tab. 18: Hemmdaten (IC_{50} -Werte) der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** an der SB-LO-1 (Einzelmessungen). NDGA, BW755C (Referenzen). n.d.: keine Daten erhalten.

Verbindung	IC_{50} [μM]	$-\log IC_{50}$
4a	n.d.	n.d.
4b	0,015	7,83
4c	0,18	6,74
4d	0,14	6,86
4e	0,43	6,37
4f	1,1	5,96
4g	1,0	6,00
4h	0,55	6,26
NDGA	1,70 ^{a)}	5,77
BW755C	0,10 ^{b)}	7,00

^{a)} 3,6 μM [Chang 1984], 2,0 μM [Galey 1988], ^{b)} siehe Chang 1984

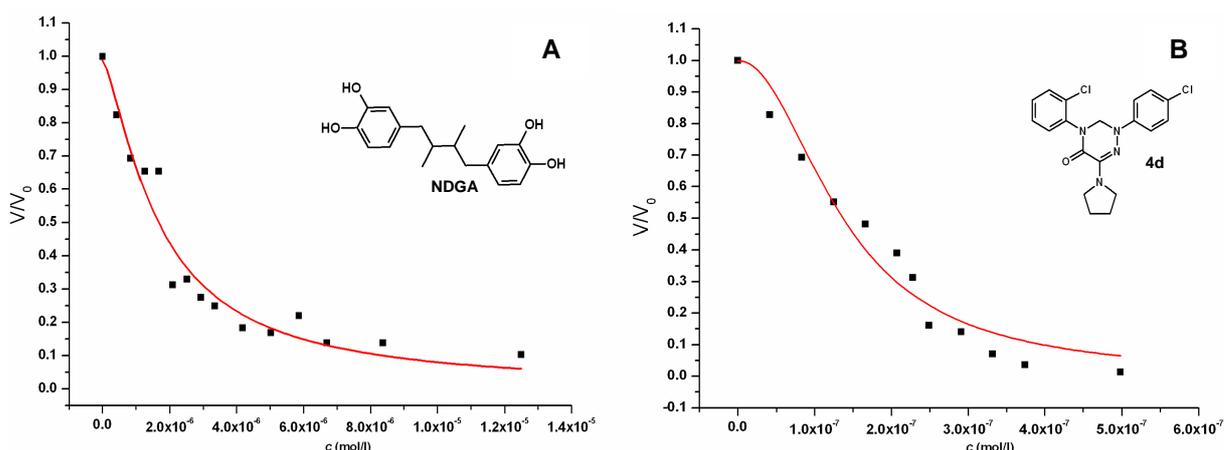


Abb. 24: Hemmkurven für die inhibitorische Aktivität von (A) NDGA (IC_{50} : 1,7 μM) und (B) **4d** (IC_{50} : 0,14 μM) an der SB-LO-1. Nicht-lineare Regression aus dem Anstieg der Sauerstoffverbrauchskurven (enzymatische Restaktivität, V/V_0) in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Inhibitoren.

4.1.2h Zytotoxizitäts- und Antiproliferationsevaluierung

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die für Substanzen mit einer offenen oder in einen Ring inkorporierten Amidrazongrundstruktur - wie bei den 1,2,4-Triazin-5-onen gegeben - eine große Variabilität bezüglich ihres pharmakologischen Wirkprofils zeigen [Bhatia 1996, Kim 1996, ¹Abdel-Rahman 2001, Pontillo 2005, Sztanke 2007]. So wurde für verschiedene 1,2,4-Triazinone nicht nur eine hemmende Aktivität auf die h5-LO, sondern auch ein antitumoraler und –metastatischer sowie ein Kinase-inhibierender Effekt beobachtet [²Abdel-Rahman 2001, Hunt 2004, Dalloul 2008, Sztanke 2008, Sztanke 2009]. Um diesem Sachverhalt Rechnung zu tragen wurden die Verbindungen neben den

Untersuchungen auf h5-LO-Hemmung an verschiedenen Krebszell-Linien (HUVEC, K-562) und zusätzlich auf Zytotoxizität (HeLa) getestet (3.2.3c). Als Vergleichssubstanzen dienten der in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie (CML) eingesetzte Kinase-Inhibitor Imatinib (Glivec[®]) und das Zytostatikum Doxorubicin (Adriamycin[®]) (Tab. 19).

Tab. 19: Antiproliferativer Effekt (GI₅₀) und Zytotoxizität (CC₅₀) der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**. Imatinib, Doxorubicin (Referenzen). Die Ergebnisse der GI₅₀- und CC₅₀-Messung stellen Mittelwerte aus drei parallelen Messungen dar. SD: Standardabweichung [Krauth 2010].

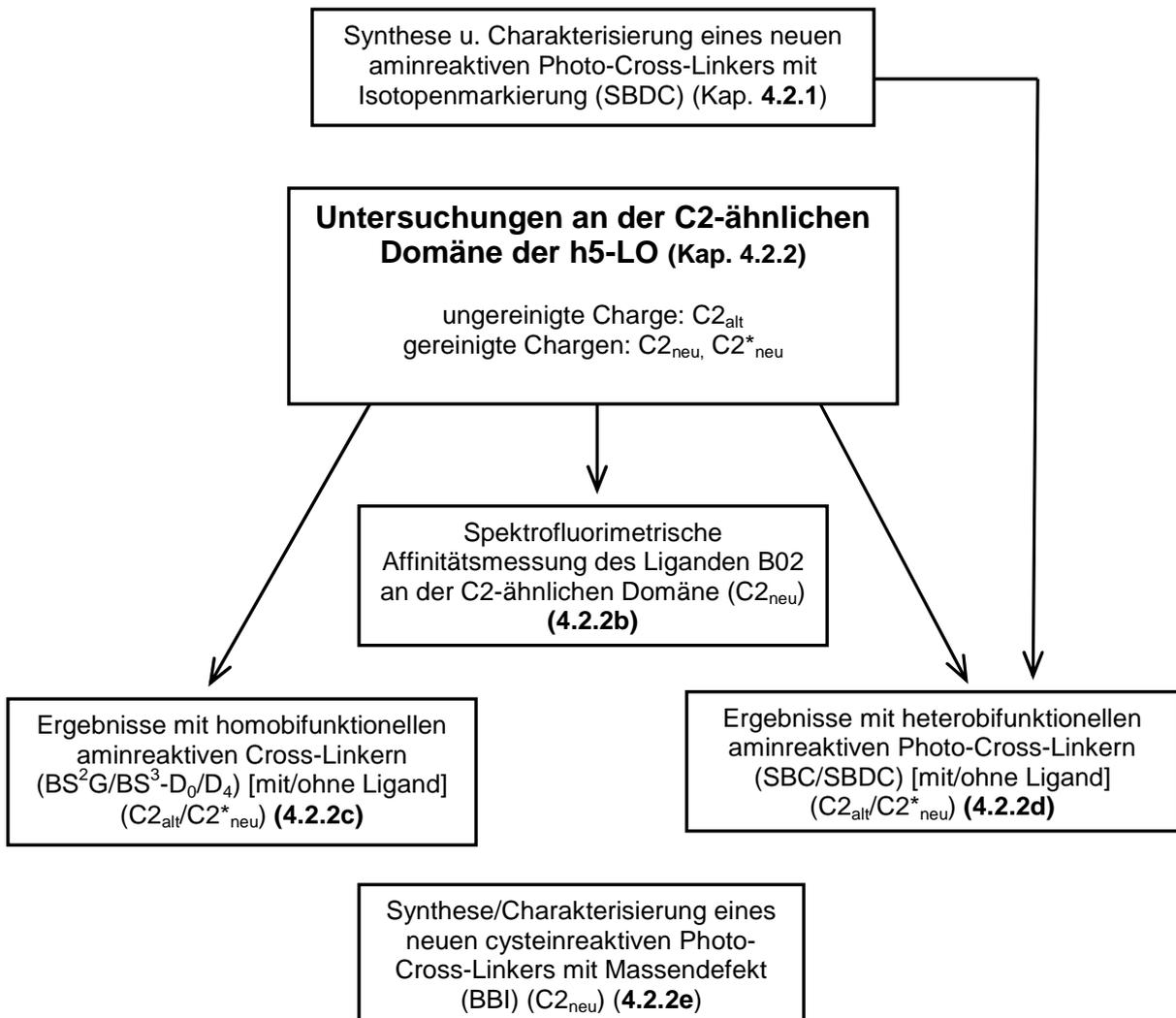
Verbindung	HUVEC GI ₅₀ ^a [µg/ml ± SD]	K-562 GI ₅₀ ^a [µg/ml ± SD]	HeLa CC ₅₀ ^b [µg/ml ± SD]
4a	34,5 ± 2,8	5,8 ± 0,4	39,5 ± 7,6
4b	16,1 ± 1,4	11,0 ± 0,7	39,4 ± 5,2
4c	40,9 ± 4,9	5,2 ± 0,4	44,3 ± 5,8
4d	18,9 ± 1,5	8,6 ± 0,6	> 50
4e	24,7 ± 2,1	42,0 ± 5,5	26,0 ± 2,3
4f	> 50	> 50	> 50
4g	> 50	> 50	> 50
4h	45,6 ± 5,6	> 50	> 50
Imatinib	10,9 ± 1,2	0,1 ± (6,7 x 10 ⁻³)	38,8 ± 1,4
Doxorubicin	0,132	1,0 ± 0,6	2,0 ± 0,8

^a 50% Wachstumshemmung ^b Zytotoxische Konzentration für 50% der Zellen

Neben einer schwachen Zytotoxizität aller 1,2,4-Triazin-5-one zeigten **4b** und **4d** eine leicht bevorzugte antiproliferative Wirkung auf HUVEC-Zellen, wohingegen an der Leukämiezell-Linie K-562 die Verbindungen **4a-d** eine ähnlich gute Wirksamkeit offenbarten. Eine Vergrößerung des Substituenten R³ (4.1.1, Tab. 10, Piperidin, Morpholin) führte bei den Verbindungen **4e-h** in beiden Antiproliferationsassays zu einer deutlichen Verschlechterung der Wirksamkeit. Das Vorhandensein eines Chlorsubstituenten am Phenylrest R² (**4b**, **4d**) scheint für einen antiproliferativen Effekt an HUVEC-Zellen von Vorteil zu sein, wobei möglicherweise eine Erhöhung der Lipophilie der Verbindungen eine Rolle spielt.

4.2 Interaktionsstudien zwischen der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und niedermolekularen Liganden mittels chemischen Cross-Linkings und Massenspektrometrie

Der Einfluss von niedermolekularen Liganden auf die Konformation der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO sollte untersucht werden. Dazu wurden chemische Quervernetzungsreaktionen mit kommerziell erhältlichen und neu synthetisierten Reagenzien unterschiedlicher gruppenspezifischer Reaktivität in An- und Abwesenheit verschiedener Liganden durchgeführt und massenspektrometrisch ausgewertet. Durch die Analyse intramolekularer Quervernetzungsprodukte zwischen den Aminosäureseitenketten des Proteins sollten konformative Veränderungen der C2-ähnlichen Domäne bei Bindung des Liganden erkannt und für ein Strukturmodell genutzt werden. Die Chronologie der durchgeführten Experimente zeigt die Übersicht (Schema 11).



Schema 11: Chronologie der (bio-)chemischen und massenspektrometrischen Experimente zwischen der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und verschiedenen niedermolekularen Liganden.

4.2.1 Synthese und Charakterisierung eines neuen aminreaktiven Photo-Cross-Linkers mit Isotopenmarkierung (SBDC)

4.2.1a UV-Durchlässigkeit der Reaktionsgefäße

In der Literatur werden für Photoreaktionen im UV-Bereich vorwiegend Quarzgefäße eingesetzt. Um die Durchführbarkeit der Photovernetzungsreaktionen in Polypropylen (PP)-Reaktionsgefäßen zu überprüfen, wurde die UV-A-Durchlässigkeit (~ 365 nm) sowohl für farblose als auch für braune Gefäße bestimmt (Abb. 25) (3.2.4b).

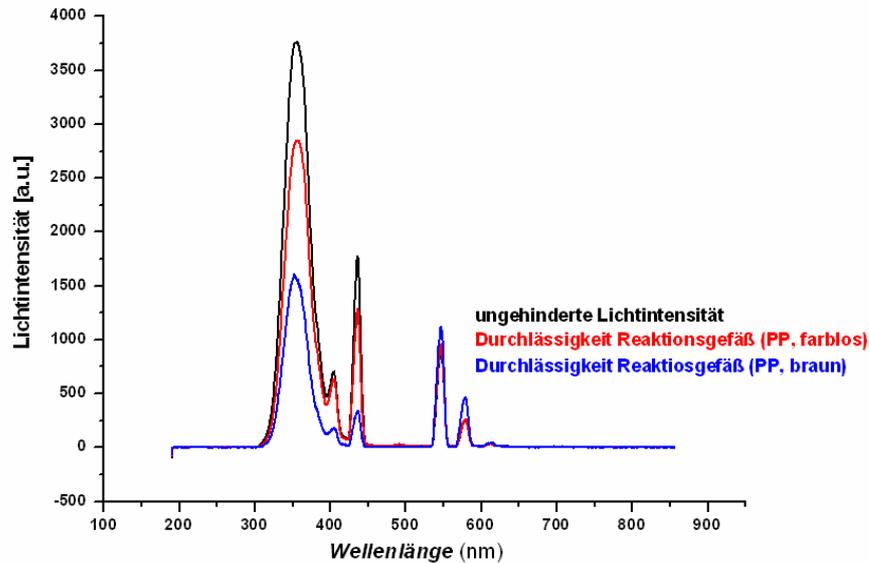


Abb. 25: UV-Durchlässigkeit der zum Photo-Cross-Linking verwendeten Reaktionsgefäße. Intensität der UV-Licht-Transmission ($\lambda \approx 365$ nm) durch ein farbloses und ein braunes PP-Reaktionsgefäß im Vergleich zur ungehinderten UV-Lichtintensität.

Für beide PP-Reaktionsgefäße (farblos, braun) ließ sich eine gute Lichtdurchlässigkeit bei 365 nm beobachten.

4.2.1b Photoreaktivität von Benzophenon

Zur Ermittlung der optimalen Bestrahlungsparameter für eine Photovernetzung von Benzophenon (BP) mit Peptiden oder Proteinen wurde das aus elf Aminosäuren bestehende Neuropeptid Substanz P (RPKPQQFFGLM-NH₂, 1347,74 Da) als Modell verwendet (3.2.4c). Bei der Wahl des Peptides sollte auch der in der Literatur beschriebenen bevorzugten Photoreaktivität von BP gegenüber der Aminosäure Methionin Rechnung getragen werden [Wittelsberger 2006]. Schon bei einer Bestrahlungsmenge von 4 J/cm² zeigte sich die Bildung erster Photoreaktionsprodukte am C-terminalen Methionin des Peptides (Abb. 26).

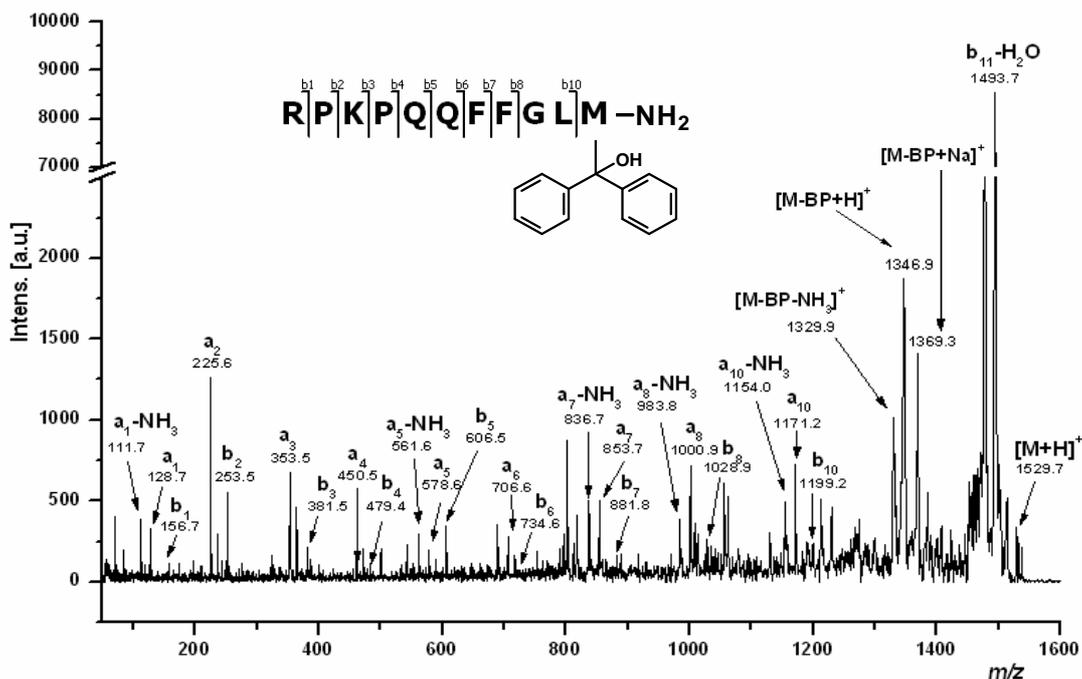
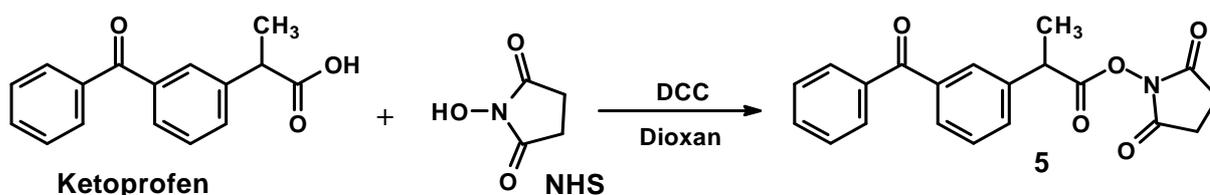


Abb. 26: MALDI-TOF/TOF-MS/MS von photochemisch modifizierter Substanz P ($[M+H]^+$ bei m/z 1529,7). BP-Modifizierung am C-terminalen Methionin. BP wurde in zehnfach molarem Überschuss zu Substanz P eingesetzt, die verwendete UV-A-Bestrahlungsmenge lag bei 4 J/cm^2 .

Eine Erhöhung der Strahlungsdosis führte ab 10 J/cm^2 zu verstärktem Auftreten von Oxidationsprodukten, sodass in den folgenden Photovernetzungsexperimenten mit Proteinen, wenn nicht anders angegeben, eine Bestrahlungsdosis von 4 J/cm^2 angewendet wurde.

4.2.1c Quervernetzungsexperimente mit Keto-NHS und CaM

Zum Studium der Modifizierungs- und anschließenden Vernetzungseffizienz eines heterobifunktionellen aminreaktiven Benzophenon-Photoaffinitätsreagenzes wurde aus dem sauren antiphlogistisch wirksamen Arzneistoff Ketoprofen (Gabrilen[®], Spondylon[®]) in einer Einstufensynthese mit NHS der entsprechende aktivierte Ester **5** (Keto-NHS) (Schema 12) dargestellt (3.4.1).



Schema 12: Synthese von Ketopropensuccinimidylester **5** (Keto-NHS).

Das Ca^{2+} -bindende regulatorische Protein Calmodulin (CaM) mit sieben zugänglichen Lysininen (K13, 21, 30, 75, 77, 94, 148) und neun Methioninen (M36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144, 145) diente als Modellprotein (Schema 13).

Calmodulin

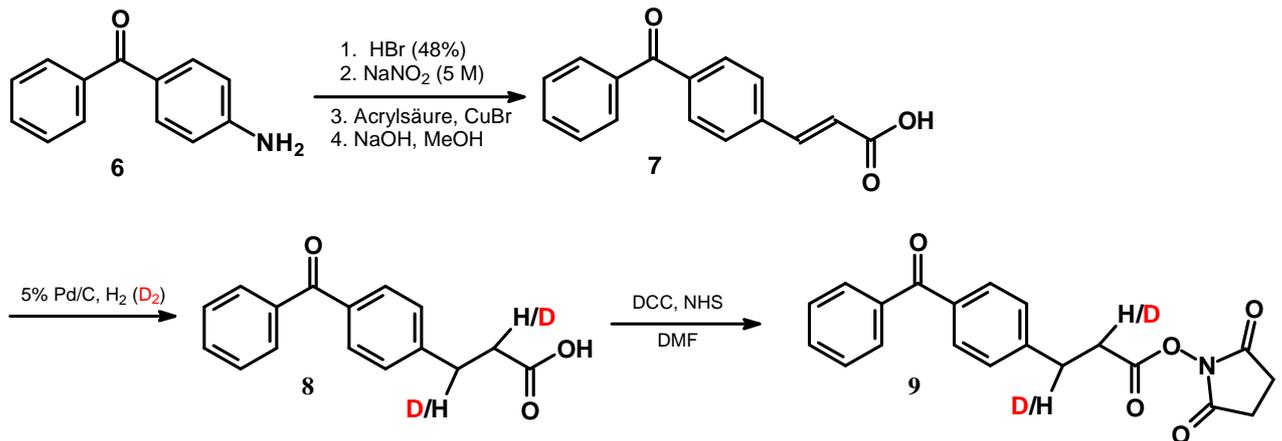
1 ADQLTEEQIA EFKEAFSLFD KDGDGTITTK ELGTVMRSLG QNPTEAELQD
 51 MINEVDADGN GTIDFPEFLT MMARKMKDTD SEEEIREAFR VFDKDGNGYI
 101 SAAELRHVMT NLGEKLTDEE VDEMIREADI DGDGQVNYEE FVQMMTAK

Schema 13: Aminosäuresequenz von bovinem Calmodulin. Die modifizierten Aminosäuren A1 (acetyliert) und K115 (trimethyliert) sind unterstrichen.

Die Modifizierung des CaM erfolgte über die aminreaktive Succinimidestergruppe an Lysin-Seitenketten (3.2.4h). Nach tryptischer *in-Gel*-Proteolyse (3.2.4m) wurden die extrahierten Spaltpeptide mit Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS (3.2.4o) untersucht und mittels Peptidfragment-Fingerprint-Analyse (PFF) dem CaM eindeutig zugeordnet. Eine vollständige Sequenzabdeckung, inklusive der posttranslationalen Modifizierungen, Acetylierung an A1 und eine Trimethylierung am K115, konnte erreicht werden. Die Neigung von N97, eine Deamidierung einzugehen [Pottratz 2008], konnte experimentell bestätigt werden (Anhang, Tab. I). Für die photochemische Vernetzungsreaktion wurde der Überschuss an unreaktiertem Keto-NHS mittels Mikrodialyse abgetrennt (3.2.4f) und die Lösung im Anschluss mit 4 J/cm² bei 365 nm bestrahlt (3.2.4i). Trotz der erfolgreichen Modifizierung der Lysine 13, 21, 30, 75, 77 und 94 mit Keto-NHS konnte kein Fragmentationsspektrum einem intra- oder interpeptidalen Cross-Link zugeordnet werden. Um die Auswertung von Photovernetzungsprodukten zu vereinfachen, sollte im nächsten Schritt eine stabile Isotopenmarkierung in das Quervernetzungsreagenz eingebaut werden (4.2.1d).

4.2.1d Quervernetzungsexperimente mit aminreaktiven Photo-Cross-Linkern mit und ohne Isotopenmarkierung (SBC/SBDC) und CaM

Nach erfolgreicher Synthese des unmarkierten (SBC) und zweifach deuterierten (SBDC) heterobifunktionellen, aminreaktiven BP-Photoaffinitätsreagenzes **9** (3.4.2) (Schema 14) wurde die Proteinmodifizierung über den aminreaktiven Succinimidester und die anschließende photochemische Vernetzung mittels der BP-Gruppe analog Kap. 4.2.1c durchgeführt (3.2.4i).



Schema 14: Synthese von *N*-Succinimidyl-*p*-benzoyldihydro(dideuterio)cinnamat **9** (SBC, SBDC) aus *p*-Aminobenzoesäure **6** über *p*-Benzoylzimtsäure **7** und *p*-Benzoyldihydro(dideuterio)-zimtsäure **8** [nach Olzschewski 1995].

Durch MALDI-TOF-MS konnte eine vierfache Modifizierung des unbestrahlten Proteins nachgewiesen werden (Abb. 27), während anschließend mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der in Lösung gespaltenen tryptischen CaM-Peptide (3.2.4n) auch die an der Reaktion beteiligten Lysinreste (K21, 75, 77, 94) identifiziert werden konnten (Anhang, Tab. II, Abb. 28, 29).

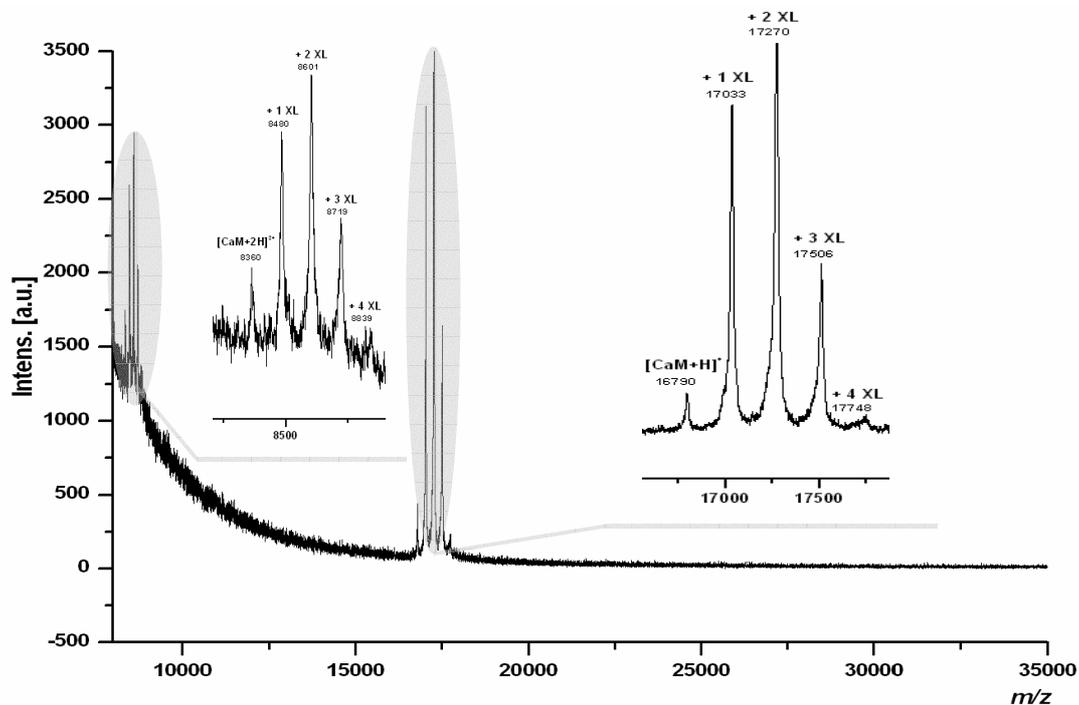


Abb. 27: MALDI-TOF-MS der Cross-Linking-Reaktionsmischung aus CaM und SBC/SBDC (fünffach molarer Überschuss an Cross-Linking-Reagenz), bei einer Reaktionszeit von 120 min (ohne Bestrahlung). Es ist der Massenbereich von m/z 8000 bis 35 000 dargestellt. XL: Anzahl der gebundenen Cross-Linker.

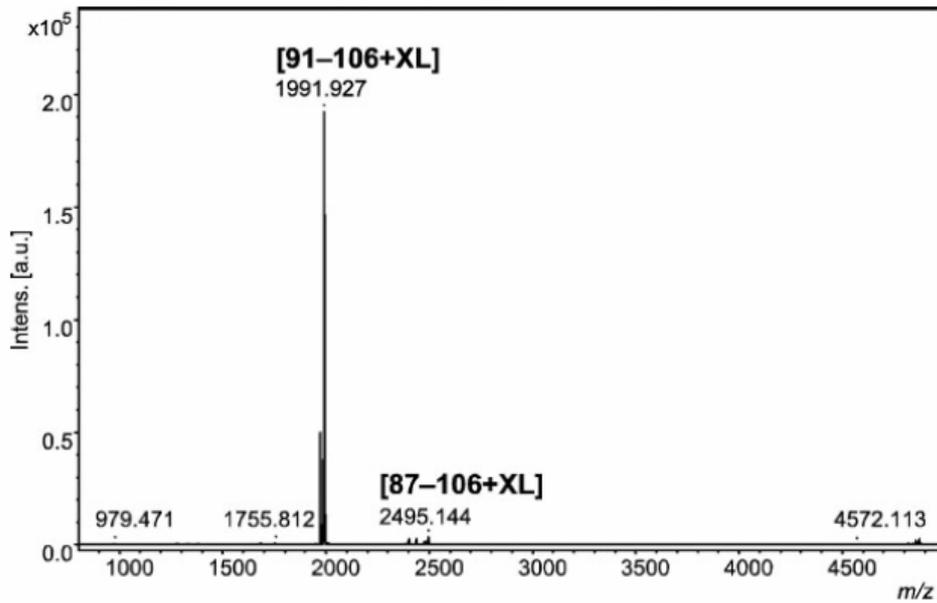


Abb. 28: MALDI-TOF-MS einer Nano-HPLC-Fraktion nach tryptischer Spaltung eines SBC/SBDC-Reaktionsansatzes mit zwei modifizierten CaM-Peptiden (Aminosäuren 91-106+XL, 87-106+XL); XL: Cross-Linker [²Krauth 2009].

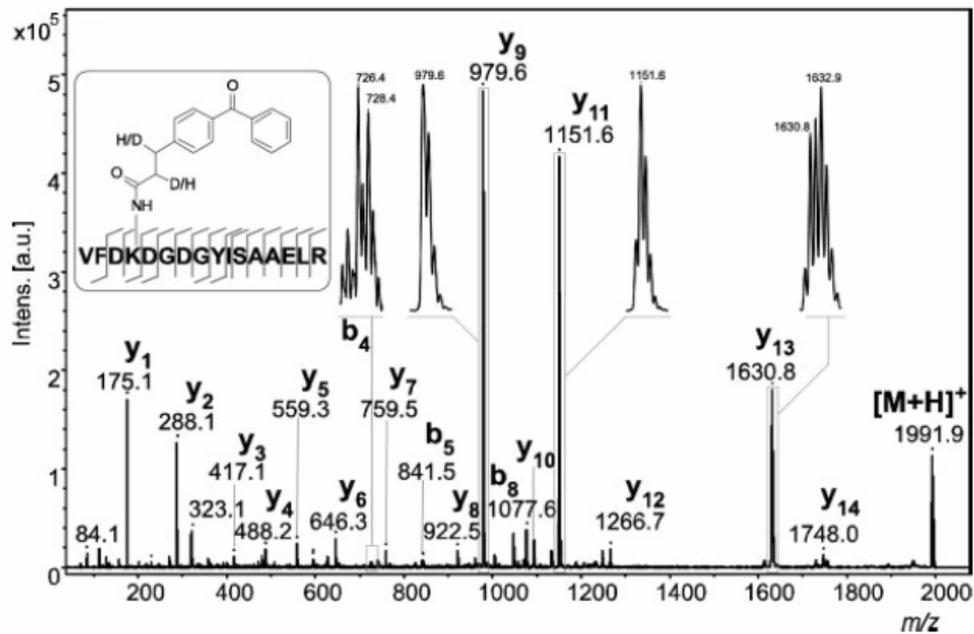


Abb. 29: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum des modifizierten CaM-Peptides (Aminosäuren 91-106, VFDKDG DG YISAAELR; $[M+H]^+$ bei m/z 1991,927). Die vergrößert dargestellten Signale zeigen die Fragmentationen y_9 (m/z 979,6, ohne Deamidierung an N97), y_{11} (m/z 1150,5 mit N97, m/z 1151,6 mit D97), y_{13} und b_4 , welche sowohl eine Modifizierung am K94 (modifiziert mit SBC/SBDC) als auch eine Deamidierung an N97 bestätigen [²Krauth 2009].

Durch die Verwendung einer 1:1-Mischung aus SBC/SBDC erhält man b- und y-Fragmentationen, welche wegen der modifizierten Aminosäure K94 ein charakteristisches Isotopenmuster mit einer Massendifferenz von 2 amu zeigen (Abb. 29).

Zusätzlich konnten drei Quervernetzungen in CaM zwischen den Seitenketten von K21 und M36, zwischen K94 und M36 und zwischen K94 und M144/145 nachgewiesen werden (Tab. 20). Bei den identifizierten Cross-Linking-Produkten bei m/z 4481,218 und m/z 4483,293 handelt es sich jeweils ausgehend von K94 um Mischungen von mit M144 oder M145 vernetzten Spezies.

Tab. 20: Mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte intramolekulare Vernetzungen in CaM [Krauth 2009].

CaM Sequenz A	CaM Sequenz B	$[M+H]^+_{exp}$	$[M+H]^+_{calc}$	Δm [ppm]	Cross-Links (vernetzte Aminosäuren)
14-30	31-37	2885,406	2885,391	5	SBC (K21-M36)
14-30	31-37	2887,445	2887,403	14	SBDC (K21-M36)
91-106	31-37	2796,394	2796,355	14	SBC (K94-M36)
91-106	31-37	2798,387	2798,367	7	SBDC (K94-M36)
91-106	127-148	4481,218	4481,011	46	SBC (K94-M144/145)
91-106	127-148	4483,293	4483,023	60	SBDC (K94-M144/145)

Um die Verwendbarkeit von SBC/SBDC für ESI-MS/MS-Anwendungen zu zeigen, wurden mit den gleichen Ansätzen Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse für die identifizierten modifizierten tryptischen Peptide (Anhang, Tab. III) und Quervernetzungsprodukte (Tab. 21, Abb. 30 und 31) bestätigen die MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten und zeigen die Anwendbarkeit der neuen Reagenzien in beiden Ionisierungstechniken.

Die intramolekularen Quervernetzungsprodukte passen zu einer vollständig mit Ca^{2+} beladenen kompakten CaM-Kristallstruktur (Abb. 32, pdb: 1prw) [Fallon & Quioco 2003]. Trotz einer geschätzten Moleküllänge von ca. 10,2 Å und eines reaktiven Radius von 3,1 Å um die Carbonylfunktion der BP-Gruppe [Dorman 1994], konnte in früheren Arbeiten [Schulz 2007, Chen 2010] gezeigt werden, dass aufgrund der hohen Flexibilität der Lysinseitenketten, C_{α} - C_{α} -Abstände von bis zu 19 Å (maximal 25 Å) als Distanzbeschränkungen bei der Verwendung von Quervernetzungsreagenzien mit einer Länge von ca. 11 Å angenommen werden können.

Tab. 21: Mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS identifizierte intramolekulare Vernetzungen in CaM [²Krauth 2009].

CaM Sequenz A	CaM Sequenz B	$[M+H]^+_{exp}$	$[M+H]^+_{calc}$	Ladungszustand	Δm [ppm]	Cross-Links (vernetzte Aminosäuren)
91-106	31-37	2796,358	2796,355	4+	1	SBC (K94-M36)
91-106	31-37	2798,361	2798,367	4+	2	SBDC (K94-M36)
14-30	31-37	2885,396	2885,391	3+	2	SBC (K21-M36)
14-30	31-37	2887,401	2887,404	3+	1	SBDC (K21-K36)
91-106	127-148	4481,035	4481,011	4+	5	SBC (K94-M144/145)
91-106	127-148	4483,029	4483,024	4+	1	SBDC (K94-M144/145)

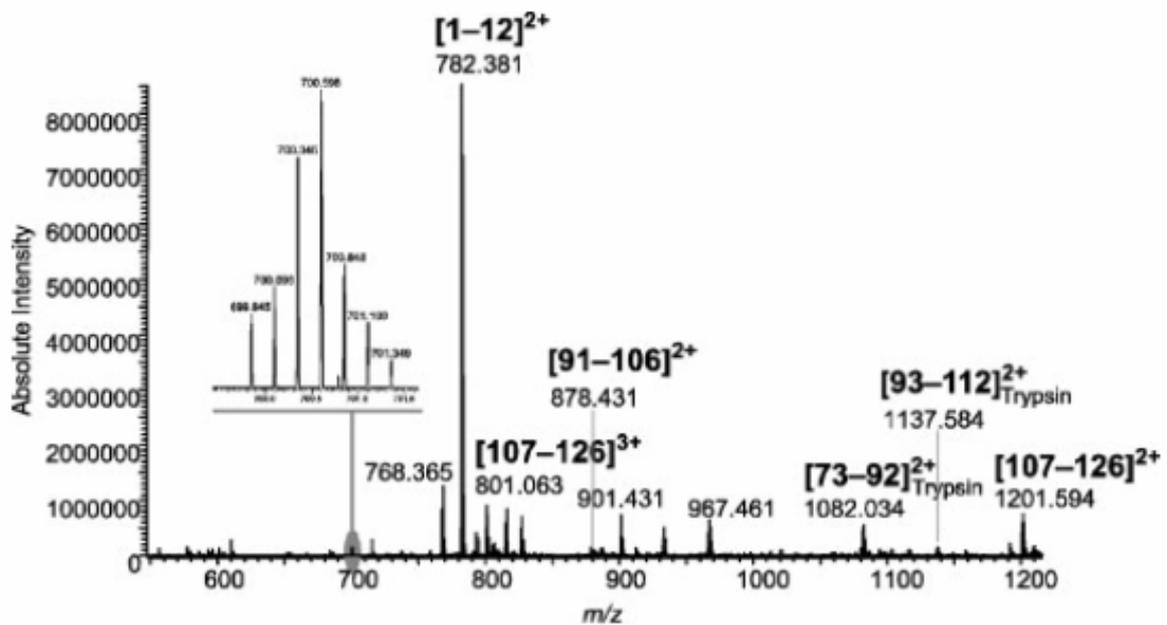


Abb. 30: ESI-LTQ-Orbitrap-MS einer Nano-HPLC-Fraktion nach tryptischer Spaltung eines CaM-Reaktionsansatzes mit SBC/SBDC. Die Aminosäuresequenzen der unmodifizierten CaM-Peptide und tryptischen Autolyseprodukte sind gekennzeichnet. Das Signal des vierfach geladenen Cross-Linking-Produktes bei m/z 699,845 zwischen Aminosäuren 31-37 und 91-106 ist vergrößert dargestellt [²Krauth 2009].

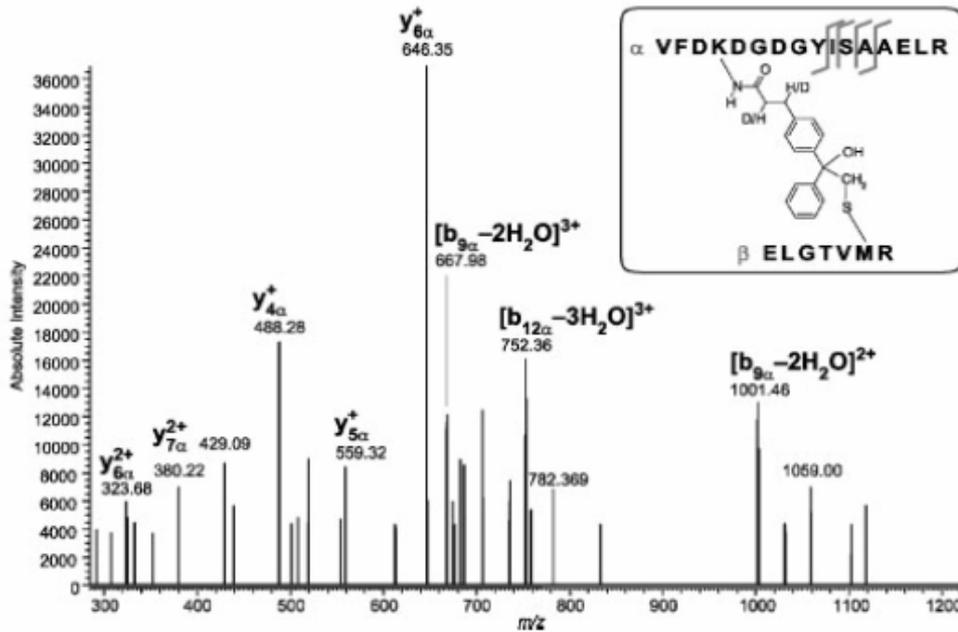


Abb. 31: ESI-LTQ-Orbitrap-Fragmentationenspektrum einer vierfach geladenen Spezies aus einem CaM-Reaktionsansatz mit SBC/SBDC (m/z 699,845). Die Fragmentierung erfolgte in der linearen Ionenfalle (LTQ), die anschließende Analyse der Fragmentionen im Orbitrap-Massenanalysator. Die MS/MS-Daten erlauben eine eindeutige Bestätigung der Quervernetzung zwischen den CaM-Peptiden 31-37 (ELGTVMR) und 91-106 (VFDKDG DGYISAAELR) über M36 und K94 [Krauth 2009].

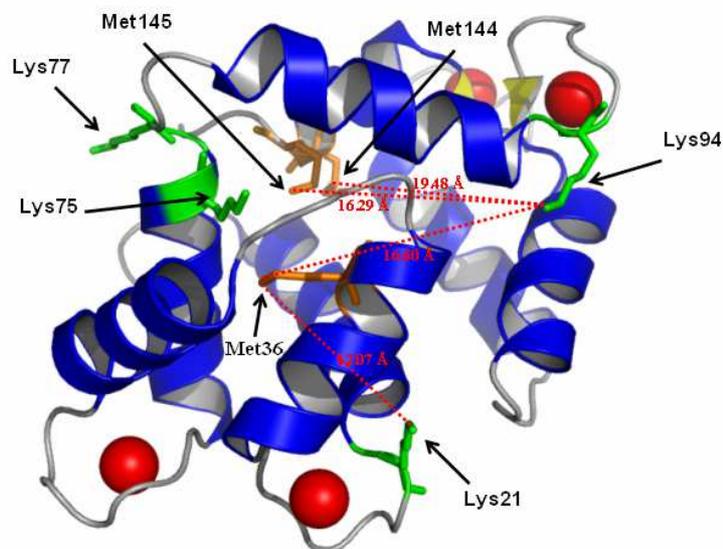


Abb. 32: Kristallstruktur von holo-CaM aus Rinderhirn (pdb: 1prw). Calciumionen sind als rote Kugeln dargestellt. Quervernetzungen zwischen Aminostickstoffatomen (N ϵ) der Lysinseitenketten und Methylgruppen der Methioninseitenketten sind mit rot gepunkteten Linien markiert (12,07 Å (K21-M36), 16,60 Å (K94-M36), 19,48 Å (K94-M144), 16,29 Å (K94-M145)). Die C α -C α -Distanzen betragen 12,24 Å (K21-M36), 17,09 Å (K94-M36), 19,34 Å (K94-M144), 19,41 Å (K94-M145). Modifizierte Lysinreste sind in hellgrün, an der Quervernetzung beteiligte Methioninreste in orange dargestellt (Modell wurde mit Pymol 0.99rc6 erstellt) [Krauth 2009].

4.2.2 Untersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO

Die während dieser Arbeit eingesetzten C2-Proteinlösungen stammten entweder aus einem nach TEV-Proteolyse erhaltenen ungereinigten Spaltansatz des Fusionsproteins MBP-C2 (Schema 15-17) (C2_{alt}), einer mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) und Brij-35 gereinigten Lösung (C2*_{neu}) oder einer nach TEV-Spaltung über den C-terminalen His₆-Tag gereinigten Detergens-freien Lösung der C2-ähnlichen Domäne (C2_{neu}). Die Herkunft der Daten ergibt sich jeweils aus den verwendeten Abkürzungen (C2_{alt}: ungereinigte Spalllösung, C2*_{neu}: mit Detergens gereinigt, C2_{neu}: ohne Detergens gereinigt). Das auf diese Methode erhaltene und untersuchte Protein besaß im Gegensatz zur nativen C2-ähnlichen Domäne (Aminosäuren 1-114) *N*-terminal fünf zusätzliche Aminosäuren des TEV-Spaltmotivs und *C*-terminal 14 zusätzliche Aminosäuren der sekundärstrukturfreien Interdomänenbindungsregion. Daher besitzt das im Folgenden als C2-ähnliche Domäne bezeichnete Protein 133 Aminosäuren und wird dementsprechend anders nummeriert (Schema 17).

4.2.2a Überprüfung der Primärstruktur mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS

Die Expression der *N*-terminalen C2-ähnlichen Domäne der h5-LO als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP-C2, Schema 15) in *E. coli* und die anschließende flüssigkeitschromatographische Reinigung wurden von Angela Michel (AG Steinhilber, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.) realisiert [Michel 2008].



Schema 15: Schematische Darstellung des Fusionsproteins MBP-C2 [modifiziert nach ¹Michel 2008].

Danach lag das Fusionsprotein ($M_r \sim 58$ kDa) in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, 1 mM EDTA und 10 mM Maltose in einer mit SDS-PAGE bestimmten Reinheit von ca. 94% vor. Die für die Cross-Linking-Experimente verwendeten Proteinlösungen wiesen einen Proteingehalt von 2,4-4,9 mg/ml (41-84 μ M) auf, welcher UV-photometrisch nach Bradford überprüft wurde (3.2.4d). Die Inkompatibilität des Tris-HCl-Puffers mit aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzien machte einen Pufferwechsel auf 20 mM HEPES (pH 7,4; 1 mM CaCl₂) mittels Mikrodialyse nötig (3.2.4f). Die Abspaltung der C2-ähnlichen Domäne vom Fusionsprotein wurde mit Hilfe der TEV-Protease (3.2.4g) realisiert. Die folgende

Proteintrennung über SDS-PAGE (3.2.4j) diente einmal zur Erfolgskontrolle der Mikrodialyse und zum anderen zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die TEV-Spaltung (Abb. 33).

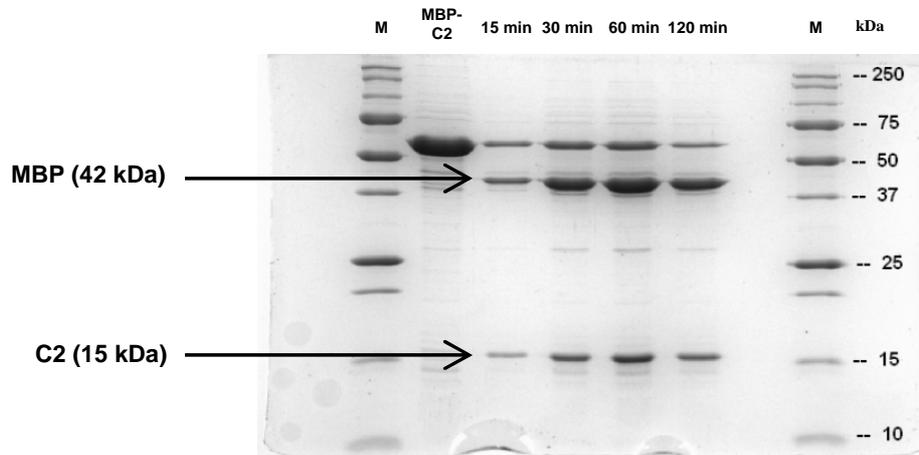


Abb. 33: SDS-PAGE (15%) des mittels TEV-Protease gespaltenen (Inkubationszeiten: 15, 30, 60, 120 Minuten) und mikrodialysierten Fusionsproteins MBP-C2 (~58 kDa); die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau angefärbt; M: Proteinmarker, MBP: Maltose-bindendes Protein, C2: C2-ähnliche Domäne der h5-LO.

Nach der erfolgreichen TEV-Proteolyse wurden die Banden des MBP und der C2-ähnlichen Domäne nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten aus dem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin oder einer Mischung aus Trypsin und AspN enzymatisch *in-Gel* gespalten (3.2.4m). Die Aminosäuresequenzen von MBP und der C2-ähnlichen Domäne sind in den Schemata 16 und 17 dargestellt.

MBP

```

1   MKMNEGKLV I WINGDKGYNG LAEVGKKFEK DTGIKVTVEH PDKLEEKFPQ
51  VAATGDGPD I IFWAHDRFGG YAQSGLLAEI TPDKAFQDKL YPFTWDAVRY
101 NGKLIAYPI A VEALSLIYNK DLLPNPPKTW EEIPALDKEL KAKGKSALMF
151 NLQEPYFTW P LIAADGGYAF KYENGGYDIK DVGVDNAGAK AGLTFLVDLI
201 KNKHMNADT D YSIAEAAFNK GETAMTINGP WAWSNIDTSK VNYGVTVLPT
251 FKGQPSKPF V GVLSAGINAA SPNKELAKEF LENYLLTDEG LEAVNKDKPL
301 GAVALKSYE E ELAKDPRIAA TMENAQKGEI MPNIPQMSAF WYAVRTAVIN
351 AASGRQTVDE ALKDAQTNSS SHHHHHHGTE NLYFQ

```

Schema 16: Aminosäuresequenz von MBP mit His₆-Markierung. Die letzten fünf Aminosäuren (kursiv) stellen die Erkennungsregion der TEV-Protease dar.

C2-ähnliche Domäne

1 *GSEFMPSYTV* TVATGSQWFA GTDDYIYLSL VGSAGCSEKH LLDKPFYNDF
 51 ERGAVDSYDV TVDEELGEIQ LVRIEKRYW LNDDWYLKYI TLKTPHGDYI
 101 EFPCYRWITG DVEVVLRDGR AKLARDDQIH ILK

Schema 17: Aminosäuresequenz der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO. Die ersten fünf Aminosäuren (kursiv) stellen das Spaltmotiv der TEV-Protease dar und sind nicht Teil der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO. Die letzten 14 Aminosäuren (unterstrichen) gehören zu einem sekundärstrukturfreien Aminosäureabschnitt (*random coil*), der die C2-ähnliche regulatorische Domäne mit der katalytischen Domäne der h5-LO verbindet.

Während des Entstehens der vorliegenden Arbeit konnte Mirjam Schröder (AG Steinhilber, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.) die Aufarbeitungsmethode von gespaltenem MBP-C2 weiter optimieren, sodass es zum ersten Mal möglich war, mit gereinigter C2-ähnlicher Domäne (C2*_{neu}, C2_{neu}) Untersuchungen durchzuführen. Mit Hilfe hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) in Anwesenheit des nicht denaturierenden nichtionischen Tensides Polyoxyethylenglycol-dodecylether (Brij-35) gelang es ihr, nicht nur die C2-ähnliche Domäne abzutrennen, sondern auch Menge und Reinheit des Proteins zu verbessern. Nach einer finalen Umpufferung lag C2*_{neu} in 1 M HEPES und < 0,1% Brij-35 vor. Mit der nach dieser Methode gereinigten Charge der C2-ähnlichen Domäne (C2*_{neu}) wurden alle weiteren Cross-Linking-Experimente durchgeführt. Gegen Ende dieser Arbeit gelang es Schröder mit Hilfe einer N-terminalen Hexahistidin-Affinitätsmarkierung (His₆-Tag) an der C2-ähnlichen Domäne eine Detergens-freie Charge der C2-ähnlichen Domäne (C2_{neu}) über Nickel-Affinitätschromatographie zu erhalten. Diese Charge (C2_{neu}) wurde für die Bestimmung des K_d-Wertes von B02 an der C2-ähnlichen Domäne und die Charakterisierung des neuen Photo-Cross-Linkers BBI verwendet (4.2.2b, 4.2.2e).

Die Analyse der Spaltpeptide erfolgte sowohl bei C2_{alt} als auch bei C2_{neu} mit Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie (3.2.4o). Die Sequenzabdeckung (94% für MBP und 100% für C2) und damit die Absicherung der bekannten Primärstruktur des Maltosebindungsproteins und der C2-ähnlichen Domäne konnte über *peptid-fragment-fingerprint*-Analyse (PFF, 3.2.4q) realisiert werden. Mittels MALDI-TOF-MS-Untersuchungen (3.2.4e) konnte das Molekulargewicht von C2_{neu} (M_r: 15442,4 Da) bestätigt werden (Abb. 34).

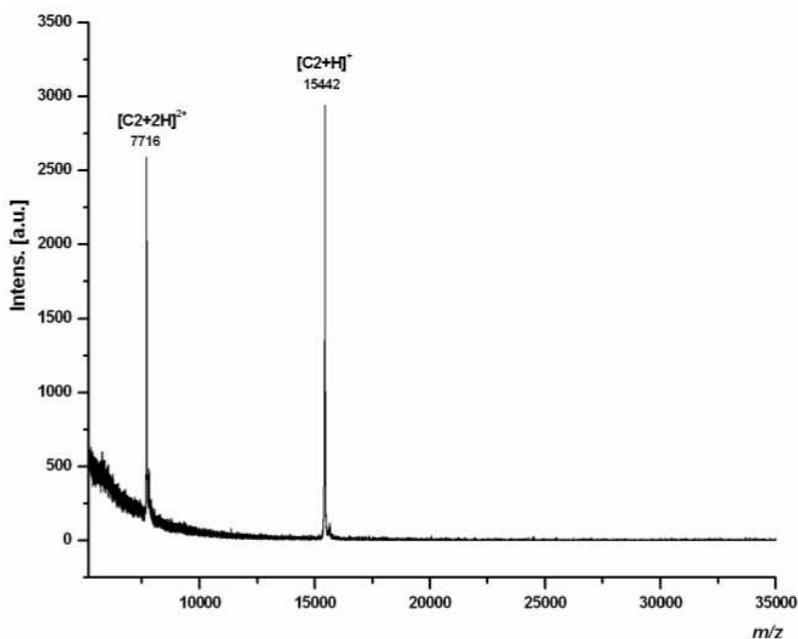


Abb. 34: MALDI-TOF-MS von C2_{neu}.

Die Eliminierung von Methylthiol (- 48 amu) aus der Seitenkette von M5 (Schema 17) wurde in MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Analysen gehäuft beobachtet. Ob der Abspaltung eine ein- oder zweifache Oxidation des Schwefels zum Methioninsulfoxid oder Methioninsulfon vorausging, konnte nicht ermittelt werden.

4.2.2b Spektrofluorimetrische K_d -Wertbestimmung des Liganden B02 an der C2-ähnlichen Domäne

Um erstmalig für den Liganden B02 eine Dissoziationskonstante (K_d) zur C2-ähnlichen Domäne der h5-LO zu bestimmen, sollte die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) genutzt werden. Die Versuche scheiterten allerdings an der geringen Löslichkeit des Liganden im Puffer und der heterogenen Pufferzusammensetzung der Probe. Selbst mit einer Detergens-freien Charge der C2-ähnlichen Domäne (C2_{neu}) konnte das Experiment nicht durchgeführt werden. Nachdem für die ebenfalls schwerlöslichen 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie K_d -Werte für eine HSA-Bindung erhalten werden konnten, sollte diese Methode auch für die Bindung von B02 an C2_{neu} angewendet werden. Bei einer Calciumionenkonzentration von 100 μM ließ sich ein K_d -Wert von $\sim 16 \mu\text{M}$ bestimmen, bei 10 μM Ca²⁺ ergab sich ein K_d -Wert von $\sim 8 \mu\text{M}$ (Abb. 35, 36).

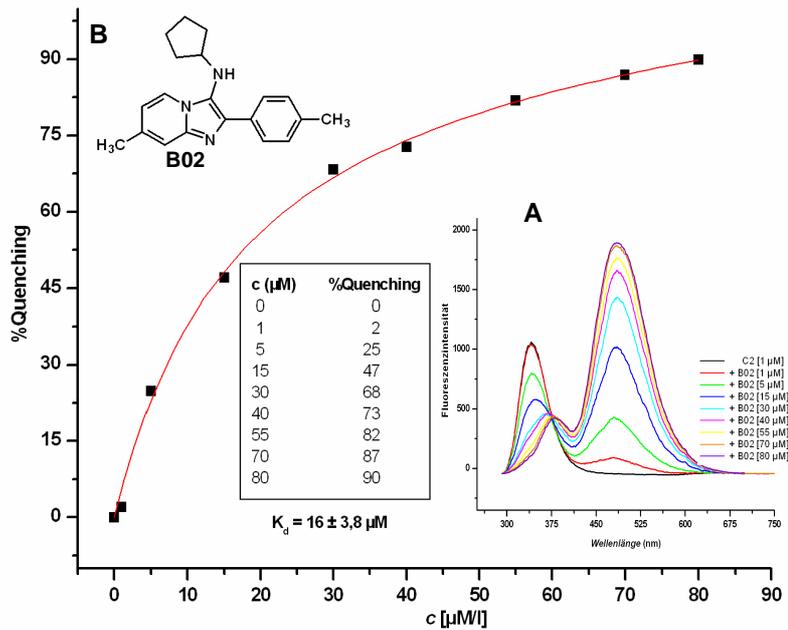


Abb. 35: Spektrofluorimetrische K_d -Wertbestimmung von B02 an $C2_{\text{neu}}$ in Anwesenheit von $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$. **A:** Messung der Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz von $1 \mu\text{M C2}$ -ähnliche Domäne in Abhängigkeit der titrierten Menge an B02 (Einzelmessungen); Messungen wurde in HEPES, pH 7,4, $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$ durchgeführt; Anregung bei $\lambda=280 \text{ nm}$. **B:** Nichtlineare Regression der spektrofluorimetrischen Daten zur Bestimmung des K_d -Wertes von B02 an $C2_{\text{neu}}$.

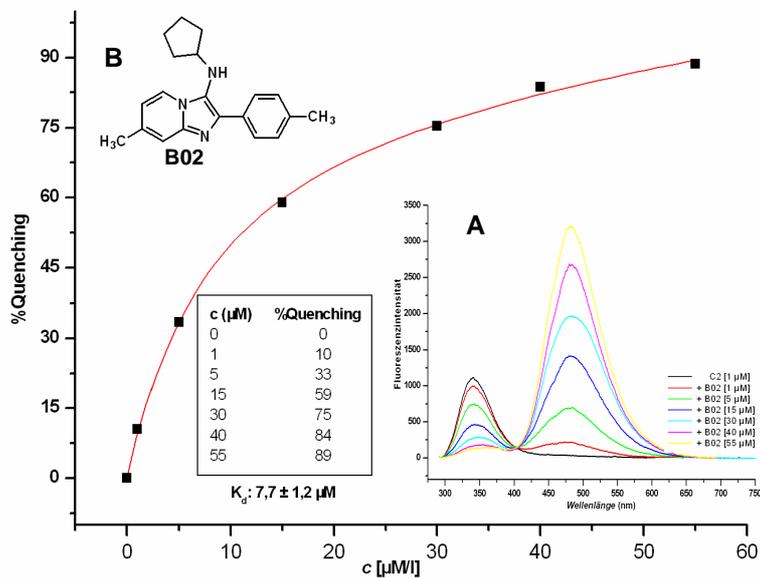


Abb. 36: Spektrofluorimetrische K_d -Wertbestimmung von B02 an $C2_{\text{neu}}$ in Anwesenheit von $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$. **A:** Messung der Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz von $1 \mu\text{M C2}_{\text{neu}}$ in Abhängigkeit der titrierten Menge an B02 (Einzelmessungen); Messungen wurden in HEPES, pH 7,4, $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ durchgeführt; Anregung bei $\lambda=280 \text{ nm}$. **B:** Nichtlineare Regression der spektrofluorimetrischen Daten zur Bestimmung des K_d -Wertes von B02 an $C2_{\text{neu}}$.

Während der Messungen konnte eine Überlappung in der Fluoreszenzemission der C2-ähnlichen Domäne mit der erforderlichen Anregungswellenlänge des Liganden B02 beobachtet werden - eine Voraussetzung für einen Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [Das 2007]. Der Versuch, den Liganden B02 (Absorptions-Akzeptor) bei 280 nm Anregungswellenlänge über die Fluoreszenzemission von C2_{neu} (Emissions-Donor) anzuregen, ließ sich erfolgreich durchführen (Abb. 37: rote Kurve). Die Interaktionsregion zwischen Protein und Ligand ließ sich aufgrund der knappen Ressourcen an C2-ähnlicher Domäne und Ligand nicht identifizieren.

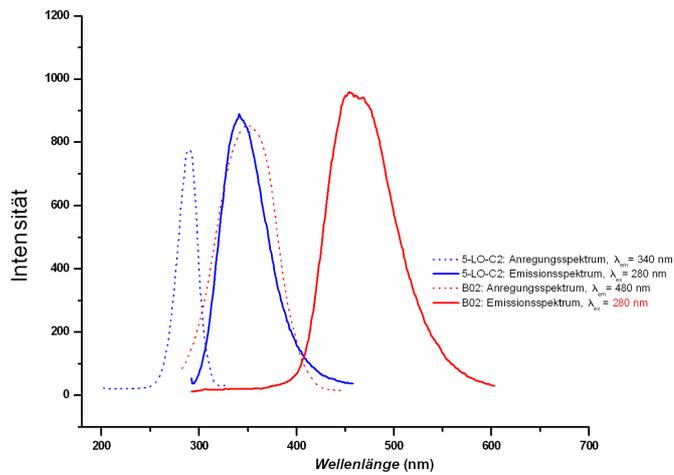


Abb. 37: Anregungs- (•••••) und Emissionsspektren (—) von B02 (40 μ M) und C2_{neu} (1 μ M) in HEPES-Puffer, pH 7,4, 100 μ M Ca²⁺.

4.2.2c Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der Quervernetzungsprodukte mit BS³- und BS₂G-D₀/D₄

Die ersten Experimente wurden mit isotopenmarkierten homobifunktionellen aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien (2.2.1) und der ungereinigten C2-ähnlichen Domäne (C2_{alt}) in An- oder Abwesenheit des niedermolekularen Liganden LP₁₂₁, einem Pirinixinsäurederivat (2.1.5, Abb. 10), durchgeführt. Damit sollten Konformationsänderungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne nach Ligandenbindung untersucht werden.

Nach Dialyse gegen HEPES (20 mM, pH 7,4, CaCl₂, 1 mM) und Abspaltung des MBP mittels TEV-Protease wurde die Lösung in sechs Ansätze zu je 10 μ M (Puffer-Gesamtvolumen: 600 μ l) aufgeteilt. Nach Zugabe des Liganden in einer zum Protein äquimolaren Konzentration (oder des entsprechenden Volumens an DMSO in der Blindprobe) wurde 20 min inkubiert und anschließend die Quervernetzungsreaktion innerhalb der C2-ähnlichen Domäne durch Zufügen der Cross-Linker BS²G-D₀/D₄ oder BS³-D₀/D₄ (3.2.4h) gestartet. Nach Ablauf der vorgegebenen Inkubationszeiten (15, 30, 60, 120 min) wurde die Reaktion

durch Inaktivierung der aminreaktiven Cross-Linker mit einem Überschuss an Ammoniumhydrogencarbonat abgestoppt und die Reaktionsmischung mit SDS-PAGE aufgetrennt. Schon bei kürzester Inkubationszeit (15 min) und unabhängig von der Anwesenheit des Liganden waren auf den mit Coomassie-Brillantblau gefärbten Gelen für beide Quervernetzungsreagenzien polymere Vernetzungsprodukte sichtbar, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht mehr in das Gel eindringen konnten (Abb. 38).

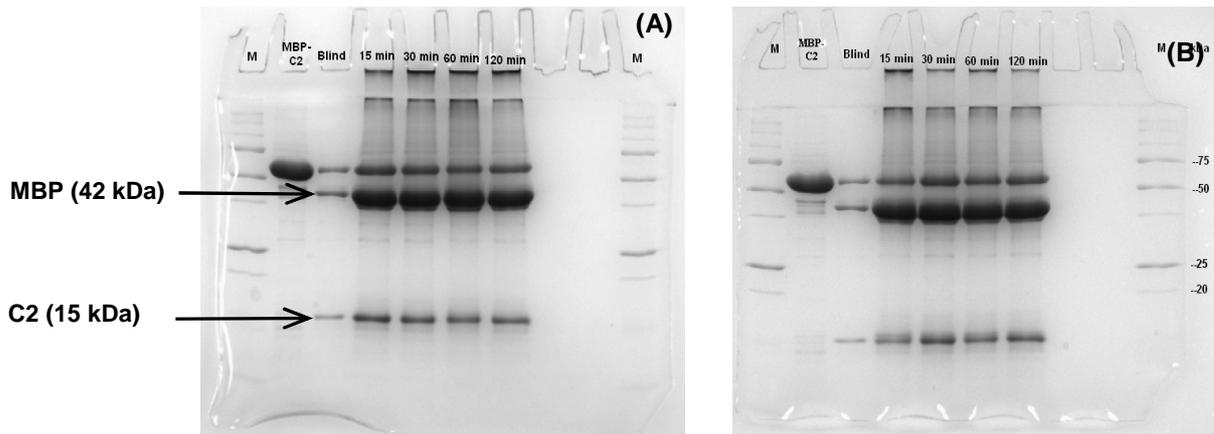


Abb. 38: SDS-PAGE (15%) eines Cross-Linking-Ansatzes mit TEV-gespaltenem Fusionsprotein MBP-C2 und BS³-D₀/D₄ (A) oder BS²G-D₀/D₄ (B) in Anwesenheit des Liganden LP₁₂₁ (Inkubationszeiten: 15, 30, 60 und 120 min). Blind: Gespaltenes Fusionsprotein (MBP-C2) ohne Quervernetzungsreagenz, M: Proteinmarker. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau angefärbt.

Die anschließende tryptische *In-Gel*-Proteolyse der vereinigten C2-Banden (15-120 min, Abb. 38) und Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Analytik erfolgte wie im Experimentellen Teil beschrieben (3.2.4m, 3.2.4o). Mit den aminreaktiven Cross-Linkern konnten für BS²G-D₀/D₄ die Lysinreste 44, 78, 88, 93, 122 und 133 und für BS³-D₀/D₄ die Lysinreste 44, 93, 122 und 133 modifiziert nachgewiesen werden (Anhang, Tab. IV-V, Abb. 39 und 40). Durch die Verwendung einer 1:1-molaren Mischung BS²G-D₀/D₄ oder BS³-D₀/D₄ erhält man b- und y-Fragmentionen, welche ausgehend von der modifizierten Aminosäure ein auffälliges charakteristisches Isotopenmuster mit einer Massendifferenz von 4 amu zeigen.

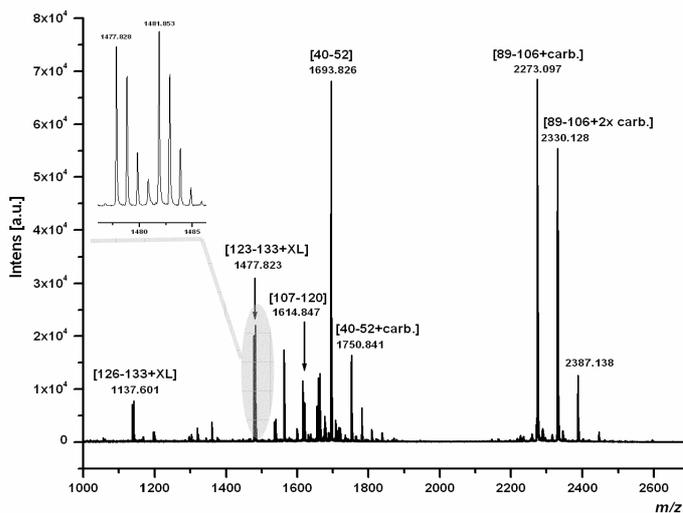


Abb. 39: MALDI-TOF-MS von unmodifizierten und mit BS³-D₀/D₄ modifizierten ([126-133+XL], [123-133+XL]) tryptischen Spaltpeptiden in Anwesenheit des Liganden LP₁₂₁. XL: Cross-Linker, carb.: carbamidomethyliert.

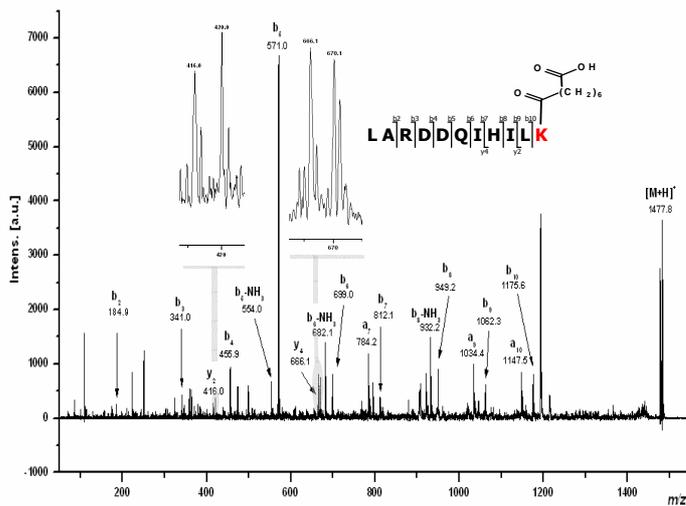


Abb. 40: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit BS³-D₀/D₄ einfach modifizierten Spaltpeptides in Anwesenheit des Liganden LP₁₂₁. Vorläuferion [M+H]⁺ bei *m/z* 1477,82 [123-133+XL]. y₂- und y₄-Ionen zeigen beide aufgrund der Modifizierung des C-terminalen K133 ein charakteristisches Isotopenmuster, während alle b-Fragmentionen dieses nicht aufweisen.

Die blau hervorgehobenen modifizierten Lysinreste in der Struktur der C2-ähnliche Domäne (Abb. 41) lassen eine Bevorzugung der oberflächenzugänglichen Lysinreste für die Modifizierungsreaktion erkennen.

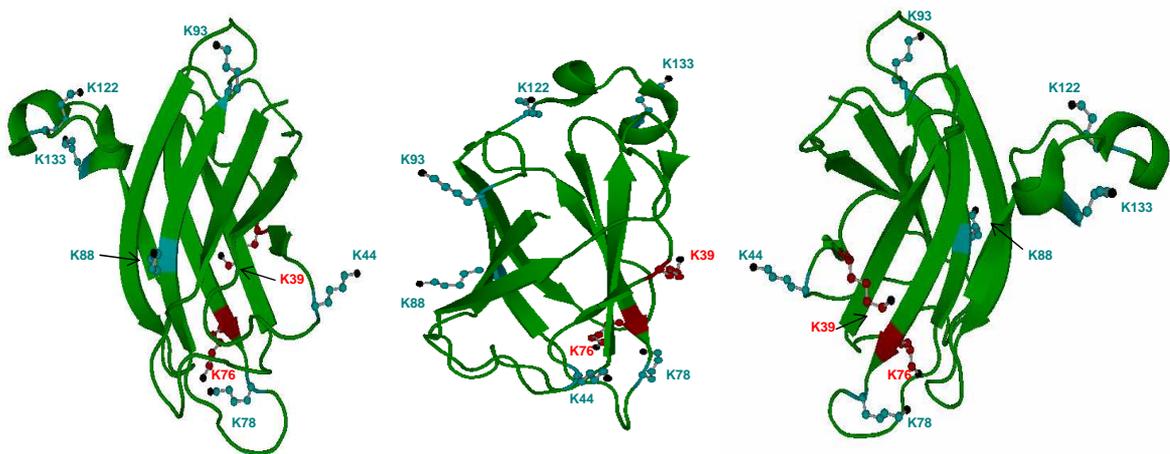


Abb. 41: Darstellung der Lysin-Seitenkettenmodifizierungen in der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO aus drei Perspektiven (pdb: 3O8Y). Mit aminreaktiven Cross-Linkern modifizierte Lysinreste (K44, 78, 88, 93, 122, 133) sind blau, die der Modifizierungsreaktion unzugänglichen Lysinreste (K39, 76) sind rot hervorgehoben.

Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne waren in keinem Reaktionsansatz nachweisbar, was auf Oligomerisierung bei der Reaktion mit den Cross-Linkern zurückzuführen sein könnte. Die Analyse der modifizierten Lysine ergab keine Unterschiede abhängig davon, ob die Reaktion mit oder ohne LP₁₂₁ durchgeführt wurde. Ein Hinweis auf eine Konformationsänderung bei Ligandenbindung an die C2-ähnliche Domäne der h5-LO ergab sich damit nicht.

In den Experimenten mit $C2^*_{\text{neu}}$ wurde der neue Ligand B02 eingeführt (2.1.5, Abb. 10). Die Probenvorbereitung und Durchführung der Quervernetzungsexperimente erfolgte analog Kapitel 3.2.4h. In der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung (3.2.4j) sieht man, im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten mit $C2_{\text{alt}}$, keine Oligomerbildung nach Cross-Linker-Zugabe (Abb. 42).

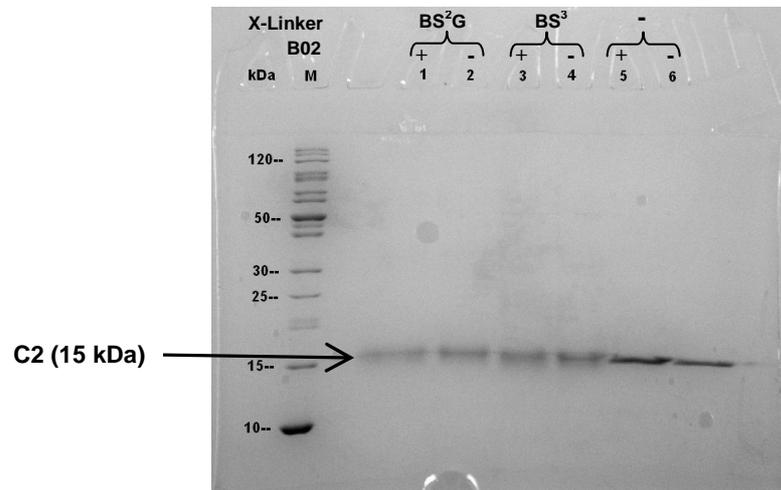


Abb. 42: SDS-PAGE (15%) eines Cross-Linking-Ansatzes mit $C2^*_{\text{neu}}$ und BS^2G - und BS^3 - D_0/D_4 in An- und Abwesenheit des Liganden B02 (30 min Inkubationszeit). M: Proteinmarker.

MALDI-TOF-MS-Messungen der Cross-Linking-Reaktion (Abb. 43, BS^2G - D_0/D_4 mit B02) zeigte eine bis zu vierfache Modifizierung der C2-ähnlichen Domäne durch BS^2G - D_0/D_4 an. Eine Vergrößerung der ein- und zweifach geladenen Spezies zeigt Abbildung 43.

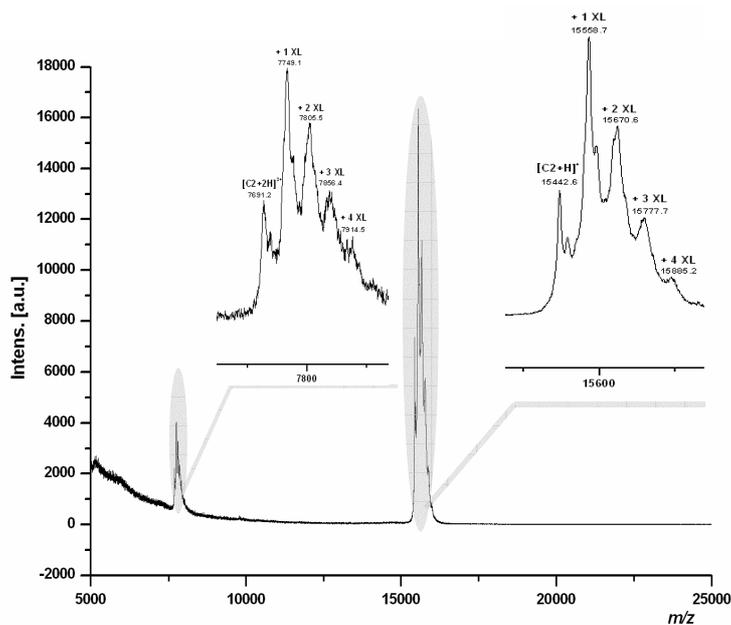


Abb. 43: MALDI-TOF-MS von $C2^*_{\text{neu}}$ nach Modifizierung mit BS^2G - D_0/D_4 in Anwesenheit des Liganden B02. XL: Cross-Linker.

Eine Proteolyse mit Trypsin/AspN in Lösung und anschließende Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der Reaktionsansätze erfolgten wie in den Kapiteln 3.2.4n und 3.2.4o beschrieben.

Die Auswertung der erhaltenen Fragmentationenspektren in Anwesenheit des Liganden B02 zeigte eine erfolgreiche Modifizierung des Serinrestes 7 der C2-ähnlichen Domäne (C2*_{neu}) und der Lysinreste 39, 88 und 93 durch BS²G-D₀/D₄ und BS³-D₀/D₄. Die Tyrosinreste 99/105 konnten mit einer BS²G-D₀/D₄-Modifizierung nachgewiesen werden (Anhang, Tab. VI, Abb. 44, 45).

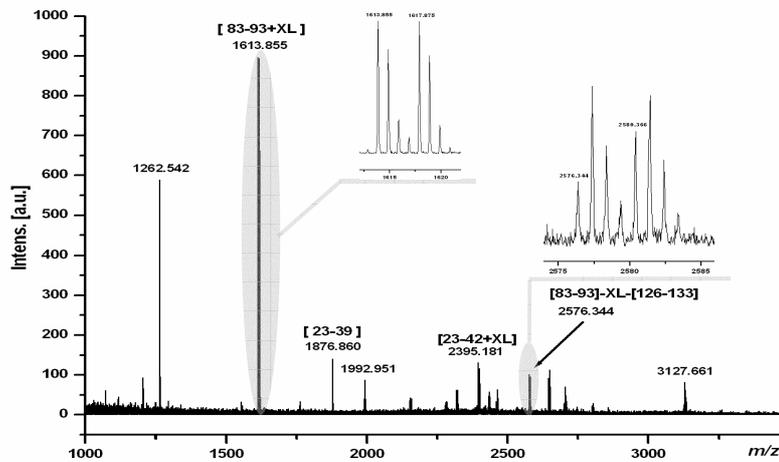


Abb. 44: MALDI-TOF-MS von mit BS³-D₀/D₄ modifizierten ([83-93+XL], [23-42+XL]) und quervernetzten ([83-93]-XL-[126-133]) Spaltpeptiden in Anwesenheit des Liganden B02.

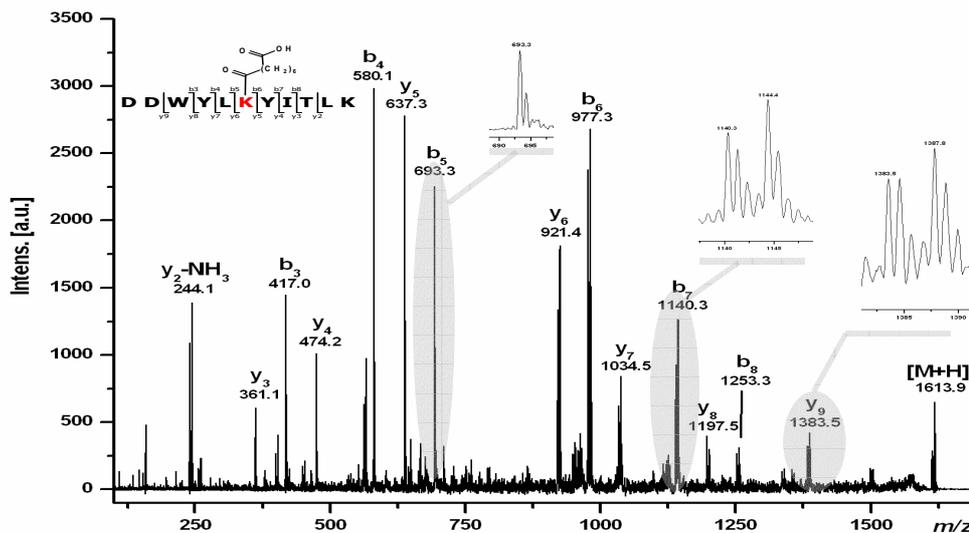


Abb. 45: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit BS³-D₀/D₄ modifizierten Spaltpeptides (Vorläufer [M+H]⁺ bei m/z 1613,855 [83-93+XL]); b₆ zeigt, im Gegensatz zu b₅ durch die Einführung einer BS³-D₀/D₄-Modifizierung an K88 ein charakteristisches Isotopenmuster).

In Abwesenheit des Liganden B02 konnten lediglich der Serinrest 7 und der Lysinrest 88 sowohl mit BS²G-D₀/D₄ als auch mit BS³-D₀/D₄ modifiziert nachgewiesen werden. Ausschließlich mit BS²G-D₀/D₄ modifiziert wurden der Lysinrest 39 und 93. Modifizierte Tyrosine wurden nicht gefunden (Anhang Tab. VII). Zusätzlich zu den Modifizierungen konnten erstmals Quervernetzungen mit homobifunktionellen aminreaktiven Reagenzien innerhalb der C2-ähnlichen Domäne (C2*_{neu}) nachgewiesen werden. In Anwesenheit von B02 konnten Verknüpfungen zwischen proteolytisch (Trypsin/AspN) gespaltenen C2-Peptiden zwischen den Seitenketten von K76 und K88 (BS²G-D₀/D₄), K88 und K122 (BS²G-D₀/D₄, BS³-D₀/D₄), K88 und K133 (BS²G-D₀/D₄, BS³-D₀/D₄) und K122 und K133 (BS²G-D₀/D₄) gefunden werden (Tab. 22, Abb. 46).

Tab. 22: Intramolekulare Cross-Links mit BS²G- und BS³-D₀/D₄ in Anwesenheit von B02 (MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten).

C2 Sequenz A	C2 Sequenz B	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Cross-Links (vernetzte Aminosäuren)
74-77	83-93	2098,123	2098,123	0	BS ² G-D ₀ (K76-K88)
74-77	83-93	2102,143	2102,148	-2	BS ² G-D ₄ (K76-K88)
83-93	121-125	2111,202	2111,154	23	BS ² G-D ₀ (K88-K122)
83-93	121-125	2115,195	2115,179	8	BS ² G-D ₄ (K88-K122)
83-93	121-125	2153,185	2153,201	7	BS ³ -D ₀ (K88-K122)
83-93	121-125	2157,204	2157,226	10	BS ³ -D ₄ (K88-K122)
83-93	121-128	2534,343	2534,318	10	BS ² G-D ₀ (K88-K133)
83-93	121-128	2538,363	2538,344	7	BS ² G-D ₄ (K88-K133)
83-93	121-128	2576,344	2576,365	-8	BS ³ -D ₀ (K88-K133)
83-93	121-128	2580,366	2580,390	-9	BS ³ -D ₄ (K88-K133)
121-125	126-133	1634,909	1634,923	-9	BS ² G-D ₀ (K122-K133)
121-125	126-133	1638,927	1638,948	-13	BS ² G-D ₄ (K122-K133)

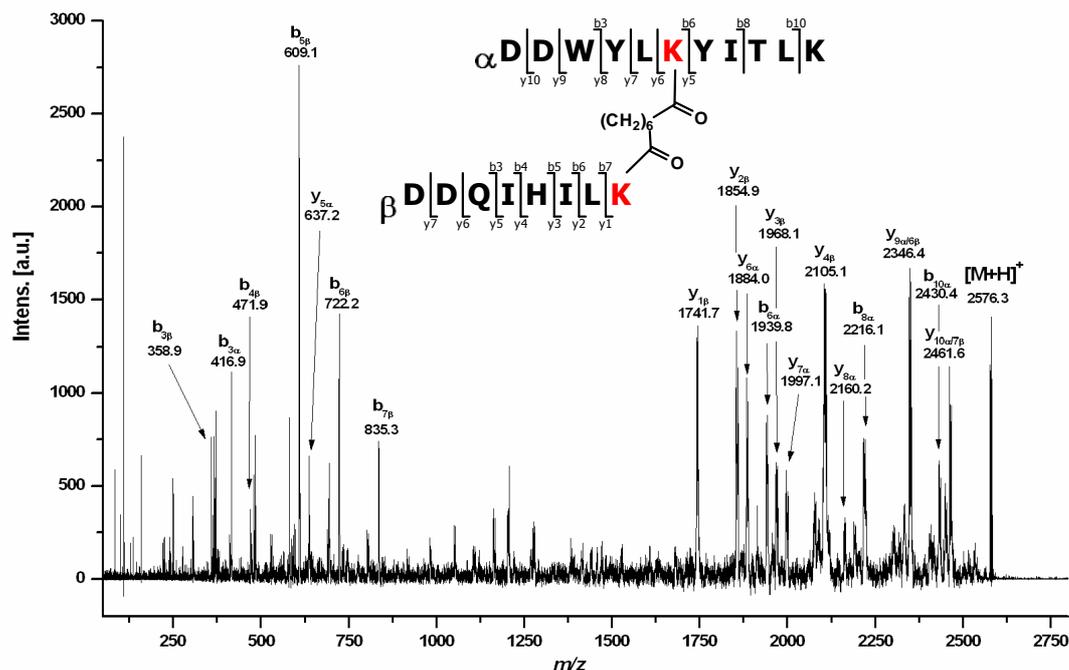


Abb. 46: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationsspektrum einer mit BS^3 - D_0/D_4 quervernetzten Spezies (Vorläuferion $[M+H]^+$ bei m/z 2576,344 [α 83-93]-XL- $[\beta$ 126-133]).

In Abwesenheit des Liganden B02 konnten Quervernetzungen zwischen proteolytisch (Trypsin/AspN) gespaltenen C2-Peptiden zwischen den Seitenketten von K44 und K133 (BS^2G - D_0/D_4), K76 und K88 (BS^2G - D_0/D_4), K88 und K122 (BS^2G - D_0/D_4 , BS^3 - D_0/D_4) und K93 und K133 (BS^3 - D_0/D_4) gefunden werden (Tab. 23).

Tab. 23: Intramolekulare Cross-Links mit BS^2G - und BS^3 - D_0/D_4 in Abwesenheit von B02 (MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten).

C2 Sequenz A	C2 Sequenz B	$[M+H]^+$ _{exp}	$[M+H]^+$ _{calc}	Δm [ppm]	Cross-Links (vernetzte Aminosäuren)
43-48	126-133	1901,946	1901,965	-10	BS^3 - D_0 (K44-K133)
43-48	126-133	1905,969	1905,990	-11	BS^3 - D_4 (K44-K133)
74-77	83-93	2098,111	2098,123	-6	BS^2G - D_0 (K76-K88)
74-77	83-93	2102,125	2102,148	-11	BS^2G - D_4 (K76-K88)
83-93	121-125	2111,149	2111,154	-2	BS^2G - D_0 (K88-K122)
83-93	121-125	2115,161	2115,179	-9	BS^2G - D_4 (K88-K122)
83-93	121-125	2153,223	2153,201	10	BS^3 - D_0 (K88-K122)
83-93	121-125	2157,237	2157,226	5	BS^3 - D_4 (K88-K122)
89-97	126-133	2148,137	2148,171	-16	BS^3 - D_0 (K93-K133)
89-97	126-133	2152,159	2152,196	-17	BS^3 - D_4 (K93-K133)

Die Abstände der intramolekular quervernetzten Aminosäuren wurden anhand der Röntgenkristallstruktur der stabilen h5-LO (pdb: 3O8Y) bestimmt. Die angegebenen Distanzen spiegeln die jeweiligen C_{α} - C_{α} -Verknüpfungen wider (Abb. 47). Beim direkten Vergleich der Ergebnisse fällt auf, dass es in Anwesenheit des Liganden (Abb. 47 A) offensichtlich zu einer stärkeren Oberflächenexposition der Tyrosinreste Y99 und Y105 kommt, die eine Modifizierungsreaktion ermöglicht. Die Vernetzungen über die C-terminalen Lysinreste K122 (mit K88) und K133 (mit K122, K93, K88 und K44) erscheinen unter der Annahme einer erhöhten dynamischen Flexibilität in Lösung durchaus möglich. Auffällig ist, dass nach Ligandenbindung die Quervernetzungsprodukte zwischen K133 und K44 bzw. K133 und K93 nicht mehr zu finden sind. Dafür scheint K88 in größere räumliche Nähe gerückt zu sein. Die Quervernetzung zwischen K76 und K88, die mitten durch das Protein führt und bei beiden Experimenten gefunden wurde, erscheint trotz eines günstigen Abstandes von 14,92 Å, unter den Bedingungen der starren räumlichen Kristallstruktur und der hohen Hydrophobizität der C2-ähnlichen Domäne als eher fraglich.

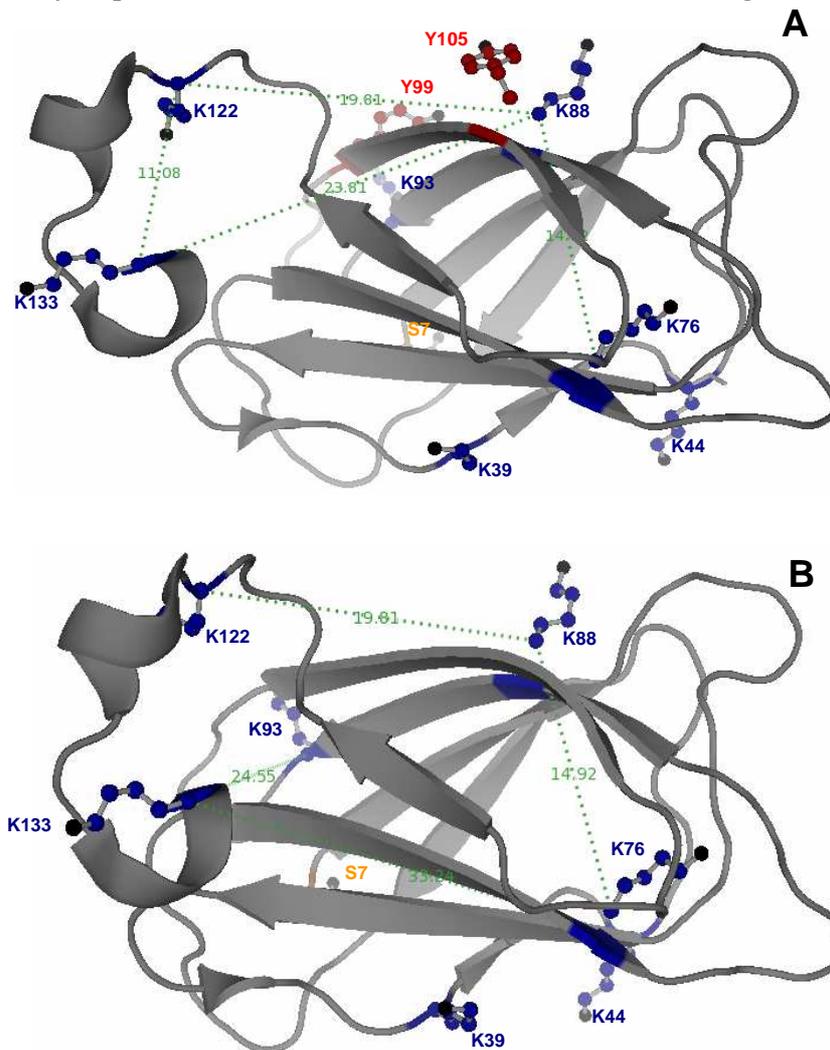


Abb. 47: Ergebnisse der Cross-Linking-Experimente an der C2-ähnlichen Domäne (C2*_{neu}) der h5-LO (pdb: 3O8Y). Quervernetzungen zwischen den Lysinseitenketten in An- (A) und Abwesenheit (B) des Liganden B02 sind mit grün gepunkteten Linien markiert. Die C_{α} - C_{α} -Distanzen betragen 33,24 Å (K44-K133), 14,92 Å (K76-K88), 19,81 Å (K88-K122), 23,81 Å (K88-K133), 24,55 Å (K93-K133), 11,08 Å (K122-K133). Lysinreste sind in blau, Tyrosinreste rot und Serinreste in orange dargestellt. (Das Modell wurde mit Pymol 0.99rc6 erstellt).

4.2.2d Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS der Quervernetzungsprodukte mit SBC/SBDC (D₀/D₂)

Durch die Erweiterung des Vernetzungsspektrums mit den heterobifunktionellen, photoreaktiven Cross-Linkern (SBC/SBDC) sollten zusätzliche Strukturinformationen erhalten werden. Die ersten Experimente mit isotopenmarkierten photoreaktiven Cross-Linkern und der C2-ähnlichen Domäne, welche noch mit C2_{alt} durchgeführt werden sollten, wurden nach der zuvor beobachteten Oligomerbildung von C2_{alt} nach Zugabe der aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien (Abb. 38, 4.2.2c) ohne den Liganden B02 durchgeführt. Nach dem erforderlichen Pufferwechsel und der anschließenden Abspaltung des MBP mittels TEV-Protease (3.2.4f-g) wurde C2_{alt} mittels heterobifunktioneller amin- und photoreaktiver Quervernetzungsreagenzien zuerst an reaktiven Aminogruppen (z.B. Lysin, N-Terminus) modifiziert und anschließend mittels UV-A-Licht zur Vernetzung angeregt (3.2.4i). Nach Beendigung der Bestrahlung schloss sich eine Proteintrennung über SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung an (3.2.4j-k). Wie zuvor mit den aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien beobachtet, zeigte sich bereits unmittelbar nach kleinster Bestrahlungsmenge (4 J/cm²) eine Oligomerisierung, welche mit zunehmender Bestrahlungsmenge zunahm (Abb. 48).

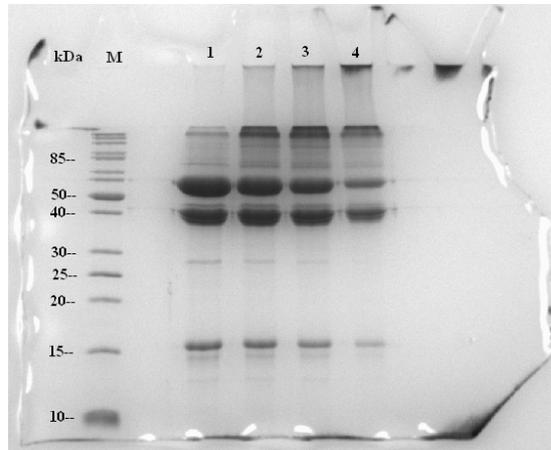


Abb. 48: Photo-Cross-Linking-Ansatz mit TEV-gespaltenem Fusionsprotein MBP-C2 und SBC/SBDC. 1: ohne Bestrahlung, 2: 1 J/cm², 3: 2 J/cm², 4: 4 J/cm². M: Proteinmarker. Die Proteine wurden mit Coomassie-Brillantblau angefärbt.

Nach *In-Gel*-Proteolyse (Trypsin/AspN) und anschließender Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Analyse (3.2.4m, 3.2.4o und 3.2.4q) ergab die Auswertung für die photoreaktiven Cross-Linker SBC/SBDC eine Modifizierung der Lysinreste K44, 88, 93, und 133 (Anhang, Tab. VIII). Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne (C2_{alt}) konnten nicht identifiziert werden.

Die Experimente mit der gereinigten C2-ähnlichen Domäne ($C2^*_{\text{neu}}$) sollten wie zuvor (4.2.2b) in An- und Abwesenheit des Liganden B02 erfolgen. Die Probenvorbereitung und -durchführung der Modifizierung und anschließende Photovernetzung mit SBC/SBDC (D_0/D_2) erfolgte analog den Angaben im Experimentellen Teil (3.2.4i).

Wie zuvor bei CaM konnte die Modifizierungseffizienz der neuen Reagenzien (SBC/SBDC) an $C2^*_{\text{neu}}$ bestätigt werden (Abb. 49).

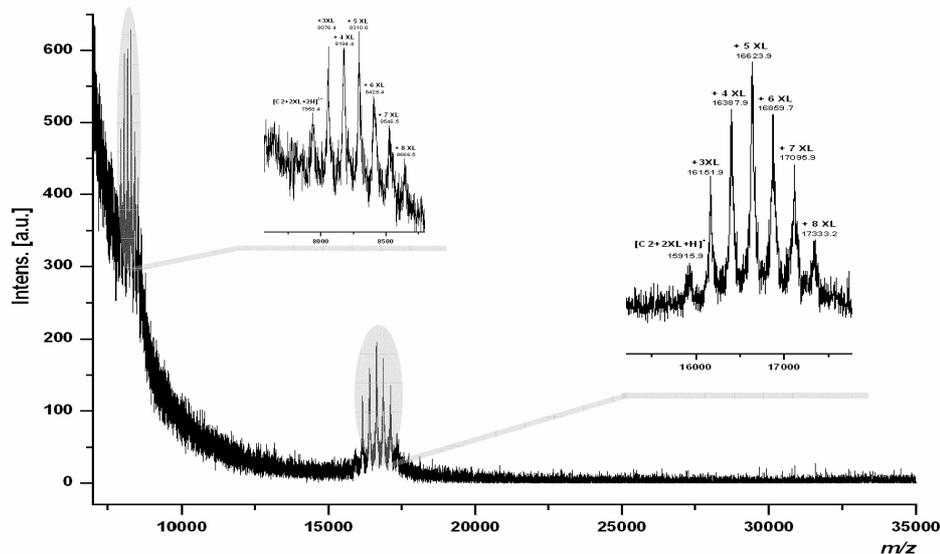


Abb. 49: MALDI-TOF-MS der Cross-Linking-Reaktionsmischung aus $C2^*_{\text{neu}}$ und SBC/SBDC (zehnfacher molarer Überschuss). Inkubation im Kühlschrank (4-8°C) über Nacht. Es ist der Massenbereich von m/z 7000 bis 35 000 mit Signalen für die einfach positiv geladenen und zweifach positiv geladenen Ionen von $C2_{\text{neu}}$ dargestellt; XL bezeichnet die Anzahl der zusätzlich gebundenen hydrolysierten Cross-Linker.

Nach Proteolyse (Trypsin/AspN) in Lösung und Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS (3.2.4n, 3.2.4o) ergab die Auswertung für die photoreaktiven Cross-Linker SBC/SBDC in Anwesenheit von B02 eine effektive Modifizierung des Serinrests S7, der Tyrosinreste Y99 und 105 und der Lysinreste K39, 44, 78, 88, 93 und 133 der C2-ähnlichen Domäne (Anhang, Tab. IX). In den Proben ohne den Liganden B02 fanden sich bis auf die Lysinreste K44 und 78 dieselben Modifizierungen wie in den Experimenten mit Ligand wieder (Anhang, Tab. X, Abb.50, 51). Quervernetzungen konnten nicht identifiziert werden.

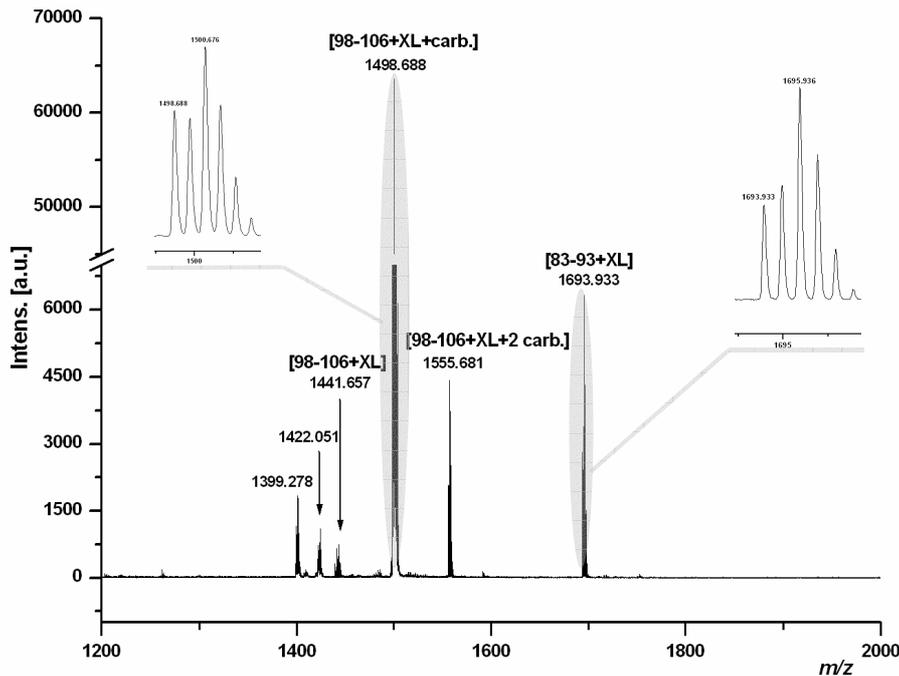


Abb. 50: MALDI-TOF-MS von mit SBC/SBDC modifizierten Spaltpeptiden ([98-106+XL+carbamidomethyliert], [83-93+XL]) in Anwesenheit des Liganden B02.

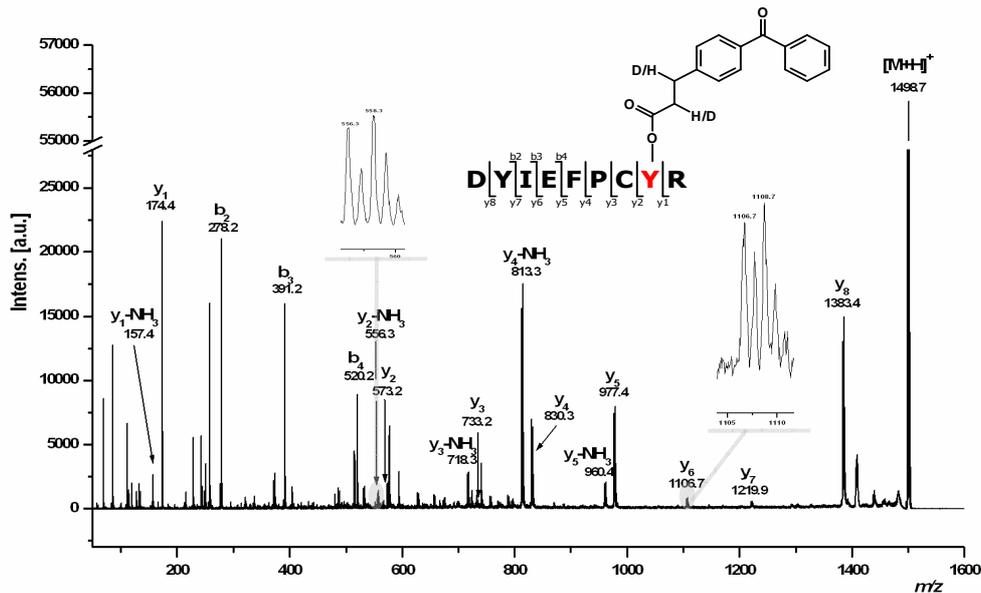


Abb. 51: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit SBC/SBDC modifizierten Peptides (Vorläuferion $[M+H]^+$ bei m/z 1498,688 [98-106+XL+carbamidomethyliert]).

Um die Vernetzbarkeit von B02 mit einem BP-enhaltenen photoreaktiven Cross-Linker zu untersuchen, wurde die Substanz in Anwesenheit von BP steigenden UV-A-Strahlungsmengen ausgesetzt. Statt des erwarteten Photo-Adduktes konnte dabei eine Photoreaktivität von B02 beobachtet werden. Mittels mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) wurde eine methanolische B02-Lösung, nach verschiedenen UV-

A-Bestrahlungsmengen, einzeln aufgetrennt und fluorimetrisch vermessen. Dabei zeigte das MEKC nach einer Retentionszeit von ca. 13 Minuten ein Signal, welches mit zunehmender Bestrahlungsmenge - auf Kosten eines Signals bei $t_R \sim 10,5$ Minuten - an Intensität verlor (Abb. 52, 3.2.4r).

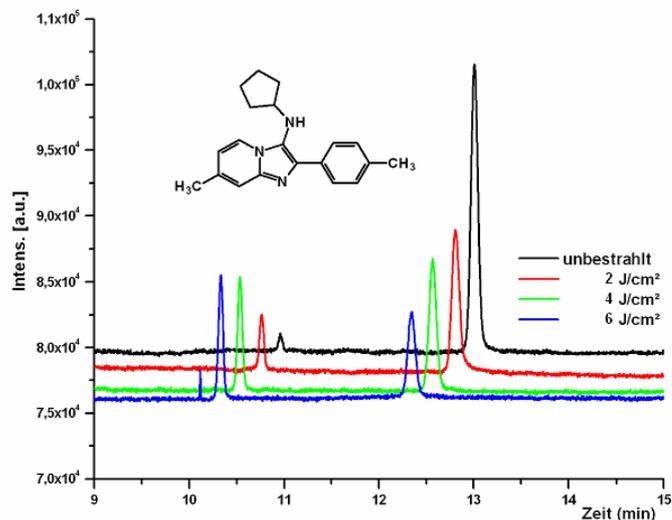


Abb. 52: Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) einer methanolischen B02-Lösung (0,1 mM) nach Bestrahlung (0-6 J/cm²) mit Fluoreszenzdetektion. Der verwendete Laufpuffer war SDS/Borax (20 mM/10 mM), Injektionsdruck: 10 mbar, Spannung: 25 kV.

Das photochemische Verhalten des Liganden B02 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Vermutlich wird der Ligand mit zunehmender UV-A-Strahlungsdosis oxidiert und schließlich zersetzt (unveröffentlichte ESI-LTQ-MS-Daten). Photoaddukte von B02 an der C2-ähnlichen Domäne waren massenspektrometrisch nicht nachweisbar.

4.2.2e Synthese und Charakterisierung eines neuen cysteinreaktiven Photo-Cross-Linkers (BBI) mit Massendefekt

Zur Erweiterung des zur Verfügung stehenden Photo-Cross-Linker-Sortimentes sollte die bekannte cysteinreaktive Verbindung BI (2.2.2, Abb. 11) mit einer Brommarkierung (BBI) versehen werden. Das Ziel dabei war durch den Einbau eines Atoms mit einer natürlichen Isotopenhäufigkeit von ~50% (⁷⁹Br/⁸¹Br; 50,69%/49,31%) eine natürliche 1:1-Mischung eines Quervernetzungsreagenzes mit einem Massenunterschied von 2 amu zu erhalten. Gleichzeitig sollte die Bestimmung hochgenauer Massen von mit BBI modifizierten Peptiden durch den hohen Massendefekt des Bromatoms eine Erleichterung erfahren [Hall 2003].

Vor der geplanten Synthese sollte der Oxidationsstatus der beiden Cysteine (C36, C104) in der C2-ähnlichen Domäne überprüft werden. Dazu wurde während eines durchgeführten Cross-Linking-Experimentes mit dem amireaktiven Photo-Cross-Linker Keto-NHS **5** (4.2.1c,

Schema 12), ohne die Anwesenheit eines Liganden und nach Abschluss der Modifizierungsreaktion (120 min), ein Cystein-selektiver Alkylierungsschritt mit Iodacetamid (IAA) eingebaut. Dieser erfolgte sowohl ohne als auch mit vorheriger Zugabe des Reduktionsmittels TCEP (Tab. 24). Nach zwanzigminütiger Inkubation mit TCEP bei RT wurde für 30 Minuten mit IAA im Dunkeln bei RT alkyliert. Danach wurde wie unter (3.2.4i) beschrieben weiterverfahren.

Tab. 24: Modifizierung von C2_{neu} mit Keto-NHS (120 min) und Iodacetamid (30 min).

	1	2	3	4	Endkonz.
C2 [29 µM]	172 µl	172 µl	172 µl	172 µl	10 µM
CaCl₂ [50 mM]	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	1 mM
Keto-NHS [10 mM]	5 µl	5 µl	5 µl DMSO	5 µl DMSO	100 µM
IAA [100 mM]	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	1 mM
TCEP [80 mM]	63 µl	----	63 µl	----	10 mM
H₂O-MQ	245 µl	308 µl	245 µl	308 µl	

Die gelelektrophoretische Proteintrennung (3.2.4j) nach der Photovernetzungsreaktion zeigte mit steigender Bestrahlungsdosis eine zunehmende Oligomerisierung. An der schwach sichtbaren C2-Dimerbande in den unbestrahlten Proben ist eine beginnende Alterung des Proteins zu erkennen (Lagerung ca. 1 Woche bei 4-8°C) (Abb. 53).

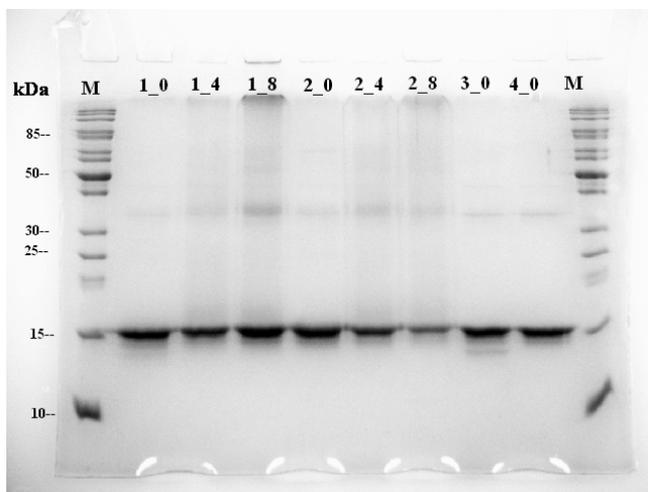
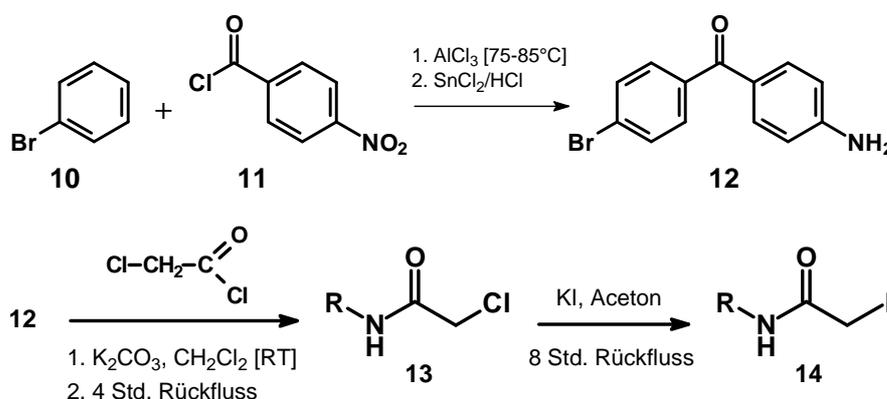


Abb. 53: SDS-PAGE (15%) eines Cross-Linking-Ansatzes mit C2_{neu} und Keto-NHS in Abwesenheit des Liganden B02 nach 120 min Inkubationszeit. 1_0, 1_4, 1_8 (Tab. 24, Spalte 1, unbestrahlt, 4 J/cm², 8 J/cm²), 2_0, 2_4, 2_8 (Tab. 24, Spalte 2, unbestrahlt, 4 J/cm², 8 J/cm²), 3_0 (Tab. 24, Spalte 3, unbestrahlt), 4_0 (Tab. 24, Spalte 4, unbestrahlt), M: Proteinmarker.

Nach Proteolyse (Trypsin/AspN) in Lösung und Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Analyse (3.2.4n, 3.2.4o) ergab die Auswertung (3.2.4q) für den photoreaktiven Cross-Linker Keto-NHS (ohne Ligand) eine Modifizierung der Lysinreste K44, 76, 88, 93, 122 und 133 von C2_{neu} (Anhang, Tab. XI). Die Cysteinreste C36 und C104 wurden beide mit IAA modifiziert und lagen damit in reduzierter Form vor. Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO wurden nicht gefunden.

Die Synthese des cysteinreaktiven Photo-Cross-Linkers *N*-{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-iodoacetamid **14** (BBI) konnte in drei Stufen (3.4.3) realisiert werden (Schema 18).



Schema 18: Synthese von *N*-{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-iodoacetamid **14** (BBI) aus 4-Brom-4'-aminobenzophenon **12** über *N*-{4-[(4-Bromphenyl)carbonyl]phenyl}-2-chloroacetamid **13**. R = 4-(4'-Brombenzoyl)phenyl.

Nach Reinigung und Charakterisierung von **14** wurde die Thiolgruppenreaktivität mit Hilfe eines einfachen Kopplungsexperimentes an das Tripeptid Glutathion (GSH) untersucht (3.2.4t). Der anschließende qualitative Nachweis für die erfolgreiche Reaktion erfolgte dünnschichtchromatographisch mit anschließender Ninhydrinfärbung. Auf dem Dünnschichtchromatogramm sieht man, verglichen mit der GSH-Referenz, ein neu gebildetes, mit Ninhydrin anfärbbares Produkt (violetter Fleck, Abb. 54). Die mit Bleistift markierten BBI-Flecke ließen sich nur anhand ihrer UV-Absorption detektieren und waren nach dem Besprühen mit Ninhydrin nicht mehr nachweisbar.

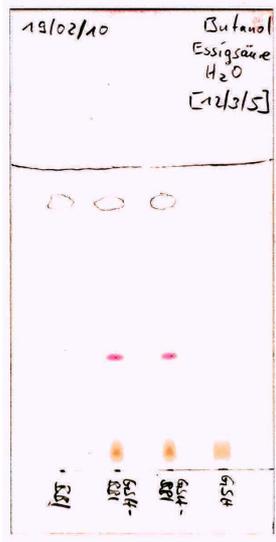


Abb. 54: Mit Ninhydrin angefärbtes Dünnschichtchromatogramm der Reaktionsmischung aus BBI und GSH und der jeweiligen Einzelverbindungen. Die Flecke für BBI wurden vor dem Besprühen mit Bleistift markiert.

Nach diesen Vorversuchen mit GSH wurde der Cross-Linker BBI an C2_{neu} verwendet. Die Durchführung der Proteinmarkierung und anschließenden UV-A-Bestrahlung erfolgte nach demselben Protokoll wie für SBC/SBCD (3.2.4i). Die gelelektrophoretische Proteintrennung zeigte weder einen qualitativen Unterschied zwischen den Proben, die in An- oder Abwesenheit des Liganden B02 durchgeführt wurden, noch schien die Bestrahlungsdosis einen Unterschied zu machen (Abb. 55).

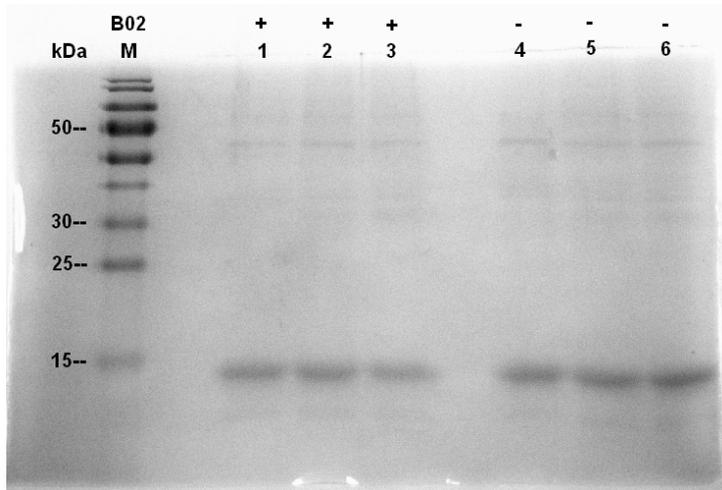


Abb. 55: SDS-PAGE (15%) eines Photo-Cross-Linking-Ansatzes mit C2_{neu} und BBI sowohl in An- (1-3) als auch Abwesenheit (4-6) von B02. Inkubiert wurde bei 4°C über Nacht. 1, 4: ohne Bestrahlung, 2, 5: 1 J/cm², 3, 6: 2 J/cm² (UV-Bestrahlung bei 365 nm).

Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die C2-Banden (15 min, Abb. 55) ausgeschnitten, mit einer Mischung aus Trypsin und Glu-C enzymatisch gespalten und mit Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS untersucht. Durch die Verwendung eines Brommarkierten BP-Restes erhält man Massensignale von modifizierten Peptiden, welche aufgrund der natürlichen Isotopenhäufigkeit des Elementes Brom ein charakteristisches Isotopenmuster

mit einer Massendifferenz von 2 amu zeigen. Die Identifizierung der modifizierten Aminosäure C104 konnte unter diesen Bedingungen erreicht werden (Abb. 56, 57).

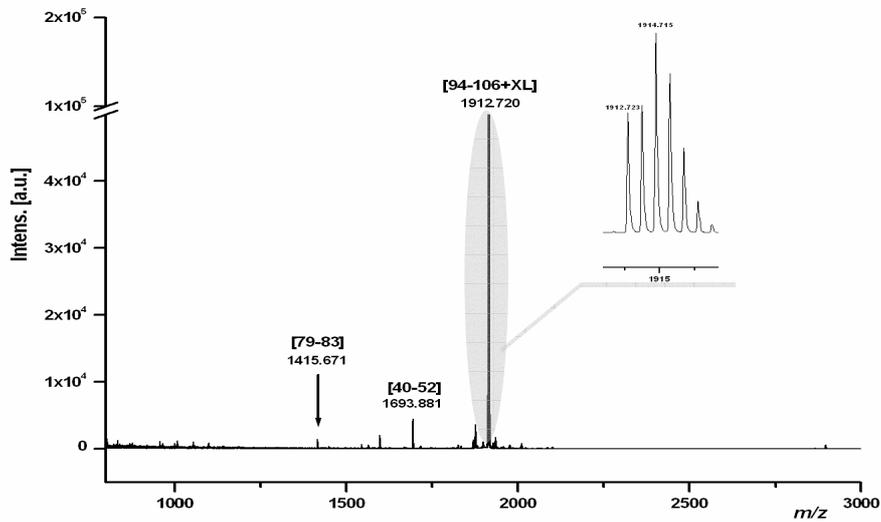


Abb. 56: MALDI-TOF-MS einer mit Trypsin/Glu-C gespaltenen Peptidfraktion von $C2_{neu}$ nach Modifizierung mit BBI und anschließender UV-A-Bestrahlung (4 J/cm^2).

Die MS/MS-Daten liefern b- und y-Fragmentionen, welche ausgehend von der modifizierten Aminosäure C104 ebenfalls das charakteristische Isotopenmuster zeigen (Abb. 57).

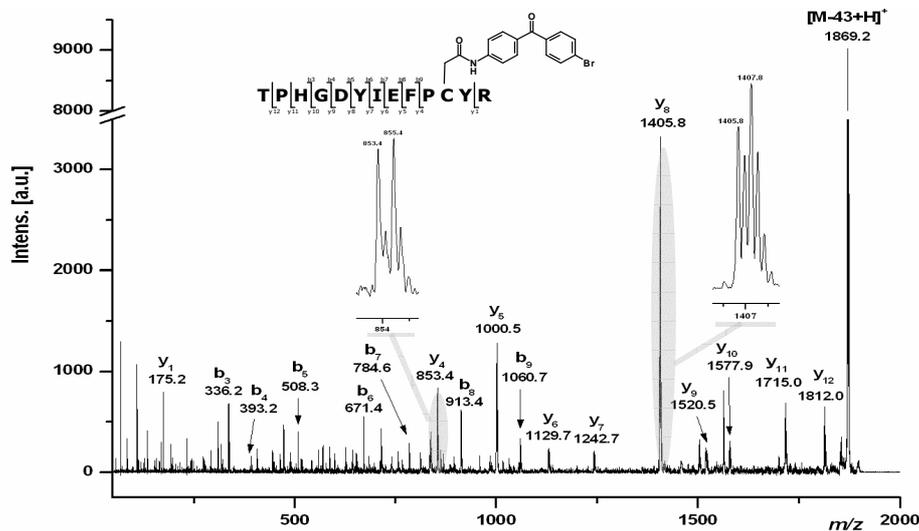
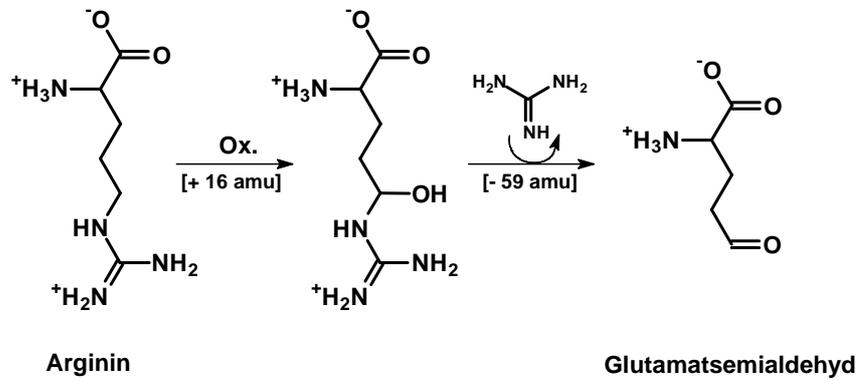


Abb. 57: MALDI-TOF/TOF-Fragmentationenspektrum eines mit BBI an C104 modifizierten Spaltpeptides von $C2_{neu}$ (Vorläuferion $[M+H]^+$ bei m/z 1912,720 [94-106+XL]).

Das intensitätsstärkste Signal bei m/z 1869,2 $[M-43+H]^+$ im Fragmentionenspektrum des mit BBI modifizierten Peptides ist möglicherweise einer Oxidation der Seitenkette des C-terminalen Arginins mit anschließender Glutamatsemialdehydbildung geschuldet (Schema 19) [Berlett 1997, Requena 2001].



Schema 19: Bildung von Glutamatsemialdehyd nach Oxidation der Argininseitenkette [modifiziert nach Requena 2001].

5 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

5.1 1,2,4-Triazin-5-one als potentielle h5-LO-Inhibitoren?

Die Synthese und Testung von Säureamidhydrazonen (Amidrazonen) und deren zyklischen Derivaten wie den Triazolinen, Triazolen und Benzotriazepinen führte seit Mitte der 1980er Jahre am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Entwicklung zahlreicher Inhibitoren der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 (SB-LO-1; isoliertes Enzym), der humanen 5-Lipoxygenase (h5-LO; intakte PMNG und Vollblut) und der humanen Cyclooxygenase (hCOX; Vollblut) [Harenberg 1987, Nuhn 1993, Lettau 1993, Froberg 1995, Froberg 1997, Drutkowski 2003, Klietsch 2004]. Mit der Synthese der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h**, deren Grundgerüst im Prinzip einem zyklischen Amidrazon entspricht, wurde das Ziel verfolgt weitere sauerstoff- und lichtunempfindliche Verbindungen mit einem im Vergleich zu den Triazolinen ähnlichen oder besseren Wirkprofil an der h5-LO [Drutkowski 2003] zu erhalten. Für verschiedene 1,2,4-Triazin-3-one war in einer Studie sowohl im Zelllysät von basophilen Leukämiezellen der Ratte (RBL-1) als auch im humanen Vollblut eine gute Wirksamkeit an der 5-LO mit für den Menschen vertretbaren Nebenwirkungen beschrieben worden [Bhatia 1996]. Die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** wurden nach erfolgreicher Synthese und Charakterisierung an intakten polymorphkernigen Granulozyten (PMNG) auf h5-LO-Hemmung untersucht. Die Ergebnisse der parallel durchgeführten Untersuchungen an der SB-LO-1 wurden mit denen am humanen Enzym h5-LO verglichen und die gegenseitige Übertragbarkeit diskutiert.

Die im Verlauf dieser Arbeit ermittelten Charakteristika und pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindungen sind am Ende des Kapitels 5.1.2 in der Tabelle 25 zusammengestellt.

5.1.1 Synthese und „Rule-of-five“-Deskriptoren der 1,2,4-Triazin-5-one

Durch einfache *Click-Chemie* gelang die Zyklisierung der offenkettigen Amidrazonedukte mit Formaldehyd zu den neuen 1,2,4-Triazin-5-onen **4a-h** (4.1.1). Die Forderungen gemäß der „rule-of-five“ von Lipinski, die häufig zur Einschätzung potentiell oral bioverfügbarer Wirkstoffe dienen [Lipinski 1997], wurden von allen Substanzen erfüllt (4.1.2a). Dabei wurden die vorhergesagten Lipophilien in Form von berechneten log *P*-Werten (log *P*_{calc}: 3,3-5,1) (4.1.2a) experimentell bestätigt (4.1.2b; indirekte log *P*_{O/W}-Bestimmung mittels HPLC über den Retentionsfaktor *k*). Sowohl die virtuelle (4.1.2a), als auch die experimentelle Methode der log *P*-Bestimmung (4.1.2b) konnten damit erfolgreich als Ersatz für die

zeitaufwändige Schüttelflaschenmethode eingesetzt werden, deren Durchführung sich auch aufgrund der mäßigen Wasserlöslichkeit der Verbindungen (4.1.2c; aus experimentellen Daten berechnete $\log S_{\text{exp}}$ (-3,9)-(-6,2)) schwierig gestaltet hätte (5.1.2, Tab. 25).

5.1.2 Einfluss von Lipophilie und Redoxpotential auf die Hemmung der h5-LO und SB-LO-1

Anhand der experimentell ermittelten $\log P$ -Werte und Redoxpotentiale sollte der Einfluss der Lipophilie und der Oxidierbarkeit der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** auf deren Wirksamkeit an der h5-LO genauer betrachtet werden. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten bereits zuvor für die in ihren Studien untersuchten Substanzgruppen unterschiedliche Zusammenhänge gefunden. So konnte Hammond 1989 zeigen, dass innerhalb einer Substanzklasse – in diesem Fall 2,3-Dihydro-5-benzofuranole – die hemmende Aktivität an der h5-LO aus intakten PMNG – anhand des berechneten $\log P$ -Wertes abgeschätzt werden kann [Hammond 1989]. Ähnliches berichteten Summers über Hydroxamsäurederivate und Hlasta über Phenidon-Analoga an der 5-LO aus einem RBL-1-Zelllysat [Summers 1990, Hlasta 1991]. Während Naito 1991 für Catechol-Derivate am Zelllysat von Meerschweinchen-PMNG sogar ein Hydrophobizitätsoptimum bei $\log P$ 4,3-4,7 postulierte [Naito 1991], konnte Sogawa kurze Zeit später für seine am RBL-1-Zelllysat untersuchten 3,4-Dihydroxychalcone keine Korrelation zwischen einer guten 5-LO-Hemmung und dem jeweiligen $\log P$ -Wert erkennen [Sogawa 1993]. Bei den redoxaktiven LO-Inhibitoren BW755C und Phenidon (2.1.3, Abb. 3), die in der Vergangenheit als Leitstrukturen für eine große Anzahl synthetisierter Amidrazon-Verbindungen dienten [Frohberg 1997], ist bekannt, dass ihre Wirkung von einer toxischen Methämoglobinbildung begleitet wird, die möglicherweise im Zusammenhang mit einem niedrigen Redoxpotential ($E_{1/2}$ (BW755C): 310 mV, $E_{1/2}$ (Phenidon): 390 mV [Bruneau 1991]) steht [Musser 1992]. Auch wenn dieser Zusammenhang als alleinige Begründung eher unwahrscheinlich anmutet, da beispielsweise Substanzen wie die Hydroxamsäurederivate (2.1.3, Abb. 2) oder AA-861 (2.1.3, Abb. 3) ebenfalls eine gewisse Redoxaktivität besitzen und diesen Effekt nicht zeigen [Musser 1992], schlossen sich zur elektrochemischen Charakterisierung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** zykelvoltammetrische Untersuchungen und Radikalfänger-Experimente mit dem stabilen Radikal 2,2'-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) an (4.1.2d).

Überraschenderweise zeigte keine der acht neuen Substanzen **4a-h** eine herausragende antileukotriene Aktivität auf die h5-LO im Zellassay an intakten PMNG (4.1.2f). Lediglich mit **4b** wurde bei einer Konzentration von 30 μM eine Senkung der h5-LO-Restaktivität

unter 20% erreicht. Ein Trend bezüglich eines günstigen log *P*-Wertes für eine optimale Wirksamkeit am intrazellulären Enzym konnte nicht festgestellt werden. Die elektrochemischen Ergebnisse zeigten, dass alle 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** ein vergleichbares Redoxpotential wie BW755C besitzen ($E_{1/2}$: 290-420 mV vs. $E_{1/2}$: 220 mV), aber nach der elektrochemischen Oxidation - im Gegensatz zu BW755C - kinetisch stabile (persistente) Radikale bilden (5.2, Tab. 25). Dieser Effekt war bereits 2005 für die Gruppe der h5-LO- und SB-LO-1-inhibierenden Triazoline gezeigt worden [Krauth 2005]. Radikalfänger-eigenschaften gegenüber dem stabilen Radikal DPPH konnten trotz mit BW755C vergleichbarer Redoxpotentiale nicht in nennenswerter Weise beobachtet werden.

Der in der Vergangenheit für die pharmakologische Charakterisierung der Amidrazone und für mechanistische Studien häufig eingesetzte SB-LO-1-Assay [Clemens 2001] (4.1.2g) dient trotz berechtigter Bedenken [Sircar 1983, Chang 1984, Schewe 1986, Nuhn 1991] manchen Arbeitsgruppen immer noch als Voruntersuchungsmethode für eine inhibitorische Aktivität an der h5-LO [Hadjipavlou 2009, Pontiki 2011]. Als Rechtfertigung der Verwendung der SB-LO-1, die in Bezug auf das Substrat Arachidonäure eine 15-LO darstellt, wird dabei auf die hohe Konservierung des aktiven Zentrums aller LOs untereinander und den vergleichbaren Mechanismus der Fettsäureperoxidation verwiesen. In einer Studie von 1984 wurden für eine Reihe von LO-Inhibitoren, u.a. BW755C, Eicosatetra-5,8,11,14-tetrainsäure und NDGA, vergleichbar gute Hemmaktivitäten an der SB-LO-1 und an der 5-LO aus neutrophilen Rattengranulozyten (IC_{50} (SB-LO-1): 0,1-3,6 μ M; IC_{50} (5-LO): 1-43 μ M) gezeigt, wobei der Autor sich unmissverständlich davon distanziert, SB-LO-1 als Modellenzym für h5-LO zu verwenden [Chang 1984]. Um für die Substanzgruppe der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** eine mögliche Übertragbarkeit der aus dem pflanzlichen Assay gewonnenen Daten auf eine h5-LO-Inhibition zu überprüfen, wurde deren Aktivität an der SB-LO-1 mittels einer polarographischen Sauerstoffverbrauchsmessung (3.2.3b) untersucht. Dabei zeigten alle Verbindungen eine mit ihren Ausgangsamidrazonen vergleichbare Aktivität an der pflanzlichen LO (IC_{50} : 0,015-1,0 μ M). Substanz **4b** war mit einem IC_{50} -Wert von 15 nM die potenteste Verbindung. Ein wenig raumgreifender Substituent R^3 ($N(CH_3)_2$) schien dabei einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit an der SB-LO-1 zu besitzen (5.2, Tab. 25). Eine Korrelation zwischen den prozentualen Hemmdaten aus dem humanen Granulozytenassay und den IC_{50} -Werten an der SB-LO-1 ergab sich für die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** nicht. Ebenso konnte kein Einfluss der Lipophilie (log *P*) auf die Wirksamkeit an der SB-LO-1 erkannt werden. Die Ergebnisse aus den zykelvoltammetrischen Untersuchungen und des DPPH-Radikalfängertests deuten allerdings darauf hin, dass für die Gruppe der 1,2,4-Triazin-

5-one **4a-h** der entscheidende Inhibitionsmechanismus, zumindest an der SB-LO-1, nicht ausschließlich redoxvermittelt ablaufen dürfte. Gundersen und Brathe kamen in ihren Untersuchungen von an der SB-LO-1 wirksamen Indolizinen bzw. Purinen mit DPPH zu ähnlichen Ergebnissen [Gundersen 2003, Brathe 2005].

Unter den charakterisierten 1,2,4-Triazin-5-onen **4a-h** konnte bedauerlicherweise keine Leitstruktur für die Synthese neuer h5-LO-Inhibitoren gefunden werden. Die gute inhibitorische Wirksamkeit der Substanzen an der 15-LO der Sojabohne (SB-LO-1), die im Gegensatz zur geringen Wirksamkeit an der h5-LO steht, zeigte die marginale Übertragbarkeit der pflanzlichen IC₅₀-Werte auf eine Wirksamkeit am humanen Enzym. Neben der geringen Sequenzidentität zwischen h5-LO und SB-LO-1 von ~ 27%, völlig anderen natürlichen Substraten und pH-Verhältnissen ist das Fehlen sämtlicher zelltypischer Bestandteile, insbesondere Membranen ein weiterer entscheidender Nachteil, Inhibitionsassays an einem isolierten Enzym wie der SB-LO-1 durchzuführen. Weitere Untersuchungen zur LO-Hemmung mit den 1,2,4-Triazin-5-onen **4a-h**, beispielsweise an einer Säuger-15-LO oder im humanen Vollblut, wurden zu Gunsten von Antiproliferations- und Zytotoxizitätsstudien, in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt (5.2). Um eine verminderte Permeabilität der Granulozytenmembran als Ursache für die Wirkungslosigkeit der Substanzen an der h5-LO auszuschließen, sollten weitere Experimente an Zelllysaten der homogenisierten PMNG bzw. deren S100-Überständen erfolgen und danach gegebenenfalls die Lipophile der Verbindungen durch chemische Modifizierungen angepasst werden.

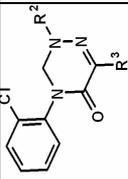
5.1.3 Ist ein Einsatz der 1,2,4-Triazin-5-one bei chronischer myeloischer Leukämie denkbar?

Bereits 1986 wurde am Beispiel der nicht-zytotoxischen Verbindung AA-861 (2.1.3, Abb. 3) auf einen möglichen Zusammenhang zwischen einer h5-LO-Hemmung und einer antiproliferativen Wirkung an humanen Leukämiezellen, z.B. K-562 aufmerksam gemacht [Tsukada 1986]. In einer Studie an Mäusen mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) wurde ein verlängertes Überleben bei der Kombination aus dem Standardtherapeutikum Imatinib und dem h5-LO-Hemmer Zileuton im Gegensatz zur Imatinib-Monotherapie beobachtet. Dabei schien Zileuton, über die Inhibition der h5-LO, eine regulatorische Wirkung auf die CML-Stammzellen auszuüben, welche auf BCR-ABL-Kinaseinhibitoren, wie Imatinib, nicht ansprachen [Chen 2009]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-h** neben der Testung auf h5-LO-Hemmung auf ihre Zytotoxizität an HeLa-Zellen und antiproliferative Wirksamkeit an der Krebszell-Linie K-562 untersucht.

Gleichzeitig erfolgte eine Prüfung der antiproliferativen Wirksamkeit an HUVEC-Zellen. Überraschenderweise zeigten einige 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** ungeachtet der gemessenen Unwirksamkeit an der h5-LO (4.1.2g) und der fehlenden Zytotoxizität an HeLa-Zellen (4.1.2h) eine gute inhibitorische Aktivität an der K-562-Zell-Linie (4.1.2h) (Tab. 25). Ähnlich wie bei der SB-LO-1-Inhibition scheint ein kleiner Substituent R^3 einen günstigen Einfluss auf die Wirksamkeit an K-562-Zellen zu besitzen. Ein Pyrrolidin-Substituent wie bei **4c** und **4d** macht dabei gegenüber einem Dimethylsubstituenten wie bei **4a** und **4b** bzgl. der Wirksamkeit den Eindruck einer leichten Bevorzugung. Der Einbau von Morpholin als R^3 wie bei **4g** und **4h** führte dagegen zum vollständigen Wirkungsverlust. Die Einführung eines 4-Chlorphenyl-Substituenten als R^2 , wie bei **4b** und **4d**, scheint die Wirkung an der K-562-Zell-Linie gegenüber **4a** und **4c** möglicherweise durch Lipophilie-Erhöhung abzuschwächen, während sich dies offensichtlich günstig an der HUVEC-Zell-Linie auswirkt.

Als für die Pharmakokinetik interessanten Parameter wurden die an der K-562-Zell-Linie wirksamen Verbindungen **4a-d** abschließend auf eine Bindung an humanes Serumalbumin (HSA) untersucht (K_d : 3-10 μ M, 4.1.2e). Diese Versuche waren am Ende der Arbeit noch nicht vollständig abgeschlossen und sollten für eine vollständige Charakterisierung noch mit Affinitätsdaten an α_1 -saurem Glycoprotein ergänzt werden.

Die trotz fehlender h5-LO-Hemmaktivität messbare antiproliferative Wirkung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** an K-562-Zellen wirft die Frage nach dem Inhibitionsmechanismus auf, dessen Aufklärung eine Zielstellung zukünftiger Arbeiten sein könnte. Eine Anwendung der neuen Verbindungen als Kombinationspartner mit Imatinib zur Behandlung der CML, wie für den h5-LO-Inhibitor Zileuton in der Studie von Chen und Kollegen beschrieben [Chen 2009], dürfte damit wenig erfolgversprechend sein. Verglichen mit Imatinib besitzen die 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** zwar eine schwächere inhibitorische Aktivität an K-562-Zellen, die fehlende Zytotoxizität der Verbindungen lässt allerdings eine weitere Strukturoptimierung in Richtung potenterer und wenig toxischer Chemotherapeutika zu.

	R ²	R ³	log P _{cal} / log P _{exp}	Wasserlöslichkeit [µg/ml] (S _{exp} *M _W / S _{virt} *M _W)	E _{1/2} (mV)	IC ₅₀ (µM) SB-LO-1	h5-LO- Restaktivität (%) PMNG bei 3/10/30 µM	GI ₅₀ (µg/ml±SD) HUVEC	GI ₅₀ (µg/ml±SD) K-562	CC ₅₀ (µg/ml±SD) HeLa
4a	C ₆ H ₅	N(CH ₃) ₂	3,5/3,6	38/134	350	n.d.	103,6/99,3/56,9	34,5 ± 2,8	5,8 ± 0,4	39,5 ± 7,6
4b	4-Cl- C ₆ H ₄	N(CH ₃) ₂	4,2/4,1	7,1/32	290	0,015	95,5/64,2/19,9	16,1 ± 1,4	11,0 ± 0,7	39,4 ± 5,2
4c	C ₆ H ₅	Pyrrolidin	3,9/4,0	12/64	300	0,18	97,6/79,7/28,5	40,9 ± 4,9	5,2 ± 0,4	44,3 ± 5,8
4d	4-Cl- C ₆ H ₄	Pyrrolidin	4,6/4,6	2,4/17	350	0,14	88,6/61,4/53,0	18,9 ± 1,5	8,6 ± 0,6	> 50
4e	C ₆ H ₅	Piperidin	4,4/4,5	2,7/44	360	0,43	103,0/68,9/29,4	24,7 ± 2,1	42,0 ± 5,5	26,0 ± 2,3
4f	4-Cl- C ₆ H ₄	Piperidin	5,1/5,0	0,24/11	340	1,1	80,4/61,4/53,1	> 50	> 50	> 50
4g	C ₆ H ₅	Morpholin	3,3/3,5	19/140	400	1,0	n.d. ^{a)} /n.d./n.d.	> 50	> 50	> 50
4h	4-Cl- C ₆ H ₄	Morpholin	4,0/3,9	3,1/40	420	0,55	94,0/80,4/63,2	45,6 ± 5,6	> 50	> 50
BW75C	-	-	2,4/2,8 ^{b)}	-	220	0,1 ^{c)}	13 (bei 10µM) ^{d)}	-	-	-
Imatinib	-	-	3,9/1,2 ^{e)}	-	-	-	-	10,9 ± 1,2	0,1 ± (6,7x 10 ⁻³)	38,8 ± 1,4

Tab. 25: Übersicht der Untersuchungsergebnisse für die 1,2,4-Triazin-5-one. E_{1/2}: Redoxpotential; IC₅₀: Inhibitorkonzentration, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt ist; PMNG: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten; GI₅₀: Substanzkonzentration für eine 50%ige Wachstumshemmung; CC₅₀: Zytotoxische Konzentration für 50% der Zellen; SD: Standardabweichung; M_W: Molekulargewicht

^{a)} Überlagerung mit dem inneren Standard; ^{b)} siehe Kupfer 1996; ^{c)} siehe Chang 1984; ^{d)} siehe Steinhilber 1987; ^{e)} siehe Velpandian 2004

5.2 Interaktionsstudien niedermolekularer Liganden an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO mittels (photo-)chemischem Cross-Linking und Massenspektrometrie

5.2.1 Synthese und Charakterisierung des isotopenmarkierten Photo-Cross-Linkers SBDC

Benzophenon(BP)-Reste als funktionelle Gruppen zur Photoaffinitätsmarkierung werden in der biochemischen Forschung seit Langem vielseitig eingesetzt (2.2.2) [Prestwich 1997].

Durch die Synthese eines heterobifunktionellen amin- und photoreaktiven BP-basierten Cross-Linkers sollte die Quervernetzungsvariabilität zur Gewinnung von Strukturinformationen von Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen, insbesondere der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO, vergrößert werden (4.2.1). Als Modellprotein für die Cross-Linker-Charakterisierung diente das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin (CaM), welches bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Sinz war [Schulz 2004, Schmidt 2005, Ihling 2006, Dimova 2009]. Mit seinen sieben Lysinen (K13, 21, 30, 75, 77, 94, 149) und neun Methioninen (M36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144, 145) bot das Protein optimale Bedingungen für die Charakterisierung eines solchen Cross-Linkers.

Die ersten Photo-Cross-Linking-Experimente wurden mit der Substanz Keto-NHS **5** (4.2.1c, Schema 12) durchgeführt, welche zuvor in einer Einstufensynthese durch Veresterung des sauren antiphlogistischen Arzneistoffes Ketoprofen mit *N*-Hydroxysuccinimid dargestellt werden konnte. Neben der vollständigen Sequenzabdeckung einschließlich der post-translationalen Modifizierungen (acetyliertes A1, trimethyliertes K115) konnten mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS zahlreiche an Lysinen (K13, 21, 30, 75, 77, 94) modifizierte Peptide gefunden werden. Intramolekulare Quervernetzungsprodukte konnten nach der UV-A-Bestrahlung nicht nachgewiesen werden.

Zur vereinfachten Auswertung massenspektrometrischer Daten lag mit der Substanz SBDC der Schwerpunkt auf der Darstellung eines heterobifunktionellen Photo-Cross-Linkers mit stabiler Isotopenmarkierung (4.2.1d). Dabei erfolgte die Darstellung in Anlehnung an eine bekannte Präparationsvorschrift [Olszewski 1995]. In einer 1:1-Mischung mit der undeutierten Analogverbindung SBC (D_0) wurde die Anwendbarkeit von SBDC (D_2) für die massenspektrometrische Strukturuntersuchung von Calmodulin (CaM) gezeigt. CaM lag in seiner vollständig mit Ca^{2+} beladenen Form vor. Obwohl in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass aminreaktive Cross-Linker ebenfalls mit Hydroxylgruppen, wie in den Seitenketten von Serin, Threonin und Tyrosin, reagieren können [Kalkhof 2008, Mädler 2009], wurden hier ausschließlich Reaktionsprodukte mit Lysinseitenketten gefunden.

Sowohl mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS- als auch ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Analytik der mit UV-A-Licht bestrahlten Proben konnte die Existenz von drei intramolekularen Vernetzungsprodukten (zwischen den Aminosäuren K21-M36, K94-M36, K94-M144/145) nachgewiesen werden, deren Distanzen (Länge von SBC/SBDC: $\sim 10,2 \text{ \AA}$) in guter Übereinstimmung zur kompakten, vollständig mit Ca^{2+} beladenen Röntgenkristallstruktur von CaM (pdb: 1prw) standen. Damit ließ sich sowohl die Anwendbarkeit des neuen Reagenzes SBDC für Photoaffinitätsmarkierungsstudien als auch die für BP in der Literatur beschriebene Präferenz für Methionin als Reaktionspartner [Wittelsberger 2006] bestätigen. Trotz der durch die Anwendung der 1:1-Mischung aus zweifach deuteriertem (SBDC) und undeuteriertem (SBC) Reagenz vereinfachten visuellen Interpretation der massenspektrometrischen Daten muss berücksichtigt werden, dass dieses Quervernetzungsreagenz aufgrund des geringen Massenunterschiedes von 2 amu Limitierungen aufweist. Beispielsweise liegt die Aminosäure N97 im CaM-Peptid VFDDKDGNGYISAAELR (Aminosäuren 91-106) teilweise deamidiert vor und trägt damit zu einer Massenverschiebung von + 0,984 amu bei. Die Überlagerung der Isotopenmuster von amidierter/deamidierter Spezies mit einer durch den Cross-Linker erzeugten Massenverschiebung von 2 amu erschwert so eine exakte Signalzuordnung im Massenspektrum. Für eine bessere Differenzierung der Massensignale ist daher eine größere Massenverschiebung, von z.B. 4 amu (vgl. $\text{BS}^2\text{G}/\text{BS}^3\text{-D}_0/\text{D}_4$), hilfreich. Dabei sind jedoch der Anzahl an einführbaren Deuteriummarkierungen durch das stark veränderte chromatographische Elutionsverhalten der isotopenmarkierten gegenüber der unmarkierten Spezies ebenfalls Grenzen gesetzt.

5.2.2 Untersuchungen an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO

5.2.2a Affinität des Liganden B02 an die C2-ähnliche Domäne

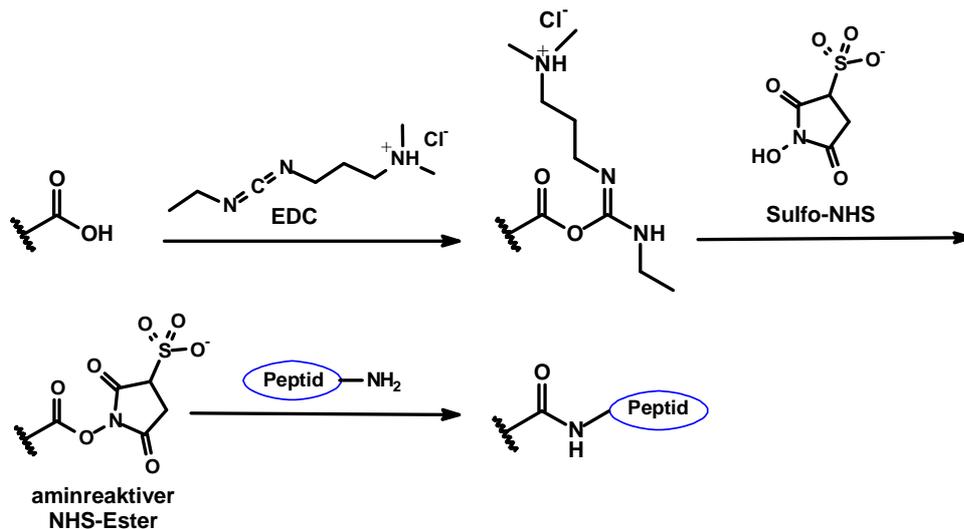
Die niedermolekularen Verbindungen LP_{121} und B02 (2.1.5, Abb. 10) waren in einem Kompetitionsassay als potentielle Liganden an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO identifiziert worden [Michel 2008] und hatten im h5-LO-Granulozytenassay eine mäßige (IC_{50} : $34 \mu\text{M}$ für LP_{121} im S100-Überstand des Zelllysates) [Werz 2008] bis gute (IC_{50} : $0,9 \mu\text{M}$ bzw. $0,65 \mu\text{M}$ für B02 an intakten PMNG bzw. im S100-Überstand des Zelllysates) [Hofmann 2008, Rödel 2011] inhibitorische Wirksamkeit gezeigt. Die eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen Protein-Liganden-Affinität und IC_{50} -Werten [Cheng 1973] war zu Beginn dieser Arbeit bekannt, konnte aber erst gegen Ende mit der Verfügbarkeit einer gereinigten Charge von C2-ähnlicher Domäne (C2_{neu}) und nur für die wirksamere Verbindung B02 in Form einer Dissoziationskonstanten (K_d) überprüft werden.

Unter der Annahme eines nicht-kompetitiven Interaktionsmechanismus mit der regulatorischen C2-ähnlichen Domäne [persönliche Mitteilung B. Hofmann] wurde davon ausgegangen, dass sich die Dissoziationskonstanten der Verbindungen im Bereich der gemessenen IC_{50} -Werte bewegen. Unter den zahlreichen Techniken für Protein-Liganden-Bindungsstudien wie Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugierung, Größenausschluss- und Affinitätschromatographie, Affinitätskapillarelektrophorese, Fluoreszenzspektroskopie [Oravcova 1996, Epps 1999, Parikh 2000], isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) [Praefcke 2005] und Oberflächenplasmonresonanz [Myszka 2000] fiel zuerst die Wahl auf das kalorimetrische Verfahren. Die Vorteile der ITC liegen darin, dass weder Immobilisierung noch Markierung der Reaktionspartner erforderlich sind und neben der Dissoziationskonstanten zusätzlich Aussagen über die Stöchiometrie des gebildeten Protein-Liganden-Komplexes und damit die Anzahl der Liganden-Bindungsstellen getroffen werden können [Praefcke 2005]. Aufgrund der begrenzten Menge an gereinigter Detergens-freier C2-ähnlicher Domäne ($C2_{neu}$) und der geringen Löslichkeit des Liganden B02 in HEPES-Puffer ($\log P_{calc}$: 5,2; www.molinspiration.com) führte diese Methode jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis. Aus diesem Grund sollte das für die Untersuchung der HSA-Bindung der 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** bereits erfolgreich eingesetzte fluoreszenzspektroskopische Verfahren (3.2.2f), welches die am häufigsten für die Untersuchung der Serumalbuminbindung von Arzneistoffen verwendete Methode ist [Oravcova 1996, Epps 1999, Parikh 2000], auf die Ligandenbindung von B02 an der C2-ähnlichen Domäne ($C2_{neu}$) übertragen werden. Diese Technik erwies sich als weniger störanfällig als die ITC und es konnten in Abhängigkeit der zugegebenen Calciumionenkonzentration K_d -Werte für den B02/ $C2$ -Komplex im niederen mikromolaren Bereich erhalten werden (K_d : 8-16 μ M, 4.2.2b). Eine während der Messungen beobachtete Überlappung in der C2-Fluoreszenzemission mit der erforderlichen Anregungswellenlänge des Liganden B02 – eine Voraussetzung für einen Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) – konnte leider aufgrund der knappen Ressourcen an Ligand (B02) und Protein ($C2_{neu}$) nicht mehr für die Identifizierung der Protein-Liganden-Interaktionsregion genutzt werden.

5.2.2b Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS der Quervernetzungsprodukte mit BS³- und BS²G-D₀/D₄

Die ersten Quervernetzungsstudien fanden mit dem durch TEV-Protease gespaltenen Fusionsprotein MBP-C2 (4.2.2a, Schema 15) und dem Liganden LP₁₂₁ statt. Ein vorheriger Pufferwechsel von Tris-HCl, das eine primäre Aminogruppe enthält, gegen HEPES-Puffer sollte die Verwendung aminreaktiver Quervernetzungsreagenzien ermöglichen. Nach der proteolytischen Spaltung wurde eine Mischung aus intaktem MBP-C2, freiem MBP, freier C2-ähnlicher Domäne (C2_{alt}) und TEV-Protease erhalten. Die Zugabe des Liganden LP₁₂₁ (2.1.5, Abb. 10) (IC₅₀: 34 µM) und der isotopenmarkierten Quervernetzungsreagenzien BS²G- und BS³-D₀/D₄ (2.2.1, Tab. 2) erfolgte ohne vorherige Trennung der Proteinmischung, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Möglichkeit bestand, die abgespaltene, stark hydrophobe C2-ähnliche Domäne ohne größere Verluste zu reinigen (persönliche Mitteilung A. Michel). Nach Abschluss der Quervernetzungsreaktionen und gelelektrophoretischer Proteintrennung wurden die ausgeschnittenen C2-Banden tryptisch gespalten und mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS analysiert. Erwartungsgemäß kam es durch die Anwesenheit der überschüssigen Reaktionspartner (MBP-C2, MBP, TEV-Protease) zu verstärkter Oligomerisierung und Proteinverlust nach der Gelelektrophorese (4.2.2c, Abb. 34).

Anhand der charakteristischen Isotopenmuster der eingebauten Cross-Linker konnten sechs von acht Lysinresten (K44, 78, 88, 93, 122, 133) modifiziert nachgewiesen werden. Die weniger oberflächenexponierten Lysinreste K39 und K76 waren dieser Reaktion nicht zugänglich. Intramolekulare Quervernetzungen in der C2-ähnlichen Domäne (C2_{alt}) konnten nicht identifiziert werden. Sowohl in An- als auch Abwesenheit des Liganden LP₁₂₁ wurden die identischen Lysinseitenketten modifiziert gefunden, sodass sich diese wahrscheinlich nicht in der Nähe der Liganden-Bindungsregion befinden. Aussagen über konformative Veränderungen des Proteins waren ohne die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten nicht möglich. Von der Verwendung des carboxylreaktiven Null-Längen-Cross-Linkers EDC in Kombination mit dem aminreaktiven Sulfo-NHS zur Modifizierung und anschließenden Vernetzung von LP₁₂₁ (Schema 20) wurde aufgrund des großen Überschusses an Carboxylgruppen innerhalb aller Proteine in der Reaktionsmischung (MBP-C2, MBP, C2_{alt}, TEV) und einer nicht vorhandenen Isotopenmarkierung des Quervernetzungsreagenzes abgesehen.



Schema 20: Verknüpfung von Molekülen mit Carboxylfunktion und Aminogruppen aus Aminosäureseitenketten mit dem Null-Längen-Cross-Linker EDC in Kombination mit Sulfo-NHS .

Zur Überprüfung der Plausibilität der mit LP₁₂₁ erhaltenen Daten sollten die Versuche mit einem weiteren Liganden durchgeführt werden. Mit B02 wurde durch Ligand-basierte Pharmakophorsuche [Hofmann 2008] ein gut wirksamer Ligand mit einer moderaten, Ca²⁺-abhängigen Affinität zur C2-ähnlichen Domäne (5.3.2a) gefunden. Die Cross-Linking-Studien wurden nun mit einer mittels Detergens (Brij-35) gereinigten Charge C2-ähnlicher Domäne (C2*_{neu}) durchgeführt. Brij-35 findet häufig bei der Reinigung von Membranproteinen, wie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Verwendung [Corin 2011]. Wie erhofft, war im Gelelektropherogramm (Abb. 38, 4.2.2c) keine Oligomerbildung zu beobachten.

Die Ergebnisse der Cross-Linking-Experimente zeigten je nach An- oder Abwesenheit des Liganden B02 unterschiedliche Ergebnisse. So scheinen konformative Veränderungen durch die Interaktion zwischen C2*_{neu} und B02 dazu zu führen, dass die Aminosäuren Y99 und Y105 sich verstärkt an der Oberfläche präsentieren und dadurch zugänglicher für Modifizierungsreaktionen werden. Gleichzeitig erfährt offenbar K93 eine Abschirmung durch den Liganden, welche die Quervernetzung mit K133 unmöglich macht. K133 hat dadurch die erforderliche Distanz (max. 25 Å) zu K122 und K88, um mit diesen Aminosäuren vernetzt zu werden. Die überbrückbare maximale Distanz zu K44 hingegen ist überschritten (4.2.2c, Abb. 47). Unter der Voraussetzung einer größeren dynamischen Flexibilität des C-Terminus (Aminosäuren 117-133) in Lösung und einer nativen Faltung des Proteins nach der Reinigung mit Brij-35 sind die gefundenen Cross-Linking-Ergebnisse im Vergleich zur Röntgenkristallstruktur der h5-LO als plausibel zu betrachten.

5.2.2c Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS der Quervernetzungsprodukte mit SBC/SBDC

Die photoreaktiven Cross-Linker SBC und SBDC sollten nach ihrer erfolgreichen Charakterisierung an CaM an der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO zur Gewinnung weiterer Strukturinformationen eingesetzt werden. Nach der beobachteten starken Oligomerisierung in den Cross-Linking-Experimenten mit den homobifunktionellen aminreaktiven Reagenzien und C2_{alt} (4.2.2c) sollten die ersten Versuche mit den neuen Quervernetzungsreagenzien und C2_{alt} ohne den Liganden B02 durchgeführt werden. Verglichen mit den Ergebnissen aus den Quervernetzungsexperimenten mit BS²G-D₀/D₄ und BS³-D₀/D₄ wurden mit SBC und SBDC – möglicherweise aufgrund einer durch BP begründeten erhöhten Lipophilie und eingeschränkten Beweglichkeit der Verbindungen – nur vier Lysine modifiziert nachgewiesen (K44, 88, 93, 133). Zu Quervernetzungen innerhalb der C2-ähnlichen Domäne kam es erneut nicht.

Bei den Versuchen mit den heterobifunktionellen Cross-Linkern SBC/SBDC und C2*_{neu} wurden in Anwesenheit des Liganden B02 im Wesentlichen dieselben Aminosäuren wie bei den Experimenten mit den aminreaktiven Cross-Linkern an C2*_{neu} modifiziert wiedergefunden. Einzige Ausnahmen waren die Modifizierung von K78 an Stelle von K76 und das vollständige Fehlen einer K122-Modifizierung. In Abwesenheit von B02 fehlten, verglichen mit den Messungen in Anwesenheit des Liganden, die Modifizierungen an K44 und K78. Intramolekulare Quervernetzungen konnten mit den photoreaktiven Reagenzien an C2*_{neu} ebenfalls nicht gefunden werden.

Eine unter Photo-Cross-Linking-Bedingungen beobachtete Instabilität des Liganden B02 (4.2.2d) führte dazu, dass keine weiteren Untersuchungen mit Quervernetzungsreagenzien aus dieser Gruppe unternommen wurden. Photo-Addukte von B02 an der C2-ähnlichen Domäne (C2*_{neu}) waren in diesen Experimenten nicht nachweisbar.

5.2.2d Synthese und Charakterisierung eines cysteinreaktiven Photo-Cross-Linkers (BBI) mit Massendefekt

Die Anwendung heterobifunktioneller thiol- und photoreaktiver Cross-Linker sollte bei Anwesenheit zweier einzelner Cysteinreste (C36, C104) innerhalb der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO zusätzliche Strukturinformationen liefern. Nachdem die Vorversuche mit dem in der Literatur umfassend beschriebenen Cross-Linker Mal-BP (2.2.2, Abb. 11) [Tao 1985, Wang 1988, Giron-Monzon 2004, Tamura 2009] nicht zur Modifizierung von Aminosäuren führte (unveröffentlichte Daten), sollte vor weiteren Experimenten der Oxidationsstatus der

Cysteine überprüft werden. Dies geschah während eines Cross-Linking-Experimentes mit dem aminreaktiven Photo-Cross-Linker Keto-NHS und C2_{neu} (4.2.2e), bei dem die Cysteine der C2-ähnlichen Domäne mit dem thiolreaktiven Alkylierungsreagenz Iodacetamid sowohl in An- als auch Abwesenheit des Reduktionsmittels TCEP reagieren sollten. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cysteine in der C2-ähnlichen Domäne in freier reduzierter Form vorliegen. Aufgrund dieser Resultate sollten die zukünftigen Photo-Cross-Linking-Versuche mit einem heterobifunktionellen Reagenz erfolgen, das auf der thiolreaktiven Seite eine Iodacetamidgruppe und zur einfacheren massenspektrometrischen Datenauswertung einen Substituenten mit charakteristischer Isotopenverteilung und großem Massendefekt (⁷⁹Br/⁸¹Br) enthält. Mittels einer dreistufigen Synthese konnte der mit der Verbindung BI (2.2.2, Abb. 11) verwandte Cross-Linker BBI erhalten werden, welcher erfolgreich die Seitenkette der Aminosäure C104 modifizierte und damit sein Potential für zukünftige Untersuchungen unter Beweis stellte.

5.3 Ausblick

Der Bedarf an innovativen Wirkstoffen mit neuen Angriffspunkten zur Therapie entzündlicher und allergischer Erkrankungen ist zu Beginn des 21. Jahrhunderts nach wie vor gegeben. Mit der röntgenkristallographischen Aufklärung sämtlicher bisher identifizierter Schlüsselenzyme im h5-LO-Stoffwechselweg (cPLA₂α, h5-LO, FLAP, LTA₄-Hydrolase, LTC₄-Synthase) [Haeggström & Funk 2011] ist ein neues Zeitalter für die Wirkstofffindung für diesen Teil der Arachidonsäure-Kaskade angebrochen. *Pharmakophor-Alignment* und *Molecular-Docking*-Experimente in Kombination mit zielgerichteter Wirkstoff-Synthese könnten in nicht all zu ferner Zukunft eine große Anzahl neuer potentieller Liganden hervorbringen, unter denen sich vielleicht ein neuer antileukotriener Arzneistoff befindet. Auf der anderen Seite existieren neue Techniken, wie z.B. aus der Immuno-Chemo-Proteomik, die die Möglichkeit bieten, durch Ligandenimmobilisierung, Affinitätschromatographie und massenspektrometrischer oder immunochemischer Analytik in einem Schritt eine synthetisierte Verbindung gegen tausende potentielle Zielstrukturen (*target deconvolution*) zu untersuchen [Saxena 2008].

Weitere Erkenntnisse über die Flexibilität der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO in Lösung und die potentielle Ligandenbindungsregion könnten durch den Einbau photochemisch aktiver Aminosäuren (Bpa (2.2.2, Abb. 12) [Chin 2002], Photo-Leucin/-Methionin [Suchanek 2005]) in der Nähe der potentiellen Interaktionsregion und anschließendem Cross-Linking gewonnen werden. Ebenso könnten Mutationsversuche der Tryptophane der C2-ähnlichen

Domäne (W13, 75, 80 und 103) Aufschluss darüber geben, welche der vier Aminosäuren am FRET beteiligt ist und damit in der Ligandenbindungsregion liegt.

In der Behandlung der BCR-ABL-positiven chronischen myeloischen Leukämie (CML) gilt der im Jahr 2002 für die perorale Therapie zugelassene Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Glivec[®]) als Goldstandard. Trotz der sehr guten und selektiven Wirksamkeit des Arzneistoffes existiert ein nicht geringes Patientenkollektiv, das unzureichend auf eine Imatinib-Therapie anspricht (Imatinib-Resistenz) und daher eine kontinuierliche Überwachung des Therapieerfolges erfordert. Ungeachtet der Existenz weiterer für die Zweitlinientherapie zugelassener Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib (Sprycel[®]) und Nilotinib (Tasigna[®]) besteht für die Therapie der CML weiterhin Bedarf innovativer und nebenwirkungsarmer Arzneistoffe [von Bubnoff 2010]. Durch weitere Strukturoptimierung der an der Leukämiezelllinie K-562 antiproliferativ wirksamen und nicht zytotoxischen 1,2,4-Triazin-5-one **4a-d** könnte sich die Möglichkeit für die Entwicklung potenterer und für den Menschen gut verträglicher Wirkstoffe eröffnen.

Literaturverzeichnis

- ¹**Abdel-Rahman R. M.** Role of uncondensed 1,2,4-triazine derivatives as biocidal plant protection agents. *Pharmazie*. **2001**; 56: 195.
- ²**Abdel-Rahman R. M.** Role of uncondensed 1,2,4-triazine compounds and related heterobicyclic systems as therapeutic agents. *Pharmazie*. **2001**; 56: 18.
- Aharony, D., Redkar-Brown, D. G., Hubbs, S. J., Stein, R. L.** Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Prostaglandins*. **1987**; 33: 85.
- Andre, E., Hou, K.** Sur la presence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja. Glycine soja sieb. *Comptes Rendus de la Academie des Sciences*. **1932**; 194: 645.
- Back, J. W., de Jong, L., Muijsers, A. O., de Koster, C. G.** Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J Mol Biol*. **2003**; 331: 303.
- Baraldi, P. G., Preti, D., Tabrizi, M. A., Fruttarolo, F., Saponaro, G., Baraldi, S., Romagnoli, R., Moorman, A. R., Gessi, S., Varani, K., Borea, P. A.** N⁶-[(Hetero)aryl/(cyclo)alkyl-carbamoyl-methoxy-phenyl]-(2-chloro)-5'-N-ethylcarboxamido-adenosines: the first example of adenosine-related structures with potent agonist activity at the human A_{2B} adenosine receptor. *Bioorg Med Chem*. **2007**; 15: 2514.
- Baumann, J., v. Bruchhausen, F., Wurm, G.** Flavonoid and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*. **1980**; 20: 627.
- Baumann, J., Wurm, G.** Soybean lipoxygenase-1 inhibition by ketone hydrazones. *Agents Actions*. **1982**; 12: 360.
- Beck, F.** Elektroorganische Chemie – Grundlagen und Anwendungen. 1. Aufl. Berlin: Akademie Verlag; **1973**.
- Berlett, B. S., Stadtman, E. R.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. **1997**; 272: 20313.
- Bhatia, P. A., Brooks, C. D. W., Basha, A., Ratajczyk, J. D., Gunn, B. P., Bouska, J. B., Lanni, C., Young, P. R., Bell, R. L., Carter, G. W.** 5-Lipoxygenase inhibitors: synthesis and structure-activity relationships of a series of 1-aryl-2H, 4H-tetrahydro-1,2,4-triazin-3-ones. *J Med Chem*. **1996**; 39: 3938.
- Biemann, K.** Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem*. **1992**; 61: 977.
- Bindu, P. H., Sastry, G. M., Systry, G. N.** Characterization of calcium and magnesium binding domains of human 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. **2004**; 320: 461.
- Bittova, L., Sumandea, M., Cho, W.** A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2: identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem*. **1999**; 274: 9665.
- Blois, M. S.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **1958**; 181: 1199.

- Blackwell, G. J., Flower, R. J.** 1-Phenyl-3-pyrazolidone: an inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in lung and platelets. *Prostaglandins*. **1978**; 16: 417.
- Bombard, S., Chopard-Casadevall, C., Chottard, J.-C.** A new peroxidase pathway for soybean lipoxygenase-1. *Bull Soc Chim Fr*. **1993**; 130: 417.
- Bond, A. M., Oldham, K. B., Snook, G. A.** Use of the ferrocene oxidation process to provide both reference electrode potential calibration and a simple measurement (via semiintegration) of the uncompensated resistance in cyclic voltammetric studies in high-resistance organic solvents. *Anal Chem*. **2000**; 72: 3492.
- Borgeat, P., Hamberg, M., Samuelsson, B.** Transformation of arachidonic acid and homo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. **1976**; 251: 7816.
- Boyington, J. C., Gaffney, B. J., Amzel, L. M.** The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*. **1993**; 260: 1482.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**; 72: 248.
- Brathe, A., Gundersen, L.-L., Malterud, K. E., Rise, F.** 6-substituted purines as inhibitors of 15-lipoxygenase; a structure-activity study. *Arch Pharm Chem Life Sci*. **2005**; 338: 159.
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., Jahn, R.** Synaptotagmin: a Ca^{2+} sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*. **1992**; 256: 1021.
- Bruneau, P., Delvare, C.** Indazolinones, a new series of redox-active 5-lipoxygenase inhibitors with built-in selectivity and oral activity. *J Med Chem*. **1991**; 34: 1028.
- Buchberger, W.** Elektrochemische Analyseverfahren. 1. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **1998**.
- Bürkert, E., Arnold, C., Hammarberg, T., Rådmark, O., Steinhilber, D., Werz, O.** 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*. **2003**; 278: 42846.
- Carter, G. W., Young, P., R., Albert, D. H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R. L., Summers, J. B., Brooks, D. W.** 5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther*. **1991**; 256: 929.
- Chang, J., Skowronek, M. D., Cherney, M. L., Lewis, A. J.** Differential effects of putative lipoxygenase inhibitors on arachidonic acid metabolism in cell-free and intact cell preparations. *Inflammation*. **1984**; 8: 143.
- Chen, Y., Hu, Y., Zhang, H., Peng, C., Li, S.** Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nature Genetics*. **2009**; 41: 783.
- Chen, Z. A., Jawhari, A., Fischer, L., Buchen, C., Tahir, S., Kamenski, T., Rasmussen, M., Lariviere, L., Bukowski-Wills, J.-C., Nilges, M., Cramer, P., Rappsilber, J.** Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *EMBO J*. **2010**; 29: 717.

- Cheng, Y.-C., Prusoff, W., H.** Relationship between the inhibition constant (K_i) and the coccentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* **1973**; 22: 3099.
- Chin, J. W., Schultz, P. G.** In vivo photocrosslinking with unnatural amino acid mutagenesis. *ChemBioChem.* **2002**; 3: 1135.
- Chin, J. W., Cropp, T. A., Anderson, J. C., Mukherji, M., Zhang, Z., Schultz, P. G.** An expanded eukaryotic genetic code. *Science.* **2003**; 301: 964.
- Cho, W., Bittova, L., Stahelin, R. V.** Membrane binding assays for peripheral proteins. *Anal Biochem.* **2001**; 296: 153.
- Clark, L. C. Jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z.** Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol.* **1953**; 6: 189.
- Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A., Lin, L.-L.** Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal.* **1995**; 12: 83.
- Clemens, F.** Diplomarbeit. Beiträge zur Untersuchung des Hemmechanismus offenkettiger Amidrazonderivate an der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen am Beispiel der Verbindung FroA6. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1998**.
- Clemens, F., Drutkowski, G., Wiese, M., Frohberg, P.** The inactivation of lipoxygenase-1 from soybeans by amidrazones. *Biochim Biophys Acta.* **2001**; 1549: 88.
- Coleman, M. D., Khan, N., Welton, G., Lambert, P. A., Tims, K. J., Rathbone, D. L.** Effects of glutathione, N-acetyl-cysteine, α -lipoic acid and dihydrolipoic acid on the cytotoxicity of a 2-pyridylcarboxamidrazone antimycobacterial agent in human mononuclear leucocytes in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol.* **2004**; 17: 143.
- Corin, K., Baaske, P., Ravel, D. B., Song, J., Brown, E., Wang, X., Geissler, S., Wienken, C. J., Jerabek-Willemsen, M., Duhr, S., Braun, D., Zhang, S.** A robust and rapid method of producing soluble, stable, and functional G-Protein coupled receptors. *PLoS ONE.* **2011**; 6: e23036.
- Crawley, G. C., Dowell, R. I., Edwards, P. N., Foster, S. J., McMillan, R. M., Walker, E. R. H., Waterson, D., Bird, T. G. C., Bruneau, P., Girodeau, J. M.** Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem.* **1992**; 35: 2600.
- Cucurou, C., Battioni, J. P., Thang, D. C., Nam, N. H., Mansuy, D.** Mechanisms of inactivation of lipoxygenases by phenidone and BW755C. *Biochemistry.* **1991**; 30: 8964.
- Dahlén, S. E., Björk, J., Hedqvist, P., Arfors, K.-E., Hammarström, S., Lindgren, J. Å., Samuelsson, B.** Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1981**; 78: 3887.

- Dalloul, H. M., Mohamed, E.-H. A. R., Shorafam, H. Z., El-Shorafa, A. Z.** Heterocyclic synthesis using nitrilimines. Part 11. Synthesis of 1-aryl-3-phenylaminocarbonyl-4,5-dihydro-1,4,5-triazin-6-ones. *ARKIVOC*; 13: 207.
- Das, P., Mallick, A., Haldar, B., Chakrabarty, A., Chattopadhyay, N.** Fluorescence resonance energy transfer from tryptophan in human serum albumin to a bioactive indoloquinolizine system. *J Chem Sci.* **2007**; 119: 77.
- Davidson, E. M., Rae, S. A., Smith, M. J. H.** Leukotriene B₄, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **1983**; 42: 677.
- Debord, J., N'Diaye, P., Bollinger, J. C., Fikri, K., Penicaut, B., Robert, J. M., Robert, P. S., Le Baut, G.** Cholinesterase inhibition by derivatives of 2-amino-4,6-dimethylpyridine. *J Enzyme Inhib.* **1997**; 12: 13.
- Degreef, H., Dockx, P., De Doncker, P., De Beule, K., Cauwenbergh, G.** A double-blind vehicle-controlled study of R 68 151 in psoriasis: a topical 5-lipoxygenase inhibitor. *J Am Acad Dermatol.* **1990**; 22: 751.
- Deseke, E., Nakatani, Y., Ourisson, G.** Intrinsic reactivities of amino acids towards photoalkylation with benzophenone – a study preliminary to photolabelling of the transmembrane protein glycoporphin A. *Eur J Org Chem.* **1998**; 1998: 243.
- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J. D., Seehra, J., Somers, W. S.** Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell.* **1999**; 97: 349.
- Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., Wahli, W.** The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature.* **1996**; 384: 39.
- Dimova, K., Kalkhof, S., Pottratz, I., Ihling, C., Rodriguez-Castaneda, F., Liepold, T., Griesinger, C., Brose, N., Sinz, A., Jahn, O.** Structural insights into the calmodulin–munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry.* **2009**; 48: 5908.
- Dorman, G., Prestwich, G. D.** Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry.* **1994**; 33: 5661.
- Drutkowski, G.** Diplomarbeit. Synthese von 1-Aryl-5,5-diaryl-1,2,4-triazolinen als Lipoxygease-Hemmstoffe. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1999**.
- Drutkowski, G.** Dissertation. Inhibitoren der Eicosanoidbiosynthese: Darstellung neuer Amidrazonderivate und Entwicklung einer Testmethode auf Basis humanen Vollblutes. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **2003**.
- Dupont, R., Goossens, J.-F., Cotelte, N., Vrielynck, L., Vezin, H., Hénichart, J.-P., Cotelte, P.** New bis-catechols 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **2001**; 9: 229.
- Epps, D. E., Raub, T. J., Kézdy, F. J.** A general, wide-range spectrofluometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin. *Anal Biochem.* **1995**; 227: 432.

- Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P.** Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem.* **2000**; 43: 3714.
- Esser, J., Rakonjac, M., Hofmann, B., Fischer, L., Provost, P., Schneider, G., Steinhilber, D., Samuelsson, B., Rådmark, O.** Coactosin-like protein functions as a stabilizing chaperone for 5-lipoxygenase: role of tryptophan 102. *Biochem J.* **2010**; 425: 265.
- Evans, J. F.** Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* **2002**; 68-69: 587.
- Falgueyret, J.-P., Hutchinson, J. H., Riendeau, D.** Criteria for the identification of non-redox inhibitors of 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol.* **1993**; 45: 978.
- Fallon, J. L., Quijcho, F. A.** A closed compact structure of native Ca(2+)-calmodulin. *Structure.* **2003**; 11: 1303.
- Feißt, C., Pergola, C., Rakonjac, M., Rossi, A., Koeberle, A., Dodt, G., Hoffmann, M., Hoernig, C., Fischer, L., Steinhilber, D., Franke, L., Schneider, G., Rådmark, O., Sautebin, L., Werz, O.** Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo. *Cell Mol Life Sci.* **2009**; 66: 2759.
- Feldberg, W., Kellaway, C. H.** Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J Physiol.* **1938**; 94: 187.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **1989**; 246: 64.
- Ferguson, A. D., McKeever, B. M., Xu, S., Wisniewski, D., Miller, D. K., Yamin, T. T., Spencer, R. H., Chu, L., Ujjainwalla, F., Cunningham, B. R., Evans, J. F., Becker, J. W.** Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science.* **2007**; 317: 510.
- Feuerstein, G.** Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins.* **1984**; 27: 781.
- Fischer, L., Hornig, M., Pergola, C., Meindl, N., Franke, L., Tanrikulu, Y., Dodt, G., Schneider, G., Steinhilber, D., Werz, O.** The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharmacol.* **2007**; 152: 471.
- Fischer, A. S., Metzner, J., Steinbrick, S. D., Ulrich, S., Angioni, C., Geisslinger, G., Steinhilber, D., Maier, T. J.** 5-Lipoxygenase inhibitors induce potent anti-proliferative and cytotoxic effects in human tumour cells independently of suppression of 5-lipoxygenase activity. *Br J Pharmacol.* **2010**; 161: 936.
- Fitos, I., Visy, J., Zsila, F., Mady, G., Simonyi, M.** Selective binding of imatinib to the genetic variants of human α_1 -acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* **2006**; 1760: 1704.
- Ford-Hutchinson, A. W., Gresser, M., Young, R. N.** 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem.* **1994**; 63: 383.

- Fort, F. L., Pratt, M. C., Carter, G. W., Lewkowski, J. P., Heyman, I. A., Cusik, P. K., Kesterson, J. W.** Heinz bodies, methemoglobinemia, and hemolytic anemia induced in rats by 3-amino-1-[m-(trifluoromethyl)phenyl]-2-pyrazoline. *Fundam Appl Toxicol.* **1984**; 4: 216.
- Frigola, J., Colombo, A., Pares, J., Martinez, L., Sagarra, R., Roser, R.** Synthesis, structure and inhibitory effects on cyclooxygenase, lipoxygenase, thromboxane synthetase and platelet aggregation of 3-amino-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives. *Eur J Med Chem.* **1989**; 24: 435.
- Frohberg, P., Kupfer, C., Stenger, P., Baumeister, U., Nuhn, P.** Lipoxygenase inhibitors. IV: synthesis and cyclization reactions of open-chain *N*-1-aryl-substituted amidrazones. *Arch Pharm.* **1995**; 328: 505.
- Frohberg, P., Wiese, M., Nuhn, P.** Lipoxygenase inhibitors. VI: synthesis of new tetrahydropyrazine and other heterocyclic compounds by reaction of hydrazonoyl chlorides. *Arch Pharm.* **1997**; 330: 47.
- Frohberg, P., Drutkowski, G., Wobst, I.** Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J Pharm Biomed Anal.* **2006**; 41: 1317.
- Frohberg, P., Wagner, C., Meier, R., Sippl, W.** Derivatives of arylhydrazonic acids. Part 3: stereochemical rearrangement of *Z*-oxanilo-*N*¹-dialkyl-*N*²-arylamidrazones. *Tetrahedron.* **2006**; 62: 6050.
- Fujinami, Y., Tai, A., Yamamoto, I.** Radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of ascorbic acid 2-glucoside (AA-2G) and 6-acyl-AA-2G. *Chem Pharm Bull.* **2001**; 49: 642.
- Galey, J.-B., Bombard, S., Chopard, C., Girerd, J.-J., Lederer, F., Thang, D.-C., Nam, N.-H., Mansuy, D., Chottard, J.-C.** Hexanal phenylhydrazone is a mechanism-based inactivator of soybean lipoxygenase 1. *Biochemistry.* **1988**; 27: 1058.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., Südhof, T. C.** Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell.* **1994**; 79: 717.
- Ghiglieri-Bertez, C., Coquelet, C., Alazet, A., Bonne, C.** Inhibiteurs mixtes des voies de la cyclooxygénase et des lipoxygénases: Synthèse et activité de dérivés hydrazoniques. *Eur J Med Chem.* **1987**; 22: 147.
- Ghosh, J., Myers, C. E.** Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostata cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1998**; 95: 13182.
- Gilbert, N. C.** The structure of human 5-lipoxygenase. *Science.* **2011**; 331: 217.
- Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., Browner, M. F.** The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nature Structural Biology.* **1997**; 4: 1003.

- Giron-Monzon, L., Manelyte, L., Ahrends, R., Kirsch, D., Spengler, B., Friedhoff, P.** Mapping protein-protein interactions between MutL and MutH by cross-linking. *J Biol Chem.* **2004**; 279: 49338.
- González-Rosende, M. E., Olivar, T., Castillo, E., Sepulveda-Arques, J.** 2-Sulfonyliminodihydropyrimidines: a novel class of analgesic compounds. *Arch Pharm Chem Life Sci.* **2008**; 341: 690.
- Grant, G. E., Rokach, J., Powell, W. S.** 5-Oxo-ETE and the OXE receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2009**; 89: 98.
- Gross, J. H.** Mass Spectrometry – A textbook. , 2nd ed. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag; **2010**.
- Gundersen, L.-L., Malterud, K.E., Negussie, A. H., Rise, F., Teklu, S., Ostby, O., B.** Indolizines as novel potent inhibitors of 15-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem.* **2003**; 11: 5409.
- Hadjipavlou-Litina, D., Bariamis, S. E., Militopoulou, M., Athanassopoulos, C. M., Papaioannou, D.** Trioxsalen derivatives with lipoxygenase inhibitory activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2009**; 24: 1351.
- Haeggström, J. Z., Funk, C. D.** Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev.* **2011**; 111, 5866.
- Hall, M. P., Ashrafi, S., Obegi, I., Petesch, R., Peterson, J. N., Schneider, L. V.** ‚Mass defect‘ tags for biomolecular mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **2003**; 38: 809.
- Hamann, C. H., Vielstich, W.** Elektrochemie. 4. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verl. GmbH; **2005**.
- Hamberg, M., Samuelsson, B.** Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1974**; 71: 3400.
- Hammarberg, T., Rådmark, O.** 5-Lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry.* **1999**; 38:4441.
- Hammarberg, T., Provost, P., Persson, B., Rådmark, O.** The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem.* **2000**; 275: 38787.
- Hammel, M., Walther, M., Prassl, R., Kühn, H.** Structural flexibility of the N-terminal β -barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle x-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding. *J Mol Biol.* **2004**; 343: 917.
- Hammond, M. L., Kopka, I. E., Zambias, R. A., Caldwell, C. G., Boger, J., Baker, F., Bach, T., Luell, S., MacIntyre, D. E.** 2,3-Dihydro-5-benzofuranols as antioxidant-based inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J Med Chem.* **1989**; 32: 1006.
- Harenberg, P.** Dissertation. Beiträge zur Synthese von Amidrazonen als potentielle Lipoxygenasehemmer. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1987**.
- Hawkey, C. J., Dube, L. M., Rountree, L. V., Linnen, P. J., Lancaster, J. F.** A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. The European Zileuton Study Group For Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* **1997**; 112: 718.

- Heinisch, M.** Dissertation. Untersuchungen zum Verhalten potentieller 5-Lipoxygenase- und Phospholipase A₂-Inhibitoren in einem Testsystem mit menschlichen polymorphkernigen Leukozyten. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1991**.
- Heinze, J.** Cyclic voltammetry – “Electrochemical spectroscopy”. *Angew Chem Int Ed Engl.* **1984**; 23: 831.
- Heise, C. E., O’Dowd, B. F., Figueroa, D. J., Sayer, N., Nguyen, T., Im, D.-S., Stocco, R., Bellefeuille, J. N., Abramovitz, M., Cheng, R., Williams, D. L. Jr., Zeng, Z., Liu, Q., Ma, L., Clements, M. K., Coulombe, N., Liu, Y., Austin, C. P., Evans, J. F.** Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.* **2000**; 275: 30531.
- Heldt, H. W.** Pflanzenbiochemie. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **2003**.
- Hicks, R. G.** What’s new in stable radical chemistry? *Org Biomol Chem.* **2007**; 5: 1321.
- Hino, N., Okazaki, Y., Kobayashi, T., Hayashi, A., Sakamoto, K., Yokoyama, S.** Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nature Methods.* **2005**; 2: 201.
- Hlasta, D. J., Casey, F. B., Ferguson, E. W., Gangell, S. J., Heimann, M. R., Jaeger, E. P., Kullnig, R. K., Gordon, R. J.** 5-Lipoxygenase inhibitors: the synthesis and structure-activity relationships of a series of 1-phenyl-3-pyrazolidinones. *J Med Chem.* **1991**; 34: 1560.
- Hörnig, C., Albert, D., Fischer, L., Hörnig, M., Rådmark, O., Steinhilber, D., Werz, O.** 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal c2-like domain. *J Biol Chem.* **2005**; 280: 26913.
- Hofmann, B., Franke, L., Proschak, E., Tanrikulu, Y., Schneider, P., Steinhilber, D., Schneider, G.** Scaffold-hopping cascade yields potent inhibitors of 5-lipoxygenase. *ChemMedChem.* **2008**; 3: 1535.
- Hosoi, T., Koguchi, Y., Sugikawa, E., Chikada, A., Ogawa, K., Tsuda, N., Suto, N., Tsunoda, S., Taniguchi, T., Ohnuki, T.** Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G_{i/o}. *J Biol Chem.* **2002**; 277: 31459.
- Hunt, J. T., Mitt, T., Borzilleri, R., Gullo-Brown, J., Fargnoli, J., Fink, B., Han, W.-C., Mortillo, S., Vite, G., Wautlet, B., Wong, T., Yu, C., Zheng, X., Bhide, R.** Discovery of the Pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine nucleus as a new kinase inhibitor template. *J Med Chem.* **2004**; 47: 4054.
- Ihling, C., Schmidt, A., Kalkhof, S., Schulz, D. M., Stingl, C., Mechtler, K., Haack, M., Beck-Sickinger, A. G., Cooper, D. M. F., Sinz, A.** Isotope-labeled cross-linkers and fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structural analysis of a protein/peptide complex. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2006**; 17: 1100.
- Issemann, I., Green, S.** Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* **1990**; 347: 645.

- Ivanov, I., Saam, J., Kuhn, H., Holzhütter, H.-G. Dual role of oxygen during lipoxygenase reactions. *FEBS Journal*. **2005**; 272: 2523.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R.C., Pezzuto, J. M. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science*. **1997**; 275: 218.
- Jaskolla, T. W., Karas, M. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism. *J Am Soc Mass Spectrom*. **2011**; 22: 976.
- Jones, C. E., Holden, S., Tenailon, L., Bhatia, U., Seuwen, K., Tranter, P., Turner, J., Kettle, R., Bouhelal, R., Charlton, S., Nirmala, N. R., Jarai, G., Finan, P. Expression and characterization of a 5-oxo-6E, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraenoic acid receptor highly expressed on human eosinophils and neutrophils. *Mol Pharmacol*. **2003**; 63: 471.
- Kalkhof, S., Sinz, A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive *N*-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem*. **2008**; 392: 305.
- Kapust, R. B., Tözser, J., Copeland, T. D., Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**; 294: 949.
- Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom*. **2000**; 35: 1.
- Karas, M., Hillenkamp, F. Laser-desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem*. **1988**; 60: 2299.
- Karas, M., Krüger, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev*. **2003**; 103: 427.
- Kauer, J. C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H. R. Jr., DeGrado, W. F. *p*-Benzoyl-L-phenylalanine, a new photoreactive amino acid. *J Biol Chem*. **1986**; 261: 10695.
- Keilau, R. Dissertation. Struktur-Wirkungsbeziehungen α,α -capto-dativ substituierter Formyliden-phenylhydrazine. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1991**.
- Kim, K. H., Martin, Y. C., Norris, B., Young, P. R., Carter, G. W., Haviv, F., Walters, R. L. Quantitative structure-activity relationships of inhibitors of immune complex-induced inflammation: 1-phenyl-3-aminopyrazoline derivatives. *J Pharm Sci*. **1990**; 79: 609.
- Kim, K. H., Martin, Y. C., Brooks, C. D. W. Quantitative structure-activity relationships of 5-lipoxygenase inhibitors. Inhibitory potency of triazinone analogues in a broken cell. *Quant Struct-Act Relat*. **1996**; 15: 491.
- Klebe, G. Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **2009**.
- Klickstein, L. B., Shapleigh, C., Goetzl, E. J. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphnuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J Clin Invest*. **1980**; 66: 166.

- Klietsch, O.** Dissertation. Eigenschaften von Amidrazonen und deren Inhibition der Sojabohnen-lipoxygenase L-1. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **2004**.
- Koepf, K. E., Burtnick, L. D.** Interaction of plasma gelsolin with tropomyosin. *FEBS Lett.* **1992**; 309: 56.
- Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B.** Click-Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed.* **2001**; 40: 2004.
- Kratochvil, B., Lorah, E., Garber, C.** Silver-silver nitrate couple as reference electrode in acetonitrile. *Anal Chem.* **1969**; 41: 1793.
- Kratochvil, B., Al-Daher, I, M.** Coulometrically generated copper(II) in acetonitrile as an analytical oxidant. *Talanta.* **1980**; 27: 989.
- Krauth, F.** Diplomarbeit. Hemmer der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 mit Amidrazonstruktur: Eine elektrochemische Charakterisierung unter Anwendung der Zyklischen Voltammetrie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **2005**.
- ¹**Krauth, F.,** Friedemann, R., Rüttinger, H.-H., Froberg, P. Open-chain and cyclic amidrazones forming persistent radicals. An electrochemical and quantum chemical study. *ARKIVOC.* **2009**; 7: 150.
- ²**Krauth, F.,** Ihling, C. H., Rüttinger, H.-H., Sinz, A. Heterobifunctional isotope-labeled amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight and electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2009**; 23: 2811.
- Krauth, F.,** Dahse, H.-M., Rüttinger, H.-H., Froberg, P. Synthesis and characterization of novel 1,2,4-triazine derivatives with antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem.* **2010**; 18: 1816.
- Kühn, H., Holzhütter, H.-G., Schewe, T., Hiebsch, C., Rapoport, S. M.** The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids. *Eur J Biochem.* **1984**; 139: 577.
- Kuhn, D. G., Furch, J. A., Hunt, D. A., Asselin, M., Baffic, S. P., Diehl, R. E., Miller, T. P., Palmer, Y. L., Treacy, M. F., Trotto, S. H.** Cycloalkyl-substituted amidrazones: a novel class of insect control agents. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals V (ACS Symposium Series).* **1998**; 686: 185.
- Kulkarni, S., Das, S., Funk, C. D., Murray, D., Cho, W.** Molecular basis of the specific subcellular localization of the c2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem.* **2002**; 277: 13167.
- Kupfer, C.** Dissertation. Beiträge zur Untersuchung des Arachidonsäure-Stoffwechsels in menschlichen Blutzellen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **1996**.
- Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227: 680.
- Larsson, P. K. A., Claesson, H. E., Kennedy, B. P.** Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A(2) and their effect on enzyme activity. *J Biol Chem.* **1998**; 273: 207.

- Lau, C. K., Belanger, P. C., Dufresne, C., Scheigetz, J., Therien, M., Fitzsimmons, B., Young, R. N., Ford-Hutchinson, A. W., Riendeau, D., Denis, D., Guay, J., Charleson, S., Piechuta, H., McFarlane, C. S., Chiu, S. H., L., Eline, D., Alvaro, R. F., Miwa, G., Walsh, J. L.** Development of 2,3-dihydro-6-(3-phenoxypropyl)-2-(2-phenylethyl)-5-benzofuranol (L-670,630) as a potent and orally active inhibitor of 5-lipoxygenase. *J Med Chem.* **1992**; 35: 1299.
- Lee, S. B., Rhee, S. G.** Significance of PIP₂ hydrolysis and regulation of phospholipase C isoenzymes. *Curr Opin Cell Biol.* **1995**; 7: 183
- Lee, H. S., Dimla, R. D., Schultz, P. G.** Protein-DNA photo-crosslinking with a genetically encoded benzophenone-containing amino acid. *Bioorg Med Chem Lett.* **2009**; 19: 5222.
- Lehmann, W. D.** Massenspektrometrie in der Bioanalytik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **1996**.
- Lettau, H., Büge, A., Harenberg, P., Härtel, S., Jarmer, K., Koch, K., Pöppel, W., Schikora, A., Schneider, R., Weber, C., Nuhn, P.** Synthesis of lipoxygenase inhibitors. Part 2. Synthesis of lactamarylhydrazones and tetrahydroazepinochinazolinon-arylhydrazones. *Pharmazie.* **1993**; 48: 410.
- Letts, L. G.** Leukotrienes: role in cardiovascular physiology. *Cardiovasc Clin.* **1987**; 18: 101.
- Lewis, R. A., Austen, K. F., Soberman, R. J.** Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway-biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med.* **1990**; 323: 645.
- Liavonchanka, A., Feussner, I.** Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol.* **2006**; 163: 348.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F. Dominy, B. W., Feeney, P. J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev.* **1997**; 23: 3.
- Lobos, E. A., Sharon, P., Stenson, W. F.** Chemotactic activity in inflammatory bowel disease: role of leukotriene B₄. *Dig Dis Sci.* **1987**; 32: 1380.
- Lottspeich, F., Engels, J. W.** Bioanalytik. 2. [aktualisierte und erw.] Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **2009**.
- Lu, R. C., Wong, A.** Glutamic acid-88 is close to SH-1 in the tertiary structure of myosin subfragment-1. *Biochemistry.* **1989**; 28: 4826.
- Lynch, K. R., O'Neil, G. P., Liu, Q., Im, D.-S., Sawyer, N., Metters, K. M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D. J., Zeng, Z., Connolly, B., M., Bai, C., Austin, C. P., Chateaufneuf, A., Stocco, R., Greig, G. M., Kargman, S., Hooks, S. B., Evans, J. F.** Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. *Nature.* **1999**; 399: 789.
- Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., Zenobi, R.** Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *J Mass Spectrom.* **2009**; 44: 694.

- Makarov, A.** Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* **2000**; 72: 1156.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S.** Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem.* **2006**; 78: 2113.
- Mamolo, M. G., Zampieri, D., Falagiani, V., Vio, L., Fermeglia, M., Ferrone, M., Pricl, S., Banfi, E., Scialino, G.** Antifungal and antimycobacterial activity of new N^1 -[1-aryl-2-(1*H*-imidazol-1-yl) and 1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-ethylidene]-pyridine-2-carboxamidrazone derivatives: a combined experimental and computational approach. *ARKIVOC.* **2004**; 5: 231.
- Mann, M., Meng, C. K., Fenn, J. B.** Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal Chem.* **1989**; 61: 1702.
- Mansuy, D., Cucurou, C., Biatry, B., Battioni, J. P.** Soybean lipoxygenase-catalyzed oxidations by linoleic acid hydroperoxide: different reducing substrates and dehydrogenation of phenidone and BW755C. *Biochem Biophys Res Commun.* **1988**; 151: 339.
- Mariano, P. S., Glover, G. I., Wilkinson, T. J.** Photochemistry of modified proteins benzophenone-containing bovine serum albumin. *Photochem Photobiol.* **1976**; 23: 147.
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Hardy, M., Anderson, G. D., Dufield, D., Cortes-Burgos, L., Pufahl, R. A., Graneto, M.** Pharmacology of PF-4191834, a novel, selective non-redox 5-lipoxygenase inhibitor effective in inflammation and pain. *J Pharmacol Exp Ther.* **2010**; 334: 294.
- ¹**Michel, A.** Dissertation. Die regulatorische Domäne der 5-Lipoxygenase: Expression, Aufreinigung und funktionelle Untersuchungen. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; **2008**.
- ²**Michel, A. A. Y., Steinhilber, D., Werz, O.** Development of a method for expression and purification of the regulatory C2-like domain of human 5-lipoxygenase. *Protein Expression Purif.* **2008**; 59: 110.
- Minor, W., Steczko, J., Bolin, J. T., Otwinowski, Z., Axelrod, B.** Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry.* **1993**; 32: 6320.
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., Axelrod, B.** Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1,4 Å resolution. *Biochemistry.* **1996**; 35: 10687.
- Montagne, P. J.** Über die Einwirkung alkoholischer Kalilauge auf Halogen-amino-benzophenone (und -benzhydrole). *Ber Dtsch Chem Ges.* **1916**; 49: 2243.
- Mourey, R. J., Estevez, V. A., Marecek, J. F., Barrow, R. K., Prestwich, G. D., Snyder, S. H.** Inositol 1,4,5-triphosphate receptors: labeling the inositol 1,4,5-triphosphate binding site with photoaffinity ligands. *Biochemistry.* **1993**; 32: 1719.
- Müller, M. J.** Der Leukotriensignalweg – ein vielversprechender Ansatzpunkt für Inhibitoren in der Therapie entzündlicher Erkrankungen. *PharmuZ.* **1995**; 24: 264.

- Murphy, R. C., Hammarström, S., Samuelsson, B.** Leukotriene C: a slow reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1979**; 76: 4275.
- Musser, J. H., Kreft, A. F.** 5-Lipoxygenase: properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridged)-aryl class of inhibitors. *J Med Chem*. **1992**; 35: 2501.
- Myszka, D. G., Rich, R. L.** Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *PTT*. **2000**; 3: 310.
- Naito, Y., Sugiura, M., Yamaura, Y., Fukaya, C., Yokoyama, K., Nakagawa, Y., Ikeda, T., Senda, M., Fujita, T.** Quantitative structure-activity relationship of catechol derivatives inhibiting 5-lipoxygenase. *Chem Pharm Bull*. **1991**; 39:1736.
- Neau, D. B., Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Boeglin, W., Brash, A. R., Newcomer, M. E.** The 1.85 Å structure of an 8R-Lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity. *Biochemistry*. **2009**; 48: 7906.
- Newton, A. C.** Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*. **1997**; 9: 161.
- Nishizuka, Y.** The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. **1988**; 334: 661.
- Nugteren, D. H.** Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim Biophys Acta*. **1975**; 380: 299.
- Nuhn, P., Büge, A., Köhler, T., Lettau, H., Schneider, R.** Trends of the development of lipoxygenase inhibitors. *Pharmazie*. **1991**; 46: 81.
- Nuhn, P.; Büge, A., Harenberg, P., Lettau, H., Moschner, K., Rauchmaul, M., Schneider, R.** Synthesis of lipoxygenase inhibitors 1: synthesis of open amidrazones. *Pharmazie*. **1993**; 48: 340.
- OECD Guideline for Testing of Chemicals. 107 Partition Coefficients (n-octanol/water), Shake Flask Method, OECD, Paris, 1996.**
- OECD Guideline for Testing of Chemicals. 117 Partition Coefficients (n-octanol/water), HPLC Method, OECD, Paris, 1996.**
- Okamoto, H., Hammarberg, T., Zhang, Y.-Y., Persson, B., Watanabe, T., Samuelsson, B., Rådmark, O.** Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: support for a stabilizing C-terminal loop. *Biochim Biophys Acta*. **2005**; 1749: 123.
- Oldham, M. L., Brash, A. R., Newcomer, M. E.** Insights from the x-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase-Calcium activation via a c2-like domain and a structural basis of product chirality. *J Biol Chem*. **2005**; 280: 39545.
- Olszewski, J. D., Dorman, G., Elliott, J. T., Hong, Y., Ahern, D. G., Prestwich, G. D.** Tethered benzophenone reagents for the synthesis of photoactivatable ligands. *Bioconjugate Chem*. **1995**; 6: 395.

- O'Neil, K. T., DeGrado, W. F.** The interaction of calmodulin with fluorescent and photoreactive model peptides: evidence for a short interdomain separation. *Proteins Struct Funct Gen.* **1989**; 6: 284.
- Oravcova, J., Böhs, B., Lindner, W.** Drug-protein binding studies – new trends in analytical and experimental methodology. *J Chromatogr B.* **1996**; 677: 1.
- Parikh, H. H., McElwain, K., Balasubramanian, V., Leung, W., Wong, D., Morris, M. E., Ramanathan, M.** A rapid spectrofluometric technique for determining drug-serum protein binding suitable for high-throughput screening. *Pharm Res.* **2000**; 17: 632.
- Pergola, C., Jazsar, B., Rossi, A., Buehring, U., Luderer, S., Dehm, F., Northoff, H., Sautebin, L., Werz, O.** Cinnamyl-3,4-dihydroxy- α -cyanocinnamate is a potent inhibitor of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther.* **2011**; 338: 205.
- Philipps, R. R.** The Japp-Klingemann reaction. *Org React.* **1959**; 10: 143.
- Pinto, M. C., Garcia-Barrado, J. A., Macias, P.** Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase. *J Agric Food Chem.* **1999**; 47: 4842.
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., Nicolotti, O., Carotti, A.** Design, synthesis and pharmacobiological evaluation of novel acrylic acid derivatives acting as lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitors with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Eur J Med Chem.* **2011**; 46: 191.
- Pontillo, J., Guo, Z., Wu, D., Struthers, R. S., Chen, C.** Synthesis of aryl-1,2,4-triazine-3,5-diones as antagonists of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**; 15: 4363.
- Popescu, L., Rau, O., Böttcher, J., Syha, Y., Schubert-Zsilavec, M.** Quinoline-based derivatives of pirinixic acid as dual PPAR α/γ agonists. *Arch Pharm Chem Life Sci.* **2007**; 340: 367.
- Pottratz, I.** Diplomarbeit. Untersuchung von Calmodulin/Munc13-Peptid-Komplexen mittels chemischer Quervernetzung und hochauflösender Massenspektrometrie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **2008**.
- Powell, W. S., Rokach, J.** Biochemistry, biology and chemistry of the 5-lipoxygenase product 5-oxo-ETE. *Prog Lipid Res.* **2005**; 44: 154.
- Prabhakar, K. R., Veerapur, V. P., Bansal, P., Vipani, K. P., Reddy, K. M., Barik, A., Reddy, B. K. D., Reddanna, P., Priyadarsini, K. I., Unnikrishnan, M. K.** Identification and evaluation of antioxidant, analgesic/anti-inflammatory activity of the most active ninhydrin-phenol adducts synthesized. *Bioorg Med Chem.* **2006**; 14: 7113.
- Praefcke, G. J. K., Herrmann, C.** Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum.* **2005**; 1: 44.
- Prestwich, G. D., Dorman, G., Elliott, J. T., Marecak, D. M., Chaudhary, A.** Benzophenone photoprobes for phosphoinositides, peptides and drugs. *Photochem Photobiol.* **1997**; 65: 222.

- Prigge, S. T., Boyington, J. C., Gaffney, B. J., Amzel, L. M.** Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases. *Proteins Struct Funct Gen.* **1996**; 24: 275.
- Provost, P., Samuelsson, B., Rådmark, O.** Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1999**; 96: 1881.
- Provost, P., Doucet, J., Hammarberg, T., Gerisch, G., Samuelsson, B., Rådmark, O.** 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein. *J Biol Chem.* **2001**; 276: 16520.
- Rådmark, O., Malmsten, C., Samuelsson, B.** The inhibitory effects of BW755C on arachidonic acid metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Letters.* **1980**; 213.
- Rådmark, O., Samuelsson, B.** Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005**; 338: 102.
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B.** 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem. Sci.* **2007**; 32: 332.
- Rådmark, O., Samuelsson, B.** Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* **2010**; 396: 105.
- Radschuweit, A. K.** Dissertation. Experimentelle Untersuchungen zur Photochemie und Phototoxikologie von Ketoprofen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; **2002**.
- Rajasekharan, K. N., Sivaramakrishnan, M., Burke, M.** Proximity and ligand-induced movement of interdomain residues in myosin subfragment 1 containing trapped MgADP and MgPPi probed by multifunctional cross-linking. *J Biol Chem.* **1987**; 262: 11207.
- Rakonjac, M., Fischer, L., Provost, P., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., Rådmark, O.** Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A₄ production. *PNAS.* **2006**; 103: 13150.
- Ran, Y., Jain, N., Yalkowsky, S. H.** Prediction of aqueous solubility of organic compounds by the general solubility equation (GSE). *J Chem Inf Comput Sci.* **2001**; 41: 1208.
- Ranft, D., Seyfarth, T., Schaper, K. J., Lehwark-Yvetot, G., Bruhn, C., Büge, A.** New *N*¹-hetarylmethylene-substituted amidrazones with potential antimycobacterial activity. *Arch Pharm.* **1999**; 332: 427.
- Ranft, D., Lehwark-Yvetot, G., Schaper, K. J., Büge, A.** *N*¹-Hetarylcarbonyl substituted amidrazones and 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as potential antimycobacterial agents. *Pharmazie.* **2001**; 3: 266.
- Rathbone, D. L., Parker, K. J., Coleman, M. D., Lambert, P. A., Billington, D. C.** Discovery of a potent phenolic *N*¹-benzylidene-pyridinecarboxamidrazone selective against gram-positive bacteria. *Bioorg Med Chem Let.* **2006**, 16, 879.
- Requena, J. R., Chao, C.-C., Levine, R. L., Stadtman, E. A.** Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *PNAS.* **2001**; 98: 69.

- Rizo, J., Südhof, T. C.** C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem.* **1998**; 273: 15879.
- Roberts, W. G., Simon, T. J., Berlin, R. G., Haggitt, R. C., Snyder, E. S., Stenson, W. F., Hanauer, S. B., Reagan, J. E., Cagliola, A., Tanaka, W. K., Simon, S., Berger, M. L.** Leukotrienes in ulcerative colitis: results of a multicenter trial of a leukotriene biosynthesis inhibitor, MK-591. *Gastroenterology.* **1997**; 112: 725.
- Robinette, D., Neamati, N., Tomer, K. B., Borchers, C. H.** Photoaffinity labeling combined with mass spectrometric approaches as a tool for structural proteomics. *Expert Rev Proteomics.* **2006**; 3: 399.
- Rödel, C. B., Tanrikulu, Y., Wisniewska, J. M., Proschak, E., Schneider, G., Steinhilber, D., Hofmann, B.** Potent inhibitors of 5-lipoxygenase identified using pseudoreceptors. *ChemMedChem.* **2011**; 6: 1001.
- Roepstorff, P., Fohlman, J.** Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* **1984**; 11: 601.
- Safayhi, H., Sailer, E.-R., Ammon, H. P. T.** Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid. *Mol Pharmacol.* **1995**; 47: 1212.
- Sailer, E.-R., Schweizer, S., Boden, S. E., Ammon, H. P. T., Safayhi, H.** Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem.* **1998**; 256: 364.
- Samuelsson, B.** Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and Inflammation. *Science.* **1983**; 220: 568.
- Samuelsson, B., Dahlén, S.-E., Lindgren, J. Å., Rouzer, C. A. Serhan, C. N.** Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* **1987**; 237: 1171.
- Sarma, B. K., Mugesh, G.** Antioxidant activity of the anti-inflammatory compound ebselen: a reversible cyclization pathway via selenenic and seleninic acid intermediates. *Chem Eur J.* **2008**; 14: 10603.
- Schewe, T., Kühn, H., Rapoport, S. M.** Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine.* **1986**; 23: 155.
- Schewe, C., Schewe, T., Wendel, A.** Strong inhibition of mammalian lipoxygenases by the antiinflammatory seleno-organic compound ebselen in the absence of glutathione. *Biochem Pharmacol.* **1994**; 48: 65.
- Schewe, T.** Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol.* **1995**; 26: 1153.
- Schmidt, A., Kalkhof, S., Ihling, C., Cooper, D. M. F., Sinz, A.** Mapping protein interfaces by chemical cross-linking and FTICR mass spectrometry: application to a calmodulin / adenylyl cyclase 8 peptide complex. *Eur J Mass Spectrom.* **2005**; 11: 525.

- Schulz, D. M., Ihling, C., Clore, G. M., Sinz, A.** Mapping the topology and determination of a low-resolution three-dimensional structure of the calmodulin-melittin complex by chemical cross-linking and high-resolution FTICRMS: direct demonstration of multiple binding modes. *Biochemistry*. **2004**; 43: 4703.
- Schulz, D. M., Kalkhof, S., Schmidt, A., Ihling, C., Stingl, C., Mechtler, K., Zschörnig, O., Sinz, A.** Annexin A2/p11 interaction: new insights into annexin A2 tetramer structure by chemical cross-linking, high-resolution mass spectrometry, and computational modeling. *Proteins*. **2007**; 69: 254.
- Serhan, C. N.** Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **2005**; 73: 141.
- Serhan, C. N., Chiang, N., van Dyke, T. E.** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*. **2008**; 8: 349.
- Sharon, P., Stenson, W. F.** Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. **1984**; 86: 453.
- Shibata, D., Steczko, J., Dixon, J. E., Hermodson, M., Yazdanparast, R., Axelrod, B.** Primary structure of soybean lipoxygenase. *J Biol Chem*. **1987**; 262: 10080.
- Singh, A., Thornton, E. R., Westheimer, F. H.** The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J Biol Chem*. **1962**; 237: PC3006.
- Singh, P., Hingorani, L. L.** Succinimide esters and glycine amides of non-steroidal antiinflammatory drugs. *Indian J Chem*. **1990**; 29B: 551.
- Singh, R. K., Gupta, S., Dastidar, S., Ray, A.** Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology*. **2010**; 85: 336.
- Sinz, A.** Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J Mass Spectrom*. **2003**; 38: 1225.
- Sinz, A.** Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev*. **2006**; 25: 663.
- Sircar, J. C., Schwender, C. F., Johnson, E. A.** Soybean lipoxygenase inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Prostaglandins*. **1983**; 25: 393.
- Skorey, K. I., Gresser, M. J.** Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidylcholine vesicle concentrations. *Biochemistry*. **1998**; 37: 8027.
- Skrzypczak-Jankun, E., Amzel, L. M., Kroa, B. A., Funk, M. O. Jr.** Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme. *Proteins*. **1997**; 29: 15.
- Sogawa, S., Nihro, Y., Ueda, H., Izumi, A., Miki, T., Matsumoto, H., Satoh, T.** 3,4-Dihydrochalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J Med Chem*. **1993**; 36: 3904.

- Steen, H., Mann, M.** The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*. **2004**; 5: 699.
- Steinhilber, D., Schmidt, K., Eger, K., Roth, H. J.** New class of 5-lipoxygenase inhibitors: correlation between inhibition of LTB₄ production and chemoluminescence of human polymorphnuclear granulocytes. *Pharm Res*. **1986**; 3: 271.
- Steinhilber, D.** Dissertation. Bestimmung und Beeinflussung der Leukotrien- und Lipoxinfreisetzung aus menschlichen Granulocyten. Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen; **1987**.
- Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.** Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods*. **2005**; 2: 261.
- Sud'ina, G. F., Pushkareva, M. A., Shephard, P., Klein, T.** Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*. **2008**; 78: 99.
- Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N.** The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. **1975**; 11: 824.
- Summers, J. B., Kim, K. H., Mazdiyasi, H., Holms, J. H., Ratajczyk, J. D., Stewart, A. O., Dyer, R. D., Carter, G. W.** Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: quantitative structure-activity relationships. *J Med Chem*. **1990**; 33: 992.
- Sun, F. F., McGuire, J. C., Wallach, D. P., Brown, V. R.** Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxidase reactions of prostaglandin synthase. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*. **1980**; 6: 111.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C., Sprang, S. R.** Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell*. **1995**; 80: 929.
- Sztanke, K., Pasternak, K., Rajtar, B., Sztanke, M., Majek, M., Polz-Dacewicz, M.** Identification of antibacterial and antiviral activities of novel fused 1,2,4-triazine esters. *Bioorg Med Chem*. **2007**; 15: 5480.
- Sztanke, K., Pasternak, K., Rzymowska, J., Sztanke, M., Kandfer-Szerszen, M.** Synthesis, structure elucidation and identification of antitumoral properties of novel fused 1,2,4-triazine aryl derivatives. *Eur J Med Chem*. **2008**; 43: 1085.
- Sztanke, K., Pasternak, Sztanke, M., Kandfer-Szerszen, M., Koziol, A. E., Dybala, I.** Crystal structure, antitumour and antimetastatic activities of disubstituted fused 1,2,4-triazinones. *Bioorg Med Chem Lett*. **2009**; 19: 5095.
- Tamura, M., Igarashi, T., Kasai, K., Arata, Y.** Cross-linking of *N*-acetyllactosamine-containing glycoproteins to galectin-1 with an introduced cysteine using a photoactivatable sulfhydryl reagent. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**; 390: 581.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T.** Protein and polymer analyses up to *m/z* 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. **1988**; 2: 151.

- Tao, T., Lamkin, M., Scheiner, C. J.** The conformation of the C-terminal region of actin: a site-specific photocrosslinking study using benzophenone-4-maleimide. *Arch Biochem Biophys.* **1985**; 240: 627.
- Tetko, I. V., Tanchuk, V. Y., Kasheva, T. N., Villa, A. E.** Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci.* **2001**; 41: 1488.
- Theorell, H., Holman, R. T., Akesson, A.** Crystalline lipoxydase. *Acta Chem Scand.* **1947**; 1: 571.
- Tsukada, T., Nakashima, K., Shirakawa, S.** Arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors show potent antiproliferative effects on human leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* **1986**; 140: 832.
- Van de Kerkhof, P. C., van Pelt, H., Luckner, G. P., Steijlen, P. M., Heremans, A.** Topical R-85355, a potent and selective 5-lipoxygenase inhibitor, fails to improve psoriasis. *Skin Pharmacol.* **1996**; 9: 307.
- van Rossum, G. S., Bijvelt, J. J., van den Bosch, H., Verkleij, A. J., Boonstra, J.** Cytosolic phospholipase A2 and lipoxygenase are involved in cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Cell Mol Life Sci.* **2002**; 59: 181.
- Varga, T., Czimmerer, Z., Nagy, L.** PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* **2011**; 1812: 1007.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D.** Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* **2002**; 45: 2615.
- Velpandian, T., Mathur, R., Agarwal, N. K., Arora, B., Kumar, L., Gupta, S. K.** Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples. *J Chromatogr B.* **2004**; 804: 431.
- Viehe, H. G., Merenyi, R., Stella, L., Janousek, Z.** Cpto-dative substituent effects in syntheses with radicals and radicophiles. *Angew Chem Int Ed Engl.* **1979**; 18: 917.
- Von Bubnoff, N., Duyster, J.** Chronische myeloische Leukämie-Therapie und Monitoring. *Dtsch Arztebl Int.* **2010**; 7: 114.
- Wallach, D. P., Brown, V. R.** A novel preparation of human platelet lipoxygenase – characteristics and inhibition by a variety of phenyl hydrazones and comparisons with other lipoxygenases. *Biochim Biophys Acta.* **1981**; 663: 361.
- Walther, M.** Dissertation. Untersuchungen zur Enzym-Ligand-Wechselwirkung bei tierischen Lipoxygenasen. Humboldt-Universität zu Berlin; **2003**.
- Wang, C.-L. A.** Photocrosslinking of calmodulin and/or actin to chicken gizzard caldesmon. *Biochem Biophys Res Commun.* **1988**; 156: 1033.
- Wanner, K., Höfner, G.** (Ed.) Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry aus der Reihe *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 36*, WILEY-VCH Verl. GmbH; **2007**.

- Weinblatt, M. E., Kremer, J. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S., Maier, A. L., Petrillo, G., Henson, B., Rubin, P., Sperling, R. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* **1992**; 19: 1537.
- Werz, O., Steinhilber, D. 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.* **1996**; 242: 90.
- Werz, O., Szellas, D., Henseler, M., Steinhilber, D. Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. *Mol Pharmacol.* **1998**; 54: 445.
- Werz, O., Klemm, J., Rådmark, O., Samuelsson, B. p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line. *J Leukocyte Biol.* **2001**; 70: 830.
- ¹Werz, O., Steinhilber, D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors – lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol.* **2005**; 70: 327.
- ²Werz, O., Steinhilber, D. Pharmacological intervention with 5-lipoxygenase: new insights and novel compounds. *Expert Opin Ther Patents.* **2005**; 15: 505.
- Werz, O., Steinhilber, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther.* **2006**; 112: 701.
- Werz, O., Greiner, C., Koeberle, A., Hoernig, C., George, S., Popescu, L., Syha, Y, Schubert-Zsilavec, M., Steinhilber, D. Novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase product synthesis based on the structure of pirinixic acid. *J Med Chem.* **2008**; 51: 5449.
- Wiegrebe, W., Müller, K. Treatment of psoriasis with anthrones – chemical principles, biochemical aspects, and approaches to the design of novel derivatives. *Skin Pharmacol.* **1995**; 8: 1.
- Wittelsberger, A., Thomas, B. E., Mierke, D. F., Rosenblatt, M. Methionine acts as "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments. *FEBS Letters.* **2006**; 580: 1872.
- Woodmansee, D. P., Simon, R. A. A pilot study examining the role of zileuton in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **1999**; 83: 548.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., Shimizu, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature.* **1997**; 387: 620.
- Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T., Shimizu, T. A second leukotriene B₄ receptor, BLT₂: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med.* **2000**; 192: 421.
- Zenobi, R., Knochenmuss, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Reviews.* **1998**; 17: 337.
- Zhang, Y.-Y., Hammarberg, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., NG, C. F., Funk, C. D., Loscalzo, J. Analysis of a nucleotide-binding of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences. *Biochem J.* **2000**; 351: 697.

ANHANG

Tab. I: Mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte tryptische CaM-Peptide, mit und ohne Keto-NHS-Modifizierung.

CaM-Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Bemerkung
1-13	1563,789	1563,754	22	Acetyl (Protein <i>N</i> -term)
1-30	3389,588	3389,628	-12	Acetyl (Protein <i>N</i> -term)
1-30	3625,818	3625,712	29	Acetyl (Protein <i>N</i> -term), Keto-NHS (K13)
14-30	1844,924	1844,892	17	
14-30	2081,133	2080,976	75	Keto-NHS (K21)
14-37	2631,299	2631,298	0	
14-37	2867,380	2867,382	-1	Keto-NHS (K30)
38-74	4070,780	4070,831	-12	deamidiert (N60)
75-86	1716,815	1716,780	20	Keto-NHS (K75)
75-86	1952,793	1952,863	-36	Keto-NHS (K75, K77)
75-90	1983,904	1983,945	-21	
75-90	2220,074	2220,028	21	Keto-NHS (K77)
76-90	1855,820	1855,850	-16	
78-90	1596,759	1596,714	28	
87-106	2259,218	2259,104	50	deamidiert (N97)
91-106	1755,788	1755,855	-38	deamidiert (N97)
91-106	1991,008	1990,955	27	Keto-NHS (K94)
91-106	1991,906	1991,939	-16	Keto-NHS (K94), deamidiert (N97)
107-126	2401,230	2401,174	23	Trimethyl (K115)
127-148	2490,091	2490,080	4	

Tab. II: Mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte tryptische CaM-Peptide, die mit SBC/SBDC modifizierten Lysine sind angegeben.

CaM-Sequenz	$[M+H]^+_{exp}$	$[M+H]^+_{calc}$	Δm [ppm]	Modifizierung
1-30	3626,723	3626,695	8	Acetyl (<i>N</i> -term), SBC (K21), deamidiert (Q8)
1-30	3628,704	3628,708	-1	Acetyl (<i>N</i> -term), SBDC (K21), deamidiert (Q8)
14-30	2081,041	2080,975	32	SBC (K21)
14-30	2083,040	2082,988	25	SBDC (K21)
75-86	1716,798	1716,779	11	SBC (K75)
75-86	1718,799	1718,791	5	SBDC (K75)
75-86	1954,887	1954,875	6	SBC (K75, K77)
75-86	1956,851	1956,887	-18	SBC (K75), SBDC (K77)
75-86	1958,880	1958,899	10	SBDC (K75, K77)
75-90	2219,989	2220,028	-18	SBC (K77)
75-90	2221,997	2222,040	-19	SBDC (K77)
75-90	2236,027	2236,023	2	SBC (K75), Oxidation (M76)
75-90	2238,064	2238,035	13	SBDC (K75), Oxidation (M76)
75-90	2458,154	2458,124	12	SBC (K75, K77)
75-90	2460,135	2460,136	0	SBC (K75), SBDC (K77)
76-86	1588,670	1588,684	-9	SBC (K77)
76-86	1590,680	1590,696	-10	SBDC (K77)
87-106	2494,140	2494,204	-26	SBC (K94)
87-106	2496,152	2496,217	-26	SBDC (K94)
87-106	2495,144	2495,188	-18	SBC (K94), deamidiert (N97)
87-106	2497,155	2497,204	-20	SBDC (K94), deamidiert (N97)
91-106	1990,957	1990,955	1	SBC (K94)
91-106	1992,962	1992,967	-2	SBDC (K94)
91-106	1991,946	1991,939	4	SBC (K94), deamidiert (N97)
91-106	1993,934	1993,951	-8	SBDC (K94), deamidiert (N97)

Tab. III: Mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS identifizierte, mit SBC/SBDC modifizierte tryptische CaM-Peptide.

CaM-Sequenz	$[M+H]^+_{\text{exp}}$	$[M+H]^+_{\text{calc}}$	Ladungs- zustand	Δm [ppm]	Modifizierung
14-30	2080,979	2080,975	2+	2	SBC (K21)
14-30	2082,988	2082,987	2+	0	SBDC (K21)
91-106	1990,959	1990,955	2+	2	SBC (K94)
91-106	1992,972	1992,966	2+	3	SBDC (K94)
91-106	1991,939	1991,939	2+	0	SBC (K94), deamidiert (N97)
91-106	1993,950	1993,944	2+	3	SBDC (K94), deamidiert (N97)
75-86	1716,777	1716,779	3+	-1	SBC (K77)
75-86	1718,790	1718,791	3+	-1	SBDC (K77)
127-148	2726,167	2726,164	3+	1	SBC (K148)
127-148	2728,173	2728,171	3+	1	SBDC (K148)

Tab. IV: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, mit BS²G/BS³-D₀/D₄ modifizierte tryptische C2-Peptide in Abwesenheit des Liganden LP₁₂₁.

C2-Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Modifizierung
40-52	1806,889	1806,882	4	BS ² G-D ₀ _amid (K44)
	1810,934	1810,907	15	BS ² G-D ₄ _amid (K44)
40-52	1807,888	1807,866	12	BS ² G-D ₀ (K44)
	1811,910	1811,891	10	BS ² G-D ₄ (K44)
40-52	1848,924	1848,929	-3	BS ³ -D ₀ _amid (K44)
	1852,948	1852,954	-3	BS ³ -D ₄ _amid (K44)
40-52	1849,915	1849,913	1	BS ³ -D ₀ (K44)
	1853,935	1853,938	-2	BS ³ -D ₄ (K44)
40-52	1905,943	1905,950	-4	BS ³ -D ₀ _amid (K44), carbamid. (N-term)
	1909,966	1909,975	-5	BS ³ -D ₄ _amid (K44), carbamid. (N-term)
40-52	1906,928	1906,934	-3	BS ³ -D ₀ (K44), carbamid. (N-term)
	1910,952	1910,959	-4	BS ³ -D ₄ (K44), carbamid. (N-term)
78-88	1657,796	1657,790	4	BS ² G-D ₀ (K78)
	1661,821	1661,816	3	BS ² G-D ₄ (K78)
78-93	2276,131	2276,164	-14	BS ² G-D ₀ (K88)
	2280,159	2280,190	-14	BS ² G-D ₄ (K88)
89-106	2386,187	2386,154	14	BS ² G-D ₀ _amid (K93), carbamid. (C104)
	2390,206	2390,179	11	BS ² G-D ₄ _amid (K93), carbamid. (C104)
89-106	2387,165	2387,138	11	BS ² G-D ₀ (K93), carbamid. (C104)
	2391,182	2391,164	8	BS ² G-D ₄ (K93), carbamid. (C104)
121-133	1633,924	1633,939	-9	BS ² G-D ₀ _amid (K122)
	1637,950	1637,964	-9	BS ² G-D ₄ _amid (K122)
121-133	1634,925	1634,923	1	BS ² G-D ₀ (K122)
	1638,942	1638,948	-4	BS ² G-D ₄ (K122)
121-133	1675,986	1675,986	0	BS ³ -D ₀ _amid (K122)
	1680,007	1680,011	-2	BS ³ -D ₄ _amid (K122)
121-133	1676,975	1676,970	3	BS ³ -D ₀ (K122)
	1680,998	1680,995	2	BS ³ -D ₄ (K122)
121-133	1733,006	1733,008	-1	BS ³ -D ₀ _amid (K122), carbamid. (N-term)
	1737,029	1737,033	-2	BS ³ -D ₄ _amid (K122), carbamid. (N-term)
123-133	1476,838	1476,854	-11	BS ³ -D ₀ _amid (K133)
	1480,866	1480,879	-9	BS ³ -D ₄ _amid (K133)
123-133	1477,828	1477,838	-7	BS ³ -D ₀ (K133)
	1481,853	1481,863	-7	BS ³ -D ₄ (K133)
123-133	1534,850	1534,860	-6	BS ³ -D ₀ (K133), carbamid. (N-term)
	1538,874	1538,885	-7	BS ³ -D ₄ (K133), carbamid. (N-term)

Tab. IV (Fortsetzung): Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, mit BS²G/BS³-D₀/-D₄ modifizierte C2-Peptide in Abwesenheit des Liganden LP₁₂₁.

C2-Sequenz	[M+H]⁺_{exp}	[M+H]⁺_{calc}	Δm [ppm]	Modifizierung
126-133	1094,574	1094,585	-10	BS ² G-D ₀ _amid (K133)
	1098,606	1098,610	-4	BS ² G-D ₄ _amid (K133)
126-133	1095,572	1095,569	3	BS ² G-D ₀ (K133)
	1099,601	1099,594	6	BS ² G-D ₄ (K133)
126-133	1137,602	1137,616	-12	BS ³ -D ₀ (K133)
	1141,636	1141,641	-4	BS ³ -D ₄ (K133)
126-133	1194,630	1194,638	-7	BS ³ -D ₀ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1198,650	1198,662	-10	BS ³ -D ₄ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)

Tab. V: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, mit BS²G/BS³-D₀/-D₄ modifizierte C2-Peptide in Anwesenheit des Liganden LP₁₂₁.

C2-Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Modifizierung
40-52	1806,903	1806,882	12	BS ² G-D ₀ _amid (K44)
	1810,925	1810,907	10	BS ² G-D ₄ _amid (K44)
40-52	1807,896	1807,866	17	BS ² G-D ₀ (K44)
	1811,907	1811,891	9	BS ² G-D ₄ (K44)
40-52	1848,951	1848,929	12	BS ³ -D ₀ _amid (K44)
	1852,974	1852,954	11	BS ³ -D ₄ _amid (K44)
40-52	1849,918	1849,913	3	BS ³ -D ₀ (K44)
	1853,945	1853,938	4	BS ³ -D ₄ (K44)
40-52	1905,966	1905,950	8	BS ³ -D ₀ _amid (K44), carbamid. (N-term)
	1909,992	1909,975	9	BS ³ -D ₄ _amid (K44), carbamid. (N-term)
40-52	1906,949	1906,934	8	BS ³ -D ₀ (K44), carbamid. (N-term)
	1910,970	1910,959	6	BS ³ -D ₄ (K44), carbamid. (N-term)
78-88	1657,787	1657,790	-2	BS ² G-D ₀ (K78)
	1661,813	1661,816	-2	BS ² G-D ₄ (K78)
78-93	2276,182	2276,164	8	BS ² G-D ₀ (K88)
	2280,203	2280,190	6	BS ² G-D ₄ (K88)
89-106	2386,140	2386,154	-6	BS ² G-D ₀ _amid (K93), carbamid. (C104)
	2390,162	2390,179	-7	BS ² G-D ₄ _amid (K93), carbamid. (C104)
89-106	2387,149	2387,138	5	BS ² G-D ₀ (K93), carbamid. (C104)
	2391,172	2391,164	3	BS ² G-D ₄ (K93), carbamid. (C104)
121-133	1633,951	1633,939	7	BS ² G-D ₀ _amid (K122)
	1637,972	1637,964	5	BS ² G-D ₄ _amid (K122)
121-133	1634,931	1634,923	5	BS ² G-D ₀ (K122)
	1638,939	1638,948	-5	BS ² G-D ₄ (K122)
121-133	1675,997	1675,986	7	BS ³ -D ₀ _amid (K122)
	1680,019	1680,011	5	BS ³ -D ₄ _amid (K122)
121-133	1676,991	1676,970	13	BS ³ -D ₀ (K122)
	1681,012	1680,995	10	BS ³ -D ₄ (K122)
121-133	1733,015	1733,008	4	BS ³ -D ₀ _amid (K122), carbamid. (N-term)
	1737,038	1737,033	3	BS ³ -D ₄ _amid (K122), carbamid. (N-term)
123-133	1434,792	1434,807	-10	BS ² G-D ₀ _amid (K133)
	1438,831	1438,832	-1	BS ² G-D ₄ _amid (K133)
123-133	1435,781	1435,791	-7	BS ² G-D ₀ (K133)
	1439,807	1439,816	-6	BS ² G-D ₄ (K133)
123-133	1476,856	1476,854	1	BS ³ -D ₀ _amid (K133)
	1480,880	1480,879	1	BS ³ -D ₄ _amid (K133)

Tab. V (Fortsetzung): Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, mit BS²G/BS³-D₀/-D₄ modifizierte C2-Peptide in Anwesenheit des Liganden LP₁₂₁.

C2-Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Modifizierung
123-133	1477,859	1477,838	14	BS ³ -D ₀ (K133)
	1481,882	1481,863	13	BS ³ -D ₄ (K133)
123-133	1534,876	1534,860	10	BS ³ -D ₀ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1538,899	1538,885	9	BS ³ -D ₄ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
126-133	1094,584	1094,585	-1	BS ² G-D ₀ _amid (K133)
	1098,611	1098,610	1	BS ² G-D ₄ _amid (K133)
126-133	1095,565	1095,569	-4	BS ² G-D ₀ (K133)
	1099,594	1099,594	0	BS ² G-D ₄ (K133)
126-133	1136,636	1136,632	4	BS ³ -D ₀ _amid (K133)
	1140,662	1140,657	4	BS ³ -D ₄ _amid (K133)
126-133	1137,627	1137,616	10	BS ³ -D ₀ (K133)
	1141,656	1141,641	13	BS ³ -D ₄ (K133)
126-133	1193,654	1193,653	1	BS ³ -D ₀ _amid (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1197,680	1197,678	2	BS ³ -D ₄ _amid (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
126-133	1194,645	1194,638	6	BS ³ -D ₀ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1198,672	1198,662	8	BS ³ -D ₄ (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)

Tab. VI: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, an Lysin-, Serin- oder Tyrosinresten mit BS²G-D₀/D₄ und BS³-D₀/D₄ modifizierte C2-Peptide in Anwesenheit des Liganden B02.

C2-Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Bemerkung
1-22	2389,084	2389,102	-8	BS ² G-D ₀ _amid (S7)
1-22	2393,112	2393,127	-6	BS ² G-D ₄ _amid (S7)
1-22	2390,093	2390,086	3	BS ² G-D ₀ (S7)
1-22	2394,108	2394,111	-1	BS ² G-D ₄ (S7)
1-22	2432,129	2432,133	-2	BS ³ -D ₀ (S7)
1-22	2436,145	2436,158	-5	BS ³ -D ₄ (S7)
1-23	2504,109	2504,129	-8	BS ² G-D ₀ _amid (S7)
1-23	2508,129	2508,154	-10	BS ² G-D ₄ _amid (S7)
1-23	2505,124	2505,113	4	BS ² G-D ₀ (S7)
1-23	2509,140	2509,138	1	BS ² G-D ₄ (S7)
1-23	2547,161	2547,160	0	BS ³ -D ₀ (S7)
1-23	2551,188	2551,185	1	BS ³ -D ₄ (S7)
23-42	2354,106	2354,122	-7	BS ² G-D ₀ (K39), carbamid. (C36)
23-42	2358,129	2358,148	-8	BS ² G-D ₄ (K39), carbamid. (C36)
23-42	2395,176	2395,185	-4	BS ³ -D ₀ _amid (K39), carbamid. (C36)
23-42	2399,208	2399,210	-1	BS ³ -D ₄ _amid (K39), carbamid. (C36)
23-42	2396,161	2396,170	-4	BS ³ -D ₀ (K39), carbamid. (C36)
23-42	2400,179	2400,195	-7	BS ³ -D ₄ (K39), carbamid. (C36)
24-42	2239,098	2239,116	-8	BS ² G-D ₀ (K39), carbamid. (C36)
24-42	2243,113	2243,126	-6	BS ² G-D ₄ (K39), carbamid. (C36)
83-93	1570,822	1570,815	4	BS ² G-D ₀ _amid (K88)
83-93	1574,845	1574,840	3	BS ² G-D ₄ _amid (K88)
83-93	1571,809	1571,798	7	BS ² G-D ₀ (K88)
83-93	1575,831	1575,823	5	BS ² G-D ₄ (K88)
83-93	1612,859	1612,862	-2	BS ³ -D ₀ _amid (K88)
83-93	1616,876	1616,887	-7	BS ³ -D ₄ _amid (K88)
83-93	1613,855	1613,845	6	BS ³ -D ₀ (K88)
83-93	1617,875	1617,870	3	BS ³ -D ₄ (K88)
83-97	2078,004	2078,002	1	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₀ (K88, K93)
83-97	2082,036	2082,036	0	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₄ (K88, K93)
83-97	2086,052	2086,056	-2	BS ² G-D ₄ /BS ² G-D ₄ (K88, K93)
83-97	2081,056	2081,053	1	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₄ _amid (K88, K93)
83-97	2085,080	2085,078	1	BS ² G-D ₄ /BS ² G-D ₄ _amid (K88, K93)

Tab. VI (Fortsetzung): Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, an Lysin-, Serin- oder Tyrosinresten mit BS²G-D₀/D₄ und BS³-D₀/D₄ modifizierte C2-Peptide in Anwesenheit des Liganden B02.

C2-Sequenz	[M+H]⁺_{exp}	[M+H]⁺_{calc}	Δm [ppm]	Bemerkung
83-97	2162,127	2162,112	7	BS ³ -D ₀ /BS ³ -D ₀ (K88, K93)
83-97	2166,135	2166,113	10	BS ³ -D ₀ /BS ³ -D ₄ (K88, K93)
83-97	2170,161	2170,142	9	BS ³ -D ₄ /BS ³ -D ₄ (K88, K93)
98-106	1376,605	1376,593	9	BS ² G-D ₀ (Y99/105), carbamid. (C104)
98-106	1380,628	1380,617	8	BS ² G-D ₄ (Y99/105), carbamid. (C104)

Tab. VII: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, an Lysin-, Serin- oder Tyrosinresten mit BS²G- und BS³-D₀/D₄ modifizierte C2-Peptide in Abwesenheit des Liganden B02.

C2 Sequenz	[M+H] ⁺ _{exp}	[M+H] ⁺ _{calc}	Δm [ppm]	Bemerkung
1-22	2390,091	2390,086	2	BS ² G-D ₀ (S7)
1-22	2394,116	2394,111	2	BS ² G-D ₄ (S7)
1-22	2432,118	2432,133	-6	BS ³ -D ₀ (S7)
1-22	2436,125	2436,158	-14	BS ³ -D ₄ (S7)
23-42	2353,165	2353,138	11	BS ² G-D ₀ _amid (K39), carbamid. (C36)
23-42	2357,164	2357,163	0	BS ² G-D ₄ _amid (K39), carbamid. (C36)
23-42	2354,098	2354,126	-12	BS ² G-D ₀ (K39), carbamid. (C36)
23-42	2358,096	2358,148	-22	BS ² G-D ₄ (K39), carbamid. (C36)
83-93	1571,812	1571,801	7	BS ² G-D ₀ (K88)
83-93	1575,834	1575,826	5	BS ² G-D ₄ (K88)
83-93	1595,824	1595,781	27	BS ³ -D ₀ -H ₂ O (K88)
83-93	1599,848	1599,806	26	BS ³ -D ₄ -H ₂ O (K88)
83-93	1612,843	1612,862	-12	BS ³ -D ₀ _amid (K88)
83-93	1616,869	1616,887	-11	BS ³ -D ₄ _amid (K88)
83-93	1613,875	1613,862	8	BS ³ -D ₀ (K88)
83-93	1617,886	1617,881	3	BS ³ -D ₄ (K88)
83-97	2077,991	2078,012	-10	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₀ (K88, K93)
83-97	2082,016	2082,039	-11	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₄ (K88, K93)
83-97	2086,030	2086,063	-16	BS ² G-D ₄ /BS ² G-D ₄ (K88, K93)
83-97	2081,067	2081,053	7	BS ² G-D ₀ /BS ² G-D ₄ _amid (K88, K93)
83-97	2085,079	2085,078	0	BS ² G-D ₄ /BS ² G-D ₄ _amid (K88, K93)

Tabelle VIII: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, mit SBC/SBDC modifizierte C2-Peptide in Abwesenheit des Liganden B02.

C2-Sequenz	$[M+H]^+_{\text{exp}}$	$[M+H]^+_{\text{calc}}$	Δm [ppm]	Modifizierung
43-52	1566,718	1566,687	20	SBC (K44)
	1568,700	1568,703	-2	SBDC (K44)
43-52	1567,681	1567,671	6	SBC (K44), deamidiert (N48)
	1569,691	1569,687	2	SBDC (K44), deamidiert (N48)
83-93	1693,853	1693,851	1	SBC (K88)
	1695,870	1695,865	3	SBDC (K88)
89-97	1265,684	1265,654	24	SBC (K93)
	1267,697	1267,670	21	SBDC (K93)
89-97	1322,686	1326,707	-16	SBC (K93), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1324,703	1324,691	9	SBDC (K93), carbamid. (<i>N</i> -term)
126-133	1217,631	1217,617	11	SBC (K133)
	1219,644	1219,633	9	SBDC (K133)
126-133	1274,639	1274,639	0	SBC (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
	1276,629	1276,655	-20	SBDC (K133), carbamid. (<i>N</i> -term)
127-133	1102,593	1102,594	-1	SBC (K133)
	1104,606	1104,606	0	SBDC (K133)

Tab. IX: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, an Lysin-, Serin- oder Tyrosinresten mit SBC/SBDC modifizierte C2-Peptide in Anwesenheit des Liganden B02; DTM: Dethiomethyl.

C2-Sequenz	$[M+H]^+_{exp}$	$[M+H]^+_{calc}$	Δm [ppm]	Bemerkung
1-22	2512,148	2512,135	5	SBC (S7), DTM (M5)
1-22	2514,126	2514,148	-9	SBDC (S7), DTM (M5)
1-23	2627,162	2627,162	0	SBC (S7), DTM (M5)
1-23	2629,299	2629,175	47	SBDC (S7), DTM (M5)
23-42	2476,282	2476,171	4	SBC (K39), carbamid. (C36)
23-42	2478,210	2478,187	9	SBDC (K39), carbamid. (C36)
24-42	2361,221	2361,144	33	SBC (K39), carbamid. (C36)
24-42	2363,261	2363,160	43	SBDC (K39), carbamid. (C36)
43-52	1566,736	1566,687	31	SBC (K44)
43-52	1568,750	1568,703	30	SBDC (K44)
78-82	959,529	959,467	65	SBC (K78)
78-82	961,536	961,479	59	SBDC (K78)
83-93	1693,933	1693,848	50	SBC (K88)
83-93	1695,936	1695,864	42	SBDC (K88)
89-97	1265,669	1265,657	9	SBC (K93)
89-97	1267,683	1267,673	8	SBDC (K93)
98-106	1441,657	1441,614	30	SBC (Y99/105)
98-106	1443,660	1443,627	23	SBDC (Y99/105)
98-106	1498,688	1498,632	37	SBC (Y99/105), carbamid. (C104)
98-106	1500,676	1500,648	19	SBDC (Y99/105), carbamid. (C104)
126-133	1217,667	1217,621	38	SBC (K133)
126-133	1219,678	1219,633	37	SBDC (K133)
126-133	1260,683	1260,623	48	SBC (K133), carbamyl. (N-term)
126-133	1262,678	1262,639	31	SBDC (K133), carbamyl. (N-term)
126-133	1274,692	1274,642	39	SBC (K133), carbamid. (N-term)
126-133	1276,709	1276,655	42	SBDC (K133), carbamid. (N-term)
127-133	1102,637	1102,594	39	SBC (K133)
127-133	1104,647	1104,606	37	SBDC (K133)
127-133	1159,642	1159,615	23	SBC (K133), carbamid. (N-term)
127-133	1161,664	1161,631	28	SBDC (K133), carbamid. (N-term)

Tab. X: Mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierte, an Lysin-, Serin- oder Tyrosinresten mit SBC und SBDC modifizierte C2-Peptide in Abwesenheit des Liganden B02; DTM: Dethiomethyl.

C2-Sequenz	$[M+H]^+_{\text{exp}}$	$[M+H]^+_{\text{calc}}$	Δm [ppm]	Bemerkung
1-22	2512,181	2512,135	18	SBC (S7), DTM (M5)
1-22	2514,203	2514,148	22	SBDC (S7), DTM (M5)
23-42	2476,285	2476,171	6	SBC (K39), carbamid. (C36)
23-42	2478,306	2478,187	48	SBDC (K39), carbamid. (C36)
24-42	2361,221	2361,144	33	SBC (K39), carbamid. (C36)
24-42	2363,228	2363,160	29	SBDC (K39), carbamid. (C36)
83-93	1693,963	1693,848	68	SBC (K88)
83-93	1695,987	1695,864	72	SBDC (K88)
83-93	1750,958	1750,870	50	SBC (K88), carbamid. (<i>N</i> -term)
83-93	1752,974	1752,886	50	SBDC (K88), carbamid. (<i>N</i> -term)
89-97	1265,678	1265,657	16	SBC (K93)
89-97	1267,693	1267,673	16	SBDC (K93)
98-106	1441,647	1441,614	23	SBC (Y99/105)
98-106	1443,658	1443,627	21	SBDC (Y99/105)
98-106	1498,718	1498,632	57	SBC (Y99/105), carbamid. (C104)
98-106	1500,711	1500,648	42	SBDC (Y99/105), carbamid. (C104)
98-106	1541,677	1541,638	25	SBC (Y99/105), carbamid. (C104), carbamyl (<i>N</i> -term)
98-106	1543,679	1543,654	16	SBDC (Y99/105), carbamid. (C104), carbamyl (<i>N</i> -term)
126-133	1217,655	1217,621	28	SBC (K133)
126-133	1219,661	1219,633	23	SBDC (K133)
127-133	1102,608	1102,594	13	SBC (K133)
127-133	1104,625	1104,606	17	SBDC (K133)

Tab. XI: An Lysinseitenketten mit Keto-NHS modifizierte C2-Peptide ohne vorherige TCEP-Zugabe.

C2-Sequenz	[M+H]⁺_{exp}	[M+H]⁺_{calc}	Δm [ppm]	Bemerkung
23-42	2240,134	2240,091	19	reduziert (C36)
43-55	1794,804	1794,802	1	Keto-NHS (K44), deamid. (R52)
68-77	1519,865	1519,864	1	Keto-NHS (K76)
83-97	2086,038	2086,033	2	Keto-NHS (K88)
89-97	1265,656	1265,657	-1	Keto-NHS (K93)
98-106	1205,524	1205,530	-5	reduziert (C104)
98-106	1276,570	1276,567	2	Propionamid (C104)
118-125	1122,610	1122,606	4	Keto-NHS (K122)
126-133	1217,642	1217,621	17	Keto-NHS (K133)
127-133	1102,603	1102,594	8	Keto-NHS (K133)

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Decker, M., **Krauth, F.**, Lehmann, J. Novel tricyclic quinazolinimines and related tetracyclic nitrogen bridgehead compounds as cholinesterase inhibitors with selectivity towards butyrylcholinesterase. *Bioorg Med Chem.* **2006**; 14: 1966.

Krauth, F., Sinz, A. Doping: Arzneimittelmisbrauch der besonderen Art. *Pharm. Ztg.* **2008**; 153, 24.

Krauth, F., Friedemann, R., Rüttinger, H.-H., Frohberg, P. Open-chain and cyclic amidrazones forming persistent radicals. An electrochemical and quantum chemical study. *ARKIVOC.* **2009**; 7: 150.

Krauth, F., Ihling, C. H., Rüttinger, H.-H., Sinz, A. Heterobifunctional isotope-labeled amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight and electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2009**; 23: 2811.

Krauth, F., Dahse, H.-M., Rüttinger, H.-H., Frohberg, P. Synthesis and characterization of novel 1,2,4-triazine derivatives with antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem.* **2010**; 18: 1816.

Schaks, S., Kalkhof, S., **Krauth, F.**, Jahn, O., Sinz, A. Chemisches Cross-Linking und MS zur Untersuchung von Proteinkomplexen. *BIOspektrum.* **2011**; 17: 524.

Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C. H., **Krauth, F.**, Fritzsche, R., Kühn, U., Sinz, A. StavroX - a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2011** (in press).

Posterbeiträge

Krauth, F., Frohberg, P., Friedemann, R., Rüttinger, H.-H. Amidrazones as inhibitors of SB-LOX-1: an electrochemical characterization (DPhG-Jahrestagung Marburg **2006**).

Krauth, F., Schulze, I., Schulze, G., Giera, M., Bracher, F., Frohberg, P. Novel triazinone derivatives: synthesis, physicochemical and biological investigations (DPhG-Jahrestagung Erlangen **2007**).

Krauth, F., Michel, A., Steinhilber, D., Sinz, A. Structural investigation of the c2-like beta-barrel domain of human 5-lipoxygenase by chemical cross-linking and mass spectrometry (GRK1026: First International Meeting "Conformational Transitions in Macromolecular Interactions" Halle/S. **2008**).

Krauth, F., Michel, A., Ihling, C., Steinhilber, D., Sinz, A. Structural investigation of human 5-lipoxygenase by chemical cross-linking and Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (DGMS-Jahrestagung Gießen **2008**).

Krauth, F., Sinz, A. Heterobifunctional isotope-labeled, amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (DGMS-Jahrestagung Konstanz **2009**).

Krauth, F., Ihling C., Rüttinger, H.-H., Sinz, A. Heterobifunctional isotope-labeled, amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by MALDI-TOF/TOF and ESI-LTQ-Orbitrap mass spectrometry (IMSC-Jahrestagung Bremen **2009**).

Schaks, S., **Krauth, F.**, Müller, M. Q., Ihling, C., Jahn, O., Sinz, A. Investigation of Calmodulin/Munc13 peptide interaction by chemical cross-linking, MALDI-TOF/TOF-MS and ESI-LTQ-Orbitrap-MS (DGMS-Jahrestagung Halle **2010**).

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt

...meiner Doktormutter Prof. Dr. Andrea Sinz für die freundliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die intensive Betreuung beim Erlernen der, vom Standpunkt eines Pharmazeuten, nicht ganz simplen bioanalytischen Methode des „Chemischen Cross-Linkings“ mit Massenspektrometrie. Weiterhin danke ich Ihr sehr für das entgegengebrachte Vertrauen, eigenkreative Aspekte in die Arbeit einbringen zu dürfen und das immerwährende Gefühl kein Einzelkämpfer auf meinem Gebiet zu sein. Ihre positive, mitreißende Art und Weitsicht für das Machbare erfüllt mich mit größtem Respekt.

...gleichermaßen meinem hochgeschätzten Doktorvater Prof. Dr. Hans-Hermann Rüttinger und meiner Betreuerin und guten Freundin Dr. Petra Froberg für eine unvergessliche gemeinsame Zeit als Student, Diplomand und Doktorand. Unendlich dankbar bin ich, nicht nur für ihre Unterstützung bei der Lösung wissenschaftlicher und auch privater Probleme, sondern vor allem für die Chance, 2006 an das Institut für Pharmazie zur Promotionsarbeit zurückkehren zu dürfen.

...Prof. Dr. Dieter Steinhilber und seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M., namentlich Dr. Angela Michel, Dr. Bettina Hofmann, Joanna Wisniewska und Mirjam Schröder für die Bereitstellung der C2-ähnlichen Domäne der h5-LO und Dr. Thomas Maier für die Testung der 1,2,4-Triazin-5-one auf h5-LO-Hemmung an humanen PMNG.

...Dr. Hans-Martin Dahse vom Hans-Knöll-Institut Jena für die Untersuchung der 1,2,4-Triazin-5-one auf antiproliferative Aktivität (K-562- und HUVEC-Zellen) und Zytotoxizität (HeLa-Zellen).

...Dr. Christian Ihling für die Einführung in die Bedienung der Massenspektrometer (Ultraflex III, Orbitrap) und die Hilfestellung bei der Entwicklung passender analytischer Methoden für die Untersuchung der C2-ähnlichen Domäne.

...Dr. Stefan Kalkhof für unterhaltsame und lehrreiche gemeinsame Stunden im Labor und beim „*Dönermann des Vertrauens*“.

...Dr. Mathias Müller für viele praktische Tipps im bioanalytischen Labor und die Hilfe bei graphischen Problemen (Posterdesign, Enzymmodelle, etc.).

...Jens Sproß für die Hilfe beim Umgang mit der ESI-LTQ-Orbitrap und die Dauerleihgabe eines „*bestimmten Büroschlüssels*“.

...meiner „*Labormutti*“ Antje Peters, Arbeitsgruppe Prof. Rüttinger, für Ihren leidenschaftlichen Einsatz bei der Entwicklung und Durchführung HPLC- oder CE-basierter analytischer Methoden, ihr offenes Ohr bei jeder Art von Problemen und nicht zuletzt für ihre unermüdlige Sorge um meinen Ernährungszustand.

...Bärbel Brandt und Simone Kniesa aus der Arbeitsgruppe Prof. Sinz für die mehr als kollegiale Zusammenarbeit bei der Vorbereitung und Durchführung verschiedenster Cross-Linking-Experimente, der spektrofluorimetrischen K_d -Wertmessungen, der Elementaranalysen der 1,2,4-Triazin-5-one und der IC_{50} -Messungen an der SB-LO-1.

...Monika Lunow, Arbeitsgruppe Prof. Rüttinger, für die Hilfe bei der Synthese der photochemischen Cross-Linker SBC/SBDC und BBI.

...der Arbeitsgruppe von Prof. Bodo Dobner für die Unterstützung bei präparativen Fragen, insbesondere der Hydrierung/Deuterierung neuer Cross-Linker.

Ein herzliches Dankeschön gilt an dieser Stelle auch allen hier nicht genannten Freunden, Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die mich während der vergangenen Jahre begleitet haben.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie und insbesondere meinen lieben Eltern, die mich stets vorbehaltlos und voller Vertrauen über die gesamte Zeit in meinem Vorhaben unterstützt und bestärkt haben.

Curriculum vitae

Angaben zur Person:

Geburtstag: 20.01.1978
Geburtsort: Mannheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Postgraduale Tätigkeiten

seit 04/2010 Leiter der Abteilung Arzneimittelherstellung der Zentralapothekes Klinikum Magdeburg gGmbH

01.04.2006-12.03.2010 Anfertigung einer Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Sinz am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Chemie & Bioanalytik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09.05.2005-31.03.2006 Teilzeitstelle als Apotheker in der Apotheke am Jenzig in Jena

01.03.2005-31.03.2006 Wissenschaftliche Hilfskraft im Arbeitskreis Prof. Jochen Lehmann am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

01.07.2004-28.02.2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Studium und Ausbildung

01.06.2004 Approbation zum Apotheker

14.05.2004 Drittes Staatsexamen

11/2003 – 04/2003 Pharmazie-Praktikant in der Humanitas-Apotheke in Halle/Saale

05/2003 – 10/2003 Anfertigung einer Diplomarbeit am Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
„Hemmer der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 mit Amidrazonstruktur: Eine elektrochemische Charakterisierung unter Anwendung der Zyklischen Voltammetrie“

10/1998 – 03/2003	Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Wehrdienst	
1997/1998	Grundwehrdienst in der 3./SanRgt 10 in Horb a. N.
Schulbildung	
1989–1997	Hohenstaufen-Gymnasium in Eberbach a. N.

Mitgliedschaften in wissenschaftlichen Vereinigungen

- Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V. (DPhG)
- Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)
- Bundesverband deutscher Krankenhausapotheker e.V. (ADKA)

Halle (Saale), den 11.04.12

Fabian Krauth

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Ich erkläre ferner, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt wurde.“

Halle (Saale), den 11.04.12

Fabian Krauth