

# **AMIDRAZONE ALS INHIBITOREN VON LIPOXYGENASEN**

**Dissertation**

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von Herrn Frank Clemens  
geb. am: 25.02.1973 in Freital

**Gutachter:**

1. Prof. P. Nuhn
2. Prof. A. Langner
3. Prof. M. Wiese

Halle (Saale), den 31.03.2001

**urn:nbn:de:gbv:3-000002679**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3-000002679>]

Die vorliegende Arbeit entstand  
am Institut für Pharmazeutische Chemie  
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg  
unter Leitung von  
Herrn Prof. Dr. P. Nuhn,  
dem ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas zu  
großem Dank verpflichtet bin.

# **1. EINLEITUNG.....1**

## **1.1 PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER LIPOXYGENASEN..... 1**

1.1.1 Pathophysiologische Bedeutung der 5-LOX 2

1.1.2 Pathophysiologische Bedeutung der 12-LOX 2

1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung der 15-LOX 3

## **2. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....3**

## **3. THEORETISCHE VORBETRACHTUNGEN.....4**

### **3.1 LIPOXYGENASEN..... 4**

3.1.1 Die Sojabohnen-15-Lipoxygenase-1 (L-1) 5

3.1.2 Die Kartoffel-5-Lipoxygenase 7

3.1.3 Der Mechanismus der Fettsäureoxidation 7

3.1.4 Weitere Aktivitäten von Lipoxygenasen 11

### **3.2 LIPOXYGENASE-INHIBITOREN ..... 12**

3.2.1 Radikalfänger/Redoxinhibitoren 12

3.2.2 Eisen-Komplexbildner 13

3.2.3 Substrat-Analoga 14

3.2.3.1 Mechanismus-orientierte Inhibitoren 14

3.2.3.2 Kompetitive Inhibitoren 15

3.2.4 Sonstige Inhibitoren 16

3.2.4.1 FLAP-Inhibitoren 17

3.2.4.1 Leukotrien-Antagonisten 17

### **3.3 DER POSTULIERTE MECHANISMUS DER INAKTIVIERUNG DURCH PHENYLHYDRAZONE..... 17**

3.3.1 Der postulierte Mechanismus der L-1-Inaktivierung durch BW 755c 19

## **4. MATERIAL UND METHODEN..... 20**

**4.1 REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN ..... 20**

**4.2 GERÄTE UND TESTSYSTEME ..... 22**

**4.3 VERSUCHE ZUR OXIDATION..... 25**

4.3.1 Begasung mit Sauerstoff 25

4.3.2 Oxidation durch FeCl <sub>3</sub>	27
4.3.3 Oxidation durch HgO	28

## **5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... 30**

<b>5.1 UNTERSUCHUNGEN AN DER 15-LOX.....</b>	<b>30</b>
5.1.1 Amidrazone als Inhibitoren der LOX	30
5.1.1.1 Die Anfechtung des postulierten Inaktivierungsmechanismus	30
5.1.1.2 Der Einfluß von Sauerstoff auf die Inhibition	34
5.1.1.3 Der Einfluß der Konfiguration	35
5.1.1.4 Reversibilität/Irreversibilität der Inaktivierung	36
5.1.1.5 Hochaffine Inhibition	39
5.1.1.6 Zeitabhängigkeit der Inhibition	41
5.1.1.7 Der Modus der Inhibitorbindung	47
5.1.1.8 Die Bindungsstelle der Inhibitoren	49
5.1.1.9 N <sup>1</sup> -Substituierte Amidrazone	53
5.1.1.10 Partielle Inhibition	57
5.1.1.11 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung	59
5.1.1.12 Zusammenfassung der inhibitorischen Eigenschaften	61
5.1.2 Amidrazone als Substrate der LOX	68
5.1.2.1 Oxidation der Verbindungen	68
5.1.2.1.1 Nichtenzymatische Oxidation	68
5.1.2.1.1.1 Oxidation der Amidrazone	<b>68</b>
5.1.2.1.1.2 Oxidation der Triazoline	<b>69</b>
5.1.2.1.1.3 Oxidation der Hydrazone	<b>70</b>
5.1.2.1.2 Enzymatische Oxidation	71
5.1.2.1.2.1 Der Redoxzustand der inaktivierten L-1	<b>71</b>
5.1.2.1.2.1.1 CD-spektroskopische Untersuchungen	71
5.1.2.1.2.1.2 Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen	72
5.1.2.1.2.2 Amidrazone als Substrate der Dioxygenierungsreaktion?	<b>74</b>
5.1.2.1.2.2.1 Sauerstoff-Verbrauchsmessungen	74
5.1.2.1.2.2.2 Fluoreszenz-Messungen	77
5.1.2.1.2.2.3 Abhängigkeit der Inhibitorumsetzung vom 13-HPODE-Level	79
5.1.2.1.2.3 Amidrazone als Substrate der Cooxidase-Reaktion?	<b>81</b>
5.1.2.1.2.4 Nachweis der enzymatischen Oxidationsprodukte	<b>82</b>
5.1.2.1.2.4.1 Die Phosphinoxid-Methode	83
5.1.2.1.2.4.2 Der FOX 2-Test	84
5.1.2.1.2.4.3 HPLC-Analytik	85

	III
5.1.2.1.2.4.4 MS-Analytik	85
5.1.2.1.2.4.5 Die TMPD-Methode	86
5.1.2.1.2.4.6 UV/Vis-Spektroskopie	86
5.1.2.2 Zusammenfassung der Substrateigenschaften	88
<b>5.2 UNTERSUCHUNGEN AN DER 5-LOX .....</b>	<b>90</b>
<b>5.3 ALLGEMEINE STABILITÄT DER VERBINDUNGEN.....</b>	<b>92</b>
<b><u>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>98</u></b>
<b><u>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>100</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

AA	arachidonic acid; Arachidonsäure: 5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)-Eicosatetraensäure
$\alpha$	Faktor vor $K_i$ für den Angriff von I am ES-Komplex
B	Hill-Koeffizient (auch $n_H$ )
ber.	berechnet
$\beta$	Faktor vor $k_{cat}$ bei einer partiellen Hemmung
BHT	3,5-Di-tert.-butyl-4-hydroxytoluen
CD	Cirkular-Dichroismus
CE	Kapillar-Elektrophorese
COX	Cyclooxygenase
Cyt P450	Cytochrom P450
$D_a/D_b$	notwendige Dosis des Inhibitors A bzw. B zur Erzielung eines definierten Effektes
$d_a/d_b$	isoeffektive Dosiskombination der beiden Inhibitoren A und B
DC	Dünnschichtchromatographie
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPNP	Diphenylnaphthylphosphin
DPNPO	Diphenylnaphthylphosphinoxid
E; [E]	Enzym; Enzymkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ESI	Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex
ESR	Elektronenspinresonanz (-Spektroskopie)
ETYA	eicosatetraynoic acid; 5,8,11,14-Eicosatetraensäure
FABP	fatty acid binding protein; Fettsäure-bindendes Protein
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
FOX	ferrous oxidation (with) xylenol orange
Fp	Schmelzpunkt
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HPODE	Hydroperoxy-9,11-octadecadiensäure

I; [I]	Inhibitor; Inhibitorkonzentration
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymaktivität zu 50 % gehemmt ist
K	empirische Konstante der Gleichungen 16 bis 18
K'	zusammengesetzte Konstante der Hill-Gleichung, welche nicht nur die Substrataffinität sondern auch den Interaktionsindex zwischen mehreren Bindungsstellen beschreibt
k	Geschwindigkeitskonstante(n)
k <sub>cat</sub>	katalytische Konstante
k <sub>cat</sub> '	= β x k <sub>cat</sub>
K <sub>i</sub>	(thermodynamische) Inhibitionskonstante für EI bzw. ESI
K <sub>i</sub> '	= α x K <sub>i</sub>
K <sub>iapp</sub>	scheinbare (thermodynamische) Inhibitionskonstante
k <sub>inact</sub>	(kinetische) Inaktivierungskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
k <sub>obs</sub>	scheinbare (kinetische) Inaktivierungskonstante 1. Ordnung
k <sub>off</sub>	Zerfallskonstante für den Zerfall eines Enzym-Inhibitor-Komplexes in aktives Enzym
k <sub>Zerf</sub>	Zerfallskonstante des Inhibitors
LA	linoleic acid; Linolsäure: 9(Z),12(Z)-Octadecadiensäure
LDL	low density lipoprotein
λ <sub>Em</sub>	Emissionswellenlänge
λ <sub>Ex</sub>	Anregungswellenlänge
L-1	Lipoxygenase-1 der Sojabohne
LOG-Wert	= log 1/IC <sub>50</sub> (= pIC <sub>50</sub> )
LOX	Lipoxygenase(n)
LT	Leukotrien(e)
LX	Lipoxin(e)
[M] <sup>+</sup>	Molpeak
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
m/z	Massenzahl (Masse/Ionenladung)
NDGA	Nordihydroguajaretsäure
NMR	nuclear magnetic resonance (spectroscopy)
NSAIDs	nonsteroidal antiinflammatory drugs
OA	oleic acid; Ölsäure: 9(Z)-Octadecensäure
P; [P]	Reaktionsprodukt; Produktkonzentration
PG	Prostaglandin(e)
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>

R	Regressionskoeffizient
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography
S; [S]	Substrat; Substratkonzentration
SD	Standardabweichung
$\sigma$	Quotient: $S/K_m$
SRS-A	slow reacting substance of anaphylaxis
t	Zeit; Inkubationsdauer
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-p-phenylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Thromboxan(e)
v	Reaktionsgeschwindigkeit
$v_i$	Initialgeschwindigkeit
$v_s$	steady state-Geschwindigkeit
$v_0$	Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion
$v_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Z	Interaktionsindex



# 1. Einleitung

Arachidonsäure ist der Precursor einer breiten Anzahl strukturell unterschiedlicher, hoch potenter, bioaktiver Mediatoren - unter anderem der Prostaglandine (PG), Thromboxane (TX), Leukotriene (LT) und Lipoxine (LX). Zusammenfassend werden diese Substanzen auch als Eicosanoide, als Abkömmlinge der Eicosatetraensäure (Arachidonsäure (AA)), bezeichnet. Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Regulation biologischer Systeme steht die Erforschung ihrer Metabolisierung, ihrer Wirkungsweise sowie deren mögliche medikamentöse Beeinflussung nach wie vor im Brennpunkt des Interesses zahlreicher Arbeitsgruppen.

Fettsäuren kommen *in vivo* kaum in freier Form vor sondern sind im Plasma und in der Zelle hauptsächlich in Membranen inkorporiert sowie an bestimmte Proteine gebunden, den fatty acid binding proteins (FABP). [1] Nach Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranlipiden, vor allem durch die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), beginnt die Eicosanoid-Biosynthese im menschlichen Gewebe einerseits über den Cyclooxygenase (COX)-Weg unter Bildung der PG und TX sowie ferner über den Lipoxygenase (LOX)-Weg unter Bildung der LT und LX. [2-4] Zusätzlich zu diesen beiden Hauptwegen ist die Verstoffwechslung der Fettsäuren bzw. deren Metabolite über Cytochrom P450-abhängige Enzyme nachgewiesen worden. [5-8] Alternativ hierzu ist zudem die nichtenzymatische radikalische Oxidation der Fettsäuren zu erwähnen, welche vor allem durch Schwermetalle vermittelt wird. So wurde z.B. über die derartige Bildung von *in vivo* ebenfalls aktiven Isoleukotrienen und Isoprostanen berichtet. Es wird vermutet, daß sie somit auch als Mediatoren der zellulären Antwort auf radikalische Schädigungen fungieren. [9] Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist jedoch hauptsächlich auf die Erforschung bzw. Beeinflussung des Lipoxygenase-Weges gerichtet.

## **1.1 Pathophysiologische Bedeutung der Lipoxygenasen**

Durch die vielfältigen Spezies an fettsäureumsetzenden Enzymen (Cyt P450, COX, LOX, deren Isoformen) und die zellspezifische Verteilung der einzelnen Isoformen und Folgeenzyme ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten an Reaktionswegen, was zu einer großen Anzahl an aktiven Metaboliten führt, welche letztlich aus einem einzigen Precursor hervorgegangen sind. Dies führt mithin zu einer großen Vielfalt an resultierenden Wirkungen und Wechselwirkungen. Ein Teil dieser Metabolite zeigt sogar ganz gegensätzliche physiologische Effekte. [10] So fördert z.B. die TXA<sub>2</sub>-Bildung in Thrombozyten die Plättchenaggregation während das ebenfalls über die COX gebildete PGI<sub>2</sub> einer Thrombozytenaggregation entgegenwirkt. Ebenso besitzen die aus AA via 5-LOX generierten Leukotriene proinflammatorische Aktivitäten, während die daraus gebildeten 15-LOX-Metabolite diese LT-Wirkung offenbar zum Teil antagonisieren. [11-13] In diesem Zusammenhang wurde von Vanderhoek zum ersten Mal darauf hingewiesen, daß ein Sekundärprodukt der 15-LOX, die 15-HETE, direkt die Aktivität der 5-LOX zu hemmen vermag (siehe auch Kapitel 3). [14] Andererseits konnte

wiederum auch nach Hemmung der 5-LOX in humanen Neutrophilen eine verstärkte Aktivität des 15-LOX-Weges beobachtet werden. [15]

Lipoxygenasen sind weit verbreitet in höheren Organismen und wurden bisher in Vertebraten, Algen, Pilzen und höheren Pflanzen nachgewiesen. [16] Die Funktion der LOX-Spezies *in planta* liegt noch weitgehend im Dunkeln. Bekannt ist, daß die pflanzlichen Enzyme unter anderem in die Keimung, das Wachstum, die Seneszenz, die Pathogenabwehr sowie in Wundheilungsprozesse involviert sind. [17-20] Im Gegensatz hierzu ist über die Funktion der tierischen Enzyme derzeit mehr bekannt (siehe folgende Kapitel).

Basierend auf dem Ort des katalysierten Einbaus eines Sauerstoffmoleküls in die Arachidonsäure unterteilt man die große Gruppe der Lipoxygenasen in einzelne Isoformen. Als häufigste Varianten ergeben sich hiernach 5-, 12- und 15-Lipoxygenasen. Im folgenden soll die spezifische Bedeutung der einzelnen humanen LOX-Isoformen kurz zusammengefaßt werden, ohne auf die vielfältigen Wechselwirkungen im einzelnen einzugehen.

### **1.1.1 Pathophysiologische Bedeutung der 5-LOX**

Leukotriene sind als Sekundärprodukte des 5-LOX-Weges für ihre Fähigkeit der sehr potenten Vermittlung der Primärprozesse einer akuten Entzündung sowie von immunologischen Reaktionen bekannt. [21-33] Besonders hervorzuheben sind hierbei die rheumatoide Arthritis, die Gicht, die Psoriasis sowie die Colitis ulcerosa. [34-39] Die Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> werden auch unter dem Oberbegriff slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) zusammengefaßt und sind wichtige Mediatoren des Immunsystems bei hypersensitiven Reaktionen und mitverantwortlich für die dabei auftretende Broncho- und Vasokonstriktion (Asthma bronchiale). [40-47] Ein stimulatorischer Einfluß der 5-LOX bzw. ihrer Produkte auf neurodegenerative Prozesse [48] sowie das Wachstum von Krebszellen [49,50] wird vermutet, gegensätzlich dazu konnte aber auch eine Beteiligung an der Apoptose-Auslösung in Tumorzellen [51] beobachtet werden. 5-LOX werden in Säugetieren vor allem in Neutrophilen exprimiert.

### **1.1.2 Pathophysiologische Bedeutung der 12-LOX**

Auch für die 12-LOX ist eine Beteiligung an der Karzinogenese [52], insbesondere der Metastasierung der Krebszellen [53], nachgewiesen worden, wobei speziell das Verhältnis von 13-HODE zur 15-HETE augenscheinlich von besonderer regulatorischer Bedeutung ist. [54,55] Des weiteren konnte ihre Beteiligung an epithelialen Entzündungen (Psoriasis), neuronaler Degeneration sowie der diabetischen Nephropathie beobachtet werden. [56-59] 12-LOX in Säugetieren werden vornehmlich in Thrombozyten, Leukozyten und Hautzellen exprimiert.

### 1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung der 15-LOX

Obwohl die 15-Lipoxygenase in einer Anzahl verschiedener Säugetierzellen nachgewiesen werden konnte, ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses Enzyms noch nicht völlig geklärt. Die Beteiligung der 15-LOX an immunologischen Reaktionen [60-62], der endothelialen Zellproliferation [63], der Ausreifung von Blutzellen [64-67] sowie der Atherosklerose [68-71] gilt als gesichert. Ihre Beteiligung an der arteriellen Vasokonstriktion und -relaxation [72,73], der Psoriasis [74], sowie an der Entstehung einer Lungenentzündung [75] wird diskutiert.

Das low density lipoprotein (LDL) ist der Haupttransporter des Cholesterols im Blut und erhöhte LDL-Spiegel im Serum sowie die Oxidation des LDL werden in Zusammenhang mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko gebracht. [76,77] Die Oxidation des LDL verstärkt dessen Aufnahme durch arterielle Makrophagen, was in deren Umwandlung in Schaumzellen [78-80] sowie letztlich in der Genese atherosklerotischer Läsionen resultiert. [81-83] Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen zeigen, daß die 15-LOX diesen Oxidationsprozeß initiiert. [84-87] Eine Hemmung dieses Enzyms sollte demzufolge eine Ausbreitung der Atherosklerose verhindern. [88] Die Säuger-15-LOX wird vorwiegend in Retikulozyten gefunden.

## 2. Zielstellung der Arbeit

Aufgrund der soeben geschilderten pathophysiologischen Bedeutung des Lipoxygenase-Weges und einer sich daraus ableitenden potentiellen medikamentösen Beeinflussung bedarf die intensive Suche nach weiteren potenten LOX-Inhibitoren keiner weiteren Erklärung. Dabei ist das Auffinden neuer Leitstrukturen in der Regel erst der Anfang. Hieran schließt sich nahtlos die exakte Charakterisierung der Verbindungen bezüglich der Interaktion mit dem Target-Enzym an. Einerseits sind derartige mechanistische Untersuchungen Voraussetzung zu einer üblicherweise nachfolgenden Strukturoptimierung der Inhibitoren. Andererseits sind durch die Kenntnis des Wirkmechanismus oftmals auch erste Aussagen bezüglich der Selektivität der Enzymhemmung bzw. potentieller Nebenwirkungen sowie weiterhin zu möglichen Interaktionen mit anderen Pharmaka möglich. Nicht zuletzt ist durch die genaue Kenntnis des Wirkortes der Verbindungen auch eine weitergehende biochemische Charakterisierung des Targetenzym möglich [89], was gerade im viel diskutierten Bereich der Oxygenierung von Fettsäuren von großer Bedeutung sein dürfte.

Eine Vielzahl verschiedener Arylhydrazone, Arylhydrazine und Aryldiazine [290,348,349] sowie auch die entsprechenden Amidrazone [90] sind als potente Inhibitoren von pflanzlichen als auch tierischen Lipoxygenasen mit  $IC_{50}$ -Werten im mikromolaren Konzentrationsbereich bekannt. Zielstellung dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Inaktivierungsmechanismus von Lipoxygenasen durch Amidrazon-Derivate anhand einer pflanzlichen 15-Lipoxygenase. Exemplarisch sollen die derart gewonnenen Erkenntnisse an einer pflanzlichen 5-LOX überprüft werden. Anhand der eigenen Untersuchungen soll analysiert werden, inwieweit ein für Phenylhydrazone postulierter Suizidmechanismus auf die Klasse der

Amidrazone extrapoliert werden kann. In diesem Zusammenhang soll im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, ob sich Oxidationsprodukte der Verbindungen auf enzymatischem als auch auf nichtenzymatischem Wege herstellen und näher charakterisieren lassen.

## 3. Theoretische Vorbetrachtungen

### 3.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind große einsträngige, eisenhaltige Proteine, welche molekularen Sauerstoff zur gezielten Dioxygenierung von Fettsäuren benutzen. Zusätzlich zu den natürlichen Substraten, Linolsäure resp. Arachidonsäure, wird oftmals eine Vielzahl weiterer mehrfach ungesättigter Strukturen als Substrat akzeptiert, wobei mindestens eine der beteiligten Doppelbindungen in der cis-Form vorliegen muß. [91] Das Eisenion als prosthetische Gruppe, welches in der aktiven Enzymspezies in der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form vorliegt, ist im Enzymmolekül weder über ein Häm noch über Eisen-Schwefel-Brücken gebunden, sondern wird überwiegend über Histidinreste komplexiert. Anhand der L-1 aus Sojabohnen konnte gezeigt werden, daß das Eisen als high-spin-Fe-Komplex vorliegt. [92-94] Als besonderes Phänomen bezüglich der prosthetischen Gruppe wurde kürzlich auch eine Mn-haltige LOX beschrieben. [95]

Die Sequenzen von mehr als fünfzig verschiedenen Lipoxygenasen sind beschrieben worden. Die Größe der resultierenden Proteine reicht dabei von 661 AS (Erythrozyten-15-LOX aus Kaninchen) bis 923 AS (Reis-Lipoxygenase-2). Die Lipoxygenasen pflanzlicher Herkunft sind dabei im allgemeinen um etwa 150 bis 200 AS länger als die tierischen Exemplare. Die größten Sequenzhomologien zwischen pflanzlichen und tierischen Lipoxygenasen gibt es dabei in der C-terminalen Region. [96,97]

Das bei Tieren häufigste Substrat ist Arachidonsäure (5(Z),8(Z),11(Z),14(Z)-Eicosatetraensäure). Sie wird dabei zu verschiedenen Regioisomeren umgesetzt, wobei die entsprechenden 5-, 8-, 11-, 12- oder 15-Hydroperoxide entstehen. Die gebildeten Peroxide liegen nahezu ausnahmslos in der S-Form vor. R-Enantiomere bildende Lipoxygenasen werden hingegen in einigen niederen marinen Organismen (z.B. Korallen) exprimiert [98,99], allerdings wurde erst kürzlich auch in Säugetieren eine LOX entdeckt, welche hauptsächlich die R-Formen der Fettsäurehydroperoxide bildet. [100,101]

Dementsprechend basiert die allgemeine Nomenklatur der Lipoxygenasen, wie oben bereits erwähnt, auf ihrer Positionsspezifität, d.h. an welchem C-Atom des Fettsäuremoleküls, bezogen auf Arachidonsäure, eine Dioxygenierung stattfindet. Somit ergeben sich als häufigste Varianten die 5-, 12- und 15-Lipoxygenasen. [102] Weiterhin wurde aber auch über die Existenz von 8-LOX [103,104], 9-LOX [105] sowie 11-LOX [106] berichtet. Je nach Herkunft werden diese einzelnen Isoenzyme nochmalig unterteilt. So wird z.B. die humane 12-LOX in einen Thrombozyten- und einen Leukozyten-Typ differenziert. In Mäusen wurde zusätzlich noch eine weitere Isoform in der Haut lokalisiert. [107,108] In ähnlicher Weise unterteilt man auch die 15-LOX in einen Retikulozyten- sowie in einen epidermalen Typ. [109,110] Daneben wird eine 15-LOX-Isoform noch in Eosinophilen und Makrophagen exprimiert. Die 5-LOX

kommt vorwiegend in Leukozyten vor. Durch den gemeinsamen Angriff der 5- und 15- bzw. 12-Lipoxygenase entsteht mit der resultierenden Trihydroxytetraenstruktur die Verbindungsklasse der Lipoxine (lipoxygenase interaction products). [111-113]

In Pflanzen werden Lipoxygenasen ebenfalls nach diesem System eingeteilt. Da hier jedoch nicht Arachidonsäure sondern Linol- sowie  $\alpha$ -Linolensäure die häufigsten Substrate darstellen, werden sie oftmals auch nach den daraus entstehenden 9- bzw. 13-Regioisomeren benannt. Verallgemeinernd legt man gleichwohl die Spezifität bezüglich der Arachidonsäure zugrunde. Eine pflanzliche 13-Lipoxygenase ist also in bezug auf die Arachidonsäure eine 15-LOX. Allerdings ist diese Art der Einteilung unter Umständen für einige Enzyme nicht eindeutig, da die Regiospezifität der Enzyme mitunter vom pH-Milieu und auch anderen äußeren Bedingungen abhängig sein kann. Für pflanzliche Enzyme wurde deshalb noch eine neuere Einteilung vorgeschlagen, die auf Homologien ihrer cDNA-Sequenzen basiert. So unterscheidet man hier Enzyme ohne (LOX 1-Typ) und mit (LOX 2-Typ) chloroplastidärem Transitpeptid. [114,115] Eine dritte mögliche Einteilung der verschiedenen Enzyme ist die nach der Art des intrazellulären Vorkommens. So unterteilt man Lipoxygenasen vereinzelt auch in lösliche Proteine, die ihrer Funktion z.B. im Zytosol nachkommen, sowie in solche, die an Membranen gebunden ihre katalytische Wirkung entfalten. [96,115]

Seit der Entdeckung und Charakterisierung der Lipoxygenasen nahm man an, daß ihre natürlichen Substrate ausschließlich freie ungesättigte Fettsäuren darstellen. Erst seit einigen Jahren ist bekannt, daß auch eine Umsetzung von Phospholipiden oder Triacylglycerol durch einige dieser Enzyme möglich ist (siehe Kapitel 3.1.4).

### **3.1.1 Die Sojabohnen-15-Lipoxygenase-1 (L-1)**

Die 839 Aminosäurereste der L-1 (MG: 94038) [116] sind in zwei ungleich großen Domänen organisiert: die 146 N-terminalen AS bilden die kleinere Domäne I, die restlichen 693 C-terminalen AS bilden die größere Domäne II. Die Domäne I besteht nahezu ausschließlich aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, deren Zentrum dicht gepackt ist mit hydrophoben, oftmals aromatischen Seitenketten. Die Funktion der N-terminalen Domäne ist bis dato unbekannt. Vormalig wurde angenommen, daß dieser N-Terminus ein Charakteristikum pflanzlicher Lipoxygenasen sei. Diese Domäne besitzt trotz fehlender Sequenzhomologie große räumliche Ähnlichkeit zur humanen Pankreas-Lipase und ist relativ separiert von der zweiten Domäne. Im Zentrum der größeren zweiten Domäne befindet sich das katalytisch wichtige Eisenion. Diese Domäne besteht vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices sowie zwei separaten  $\pi$ -Helices.  $\pi$ -Helices natürlichen Ursprungs, welche durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen den Resten  $i$  und  $i+5$  anstelle zwischen  $i$  und  $i+4$  gekennzeichnet sind, sind relativ selten. Nur eine geringe Anzahl dieser Strukturen konnte bisher gefunden werden. Drei Aminosäuren dieser  $\pi$ -Helices fungieren als Eisen-Liganden: die Histidine 499, 504 und 690. Der vierte Ligand wird durch den Carboxy-Terminus der Proteinkette gebildet: Isoleucin 839. Als Kandidaten für die beiden weiteren unbesetzten Positionen werden Asparagin 694 sowie ein Wassermolekül vermutet, obwohl deren Entfernung in der

Röntgenstruktur zum Zentralion eigentlich zu groß für eine Bindung ist (2,7 bzw. 3,3 Å). [117-119] Insgesamt ist die Struktur des Eisen-Komplexes des aktiven Zentrums der Lipoxygenasen relativ flexibel. [120,121] Verschiedene Studien lassen vermuten, daß während des katalytischen Kreislaufs ein Ligand durch einen exogenen Liganden ersetzt wird, die Koordination um das Zentralion sich also währenddessen ändert. [122]

Das zentrale Eisenion des Enzyms ist durch zwei langgestreckte hydrophobe Gänge mit der Oberfläche des Moleküls verbunden. Der erste Tunnel ist etwa 18 Å lang, 2 bis 8 Å breit und vornehmlich durch die Seitenketten hydrophober Aminosäuren ausgekleidet. Dieser Tunnel wird als der vermeintliche Zutrittsweg für das benötigte Sauerstoffmolekül betrachtet, da er direkt zu einer unbesetzten Position bzw. der Position des Wassermoleküls am Zentralion führt. Es wird vermutet, daß mit der Überführung des Eisenions in die aktive  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form hieraus ein Hydroxydion generiert wird, welches möglicherweise als Base zur Substrataktivierung dient (siehe Kapitel 3.1.3). [123] Der zweite Tunnel, welcher ebenfalls durch hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren ausgekleidet ist, wird als Schauplatz der katalytischen Reaktion vermutet, da auch er sehr dicht an das Eisenion heranführt, wobei hier eine Passage eines Fettsäuresubstrates nicht ohne Neuordnung verschiedener AS-Reste, welche diesen Gang blockieren, denkbar ist. Eine große Anzahl der diese Gänge auskleidenden Aminosäuren ist in allen bisher bekannten Lipoxygenasen hoch konserviert. [124]

Die Tatsachen, daß die Lipoxygenasen aus Säugetieren in aller Regel kürzer als deren pflanzliche Varianten sind sowie daß besonders in der N-terminalen Region große Unterschiede in der Primärstruktur bestehen, veranlaßten zunächst einige Arbeitsgruppen zu der Vermutung, daß die kleine N-terminale Region (Domäne I bei der L-1) bei den Säuger-LOX nicht vertreten ist. [96] Wenig später wurde jedoch die Kristallstruktur einer 15-LOX aus Kaninchen veröffentlicht, in der diese charakteristische N-terminale Region ebenfalls vorkommt, was die obige Annahme widerlegt. [125]

Für die menschliche 5-LOX ist eine Aktivierung durch eine Calcium-vermittelte Translokation an intrazelluläre Membranen sowie nachfolgend die Ausbildung eines ternären Komplexes mit dem „5-lipoxygenase activating protein“ (FLAP) und der  $\text{PLA}_2$  beschrieben worden. Auch für andere Lipoxygenasen ist eine Bindung an Membranen beschrieben worden. [126] Im Unterschied zur 5-LOX ist die L-1 der Sojabohne jedoch nicht auf weitere Cofaktoren angewiesen. Vor der Entdeckung der zentralen Rolle des Eisenions wurde nach einer vergleichbaren Funktion für Calciumionen gesucht. Doch diese bewirkten oftmals ganz gegensätzliche Effekte. So wurden durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowohl aktivierende als auch hemmende Effekte auf Lipoxygenasen beobachtet. [127-130] Für die L-1 ist durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein biphasischer Effekt auf Aktivität und Proteinstruktur beobachtet worden. [131-133] Ebenso konnte eine durch Calciumionen vermittelte Membranbindung ausgelöst werden. [126,132] Interessanterweise wird auch die Lipoxygenase-Aktivität von Cytochrom c, einem Häm-haltigen Enzym, unter dem Einfluß von Calcium-Ionen gesteigert. [134] Weiterhin aktivieren ATP und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen die 5-LOX. [135] Die Annahme, daß es sich bei Pyrrolochinolinchinon (PQQ) um einen weiteren Cofaktor der L-1 handelt [136], wurde jedoch nicht bestätigt. [102] Weiterhin wurde berichtet, daß zahlreiche Anionen und Kationen einen Einfluß auf die Aktivität sowie Stabilität bzw. Struktur des Proteins haben, was bei der

Auswahl des entsprechenden Puffermilieus von Bedeutung ist. [137] Das pH-Optimum der Katalyse liegt bei etwa 8,5 bis 9,5. Die L-1 besitzt eine recht breite Substratspezifität (siehe auch Kapitel 3.1.4), der  $K_m$ -Wert für LA beträgt ca. 20  $\mu\text{M}$  (wobei die in der Literatur angegebenen Werte sich im Bereich von etwa 10 bis 65  $\mu\text{M}$  befinden).

Die L-1 wurde und wird oft als Modell für andere LOX-Arten zu Untersuchungen herangezogen. Der Grund dafür liegt vor allem darin, daß das Protein relativ einfach zu isolieren ist und aufgrund des relativ hohen Masseanteils in der Sojabohne in größeren Mengen verfügbar ist, was summa summarum in einen erschwinglichen Preis resultiert. Zusätzlich ist es gelungen, das Enzym in Bakterien zu exprimieren. Überdies ist die L-1 auch noch ausreichend stabil, was gerade für das verwendete Testsystem bei erhöhter Temperatur (37 °C) von besonderer Bedeutung ist. So besitzt die L-1 bei 60 °C bezüglich ihrer Aktivität noch immer eine Halbwertszeit von etwa 30 Minuten. [138]

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Lipoxygenasen, vor allem hinsichtlich der eisenbindenden Region, werden viele Untersuchungen an der L-1 unternommen. [139] Basierend auf der bekannten Struktur der L-1 wurde versucht, Modelle der humanen LOX-Isoenzyme zu erstellen. [140,141] Man nimmt an, daß viele der damit gewonnenen Ergebnisse, z.B. bezüglich des Reaktionsmechanismus oder einzelner Inhibitoren, zumindest qualitativ auf andere LOX-Spezies übertragbar sind. [142,233,286]

### **3.1.2 Die Kartoffel-5-Lipoxygenase**

Dieses Enzym (MG ca. 97000) ist im Gegensatz zur eben beschriebenen L-1 der Sojabohne von wesentlich geringerer Stabilität (laut Herstellerangaben als Konzentrat weniger als 6 Monate bei -80 °C lagerfähig). Es besitzt eine relativ enge Substratspezifität. So akzeptiert es lediglich Linolsäure, Linolensäure sowie Arachidonsäure, wobei LA das beste Substrat (bezüglich der Umsetzungsgeschwindigkeit) abgibt. Der  $K_m$ -Wert für LA liegt bei 4  $\mu\text{M}$  und die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist dabei im Vergleich zur AA etwa doppelt so hoch. [143] Neben den freien Fettsäuren werden mit geringerer Geschwindigkeit auch Fettsäureester und die entsprechenden Alkohole umgesetzt. [144]

Aus LA entsteht durch die katalytische Umsetzung nahezu ausschließlich 9-HPODE, während bei Verwendung von AA als Substrat vorzugsweise 5-HPETE gebildet wird, daneben aber auch noch in beträchtlichen Mengen die 8-, 9-, 12- und 15-Isomere entstehen. Das pH-Optimum der katalysierten Reaktion liegt hier nicht im alkalischen Milieu, sondern bei einem pH-Wert von 6,3. [145,146]

### **3.1.3 Der Mechanismus der Fettsäureoxidation**

Nach der Isolation aus Sojabohnen liegt die L-1 in der inaktiven, farblosen, high-spin  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form vor und wird vor Beginn der eigentlichen Katalyse durch ein Äquivalent Fettsäure-Hydroperoxid in die aktive, leicht gelb gefärbte, high-spin  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form (yellow species) mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 330

nm überführt. [147-149] Die Gelbfärbung der aktiven L-1 wird auf einen Charge-Transfer-Komplex zwischen einem Imidazol-Liganden und dem Fe<sup>III</sup>-Ion zurückgeführt.

Die Art der Produktaktivierung der Lipoxygenase-Reaktion wird in der Literatur auf zwei unterschiedlichen Wegen erklärt. Ursprünglich wurde vermutet, daß dieser Prozeß auf die notwendige Oxidation der Fe<sup>II</sup>- zur aktiven Fe<sup>III</sup>-Form durch 13-HPODE zurückzuführen ist. [150] Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß das Substrat-Peroxid während dieser Aktivierung chemisch nicht verändert wird. [151] Andere Untersuchungen lassen auch auf die Existenz mehrerer Bindungsstellen für das Substrat bzw. Produkt schließen, wodurch sowohl Substrat- als auch Produkthemmung bzw. Produktaktivierung erklärt werden könnten. [152,153] Neben der katalytisch wichtigen wird also zumindest eine weitere regulatorische Bindungsstelle vermutet (siehe auch Kapitel 5.1.1.12). Der aktivierende Effekt durch das Produkt der katalytischen Reaktion - wodurch auch immer ausgelöst - ist auf jeden Fall recht spezifisch: einfache organische Hydroperoxide sind wenig effektiv [154], wobei jedoch ein Jahrzehnt später festgestellt werden konnte, daß auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selbst zur Aktivierung der L-1 in vergleichbarem Ausmaß befähigt ist. [155] Des Weiteren ist bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit der Produktaktivierung eine Sättigungskinetik zu beobachten, was nahe legt, daß diesem Prozeß nicht nur eine simple Elektronenübertragung sondern eine spezifische Bindungsinteraktion zwischen Peroxid und Protein zugrunde liegt. Die initiale ausgeprägte lag-Phase der Produktbildungskurven wird auf diese notwendige Produktaktivierung zurückgeführt.

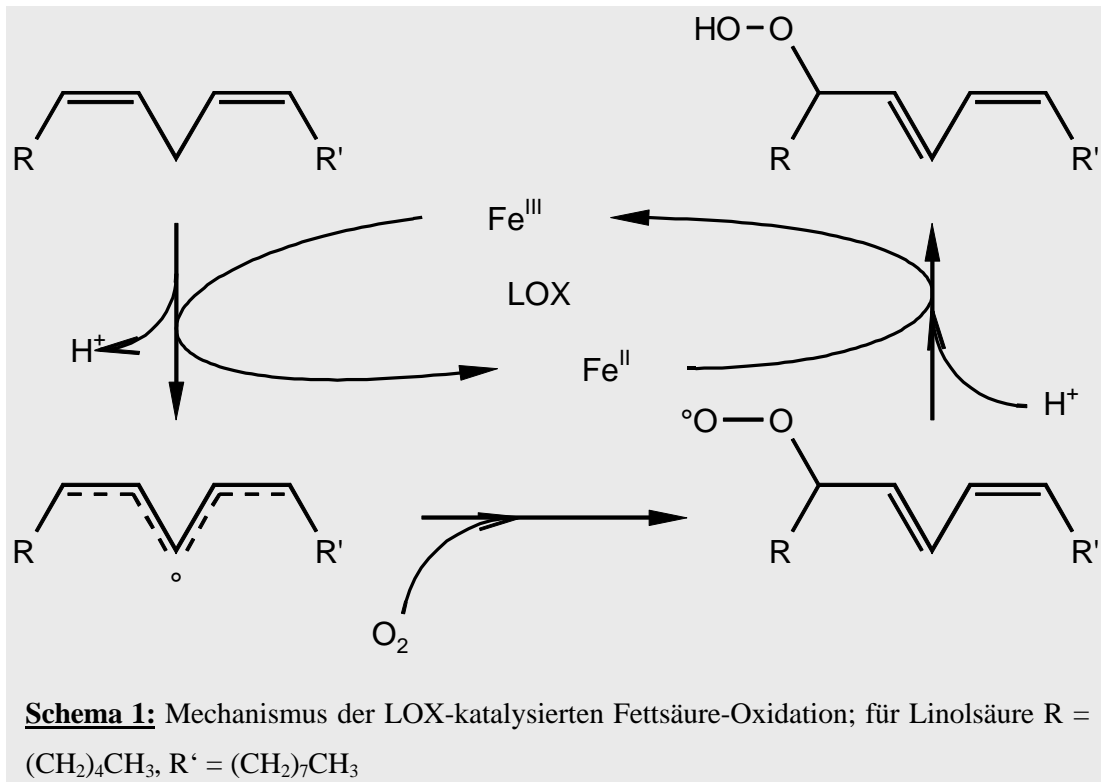
In diesem Zusammenhang ist die Ausbildung eines neuen, rot gefärbten Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 585 nm nach Zugabe überäquimolarer Mengen an 13-HPODE zur L-1 von großem Interesse. Die Rotfärbung der Lösung wird auf die Ausbildung eines spezifischen Peroxid-Fe<sup>III</sup>-charge-transfer-Komplexes zurückgeführt (purple species). [156-158] Im Vergleich hierzu verursacht 9-HPODE keine derartige Rotfärbung. [159]

Der detaillierte Mechanismus der LOX-katalysierten Reaktion ist gegenwärtig noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Zwei allgemeine Mechanismen wurden diesbezüglich postuliert und mit einer umfangreichen Anzahl an Daten untermauert: 1. der Carbanionmechanismus, 2. der Radikalmechanismus. [160]

Beim ersteren kommt es zur Ausbildung einer  $\sigma$ -Bindung zwischen dem Fe<sup>III</sup>-Ion und einem nach Protonenabstraktion resultierenden Carbanion. Nach Insertion von O<sub>2</sub> in diese Fe-C-Bindung entsteht daraus das Fettsäure-Hydroperoxid. Auf diese Weise könnte sehr anschaulich die Regio- und Stereospezifität der einzelnen Enzyme erklärt werden. [161]

Die Mehrzahl der Daten spricht jedoch für einen Radikalmechanismus. So konnte z.B. gezeigt werden, daß die L-1 in der Lage ist, Linolsäure bzw. Arachidonsäure auch in Abwesenheit von O<sub>2</sub> zum Allylradikal zu oxidieren, was für einen primären Radikalmechanismus spricht. Ergänzend hierzu wurde ebenso beobachtet, daß unter anaeroben Bedingungen durch Linolsäure die aktive Enzymspezies zur Fe<sup>II</sup>-Form reduziert wird. [162,163] Der folgende radikalische Mechanismus gilt gegenwärtig als allgemein anerkannt (Schema 1):





Während der initialen regio- und stereospezifischen Eliminierung eines Protons von der bis-Allylstellung der Fettsäure kommt es zur Bildung des Pentadienylradikals. Durch die Verwendung deuterierter Linolsäure konnte ein ungewöhnlich hoher primärer kinetischer Isotopeneffekt beobachtet werden ( $^D[k_{\text{cat}}/K_m] \approx 80$ ). [164-166] Unterhalb von 32 °C wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Substratumsetzung durch die L-1 durch Diffusionsprozesse, durch Isotopeneffekte des Lösungsmittels sowie durch die H-Abstraktion definiert. Oberhalb von 32 °C ist die Geschwindigkeit der Oxygenierung vollständig durch die H-Abstraktion limitiert. [167,168] Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch die humane 15-LOX einen hohen kinetischen Isotopeneffekt ( $\approx 60$ ) aufweist. [169]

Der kinetische Isotopeneffekt wird in Zusammenhang mit einem sogenannten Tunneleffekt des übertragenen Wasserstoffs und, übertragen auf die thermodynamischen Aspekte der Reaktion, mit der sehr niedrigen Aktivierungsenergie der Reaktion gebracht (siehe auch Kapitel 5.1.1.11). [170-172] Ein Tunneleffekt ist der quantenmechanische Transfer eines H-Atoms durch (statt über) die Energiebarriere einer Reaktion. Parallel zu diesem Protonen-Transfer wird ein Elektron auf das Eisenion der L-1 übertragen. Ein intermediäres Tyrosyl-Radikal spielt hierbei im Gegensatz zur COX [173] als Überträger jedoch keine Rolle. Des weiteren wurde durch Deuterierung der Vinylprotonen der Linolsäure ein sekundärer Isotopeneffekt beobachtet, was nahe legt, daß das entstehende Radikal oder Anion über mindestens eine der beteiligten Doppelbindungen delokalisiert ist. [174] Dieser Mechanismus ist somit der Autoxidation der Fettsäuren sehr ähnlich. [175,176]

Über die Ursachen der Positionsspezifität der einzelnen Lipoxygenasen beherrschen gegenwärtig zwei konträre Ansichten die Diskussion: die Theorie der einheitlichen Substratorientierung (single orientation theory) sowie die der inversen Substratorientierung (inverse orientation hypothesis). [177,178]

Schon vor etwa einem Jahrzehnt wurde beobachtet, daß durch den Austausch einer großvolumigen Aminosäure in der vermuteten Substratbindungstasche gegen einen etwas kleineren Rest eine Verschiebung der Positionsspezifität von einer 15- zur 12-Lipoxygenierung auftritt. [179,180] Ähnliche Mutationsversuche etwas später unterstützten diesen Ansatz. Ursprünglich wurde vermutet, daß das Fettsäure-Substrat in allen LOX-Spezies in gleicher Weise ins aktive Zentrum des jeweiligen Enzyms mit dem Methylterminus zuerst hinein penetriert. Die unterschiedliche Positionsspezifität der einzelnen Isoenzyme entstünde dann durch das unterschiedliche Volumen der Substratbindungstasche, wird also dadurch determiniert, daß bestimmte großvolumige Aminosäuren in der Substratbindungstasche das Eindringen der Fettsäure in diese nur bis zu einem bestimmten Grad erlauben. In Abhängigkeit von der Position dieses voluminösen Restes besitzen die einzelnen Enzyme dadurch eine unterschiedlich große Substratbindungstasche und damit eine verschiedene Positionsspezifität. [181]

Der zweiten Theorie zufolge trifft dies ebenso auf die 12- bzw. 15-LOX zu. Auch hierbei soll die Fettsäure mit dem Methylterminus voran in die Substratbindungstasche penetrieren. Zur Erklärung der 5-LOX-Spezifität wurde hingegen angenommen, daß diese lediglich durch eine inverse Substratorientierung entstehen kann. Die jeweilige Fettsäure müßte also mit dem Carboxyl-Terminus zuerst in die Bindungstasche penetrieren. Ein starkes Argument gegen diese These ist auf jeden Fall die durch die Einführung der negativ geladenen Carboxylgruppe in die hydrophobe Umgebung der Substratbindungsstelle hierbei zu überwindende hohe Energiebarriere (12-30 kJ/mol). [182-184] Diese Energiebarriere sollte jedoch durch einen am Boden der Tasche befindlichen positiv geladenen Aminosäurerest stark reduziert werden. Durch entsprechende Mutationsversuche an der Gurken-13-LOX, in denen durch Ersatz eines voluminösen Histidin-Restes gegen ein weniger raumfüllendes Valin eine dahinter befindliche Guanidin-Gruppe demaskiert wurde, konnte diese Möglichkeit prinzipiell aufgezeigt werden. [185,186] Methylierung der Carboxylgruppe des Substrates verbesserte teilweise dessen Umsetzung in 5-Position durch das Enzym, was ebenso für die Möglichkeit einer inversen Substratorientierung spricht. [187]

In der entstehenden radikalischen Zwischenstufe sollte die Elektronendichte über das gesamte Pentadiensystem delokalisiert sein, was eine mehr oder weniger planare Struktur des Intermediates erfordert. Andererseits sprechen später erhaltene experimentelle Daten eher dafür, daß die Ausbildung eines planaren Pentadienylradikals in der Bindungstasche des Enzyms sterisch gehindert ist und eine Delokalisation lediglich über das halbe Pentadiensystem möglich ist, gegebenenfalls auch unter Ausbildung eines  $O_2$ -überbrückten (9,10,11)-Allylradikals. Für den Fall der 13-Oxygenierung der L-1 durch die L-1 bedeutet dies eine Elektronendelokalisation lediglich zwischen C-9 und C-11. [188]

Letztendlich kommt es zur antarafacialen Einlagerung von molekularem Sauerstoff an der [+2]- oder [-2]-Position bezüglich der vorangegangenen Protonenabstraktion unter Ausbildung eines Peroxo-fettsäureradikals, vornehmlich in der (S)-Form. Gleichwohl ist es gegenwärtig noch unklar, durch welche sterischen Faktoren genau die Bildung der 13(S)-Form favorisiert wird.

Der nächste noch ungeklärte Punkt in dieser Hinsicht ist der Mechanismus der Sauerstoffeinlagerung ins Molekül. Der Eisen-Cofaktor in Oxygenasen ist oftmals notwendig zur Aktivierung des molekularen

Sauerstoffs in der enzymatischen Reaktion. Es wurde somit zuerst auch davon ausgegangen, daß das  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Ion der inaktiven Enzymform direkt an der  $\text{O}_2$ -Bindung beteiligt ist. Später konnte jedoch festgestellt werden, daß die native  $(\text{Fe}^{\text{II}})\text{L-1}$  gar nicht in der Lage ist, Sauerstoff zu binden. [189] Bisher konnte auch noch keinerlei Beweis für eine spezifische  $\text{O}_2$ -Bindungsstelle im LOX-Molekül erbracht werden. Es wird im Gegenteil allgemein eher davon ausgegangen, daß der Sauerstoffzutritt erst nach erfolgter Protonenabstraktion und Elektronenübertragung diffusionskontrolliert erfolgt und keine eigene Bindungsstelle dafür im Enzymmolekül existiert. [190]

Ursprünglich wurde vermutet, daß atmosphärischer Sauerstoff bei der L-1 durch einen hydrophoben, ca. 18 Å langen und am Ende etwa 2,5 Å breiten Tunnel zum Eisenion diffundiert. Kürzlich erhaltene Röntgendaten ergaben jedoch, daß dies nicht ohne grundlegende Verschiebungen diverser AS-Reste entlang der Tunneloberfläche möglich ist. Statt dessen ist es durchaus vorstellbar, daß  $\text{O}_2$  ebenfalls durch den angenommenen Fettsäurekanal zum Reaktionsort findet. Der zweite Kanal hat möglicherweise Bedeutung als allosterische Bindungsstelle für das Substrat oder das Produkt. [191,192] Sowohl Substrat- als auch Produkthemmung sind für LOX-katalysierte Reaktionen beschrieben worden. [153]

### **3.1.4 Weitere Aktivitäten von Lipoxygenasen**

Für nahezu alle bisher bekannten Lipoxygenasen sind zusätzlich zur Dioxygenierung freier Fettsäuren noch weitere Reaktionen beobachtet worden, die durch diese Enzyme katalysiert werden. Hierzu zählen unter anderem:

- ☞ Dioxygenierungsreaktion an anderer Stelle des Fettsäuremoleküls, was teilweise abhängig von Temperatur und pH-Wert [193-195], aber auch z.B. von der Struktur des Substrates ist. [196-198]  
So ist der produzierte Anteil an 9-HPODE durch die L-1 bei 25 °C und pH 9 etwa 5 %. Dieser Anteil kann aber wesentlich gesteigert werden durch Verschiebung des pH-Wertes des Mediums ins schwach saure Milieu oder aber durch Zusatz bestimmter Zucker oder Polyole, was auf hierdurch ausgelöste geringfügige Konformationsänderungen im Enzymmolekül zurückgeführt wird. [199,200]  
Weiterhin hat auch die  $\text{O}_2$ -Konzentration des Mediums einen wesentlichen Einfluß auf die Regiospezifität der Katalyse. So ist bei niedrigem  $\text{O}_2$ -Gehalt ( $< 5 \mu\text{M}$ ) der Anteil an 9-HPODE nahezu 50 %; [201]
- ☞ Mehrfache Dioxygenierungen am gleichen Fettsäuremolekül, was ebenfalls zum Teil abhängig von Temperatur und pH-Wert ist;
- ☞ Umsetzung veresterter Fettsäuren sowie die Umsetzung von komplexen Substraten wie Phospholipiden bzw. membranär inkorporierten Lipiden, was vor allem für 15-LOX beschrieben wurde; [202-207] Oxidation von Fettsäureamiden; [208] Umsetzung von langkettigen Aldehyden; [209]
- ☞ Epoxid- sowie Ketodien-Bildung aus dem primären Hydroperoxy-Produkt,  $\text{LTA}_4$ -Bildung; [210]
- ☞ C-C-Spaltung des primären Hydroperoxy-Produktes zum Aldehyd und Alkan; [211,212]

- ☞ Hydroperoxidase- bzw. Co-Oxidase-Aktivität, welche vor allem bei Sauerstoff- oder Fettsäure-Mangel zum Tragen kommt. Einige Lipoxygenasen besitzen diese Aktivität auch bei normalem Sauerstoffpartialdruck, so z.B. die L-2 aus Sojabohnen oder eine LOX aus Erbsen. Zahlreiche Substanzen können als Cosubstrate dieser Reaktion fungieren; [213-216]
- ☞ Glutathion-vermittelte Bildung von Superoxidanion-Radikalen sowie von Singulett-Sauerstoff, was auf eine Beteiligung am oxidativen Streß *in vivo* hinweist. [217-220]

Die Geschwindigkeit dieser Nebenreaktionen ist jedoch wesentlich geringer als die der Dioxygenierung und in der Regel nur unter speziellen Bedingungen beobachtbar, so daß ein daraus eventuell resultierender Mehrverbrauch an O<sub>2</sub> bei der verwendeten polarographischen Meßmethode nicht berücksichtigt werden muß.

### **3.2 Lipoxygenase-Inhibitoren**

Zum besseren Verständnis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen seien an dieser Stelle kurz die wichtigsten Inaktivierungsmechanismen bisher bekannter LOX-Inhibitoren aufgezählt.

#### **3.2.1 Radikalfänger/Redoxinhibitoren**

Aufgrund des radikalischen Charakters der Lipoperoxidation (siehe oben) besteht hier eine wesentliche Angriffsmöglichkeit durch den Einsatz von Antioxidantien. Diese Substanzen können auf einem oder auch mehreren Wegen ihre Wirkung entfalten. Prinzipiell ist schon durch die Reduktion der aktiven Fe<sup>III</sup>-Form der LOX eine Inhibition beobachtbar. Quantitativ ist diese Art der Hemmung allerdings oftmals schlecht erfaßbar, da derartige Inhibitoren sehr anfällig auf Beeinflussungen im Redoxmilieu, wie z.B. Schwankungen im Gehalt an enthaltenen Hydroperoxiden, reagieren. Hinzu kommt noch, daß auch die Auswertung der Produktbildungskurven mit Schwierigkeiten verbunden ist, da eine Inhibition sich hier vor allem in einer Verlängerung der initialen lag-Phase äußert. Je nach angewandeter Auswertungsmethode (Maximalanstieg der Kurve, Produktbildung pro Zeit etc.) kann es dadurch zu stark voneinander abweichenden Resultaten kommen. Im allgemeinen ist die zu erwartende Hemmung vollständig reversibel und eher – in Abhängigkeit vom Hydroperoxidlevel – mäßig stark ausgeprägt. Die antioxidative Aktivität einer Reihe von Substanzen konnte gut mit deren inhibitorischer Potenz an der LOX korreliert werden [212,222], wobei für einige Verbindungsgruppen sich eine ausreichend hohe Lipophilie als günstig bezüglich der LOX-Hemmung erwies. [223-225] Einige Substanzen (z.B. *N,N'*-Dimethylphenylendiamin) bewirken dagegen, trotz der Fähigkeit zur Elektronenübertragung auf das Enzym, kaum eine Inhibition der LOX. [226]

Zusätzlich sind diese Stoffe oftmals auch dazu in der Lage, bereits gebildete Fettsäureradikale unter Bildung eigener resonanzstabilisierter Radikale abzufangen. [227-229] Ferner wurde für einige Inhibitoren (z.B. NDGA) auch noch die sukzessive nichtenzymatische Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet, wodurch das Enzymprotein zusätzlich irreversibel inaktiviert wird. [230] Der Zutritt des NDGA zum

aktiven Zentrum der L-1 erfolgt sehr wahrscheinlich über die Bindungstasche der Linolsäure. [231,232] In der Literatur wird für diesen Naturstoff ein  $IC_{50}$ -Wert von etwa 12  $\mu M$  genannt [233], was in guter Übereinstimmung mit dem unter unseren Testbedingungen ermittelten  $IC_{50}$ -Wert von 8,9  $\mu M$  steht.

Zahlreiche Vertreter der Gruppe der Redoxinhibitoren sind Naturstoffe, wie z.B. Silibinin, Kaffeesäure und NDGA (siehe Anhang). [234-237] Ebenso zählen zahlreiche relativ einfache Hydroxylamine [238], Aniline [239], Phenole [240-244] und Aminophenole [245] hierzu. Strukturell dazugehörig sind auch Anthron-Derivate. Hier sind jedoch möglicherweise reaktive Sauerstoffspezies für die LOX-Hemmung ausschlaggebend, die sich beim nichtenzymatischen Zerfall der Substanzen bilden sollen. [246,247] Der Wirkmechanismus einiger strukturell ähnlicher Anthrachinone und Naphthochinone ist indes noch nicht bekannt. Hierzu zählt z.B. das CGS 8515, welches in unseren Untersuchungen als Negativkontrolle herangezogen wurde. Diese Substanz ist als selektiver 5-LOX-Hemmer beschrieben, ohne die Aktivitäten von 12- und 15-LOX oder COX zu beeinflussen (keine Hemmung der L-1 in unserem Testsystem, siehe Anhang). [248-250]

Auch das zyklische Amidrazon BW 755c sowie das zyklische Hydrazid Phenidon wurden ursprünglich zu dieser Gruppe hinzu gezählt. Die Bildung relativ stabiler Radikale aus diesen Molekülen wurde im Zuge der Elektronenübertragung auf die L-1 nachgewiesen. Einige Autoren konnten beobachten, daß hier die Hemmung der L-1 an die gleichzeitige Anwesenheit von langkettigen Fettsäuren bzw. deren Hydroperoxiden gebunden ist. [251] Dies konnte jedoch von uns nicht bestätigt werden (siehe unten).

Andererseits können einige Substanzen auch lediglich durch das Abfangen von Fettsäureradikalen die LOX-Aktivität hemmen, ohne in der Lage zu sein, den Redoxstatus der aktiven Form der LOX zu beeinflussen. Hierzu zählen z.B. Ascorbinsäure oder Vitamin E-Analoga. Für diese Stoffe wurde ein kompetitives Verhalten beobachtet. [252] Viele dieser Verbindungen sind gleichzeitig auch Cosubstrate der Hydroperoxidase-Aktivität der LOX. [253]

Zusammenfassend kann man sagen, daß Redox-Inhibitoren generell relativ unselektiv an Mono- oder Dioxygenasen wirken und deshalb *in vivo* eine Reihe von Nebenwirkungen hervorrufen können - falls es überhaupt (aufgrund der oftmals relativ kurzen Halbwertszeit *in vivo*) zu einer Wirkung am gewünschten Zielort kommt.

### **3.2.2 Eisen-Komplexbildner**

Das katalytische Zentrum von Nicht-Häm- und Nicht-Schwefel-Eisen-Enzymen ist in aller Regel recht labil. [254] Ein interessanter Ansatzpunkt zum Auffinden neuer inhibitorischer Leitstrukturen war daher eine diesbezügliche Testung von Eisen-Chelatoren. Für einige bekannte Inhibitoren, beispielsweise Hydroxyharnstoffe [255-257], Hydroxamsäure-Derivate [258-260] und Hydroxypyridone [261] wurde ursprünglich die Fähigkeit zur Chelatisierung des Eisen-Cofaktors der LOX postuliert. In späteren Arbeiten konnte allerdings exemplarisch nachgewiesen werden, daß diese Vertreter das zentrale Eisenion der L-1 reduzieren [262] und die Hemmung der LOX weitgehend auf die Reduktion des  $Fe^{III}$ -Cofaktors

zurückzuführen ist. [263] Dieser Inaktivierung geht aber trotzdem, vermutlich über die AA-Bindungsstelle, der direkte Zutritt des Inhibitors zum aktiven Zentrum der LOX voraus. [264]

Auch für verschiedene Brenzkatechin-Derivate wurde zusätzlich zur Reduktion der aktiven Fe<sup>III</sup>-Form der LOX die Fähigkeit zur Ausbildung von Fe<sup>III</sup>-Chelatkomplexen beobachtet. [265-267]

Die schnelle Hydrolyse der Hydroxamate zur inaktiven Carbonsäure *in vivo* verhinderte bisher deren Erfolg in klinischen Tests. Erst die nachfolgende Weiterentwicklung zu den entsprechenden Hydroxyharnstoff-Derivaten führte zu einer akzeptablen *in vivo*-Stabilität und mithin zum therapeutischen Einsatz von Zileuton in der Therapie des Asthma bronchiale. [268,269] Für diese Verbindung konnte eine reversible 5-LOX-Hemmung gezeigt werden. [270] Auch für Tepoxalin, einen dualen LOX/COX-Hemmer, welcher neben der Hydroxyharnstoffgruppierung interessanterweise noch eine zyklische Hydrazonstruktur enthält, wurde eine potente Hemmung der 5-LOX aus Ratten-Leukozyten festgestellt. [271]

### **3.2.3 Substrat-Analoga**

#### **3.2.3.1 Mechanismus-orientierte Inhibitoren**

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit einer oder mehreren Dreifachbindungen anstelle einer Doppelbindung sind als Inhibitoren von Lipoxygenasen schon seit 1965 bekannt und diesbezüglich umfassend untersucht. [272-274] Der genaue Mechanismus der Inaktivierung des Enzyms durch diese Substrat-Analoga liegt allerdings noch immer teilweise im Dunkeln. Allgemein anerkannt ist die Vorstellung, daß es sich hierbei formal um Suizid-Inhibitoren handelt, welche in einem O<sub>2</sub>-abhängigen Schritt die LOX irreversibel inaktivieren. [275,276] Diskutiert wird die Oxidation eines katalytisch wichtigen Methioninrestes zum Methioninsulfoxid. Die Inhibitormoleküle werden dabei in mindestens drei verschiedene Produkte überführt: das entsprechende Oxo-Derivat, das Hydroxy-Derivat sowie das Hydroperoxy-Derivat. Für die Inaktivierung selbst soll hingegen ein dabei gebildetes kurzlebige Intermediat (möglicherweise ein Hydroxylradikal) verantwortlich sein. [277-281] Acetylenfettsäuren sind auch als Inhibitoren der Cyclooxygenase bekannt. [282] *In vivo* sind diese Verbindungen aufgrund der zu geringen Halbwertszeit jedoch nicht wirksam.

Mit zu dieser Gruppe gezählt werden trotz struktureller Unterschiede auch die 13-Thiaarachidonsäure sowie die 12-Iodo-9-octadecensäure. [283-285] Auch diese Verbindungen bewirken eine irreversible Inaktivierung des Enzyms, ohne daß das Inhibitormolekül selbst kovalent an das Protein gebunden wird.

Ebenso sind Phenylhydrazone als sehr potente Inhibitoren von diversen Lipoxygenasen als auch Cyclooxygenasen bekannt. [286-288] Wie für die oben beschriebenen Acetylen-Fettsäuren wurde für diese Verbindungen ebenfalls eine Mechanismus-orientierte Hemmung der LOX postuliert. Auch für die Dioxygenase- und Peroxidasereaktion der COX agieren die Phenylhydrazone als gute Substrate. [289] Phenylhydrazine bewirken hingegen nach Autoxidation zu den entsprechenden Phenyl diazenen eine irreversible Inaktivierung des Enzyms. [290] Aufgrund der für diese Arbeit besonderen Bedeutung der

LOX-Inaktivierung durch Phenylhydrazone soll am Ende dieses Kapitels noch einmal gesondert auf die bisherigen mechanistischen Vorstellungen eingegangen werden.

Zu dieser Kategorie zu zählen sind per se auch die Primärprodukte der „normalen“ katalytischen Lipoxygenase-Reaktion. Die Hydroperoxyfettsäuren bewirken bei nahezu allen bekannten LOX-Arten eine irreversible Selbstinaktivierung. Lediglich die 12-LOX aus Thrombozyten scheint für eine derartige Inaktivierung weniger anfällig zu sein. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung ist stark abhängig vom jeweiligen Substrat der Reaktion. [291] Der Mechanismus dieser Inaktivierung ist im einzelnen noch nicht geklärt. Man vermutet, daß Superoxid- oder Hydroxylradikale hierfür verantwortlich sind. [292,293] Auch eine kovalente Fixierung des Epoxyproduktes (siehe Kapitel 3.1.4) wird als mögliche Ursache angesehen. [294] Nicht zuletzt wurde auch die Oxidation eines katalytisch wichtigen Methionins im aktiven Zentrum zum entsprechenden Sulfoxid hierfür verantwortlich gemacht, was später als allgemeine Ursache jedoch widerlegt werden konnte (siehe auch Kapitel 3.3). Im Falle der 15-LOX aus Kaninchen-Retikulozyten ist diese Inaktivierung nach jedem 600-sten Substratumsatz zu bemerken. Eine derartige Selbstinaktivierung wurde im übrigen auch bei der Cyclooxygenase beobachtet: etwa alle 5000 katalytische Umsätze findet hierdurch eine Inaktivierung des Enzyms statt. Nicht zu verwechseln ist diese Art der Hemmung mit derjenigen durch die Sekundärprodukte der Reaktion (siehe nächstes Kapitel).

### **3.2.3.2 Kompetitive Inhibitoren**

Eine erhebliche Anzahl von Substanzen aus dieser Reihe muß jedoch von den oben beschriebenen Substrat-Analoga abgegrenzt werden. Hierzu zählen langkettige Monoenfettsäuren wie z.B. Ölsäure oder Erucasäure. Diese sollen ebenso wie die „normalen“ Substrate an deren Bindungsstelle binden, werden aber aufgrund des Fehlens einer oxidablen bis-Allylstellung nicht vom Enzym umgesetzt (siehe auch Kapitel 5.1.1.12). Die resultierende Inhibition ist demzufolge meist relativ schwach, reversibel und rein kompetitiv. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind n-Alkohole bzw. Aldehyde mit einer Kettenlänge von vier bis zwölf Kohlenstoffatomen oder auch langkettige, partiell ungesättigte Alkylthiole. [295-297]

Daneben existiert noch eine größere Anzahl weiterer Substrat-analoger LOX-Inhibitoren, deren genauer Wirkmechanismus jedoch im einzelnen nicht bekannt ist, die vermutlich aber zu dieser Gruppe mit hinzu gezählt werden dürfen. Hierzu gehören unter anderem Lipoaminosäuren bzw. Lipopeptide [298-300] und Fettsäure-CoA-Ester, wobei das Coenzym A selbst keinen Effekt auf die LOX-Aktivität ausübt. [301] Für das Arachidonsäureamid des Serotonins ist zusätzlich noch eine irreversible Inaktivierung der L-1 beschrieben worden. [302]

Schließlich führen die Sekundärprodukte der katalytischen Reaktion der 15-LOX (z.B. 15-HETE) selbst mitunter zu einer maßgeblichen Hemmung anderer Lipoxygenasen, wie z.B. der 12-LOX der Thrombozyten sowie der 5-LOX in neutrophilen Granulozyten. [303,304] Andere Autoren hingegen sind der Meinung, daß die 15-HETE nicht als „genuiner“ 5-LOX-Inhibitor aufzufassen ist, sondern deren inhibitorische Wirkung lediglich dadurch zustande kommt, daß sie selbst als (schlechteres) Substrat einer

zusätzlichen Dioxygenierung in 5-Position unterliegt, wodurch die Bildung der 5-HETE in gewissem Umfang („kompetitiv“) unterdrückt wird. [305]

### **3.2.4 Sonstige Inhibitoren**

Diverse Pflanzenextrakte werden oft auch auf eine Beeinflussung des Arachidonsäuremetabolismus hin untersucht. So konnte z.B. für Knoblauchöl sowie für einige der daraus isolierten disulfidischen Einzelkomponenten eine Hemmung sowohl der COX aus Schafsamenblasen als auch der 5-LOX aus Schweine-Leukozyten im mikromolaren Konzentrationsbereich beobachtet werden. [306] Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Hemmung wurde jedoch noch nicht weiter untersucht. Des weiteren ließen Schöllkraut-Extrakte sowie daraus isolierte Benzophenanthridin-Alkaloide wie Sanguinarin eine beachtliche Beeinflussung der 5- und 12-LOX-Aktivität erkennen. Diese Inhibition wird ebenso wie die einer Reihe anderer Heterozyklen auf einen Non-Redox-Mechanismus zurückgeführt. [307,308] Der Mechanismus der COX/LOX-Inhibition durch eine Reihe von Benzofuran-, Pyrazol- und Indazol-Derivaten ist noch nicht aufgeklärt. [309-312]

In vielen Ländern wird in der traditionellen Medizin zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen seit langem das Harz von Boswellia-Arten verwendet. Als wirksames Prinzip der Hemmung der LT-Biosynthese konnten Boswelliasäuren hieraus identifiziert werden. [313] Nähere Untersuchungen ergaben, daß diese Substanzen nach einem nonkompetitiven redoxunabhängigen Mechanismus agieren. [314,315] Es konnte gezeigt werden, daß die Boswelliasäuren an einer zweiten, regulatorischen AA-Bindungsstelle der 5-LOX binden. [316] Diese pentazyklischen triterpenen Saponine hemmen selektiv die LT-Bildung durch die 5-LOX, ohne die Aktivität anderer Dioxygenasen (COX, 12-LOX) zu beeinflussen. [317,318] Andererseits ist aber auch die Hemmung einer 15-LOX durch Derivate der Glykyrrhizinsäure, ebenfalls ein Triterpen, beobachtet worden. [319]

Ferner wurde für eine Reihe von Thiophen-Sulfonamiden eine mäßig starke Beeinflussung der 5-LOX-Aktivität aus Ratten-Leukozyten im millimolaren Konzentrationsbereich berichtet, jedoch wurde auch hier der zugrunde liegende Mechanismus nicht näher charakterisiert. [320]

Eine weitere interessante Interaktion mit den beiden Hauptenzymen der Arachidonsäurekaskade ist für Stickstoffmonoxid berichtet worden. Dieses vermag sowohl die COX als auch die LOX nach einem bisher noch nicht klar definierten Mechanismus zu inaktivieren. [321-325]

Als Vertreter einer letzten, gleichwohl nicht weniger interessanten Gruppe an LT-Biosynthese-Inhibitoren sei hier noch das Ebselen genannt. Für diese antiinflammatorisch wirksame Substanz wurde unter anderem neben der primären antioxidativen Aktivität [326] eine irreversible Reaktion mit proteinogenen SH-Gruppen der LOX unter Ausbildung kovalenter Bindungen beobachtet. [327]



### **3.2.4.1 FLAP-Inhibitoren**

Diese Substanzen gehören strenggenommen nicht zu den LOX-Inhibitoren, sondern sie entfalten ihre Wirkung durch eine Inaktivierung des 5-Lipoxygenase-aktivierenden Proteins (FLAP). FLAP ist ein 18 kDa großes integrales Protein. Es erleichtert den Transfer des Fettsäure-Substrates zur 5-LOX nach Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen FLAP, 5-LOX und PLA<sub>2</sub> und gilt als relativ spezifisch für die Säuger-5-LOX. [328,329] Die Aktivitäten der humanen 12- und 15-Isoenzyme werden nicht durch FLAP beeinflusst. Erst kürzlich konnte jedoch auch eine Aktivierung der 5-LOX aus Kartoffeln durch FLAP beobachtet werden. [330]

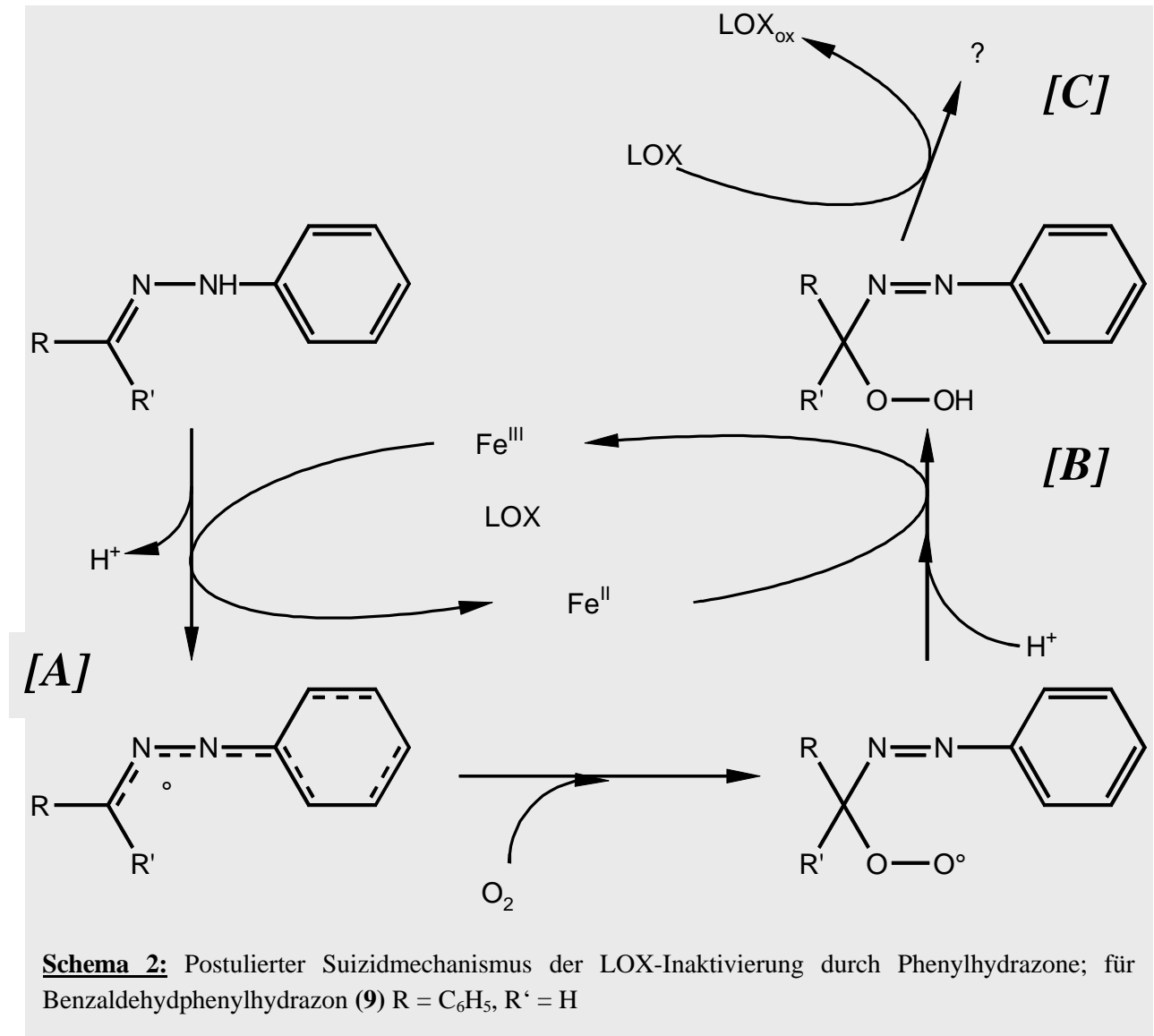
Ausgehend vom Naproxen aus der Reihe der NSAIDs (COX-Inhibitoren) entstand durch eine leichte Strukturvariation im Molekül eine drastische Änderung der inhibitorischen Spezifität in Richtung eines LT-Biosynthese-Hemmers. [331,332] Zunächst als direkte 5-LOX-Inhibitoren bzw. LT-Antagonisten (siehe unten) entwickelt und eingestuft [333], wurde im folgenden der eigentliche Wirkmechanismus der hieraus hervorgegangenen Verbindungen auf eine FLAP-Inhibition zurückgeführt. [334-337] Oftmals ist auch ein dualer Angriff dieser Substanzen am FLAP und an der 5-LOX zu verzeichnen. [338-340]

### **3.2.4.1 Leukotrien-Antagonisten**

Bei Vertretern dieser Klasse handelt es sich ebenso selbstredend nicht um Lipoxygenase-Inhibitoren im eigentlichen Sinne, sondern um Rezeptorantagonisten der Lipoxygenaseprodukte („Antileukotriene“). [341,342] Aus Gründen der Übersicht sollen sie hier ebenso erwähnt werden. Hierzu zählen unter anderem diverse Thia- und Aza-analoge Verbindungen der Leukotriene oder auch einige Aryloxypropan-Derivate. [343,344] In diese Gruppe fallen auch die mittlerweile erfolgreich gegen Asthma eingesetzten „Lukaste“, wie Montelukast, Ritolukast oder Zafirlukast. [345-347]

## **3.3 Der postulierte Mechanismus der Inaktivierung durch Phenylhydrazone**

Der recht einhelligen Meinung in der Literatur zufolge wird bisher für Hydrazone resp. Amidrazone eine Mechanismus-orientierte Hemmung der Lipoxygenasen angenommen. Das heißt, das Inhibitormolekül wird vom Enzym als Quasisubstrat akzeptiert und unterliegt als solches dem katalytischen Kreislauf des Enzyms (vergleiche Schema 1). In dessen Folge wird der Inhibitor in ein hochreaktives Intermediat - hier ein  $\alpha$ -Azohydroperoxid - transformiert, welches dann das eigentliche inhibitorisch wirksame Agens darstellt (Schema 2). In Analogie zum Mechanismus der enzymatischen Fettsäureoxidation beginnt die katalytische Umsetzung des Inhibitors am Beispiel der Hydrazone mit einer Deprotonierung am N<sup>1</sup> der Hydrazonstruktur **[A]**, was analog dem Pentadiensystem des „normalen“ Fettsäuresubstrates formal einer pseudo-bis-Allylstellung entspricht. Es resultiert schließlich ein  $\alpha$ -Azohydroperoxid **[B]**, welches sodann als hochreaktives Intermediat eine katalytisch wichtige Gruppierung des Enzyms irreversibel oxidieren soll. [348,349] Es wird vermutet, daß es sich hierbei um einen Methioninrest handelt **[C]**. Die Existenz eines Methionins in der Nähe des aktiven Zentrums der L-1 gilt als gesichert.



Azohydroperoxide sind extrem reaktive Verbindungen und unter anderem als effektive Sulfid-Oxidantien beschrieben. Ihre Reaktivität gegenüber Dimethylsulfid ist z.B. um den Faktor  $10^3$  größer als die von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und von Alkylhydroperoxiden. [350,351] Auch wurde die Entstehung von etwa einem Mol Methioninsulfoxid pro Mol Enzym nach Inkubation der aktiven L-1 mit Hexanalphenylhydrazon (**1**) nachgewiesen. [348]

Die Oxidation eines Methioninrestes im aktiven Zentrum zum entsprechenden Sulfoxid wurde ursprünglich als Ursache der Produktinaktivierung der 15-LOX aus Kaninchen-Retikulozyten durch 13-HPODE angesehen („Selbstinaktivierung“). [352-354] Wenig später konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die Oxidation eines Methionins zum Sulfoxid nicht essentiell für die Inaktivierung des Enzyms ist. [355-357] Andererseits spielt eine derartige Methioninsulfoxidbildung als allgemeine physiologische Regulationsmöglichkeit verschiedener Enzyme durchaus eine bedeutende Rolle. [358,359] So führt die Oxidation eines spezifischen Met-Restes in einer Reihe von Enzymen (z.B. Lysozym, Pepsin, Ribonukleasen) zum partiellen oder völligen Wirkverlust. [360,361] Hinzugefügt sei an dieser Stelle, daß auch für die Cyclooxygenase, deren aktives Zentrum anders als das der LOX gestaltet

ist und im Gegensatz zur LOX ein Häm-gebundenes Eisenion als prosthetische Gruppe enthält, eine derartige irreversible Produkthemmung durch die primären Hydroperoxidprodukte beschrieben wurde. Auch die Inaktivierung der L-1 durch diverse Acetylen-Fettsäuren wurde in Zusammenhang mit der Bildung eines Methioninsulfoxides in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms gebracht. [362]

Seit einigen Jahren werden am Institut für Pharmazeutische Chemie in Halle gezielt Verbindungen nach dem Prinzip der capto-dativen Substitution entwickelt. Hierbei geht man von der Theorie aus, daß ein gebildetes Radikal durch gleichzeitig anwesende elektronenziehende (cpto~) und elektronendrückende (dativ~) Substituenten stabilisiert wird. [363] In bezug auf die Inaktivierung der Lipoxygenase verspricht man sich dadurch eine wirksamere Inaktivierung des Enzyms. Derart gebildete Radikale sollten im enzymatischen Kreislauf auf der Stufe des Radikal-Intermediates *[A]* stehenbleiben (Schema 2) und das Enzym als Übergangszustands-Analogon (transition state analogue) inaktivieren. [85] Die inaktivierte LOX verbliebe demnach im Fe<sup>II</sup>-Zustand, da der katalytische Kreislauf durch die verhinderte bzw. verzögerte Hydroperoxidbildung nicht mehr (sofort) geschlossen werden kann.

### 3.3.1 Der postulierte Mechanismus der L-1-Inaktivierung durch BW 755c

Eine seit längerem bekannte zyklische Amidrazon-Verbindung, der duale COX/LOX-Inhibitor BW 755c (2) [364], wird oftmals in Inhibitorstudien als Vergleichssubstanz herangezogen und fand somit auch Einzug in die eigenen Untersuchungen.

Für diese Verbindung wurde, analog den Phenylhydrazonen, eine irreversible Hemmung der L-1 gefunden. Der Mechanismus dieser Inaktivierung wird hierbei im allgemeinen ebenfalls auf eine initiale Oxidation des Inhibitors zurückgeführt. Anstelle der entstehenden  $\alpha$ -Azohydroperoxide der Arylhydrazone (vergleiche Schema 2) werden jedoch enzymatisch generierte Radikalintermediate des Inhibitors für den eigentlichen Inaktivierungsschritt verantwortlich gemacht [365,366], wenngleich an anderer Stelle die Bildung von intermediären Hydroperoxiden nicht grundsätzlich ausgeschlossen wird. [383,388] Die radikalischen Zwischenstufen der Verbindung sollen einerseits zu einem gewissen Teil nichtenzymatisch aufgrund der relativ geringen Stabilität der Substanz sowie andererseits vornehmlich durch die sogenannte Pseudoperoxidase- bzw. Cooxidase-Aktivität der L-1 (siehe auch Kapitel 3.1.4) gebildet werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Reagenzien und Chemikalien

Katalase	(EC 1.11.1.6); Sigma Chemical; 4190 Units/mg; Lagerung < 0 °C
DPNP	freundliche Gabe von Dr. Rüttinger, FB Pharmazie, MLU Halle
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35 Gew.-%	Riedel-de Haën AG
Linolsäure	Carl-Roth-GmbH; Reinheit > 99 %; Lagerung < 0 °C
Natriumlinolat	Sigma Chemical; Reinheit > 99 %; Lagerung < 0 °C
L-1 (Sojabohnen)	(EC 1.13.11.12); Sigma Chemical; 110600 Units/mg; Lagerung < 0 °C
Kartoffel-5-LOX	(EC 1.13.11.34); Cayman Chemical; 8125 Units/ml; Lagerung bei -80 °C
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Chemical
NaHPO <sub>4</sub>	Sigma Chemical
NDGA	Fluka Chemica; Reinheit > 95 %
Ölsäure	Carl-Roth-GmbH; Reinheit > 99 %
Sauerstoff 4.5	Messer Griesheim GmbH
TMPD	Sigma Chemical; Reinheit > 95 %
Tris	Janssen Chimica; Reinheit > 99,8 %
bidestilliertes Wasser	Umkehrosiose-Anlage, ELGA Maxima

Die Herstellung der Substratzubereitungen erfolgte als  $4,0 \times 10^{-2}$  M Stammlösungen in Wasser in braunen Glasfläschchen (5 ml) unter Argon-Atmosphäre. Die Lösungen wurden sofort in 200 µl-Aliquots aufgeteilt, erneut mit Argon begast und bei -18 °C eingefroren.

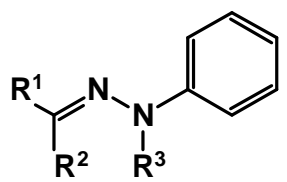
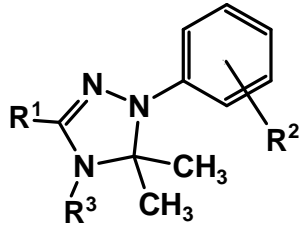
Die genaue Konzentration der Sojabohnen-L-1 wurde über deren UV-Absorption bei 280 nm ( $\epsilon = 1,6 \times 10^3$ ) [483] ermittelt. Von dem Enzym wurden zunächst je nach Anwendung eine  $1,2 \times 10^{-4}$  M bzw. eine  $6 \times 10^{-6}$  M Stammlösung in Tris-Puffer (pH 8,5) bereitet, welche ebenfalls bei -18 °C eingefroren wurden. Von der Kartoffel-5-LOX wurden hingegen keine weiteren Verdünnungen hergestellt. Die Lösung wurde sofort nach Erhalt in 100 µl-Aliquots portioniert und bei -80 °C eingefroren. Zur IC<sub>50</sub>-Ermittlung wurden 20 µl-Aliquots entnommen und deren Aktivität im Testsystem nach Zugabe von Linolsäure ( $2,0 \times 10^{-4}$  M) ermittelt. Die standardmäßige IC<sub>50</sub>-Ermittlung erfolgte mit der Fe<sup>II</sup>-Form der L-1. Für die Untersuchungen an der L-1 aus Sojabohnen wurde durchweg 0,2 M Tris-Puffer unter Zusatz von  $1,0 \times 10^{-4}$  M EDTA verwendet, dessen pH-Wert mit konz. HCl auf 8,5 eingestellt wurde. Um die L-1 in die Fe<sup>III</sup>-Form zu überführen, wurde ein 1,25-facher Überschuß an 13-HPODE hinzugegeben. 13-HPODE

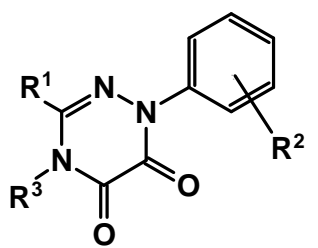
wurde enzymatisch mittels L-1 ( $2,0 \times 10^{-8}$  M) aus LA ( $1,0 \times 10^{-4}$  M) hergestellt und analog einer kürzlich beschriebenen Prozedur über RP18-Extraktionssäulen (Adsorbex SCX, Merck) gereinigt. [430] Der Gehalt an 13-HPODE wurde UV-photometrisch bei 243 nm ermittelt ( $\epsilon = 2,8 \times 10^4$ ). [430]

Der 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,3 für die Untersuchungen an der Kartoffel-5-LOX wurde hergestellt nach der Vorschrift von Rauscher et al.. [367] Die Einstellung der pH-Werte erfolgte mittels einer pH-Glaselektrode (pH-Meter 3051, Jenway).

Die der Testung unterzogenen Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, innerhalb der Arbeitsgruppe (Dr. P. Froberg, G. Drutkowski, I. Schulze, C. Donner) bereitgestellt (Tabelle I). Falls nicht gesondert angegeben, lagen in aller Regl die cis-Isomere zur Untersuchung vor. Lediglich Verbindung (15) war als trans-Isomer vorhanden. Die Verbindungen (3) und (22) lagen jeweils getrennt in der Form des cis- und trans-Isomers vor.

**Tabelle I:** Vorwiegend untersuchte Amidrazone und Hydrazone

				
Verbindungen				
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(3)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	$1,0 \times 10^{-8}$
(9)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	$3,6 \times 10^{-8}$
(10)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	$1,8 \times 10^{-7}$
(13)	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	CH <sub>3</sub>	$1,0 \times 10^{-6}$ [388]
(14)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> OH	$1,4 \times 10^{-6}$
(15)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	$7,0 \times 10^{-5}$
(25)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH	H	$3,9 \times 10^{-6}$
(38)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	H	$1,1 \times 10^{-6}$
				
Verbindungen				
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(21)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	H	CH <sub>3</sub>	$4,3 \times 10^{-8}$
(29)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	$4,2 \times 10^{-8}$
(30)	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	H	CH <sub>3</sub>	$1,9 \times 10^{-7}$
(32)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	H	H	$1,1 \times 10^{-7}$
(33)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	4-Cl	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	$9,1 \times 10^{-8}$

(34)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	4-Cl	H	2,0x10 <sup>-7</sup>
(35)	CH <sub>3</sub>	4-Cl	CH <sub>3</sub>	7,8x10 <sup>-7</sup>
(36)	CH <sub>3</sub>	4-Cl	H	7,4x10 <sup>-7</sup>
 <b>Verbindung</b>				
	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>3</sup></b>	<b>IC<sub>50</sub> [M]</b>
(16)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	H	H	5,5x10 <sup>-6</sup>

## 4.2 Geräte und Testsysteme

### Das Screeningsystem

Der Großteil der enzymkinetischen Untersuchungen wurde mit dem am Hause bereits etablierten polarographischen Assay (Meßgerät Oxical 538, WTW Weinheim; Sauerstoffelektrode Cellox 325, WTW Weinheim) in einer thermostatierten Piacryl-Meßzelle (3,5 ml) bei 37 °C durchgeführt. [133,368-370]

Zur standardmäßigen IC<sub>50</sub>-Bestimmung diverser Inhibitoren wurden diese in frisch destilliertem DMF gelöst und mit der Fe<sup>II</sup>-Form der L-1 (2,0x10<sup>-8</sup> M) für 3 Minuten in Tris-Puffer (pH 8,5) vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von Linolsäure (2,0x10<sup>-4</sup> M) initiiert wurde. DMF-Konzentrationen im Assay waren geringer als 1 % und verursachten unter diesen Bedingungen keine eigene Enzymaktivierung. Als Maß der Enzymaktivität diente in allen Untersuchungen der Initial- bzw. der nach der initialen lag-Phase auftretende Maximalanstieg der Produktbildungskurven. Die IC<sub>50</sub>-Werte selbst wurden in der Regel aus fünf bis acht verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Hemmung zwischen 20 und 80 %) mittels nichtlinearer Regression sowie nach Linearisierung über eine logit-Transformation der Meßwerte ermittelt. [371] Zwischen den Ergebnissen beider Methoden waren keine signifikanten Abweichungen zu beobachten. [133]

Die Fehlerbalken der Abbildungen repräsentieren die Standardabweichung (SD).

### Spektroskopische Untersuchungen

UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen zur Stabilität der Inhibitoren wurden an einem Zeiss-Specord M 500 bei 37 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzuntersuchungen zur Stabilität der Triazolone (siehe Kapitel 5.3) wurden an einem Fluostar-Gerät (Fluostar Galaxy, BMG) unternommen. Die Messungen der Proteinfluoreszenz wurden an einem MPF-44 Spektrometer (Perkin-Elmer) unternommen. Alle kinetischen Untersuchungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C durchgeführt.

Die CD-spektroskopischen Experimente wurden an einem AVIV-Spectrophotometer (Lakewood) bei 23 °C durchgeführt. Nach Vorinkubation der L-1 ( $2,2 \times 10^{-5}$  M) mit dem jeweiligen Inhibitor ( $3,0 \times 10^{-5}$  M) für fünf Minuten wurden die Lösungen jeweils zwanzigmal gescannt (Küvettenlänge 5 cm) und die erhaltenen Kurven gemittelt.

### Dialyse-Experimente

Dialyse-Experimente wurden in einer doppelwandigen Piacryl-Dialysekammer (5 ml, Zellulosenitratmembran, Carl-Zeiss Jena) mit 0,2 M Tris-Puffer (Fluß 2 ml/min) bei 25 °C unternommen. Der jeweilige Inhibitor wurde im zwei- bis fünffachen molaren Überschuß mit der L-1 ( $6,0 \times 10^{-6}$  M) bei 37 °C für fünf Minuten vorinkubiert. Nach Überführung der Lösung in die Dialyse-Apparatur wurden in regelmäßigen Abständen 20 µl-Aliquots entnommen und deren Enzymaktivität nach anschließender weiterer 3-minütiger Inkubation bei 37 °C ermittelt. Die erhaltenen Daten wurden gegen die über diesen Zeitraum verbleibende Restaktivität des ungehemmten Enzyms korrigiert.

### Peroxid-Detektion

☞ Zur Quantifizierung des 13-HPODE-Verbrauchs (siehe Kapitel 5.1.2.1.2.3) wurde eine bereits beschriebene Methode der Kapillarzonen-Elektrophorese mit elektrochemischer Detektion (U: 10 kV, I: 100 mA, Kapillarlänge 30 cm) eingesetzt. [372]

### ☞ DPNP-Methode

Zur Detektion von eventuellen (Inhibitor-)Peroxiden entschieden wir uns ferner für ein DPNP-HPLC-Assay. Die HPLC-Apparatur war ausgerüstet mit einem Dioden-Array- sowie einem Fluoreszenzdetektor (Merck Hitachi L-7480). Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, und die dem korrespondierenden Phosphinoxid (DPNPO) zugehörige Fluoreszenzemission wurde bei 335 nm aufgezeichnet. Als stationäre Phase wurde eine RP18 LiChroCART 150-Säule gewählt, und als mobile Phase erwies sich ein Methanol-Wasser-Gemisch (85:15) als günstig. Die Flußrate wurde auf 1,0 ml/min eingestellt. Die aktive L-1 ( $1,2 \times 10^{-5}$  M) wurde mit dem Inhibitor ( $1,2 \times 10^{-4}$  M) bei 37 °C für fünf Minuten vorinkubiert. 1 ml dieser Lösung wurde im Anschluß mit 200 µl einer methanolischen DPNP-Lösung ( $1,0 \times 10^{-3}$  M) versetzt und für 120 Minuten bei 60 °C zur Reaktion gebracht und sodann direkt vermessen.

### ☞ Die TMPD-Methode

Zur Herstellung des TMPD-Sprühreagens wurden 50 mg TMPD in einer Mischung aus 2,5 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml Methanol sowie 50 µl Essigsäure gelöst. Die Lösung wurde vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt. Nach dem Besprühen der Chromatogramme wurden diese für etwa zwei Minuten bei 60 °C im Trockenschrank erwärmt, wobei sich in Anwesenheit von Peroxiden die entsprechenden Stellen violett verfärbten.

### ☞ Der FOX 2-Test

Zur Herstellung der FOX-Stammlösung wurden 98 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Mohrsches Salz) in 14 ml Schwefelsäure (1,8 M) gelöst. Nach Zugabe von 76 mg Xylenolorange wurde mit Wasser auf

100 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Reagenzlösung wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit Methanol verdünnt. Nach Zugabe von 100 µl Probenlösung zu 900 µl Reagenzlösung wurde die Absorptionsänderung bei 560 nm gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Reaktion war in der Regel innerhalb von fünf Minuten beendet. Die maximale Absorptionsänderung wurde als Maß der Peroxidkonzentration verwendet.

#### Charakterisierung der Oxidationsprodukte

Die angegebenen Schmelzbereiche wurden mit einem Heitztischmikroskop nach Boetius bestimmt und stellen unkorrigierte Werte dar.

Die Elementaranalyse zur Bestimmung des C-, H-, N-Gehaltes erfolgte an einem Gerät von Leco im automatisierten Mikroverfahren. Der Halogengehalt wurde im Halbmikroverfahren titrimetrisch ermittelt. Die Reaktionsverläufe wurden dünnenschichtchromatographisch mit DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck, Darmstadt verfolgt. Die DC-Folien wurden entsprechend den jeweiligen Erfordernissen in den folgenden Laufmitteln entwickelt:

- |    |                         |     |
|----|-------------------------|-----|
| 1. | Hexan/Diethylether      | 7:3 |
| 2. | Chloroform/Diethylether | 7:3 |
| 3. | Toluol/Diethylether     | 7:3 |
| 4. | Methanol                |     |
| 5. | Methanol/Ethylacetat    | 1:1 |

Die Detektion erfolgte gewöhnlich durch UV-Licht bei 366 bzw. 254 nm. Zur Detektion von Peroxiden wurde das TMPD-Sprühreagens verwandt. Die Chromatogramme wurden hierbei nach dem Besprühen für etwa zwei Minuten bei 60 °C getrocknet.

Zur Aufnahme der NMR-Spektren dienten ein Varian Unity 500- sowie ein Gemini 200-Gerät. Die MS-Spektren wurden gewöhnlich an einem AMD 402-Gerät der Firma INTEDRA (70 eV) durchgeführt. Für die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Auswertung stand ein HP 5890 von Hewlett Packard mit einer DB 5-Säule zur Verfügung. Die MS-Analytik während der Stabilitätsuntersuchungen (siehe Kapitel 5.3) wurde an einem Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ (Thermo Quest, San Jose, USA) mit Elektrospray-Interface unternommen. Für den Nachweis der Verbindung (**7a**) kam ein Quadrupol-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, UK) zur Anwendung, welches ebenfalls mit einem Elektrospray-Interface gekoppelt war. Die HPLC-Untersuchungen wurden an einem Dioden-Array-Gerät (Merck Hitachi L-7480) durchgeführt.

Quantitative säulenchromatographische Trennungen wurden auf Kieselgel 60 H der Firma Merck, Säulendurchmesser 3 cm, Füllhöhe 50 cm, Fraktionsvolumen 100 ml durchgeführt. Die Eluenten sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.



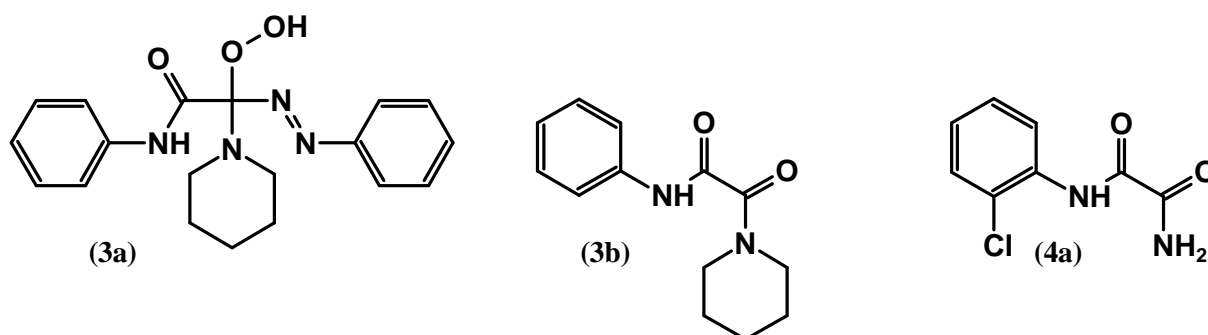
### 4.3 Versuche zur Oxidation

#### 4.3.1 Begasung mit Sauerstoff

In Anlehnung an die Literatur zur Umsetzung der analogen Phenylhydrazone [349-351,470] wurde in eine Lösung von 500 mg Substanz in 200 ml Benzol oder Toluol unter Rühren kontinuierlich O<sub>2</sub> eingeleitet.

#### Verbindungen (3), (4) und (5):

Nach 48 Stunden war noch kein nennenswerter Umsatz der Verbindungen zu verzeichnen. Es wurde deshalb zusätzlich für 36 Stunden mit UV-Licht (264/366 nm) bestrahlt, was zum Auftreten mehrerer Produkte führte. Nach insgesamt fünf Tagen wurde die Reaktion trotz des unvollständigen Stoffumsatzes abgebrochen. Die Lösung wurde auf ein Drittel eingengt und drei Tage bei -18 °C stengelassen. Das im Falle von Verbindung (3) dabei auskristallisierende Produkt mit einem Schmelzbereich von 159-160 °C wurde aus Hexan umkristallisiert und erwies sich leider nicht als das gesuchte Peroxid (3a). Es konnte als Oxalsäurediamid (2-Oxo-*N*-phenyl-2-piperidin-1-yl-acetamid) der nachfolgenden Struktur (3b) durch MS- und <sup>1</sup>H-spektroskopische Untersuchungen sowie durch Elementaranalyse identifiziert werden. Der Vergleich mit den Daten aus der Literatur (Fp 160 °C) konnte dies belegen. [373]



Die im Falle von Verbindung (4) isolierten farblosen Kristalle wurden aus Toluol umkristallisiert. Die Verbindung erwies sich anhand des Schmelzpunkts von 182-183 °C sowie der MS-Daten als 2-Amino-2-oxo-*N*-(2-chlorphenyl)-acetamid (4a). Der Vergleich mit den Literaturdaten (Fp 184 °C) bestätigte dies. [374] Weitere Produkte konnten nicht identifiziert werden.

Verbindung (5) zeigte nach kräftigem Rühren (zunächst ohne Einleiten von O<sub>2</sub>) auch nach zwölf Stunden keinerlei Umsetzung. Auch das zusätzliche Einleiten von Luft oder Sauerstoff in die Lösung brachte nicht den gewünschten Erfolg. Nach zehn Tagen ließ sich mittels DC-Kontrolle noch keine Umsetzung erkennen. Der Versuch wurde deshalb an dieser Stelle abgebrochen und der Ausgangsstoff zurückgewonnen.

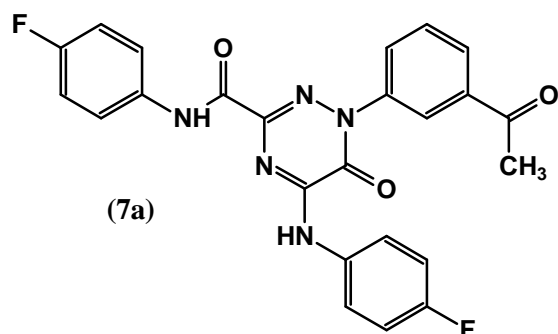
#### Verbindung (6):

Nach 36 Stunden war auch hier noch keine Umsetzung zu beobachten. Die anschließende Zugabe von Benzoylperoxid als Radikalstarter versagte ebenfalls den gewünschten Erfolg. Im folgenden wurde die benzolische Lösung noch für 48 Stunden der Bestrahlung mit UV-Licht (264/366 nm) ausgesetzt, was

ebenso nur geringen Fortschritt brachte. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und mit wenig Toluol wieder aufgenommen. Nach fünf Tagen bei -18 °C konnte in geringen Mengen (Ausbeute 20 %) nur eine Substanz isoliert und nach Umkristallisation aus Toluol erneut als das oben beschriebene Oxalsäureamid (**3b**) charakterisiert werden. Der restliche Ausgangsstoff wurde zurückgewonnen.

#### Verbindung (7):

Die Lösung der Verbindung in Toluol unter Zusatz von 100 ml DMF (aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit der Verbindung in Toluol) zeigte auch nach 72 Stunden lediglich einen marginalen Stoffumsatz mit dem Auftreten von drei Nebenflecken im Chromatogramm. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und anschließender Zugabe einer 1:1-Mischung aus  $\text{CHCl}_3$  und Heptan wurde der Ausgangsstoff abfiltriert. Das Filtrat wurde zur Trockne eingengt und mit Methanol aufgenommen. Nach fünf Tagen bei -18 °C wurden hieraus weißlich-graue rhombische Kristalle mit einem Schmelzbereich von 105-108 °C in äußerst geringer Ausbeute (< 5 %) isoliert. Nach erneuter



Umkristallisation aus Methanol konnten diese durch  $^1\text{H}$ - und hochauflösende MS-Untersuchungen als das Triazin-Derivat (**7a**) der nebenstehenden Struktur charakterisiert werden. Durch die dabei erfolgte sehr genaue Massenbestimmung (auf vier Kommastellen) sowie durch die aus der Kenntnis des Ausgangsstoffs möglichen Restriktionen ist durch diese Methode eine eindeutige Substanzzuordnung möglich.

Ein den Verbindungen (**3b**) und (**4a**) entsprechendes Oxalsäureamid konnte nicht gefunden werden. Desgleichen konnten keine anderen Produkte identifiziert werden. Auch hier wurde der Ausgangsstoff zum größten Teil zurückgewonnen.

#### Verbindung (8):

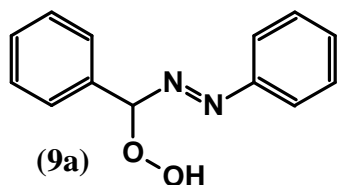
Trotz des schnellen Auftretens zweier Nebenflecken sehr geringer Intensität bei der DC-Kontrolle war hier auch nach zehn Tagen keine nennenswerte weitere Umsetzung zu beobachten. Es konnte kein Oxidationsprodukt isoliert werden. Der Ausgangsstoff wurde daraufhin zurückgewonnen.

#### Verbindungen (9) und (10):

In Anlehnung an die entsprechenden Literaturvorschriften [349-351,470] wurde versucht, durch kräftiges Rühren in Toluol (zunächst unter Einleiten von Luft anstelle von reinem Sauerstoff) eine diesbezügliche Umsetzung zu erreichen. Im Falle von Verbindung (**10**) war schon nach etwa sechs Stunden trotz eines unvollständigen Stoffumsatzes das Auftreten von mindestens fünf Nebenprodukten zu beobachten, welche jedoch nicht weiter isoliert bzw. charakterisiert werden konnten. Bei Verbindung (**9**) zeigte sich auch nach 24 Stunden (im Gegensatz zu den vorgegebenen ein bis acht Stunden) nur ein mäßiger Stoffumsatz, was aber mutmaßlich der Verwendung von Preßluft anstelle reinen Sauerstoffs geschuldet

werden muß. Aufgrund des vermehrten Auftretens von mindestens sechs Nebenprodukten wurde die Umsetzung nach 48 Stunden beendet. Das braungelbe, schlammige Rohprodukt wurde mehrmals mit Petrolether gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde im Vakuum eingedampft und zeichnete sich durch einen intensiven Bittermandel-Geruch aus, was vermutlich auf die Entstehung von Benzaldehyd zurückzuführen ist aber nicht weiter untersucht wurde. Der Zerfall von  $\alpha$ -Azohydroperoxiden von Phenylhydrazonen zu Benzaldehyd ist bekannt und bereits beschrieben worden. [350,375,376] Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel zunächst mit Chloroform später dann mit

Methanol eluiert. Es ließen sich keine Oxidationsprodukte identifizieren.



Ein zweiter Ansatz nach Lösen der Substanz in Benzol und dem Einleiten von reinem Sauerstoff anstelle der Preßluft ergab nach etwa 24 Stunden ein kristallines gelbes Hauptprodukt, welches schon während der Reaktion aus dem Ansatz ausfiel. Es konnte nach Umkristallisation aus Toluol als das erwartete entsprechende  $\alpha$ -Azohydroperoxid (9a)

identifiziert werden. Das Schmelzverhalten bei 68 °C unter Zersetzung steht in Übereinstimmung zum bereits bekannten Schmelzpunkt von 68 °C (unter Zersetzung). [470] Die MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren korrespondieren zu den in der Literatur bekannten Daten. [350,376] Zusätzlich wurde ein  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum angefertigt, dessen Interpretation das Vorliegen von Verbindung (9a) unterstützt.

#### **4.3.2 Oxidation durch $\text{FeCl}_3$**

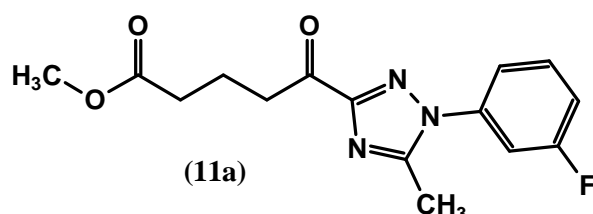
##### Verbindung (11):

300 mg Substanz wurden in 200 ml Methanol gelöst und unter Rühren und Eiskühlung mit einer äquimolaren Menge in wenig Methanol gelöstem  $\text{FeCl}_3$  versetzt und bei Raumtemperatur stengelassen. Innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe der Lösung des Eisen(III)-Salzes zum Ansatz kam es zur intensiven blau-schwarz-Verfärbung der Lösung. Nach drei Stunden war mittels DC-Kontrolle außer dem Ausgangsstoff nur das kurzzeitige Auftreten von zwei Nebenflecken sowie einer Substanz auf dem Startpunkt zu erkennen. Die neuerliche Zugabe einer äquimolaren Menge an  $\text{FeCl}_3$  nach 24 Stunden erbrachte eine vollständige Umsetzung des Ausgangsstoffes, jedoch zunächst nur zwei mittels DC trennbare Flecken geringer Intensität. Lediglich auf dem Startfleck ließ sich noch eine weitere Substanz erkennen. Doch auch durch vielfache Variation des Laufmittelgemisches ließ sich keine Erhöhung des Rf-Wertes erreichen. Die Lösung wurde eingeeengt und der Rückstand in Isopropanol aufgenommen. Die dabei auftretenden gelbbraunen Niederschläge wurden abzentrifugiert und durch die entsprechenden Nachweise als  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ - bzw.  $\text{Cl}^-$ -Salze identifiziert. [377] Eine weitere säulenchromatographische Auftrennung des Filtrates (zunächst  $\text{CHCl}_3$ , dann Methanol als mobile Phase) führte nicht zu faßbaren Produkten.

### 4.3.3 Oxidation durch HgO

#### Verbindung (11):

300 mg der Substanz wurden in 200 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit der zweifach molaren Menge an HgO versetzt. Nach zwei Stunden war eine intensive Rotfärbung der Lösung zu erkennen. Mittels DC-Kontrolle waren neben dem Hauptprodukt noch etwa fünf Flecke jeweils geringer Intensität auszumachen. Nach 48 Stunden wurde das sedimentierte Quecksilbersalz abfiltriert, das Filtrat eingeeengt



und in Toluol wieder aufgenommen. Die Lösung wurde zwei Tage bei -18 °C stengelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abgetrennt und aus Hexan/Diethylether sowie aus Isopropanol mehrfach umkristallisiert. Die feinen weißen Nadeln mit einem

Molpeak bei 305 im MS-Spektrum zeigten einen Schmelzpunkt von 59 °C und konnten durch <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, sowie UV/Vis-spektroskopische Methoden als das entsprechende Triazol (11a) identifiziert werden. Das Ergebnis der Elementaranalyse bestätigte dies. Die Verbindung wurde in einer Ausbeute von etwa 55 % erhalten. Weitere Reaktionsprodukte konnten aus dem Ansatz nicht isoliert werden.

#### Isolierte Produkte der Umsetzungen

Hierbei bedeuten J = Kopplungskonstante [Hz], δ = chemische Verschiebung [ppm], s = Singulett, t = Triplett, m = Multipllett.

*2-Oxo-N-phenyl-2-piperidin-1-yl-acetamid (3b)*: C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (231,28), farblose Kristalle, Fp 159-160 °C

☞ MS (70 eV): m/z [%] = 232 [100] [M]<sup>+</sup>, 112 [81] [CON(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 84 [81] [N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 77 [21] [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>

☞ <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ [ppm] = 3,3-3,4 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 3,8-3,9 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 6,7-7,5 (m, 5H, arom.), 9,39 (s, 1H, NH)

☞ C<sub>ber.</sub> 67,22 % C<sub>gef.</sub> 67,23 %, H<sub>ber.</sub> 6,94 % H<sub>gef.</sub> 7,01 %, N<sub>ber.</sub> 12,06 % N<sub>gef.</sub> 11,81 %

*2-Amino-2-oxo-N-(2-chlorphenyl)-acetamid (4a)*: C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MG 198,61) farblose Kristalle, Fp 182-183 °C (Fp 183 °C [374])

☞ MS (70 eV): m/z [%] = 198 [24] [M]<sup>+</sup>, 163 [100] [M-Cl]<sup>+</sup>, 154 [38] [M-NH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup>, 127 [39] [4Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH]<sup>+</sup>

*1-(3-Acetylphenyl)-5-(4-fluorphenylamino)-1H-1,2,4-triazin-6-on-3-yl-N-(4-fluorphenyl)formamid (7a)*:

C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (MG 461,43), weißgraue Kristalle, Fp 105-108 °C

☞ MS: m/z [%] = 461 [100] [M]<sup>+</sup>, 441 [4] [M-F]<sup>+</sup>, 419 [12] [M-CH<sub>3</sub>CO]<sup>+</sup>, 351 [4] [M-4F-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH]<sup>+</sup>

☞ <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, in DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 2,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,1-8,2 (m, 12H, arom.), 10,74 (s, 1H, NH), 11,25 (s, 1H, NH)

☞ hochauflösende MS:  $m/z = 484,1199 [M+Na]^+$ , kalkuliert für  $C_{24}H_{17}F_2N_5O_3Na = 484,1197$

*α-Phenylazobenzylhydroperoxid (9a)*:  $C_{13}H_{12}N_2O_2$  (MG 228,25), gelbe Kristalle, Fp 68 °C (Zersetzung)

☞  $^1H$ -NMR (400 MHz, in  $C_6D_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 6,36 (s, 1H, NCH), 7,0-7,8 (m, 10H, arom.), 8,88 (s, 1H, OH)

☞  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, in  $C_6D_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 107,8 (1C, CHOOH), 123-132 (10C, arom. CH), 134,7 (1C, arom.  $\underline{C}$ CHOOH), 151,9 (1C,  $\underline{C}$ NNCOOH)

*5-[1-(3-Fluorphenyl)-5-methyl-1,2,4-triazol-3-yl]-5-oxopentansäuremethylester (11a)*:  $C_{15}H_{16}FN_3O_3$  (MG 305,31), farblose Nadeln, Fp 59 °C

☞ MS: (70 eV):  $m/z$  [%] = 305 [20]  $[M]^+$ , 274 [29]  $[M-CH_3O]^+$ , 232 [64]  $[M-CH_3O, -CH_3]^+$ , 204 [100]  $[M-CH_3OCO(CH_2)_3]^+$ , 177 [18]  $[M-CH_3OCO(CH_2)_3CO]^+$

☞  $^1H$ -NMR (200 MHz, in  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1,92 (m,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,27 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2,39 (s, 3H,  $CCH_3$ ), 3,00 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 3,49 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 7,1-7,4 (m, 4H, arom.)

☞  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, in  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 12,4 (1C,  $CH_2$ ), 18,4 (1C,  $CH_3$ ), 32,6 (1C,  $CH_2$ ), 38,0 (1C,  $CH_2$ ), 51,1 (1C,  $CH_3O$ ), 115-117 (4C, arom. CH), 132,6 (1C, arom.  $\underline{C}$ CH), 154,1 (1C,  $N\underline{C}CH_3$ ), 158,6 (1C,  $CO\underline{C}N$ ), 159,9 (1C, CF,  $J(^{13}C^{19}F) = 151$  Hz), 173,4 (1C,  $\underline{C}OOCH_3$ ), 192,8 (1C,  $N\underline{C}CO$ )

☞  $C_{ber.}$  59,01 %  $C_{gef.}$  58,70 %,  $H_{ber.}$  5,28 %  $H_{gef.}$  5,16 %,  $N_{ber.}$  13,76 %  $N_{gef.}$  13,88 %

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Untersuchungen an der 15-LOX

#### 5.1.1 Amidrazone als Inhibitoren der LOX

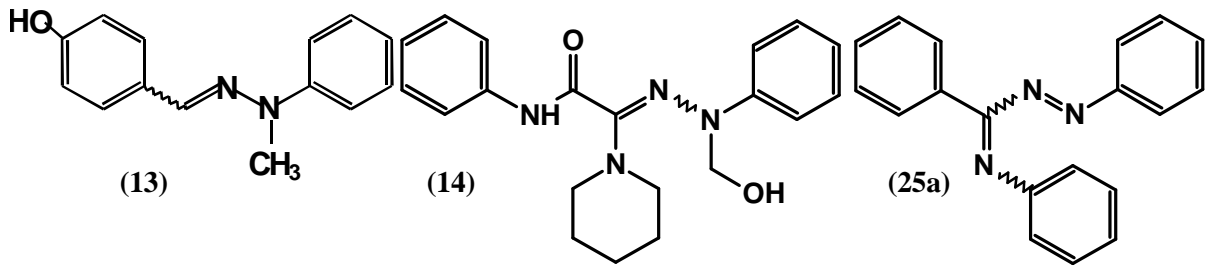
Hydrazone sind schon des längeren als Inhibitoren verschiedenster Enzyme [378-381], insbesondere aber von Lipoxygenasen [287,289,348,384] bekannt. Als potenter LOX-Inhibitor sei hier exemplarisch das Benzaldehydphenylhydrazon (**9**) genannt (siehe Anhang), welches in unsere Untersuchungen zu Vergleichszwecken Einzug fand. Für diese Verbindung wird gegenüber der L-1 aus Sojabohnen in der Literatur (ohne vorherige E-I-Inkubation) ein  $IC_{50}$ -Wert von 1,2-1,8  $\mu\text{M}$  genannt, was unter unseren Testbedingungen gut reproduziert werden konnte ( $IC_{50}$  von 2,7  $\mu\text{M}$ ) und als ein Hinweis auf vergleichbare Versuchsbedingungen gewertet werden kann. Auch die entsprechenden Aminohydrazon-Derivate (Amidrazone) sind als Inhibitoren diverser Enzyme, insbesondere von COX und LOX, des längeren bekannt. [289,382-386]

##### 5.1.1.1 Die Anfechtung des postulierten Inaktivierungsmechanismus

Ursprünglich postuliert für Phenylhydrazone vom Typ des Benzaldehydphenylhydrazons (**9**) bzw. des Acetonphenylhydrazons (**10**) wurde dieser Mechanismus (siehe Kapitel 3.3, Schema 2) im folgenden auch auf die strukturell sehr ähnlichen Amidrazone-Verbindungen vom Typ des offenkettigen Fro A6 (**3**) [368-370,503] bzw. des semizyklischen HB-1 (**12**) [387] übertragen (Formeln siehe Anhang). Doch wurde in späteren Untersuchungen am Beispiel der Verbindung (**3**) gezeigt, daß eine allgemeine Übertragung des postulierten Mechanismus vermutlich nicht ohne weiteres möglich ist. [133]

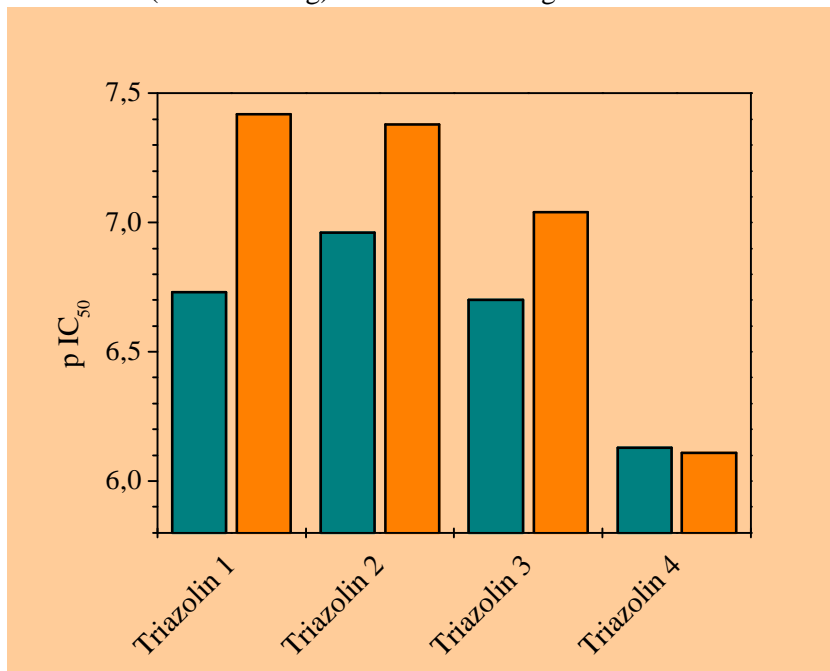
Die folgenden Fakten sprechen gegen die pauschale Übertragung eines derartigen Suizidmechanismus auf die untersuchten Amidrazone:

☞ Dem obigen Suizidmechanismus entsprechend, sollten  $N^1$ -substituierte offenkettige Verbindungen keinerlei Hemmaktivität gegenüber dem Enzym aufweisen. Jedoch erwiesen sich auch derartige Verbindungen als Inhibitoren der L-1. So wurde z.B. für die Hydrazon-Verbindung (**13**) ein  $IC_{50}$ -Wert von  $1,0 \times 10^{-6}$  M gefunden [388], wobei hier eine Wirksamkeit natürlich auch im Zusammenhang mit der Phenoleigenschaft der Substanz diskutiert werden kann. Die  $N^1$ -hydroxymethylierte offenkettige Amidrazone-Verbindung (**14**) erwies sich mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $1,4 \times 10^{-6}$  M ebenso als guter Inhibitor der L-1. Die vergleichbare methylierte Verbindung (**15**) zeigte sich unter den Testbedingungen hingegen als nahezu (wenngleich nicht völlig) wirkungslos ( $IC_{50} = 7,0 \times 10^{-5}$  M).



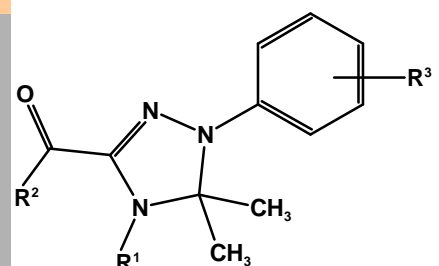
Grundsätzlich kann also kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer oxidablen NH-Position in pseudo-bis-Allylstellung und inhibitorischer Wirkung der Verbindungen aufgestellt werden. Allerdings scheint anhand dieser Daten mit N<sup>1</sup>-Substitution ein beträchtlicher Wirkverlust vergleichbarer offenkettiger Verbindungen um nahezu zwei resp. vier Größenordnungen aufzutreten. Nähere Untersuchungen diesbezüglich wurden mangels weiterer verfügbarer Verbindungen jedoch nicht durchgeführt.

- ☞ Das nach Oxidation aus einem N<sup>3</sup>-phenylierten Benzamidrazon isolierte Azoimin (**25a**) sollte, einem Suizidmechanismus gehorchend, ebenfalls keinerlei Enzyminhibition verursachen (Formel siehe Anhang). Doch konnte demgegenüber keine drastische Veränderung der inhibitorischen Potenz ( $IC_{50} = 2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) gegenüber dem Ausgangsamidrazon (**25**) ( $IC_{50} = 3,9 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) beobachtet werden. [388]
- ☞ Bei Gültigkeit des obigen Mechanismus sollten die durch Ringschluß zwischen N<sup>1</sup> und N<sup>3</sup> der Amidrazonstruktur entstehenden zyklischen Verbindungen keine Hemmung der LOX verursachen. Erstaunlicherweise erwiesen sich nun aber die derartig substituierten Verbindungen (Triazolone) ebenfalls als außerordentlich potente Inhibitoren der L-1 mit  $IC_{50}$ -Werten im Bereich von etwa 10 bis 100 nM (siehe Anhang). Ein direkter Vergleich zwischen den offenkettigen und den entsprechenden



**Abbildung 1:** Einfluß der N<sup>3</sup>-Substitution (R<sup>1</sup>) auf die inhibitorische Potenz ausgewählter zyklischer Amidrazone; Triazolone 1: R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH-, R<sup>3</sup> = H; Triazolone 2: R<sup>2</sup> = 2-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NH-, R<sup>3</sup> = H; Triazolone 3: R<sup>2</sup> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O-, R<sup>3</sup> = 4-Cl; Triazolone 4: R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>-, R<sup>3</sup> = 4-Cl; blau: R<sup>1</sup> = H, rot: R<sup>1</sup> = substituiert mit CH<sub>3</sub> oder 4-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

zyklischen Verbindungen offenbarte in aller Regel eine gleichrangige Hemmpotenz. Interessanterweise konnte innerhalb dieser Substanzklasse durch zusätzliche N<sup>3</sup>-Substitution der Verbindungen teilweise eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität bis um den Faktor zehn verzeichnet werden. Eine Wirkverstärkung war zumindest für die untersuchten



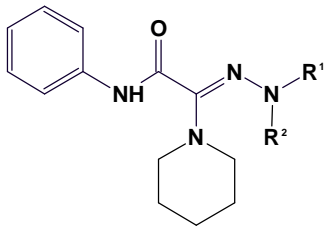
Verbindungen aus der Reihe der Amide und Ester (Triazoline 1 bis 3, Abbildung 1) zu beobachten. Das vergleichsweise eher schlecht wirksame Triazolin 4 aus der Reihe der Ketone wies diesen Effekt nicht auf (siehe Abbildung 1).

- ☞ Auch das nach Ringschluß zwischen dem N<sup>1</sup> und dem N<sup>3</sup> der Amidrazonstruktur entstehende Triazin (**16**) besitzt noch eine mäßig ausgeprägte inhibitorische Aktivität gegenüber der L-1 (IC<sub>50</sub> = 5,5x10<sup>-6</sup> M).
- ☞ Im Gegensatz zu den beschriebenen Hydrazonen offenbarten sich die analogen Amidrazon-Verbindungen, wie z.B. (**3**), generell als ausgesprochen schlechte Substrate einer enzymatischen Oxidation durch die L-1 (siehe Abschnitt 5.1.2.1.2.2). In einigen Fällen konnte eine Oxidation lediglich durch die Verwendung sehr hoher Enzymkonzentrationen überhaupt erst nachgewiesen werden. Die Untersuchungen von Heinisch ließen ebenfalls schon vermuten, daß die Fähigkeit einiger Amidrazone, schnell und quantitativ mit Sauerstoff zu reagieren, nicht die entscheidende Voraussetzung zur LOX-Hemmung sein kann. [389]
- ☞ Die zyklischen Verbindungen wurden auf eine enzymatische Oxidation hin untersucht. Es zeigte sich, daß für N<sup>3</sup>-substituierte Triazoline erwartungsgemäß keine enzymatische Umsetzung zu beobachten war. Damit ist per se ein Suizidmechanismus nach Schema 2 für diese Verbindungen auszuschließen. Überraschenderweise ließen sich hingegen die N<sup>3</sup>-unsubstituierten Verbindungen, trotz der N<sup>1</sup>-Blockade, mit einer in der Regel den entsprechenden offenkettigen Verbindungen vergleichbaren Geschwindigkeit durch die L-1 oxidieren. Mitunter erwiesen sich vereinzelte Vertreter auch als sehr gute Substrate des Enzyms und wurden von der L-1 mit einer (bis zu hundertfach) höheren Geschwindigkeit als vergleichbare offenkettige Derivate umgesetzt (siehe Kapitel 5.1.2.1.2.2). Doch auch hier korrelierte der hohe Umsatz dieser Substanzen durch die L-1 nicht mit einer eventuell daraus zu erwartenden höheren inhibitorischen Potenz. Nicht selten zeigten gerade diese Triazoline eine geringere inhibitorische Aktivität (siehe Anhang). Auch bei den offenkettigen Amidrazonen konnte kein Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung und inhibitorischer Stärke (pIC<sub>50</sub>) gefunden werden. Es existieren sowohl Verbindungen, welche, gemessen an Verbindung (**3**), relativ schnell oxidiert werden (Verbindungen (**19**) und (**20**)) und doch so gut wie keine Hemmwirkung hervorrufen, als auch Inhibitoren, welche trotz langsamer bzw. fehlender Oxidation (Verbindungen (**11**), (**21**), (**23**), (**29**) und (**38**)) eine starke Hemmung des Enzyms bewirken.
- ☞ Der direkte Vergleich der Hemmdaten einiger in *ortho*-Position des Aromaten substituierter Verbindungen ließ einen Zusammenhang zwischen inhibitorischer Potenz und Umgebung der N<sup>1</sup>H-Position vermuten. Je mehr diese Position abgeschirmt wird, desto geringer ist die inhibitorische Wirkung an der L-1. Diese Beobachtung kann als Indiz für einen Suizidmechanismus gewertet werden. Da jedoch, wie im vorigen Absatz beschrieben, kein Zusammenhang zwischen der enzymatischen Umsetzungsgeschwindigkeit und inhibitorischer Stärke der Verbindungen gefunden werden konnte, muß folglich ein anderer Effekt hierfür verantwortlich sein. Weiterhin ist nach N<sup>1</sup>-Substitution noch immer eine Hemmaktivität gegenüber der LOX zu verzeichnen, so daß die



Zugänglichkeit dieser Position lediglich einen Einfluß auf die Quantität der Hemmung hat, nicht jedoch Ursache hierfür sein kann. Die Daten sind in der folgenden Tabelle II zusammengefaßt.

**Tabelle II:** Einfluß einer Abschirmung der N<sup>1</sup>H-Position auf die inhibitorische Potenz einiger offenkettiger Amidrazon-Derivate

Verbindungen		pIC <sub>50</sub>
		
(3)	R <sup>1</sup> = Phenyl, R <sup>2</sup> = H	8,00
(86)	R <sup>1</sup> = 2-Fluorphenyl, R <sup>2</sup> = H	7,10
(87)	R <sup>1</sup> = 2-Chlorphenyl, R <sup>2</sup> = H	6,47
(17)	R <sup>1</sup> = 2,6-Dimethylphenyl, R <sup>2</sup> = H	6,47
(18)	R <sup>1</sup> = 2,6-Dichlorphenyl, R <sup>2</sup> = H	6,08
(20)	R <sup>1</sup> = 4-Trifluormethyl-chromen-2-on-7-yl, R <sup>2</sup> = H	61 % Hemmung bei 2,5x10 <sup>-4</sup> M
(15)	R <sup>1</sup> = Phenyl, R <sup>2</sup> = CH <sub>3</sub>	4,16

☞ Schließlich ist es, anders als bei den Arylhydrazonen, trotz mannigfaltiger Anstrengungen bisher nicht gelungen, Amidrazone vom Typ der Verbindung (3) in die korrespondierenden  $\alpha$ -Azohydroperoxide zu überführen bzw. einen eindeutigen Nachweis hierfür zu erbringen oder dies gar in einen kausalen Zusammenhang zur Inaktivierung der LOX zu stellen. [390]

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein initialer Oxidationsschritt des Inhibitors entsprechend dem oben beschriebenen Suizidmechanismus generell keine Voraussetzung zur Inaktivierung der LOX sein kann. Inaktivierung des Enzyms und Oxidation des Inhibitors scheinen offenkundig separate und möglicherweise auch voneinander unabhängige Prozesse zu sein. Der postulierte Suizidmechanismus kann folglich nicht ohne weiteres auf diese Verbindungen angewendet werden. Im folgenden soll nun der Frage nachgegangen werden, ob den beschriebenen Substanzen ein einheitlicher (und wenn ja, welcher) Inhibitionstyp zugrunde liegt sowie ob überhaupt bzw. in welchem Ausmaß die beschriebene Inhibitoroxidation Anteil an der Hemmung der L-1 hat.

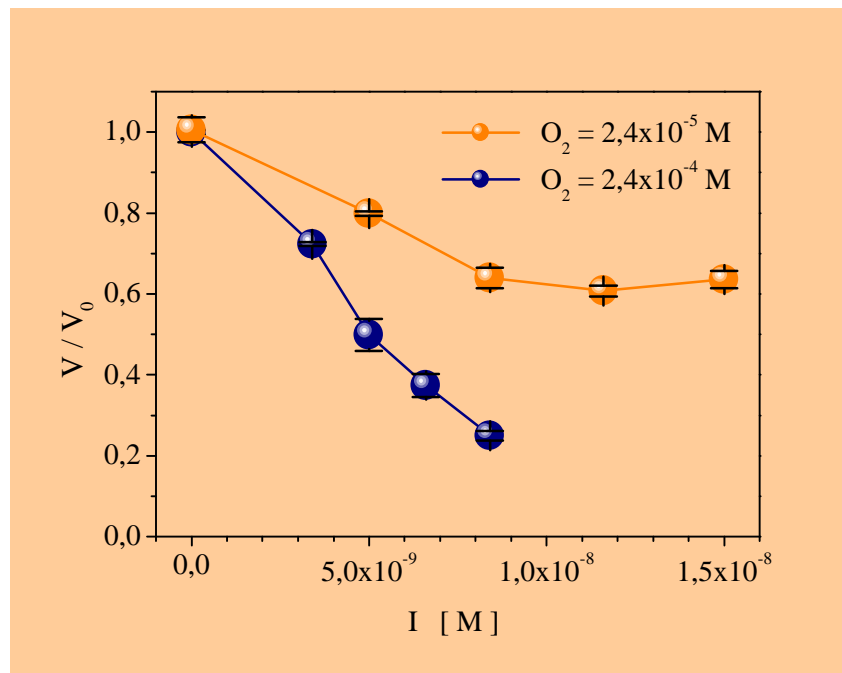
### 5.1.1.2 Der Einfluß von Sauerstoff auf die Inhibition

Die Inhibitoroxidation ist also offensichtlich keine zwingende Voraussetzung zur Hemmung der L-1. Eine interessante Frage an dieser Stelle ist: Welchen Einfluß hat nun der Sauerstoff, genauer die Sauerstoffkonzentration des Meßmediums, auf die Inaktivierung des Enzyms durch die untersuchten Verbindungen?

Da eine Hemmung der L-1 durch die getesteten Amidrazone bzw. Triazoline offenbar auch ohne vorherige Inhibitoroxidation eintritt (siehe oben), sollte man keinen Einfluß der  $O_2$ -Konzentration auf das Ausmaß der Hemmung erwarten. Bei den Phenylhydrazonen wurde diesbezüglich schon von Bombard et al. [348,349] eine beträchtliche Abhängigkeit gefunden. Nach anaerober E-I-Präinkubation konnte dort keinerlei Inaktivierung der L-1 durch Hexanalphenylhydrazon (**1**) beobachtet werden, was wiederum im Einklang zu ihrem postulierten Suizidmechanismus für die Phenylhydrazone steht. In Analogie hierzu führten wir ähnliche Untersuchungen durch. Da die Aktivität der LOX bezüglich der Fettsäuredioxygenierung nur in Gegenwart von  $O_2$  meßbar ist, nahmen wir ein indirektes Verfahren zu Hilfe. Durch Begasung mit Argon wurde der Sauerstoffpartialdruck der Pufferlösung um den Faktor zehn reduziert (auf etwa  $25 \mu M$ ). Der Inhibitor wurde in diesem sauerstoffarmen Medium mit dem Enzym für drei Minuten vorinkubiert, anschließend ein Aliquot der Lösung entnommen und dessen Enzymaktivität in luftgesättigtem Puffer bestimmt. Parallel hierzu wurde ein Kontrollexperiment vermittels E-I-Präinkubation in luftgesättigtem Puffer unternommen.

Erwartungsgemäß führt die Präinkubation von E mit dem Hydrazon (**9**) im sauerstoffarmen Medium zu einer verhältnismäßig verringerten inhibitorischen Wirkung (Abbildung 2). Bemerkenswerterweise konnte ein derartiger Effekt, wenngleich nicht so intensiv ausgeprägt, sowohl bei dem offenkettigen Amidrazon (**3**) als auch bei dem am  $N^3$ -methylierten Triazolin (**21**) beobachtet werden (Abbildung 3).

Allenfalls für Verbindung (**3**) könnte aufgrund deren langsamer enzymatischer Oxidation durch die LOX (siehe Kapitel 5.1.2.1.2) eine gewisse Abhängigkeit der Inhibition vom Sauerstoffgehalt der Lösung vermutet werden. Für Verbindung (**21**) hingegen, welche nachgewiesenermaßen nicht einer enzymatischen

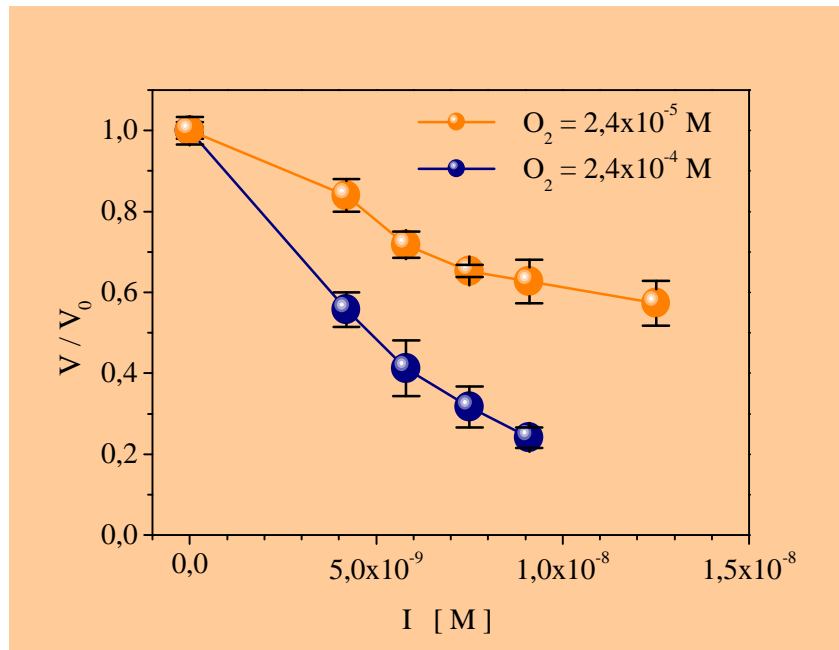


**Abbildung 2:** Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung des Phenylhydrazons (**9**) auf die L-1 in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des Mediums; gelbe Kurve:  $O_2 = 2,4 \times 10^{-5} M$ , blaue Kurve:  $O_2 = 2,4 \times 10^{-4} M$ ,  $E = 4,0 \times 10^{-9} M$ ,  $S = 2,0 \times 10^{-4} M$

Umsetzung unterliegt, ist dieses Resultat überraschend. Möglicherweise begünstigt die Gegenwart von  $O_2$  die Bindung des Inhibitormoleküls an das Enzymmolekül.

Dieser Effekt ist zunächst gänzlich unerwartet und bedarf einer gesonderten Erklärung. Rein formal handelt es sich bei der LOX-katalysierten Oxidation von Fettsäuren um eine Zwei-Substrat-Reaktion ( $O_2$  + Fettsäure: Bi-Uni-Reaktion), wobei bei ausreichender Sauerstoffsättigung des Meßmediums der  $O_2$ -Term vereinfachend vernachlässigt und eine Ein-Substrat-Reaktion (Uni-Uni-Reaktion) zugrunde gelegt wird.

In der Literatur wird der Zeitpunkt der  $O_2$ -Bindung im aktiven Zentrum der LOX bzw. der Fakt als solcher seit geraumer Zeit diskutiert (siehe Kapitel 3.1.3). Einerseits wird angenommen, daß der Sauerstoff erst nach erfolgter Radikalbildung des Fettsäuresubstrates zum aktiven Zentrum des Enzyms hinzutritt und mit dem entstandenen Radikal diffusionslimitiert reagiert. Für das  $O_2$ -Molekül wäre demnach gar keine eigene Bindungsstelle am Enzymmolekül vorhanden. Somit wäre also auch eine Promotion der Inhibitorbindung (bzw. -wirkung) am Enzym hierdurch nicht wahrscheinlich. Andererseits konnte aber anhand entsprechender kinetischer Untersuchungen [152-154,192] ermittelt werden, daß  $O_2$  offenbar auch als allosterischer Effektor an der L-1 fungiert und so die Affinität des Substrates zum Enzym positiv beeinflusst. [150,391] Es wäre also durchaus denkbar, daß durch die Gegenwart von  $O_2$  die Affinität des Inhibitors zum Enzym beeinflusst wird.

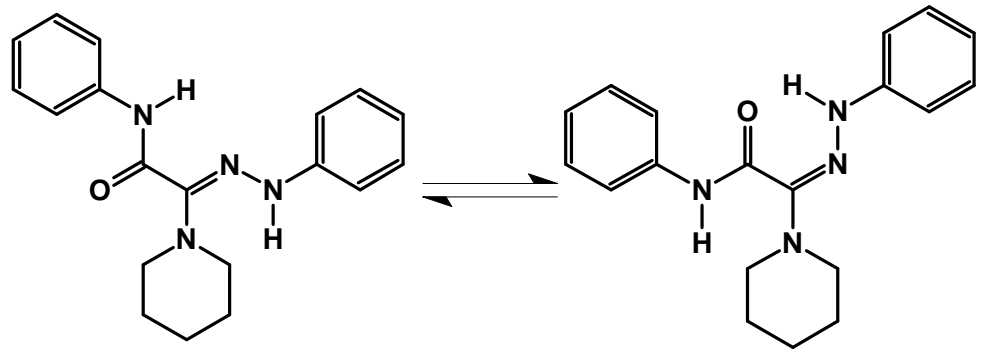


**Abbildung 3:** Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung des zyclischen Amidrazons (**21**) auf die L-1 in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des Mediums; gelbe Kurve:  $O_2 = 2,4 \times 10^{-5}$  M, blaue Kurve:  $O_2 = 2,4 \times 10^{-4}$  M;  $E = 4,0 \times 10^{-9}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M

### 5.1.1.3 Der Einfluß der Konfiguration

Aufgrund der im Molekül enthaltenen C=N-Doppelbindung sind die offenkettigen Verbindungen zur Ausbildung von cis/trans-Isomeren befähigt (Abbildung 4). Zur Testung lagen in der Regel die cis-Isomere vor. Eine Ausnahme hiervon bildete lediglich Verbindung (**15**), welche in der trans-Form zur Untersuchung vorlag. [392] Durch Galey et al. [348] wurde am Beispiel des Hexanalphenylhydrazons (**1**) beobachtet, daß sich die beiden Konfigurationsisomere beträchtlich in ihrer Wirkung am Enzym unterscheiden. Ohne vorherige E-I-Inkubation war kein signifikanter Unterschied der Wirkung erkennbar, jedoch konnte bereits nach einer einminütigen Prä-inkubation eine 10-fach stärkere Hemmung des cis-

Isomers verzeichnet werden. Die Vermutung lag also nahe, daß bei Gültigkeit eines ähnlichen Interaktionsmechanismus bei den untersuchten Amidrazonverbindungen ebenfalls



**Abbildung 4:** cis/trans-Isomerie der offenkettigen Amidrazone am Beispiel der Verbindung (3)

eine diesbezügliche Differenzierung auftritt. An dieser Stelle muß hinzugefügt werden, daß durch die Einführung des höherwertigen N-Substituenten am Hydrazonkohlenstoffatom formal eine Konfigurationsumkehr im Vergleich zu den Hydrazonen eintritt. Eine cis-Hydrazonstruktur entspricht also in der Konfiguration einem trans-Amidrazon und umgekehrt.

Am Beispiel der Verbindung (3) konnte gezeigt werden, daß sowohl mit als auch ohne Vorinkubation nur ein geringer Unterschied in der Wirkung der Isomere an der L-1 besteht. Das ist für diese Verbindung aber nicht weiter verwunderlich, da aufgrund der nachgewiesenen 1:1-Stöchiometrie des finalen EI-Komplexes (siehe unten) das zu erwartende Maximum an inhibitorischer Aktivität für Verbindung (3) ja bereits erreicht ist. Eine drastische Zunahme der inhibitorischen Potenz beim trans-Isomer ist deshalb nicht zu erwarten. Interessanterweise resultierte gleichwohl auch keine erhebliche Verschlechterung der inhibitorischen Aktivität durch den Einsatz des cis-Isomers. Auch bei Verbindung (22) konnte aufgrund der bereits hohen inhibitorischen Potenz des cis-Isomers nur eine marginale Verbesserung der inhibitorischen Wirksamkeit durch Verwendung des trans-Isomers beobachtet werden.

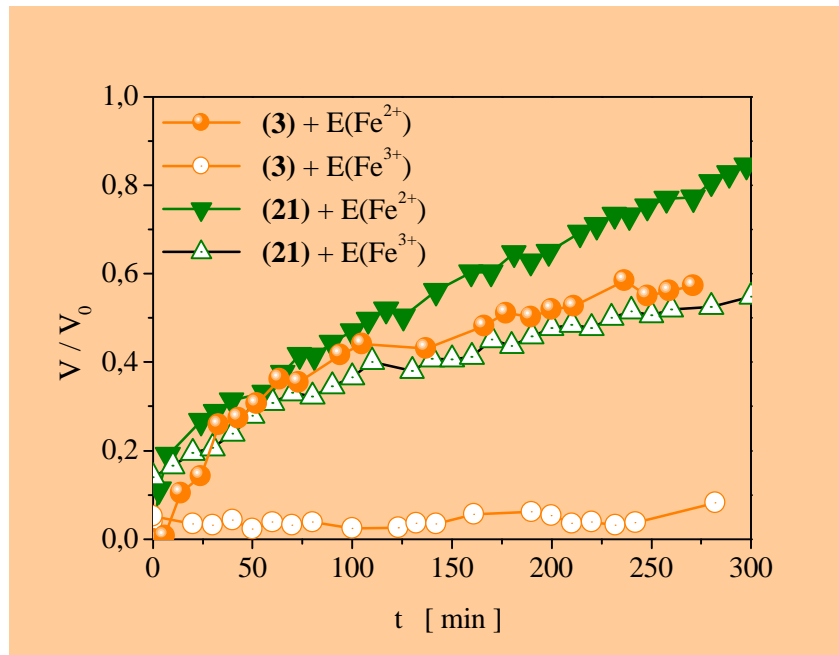
pIC <sub>50</sub> der Verbindung (3):	-cis: 8,00	-trans: 8,10
pIC <sub>50</sub> der Verbindung (22):	-cis: 7,92	-trans: 7,98

Wenngleich die Unterschiede in der Inaktivierungspotenz der einzelnen Isomere lediglich geringfügig ausgeprägt sind, so ist doch offenkundig, daß eine Bevorzugung des trans-Isomers der Verbindungen bezüglich der Inaktivierungspotenz besteht. Im Vergleich zu den Hydrazonen sind hier also wiederum deutliche Parallelen festzustellen.

#### 5.1.1.4 Reversibilität/Irreversibilität der Inaktivierung

Vor geraumer Zeit konnte durch Galey bzw. Bombard et al. [348,349] gezeigt werden, daß verschiedene Phenylhydrazone zur irreversiblen Inaktivierung der L-1 befähigt sind, was im Einklang mit der von ihnen postulierten Mechanismus-orientierten Hemmung steht. Suizidsubstrate bewirken (zwar nicht ausschließlich jedoch in aller Regel) eine irreversible Inaktivierung des jeweiligen Enzyms. [393-395] Als wenige Ausnahmen hiervon sind z.B. die Suizid-Inaktivierung der DNA-Polymerase I durch Epoxy-ATP oder auch die Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol zu erwähnen, welche nicht in der Bildung

eines kovalent modifizierten Proteins resultieren. [396,407] Diese stellen jedoch eher die Ausnahme dar, so daß verallgemeinernd zu sagen ist, daß eine irreversible Inaktivierung im vorliegenden Fall als wichtiges Indiz für eine Mechanismus-orientierte Hemmung zu werten wäre. Um dies anhand der untersuchten Verbindungen (**3**) und (**21**) zu überprüfen, wurden die nachstehend diskutierten Dialyse-Experimente unternommen (Abbildung 5). Dabei kam es zu folgenden Ergebnissen: Das Triazolol (**21**) wird sehr fest, aber reversibel sowohl von der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - als auch von der



**Abbildung 5:** Auftragung der Enzymaktivität gegen die Dialysezeit für die Verbindungen (**3**) (gelbe Kurven) und (**21**) (grüne Kurven) nach vorausgegangener Inkubation des Inhibitors mit der  $\text{Fe}^{2+}$ -Form (geschlossene Symbole) bzw. mit der  $\text{Fe}^{3+}$ -Form (offene Symbole) des Enzyms;  $E = 6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $I = 1,2 \times 10^{-5} \text{ M}$  (Verbindung (**3**)) bzw.  $I = 3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  (Verbindung (**21**)), für Aktivitätsbestimmung  $20 \mu\text{l}$  Aliquots,  $S = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

$\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form gebunden. Bezugnehmend auf das Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung (Gleichung 1, Gleichungen siehe Anhang) ergeben sich Halbwertszeiten für den Zerfall des inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexes von  $t_{1/2} = 245 \text{ min}$  für die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form und von  $130 \text{ min}$  für die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form mit  $k_{\text{off}}$ -Werten für diesen Prozeß von  $4,7$  bzw.  $8,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Für das offenkettige Amidrazon (**3**) konnte ein vergleichbarer Wert von  $t_{1/2} = 225 \text{ min}$  für die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form der LOX ermittelt werden ( $k_{\text{off}} = 5,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Es konnte jedoch überraschenderweise keinerlei Reversibilität der Inhibition nach Präinkubation des Inhibitors mit der aktiven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form des Enzyms konstatiert werden ( $k_{\text{off}} = 0$ ).

Die Unterschiede in den Zerfallskonstanten nach Prä-inkubation der beiden Inhibitoren mit der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - bzw.  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 lassen a priori die Existenz verschiedenartiger Komplexe mit der jeweiligen Enzymspezies vermuten. Für die oxidable Substanz (**3**) ist hingegen auch nicht auszuschließen, daß aufgrund der langsam einsetzenden Oxidation des Inhibitors durch die aktive LOX-Spezies eventuell noch ein Nebenweg der Inaktivierung existiert, welcher möglicherweise zu einer damit einhergehenden irreversiblen Enzymmodifikation führt. Auf diese Frage soll noch einmal an späterer Stelle intensiv eingegangen werden (siehe Kapitel 5.1.2.1.2). Für die Inaktivierung des Enzyms scheint dieser Schritt zunächst jedoch nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, da auch schon die inaktive  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form der LOX inhibiert wird, eine äquivalente reversible Hemmung also offenbar auch ohne vorherige Oxidation des Inhibitors stattfinden kann.

Als einzige Ausnahme hiervon wäre das folgende Szenario möglich: Die Bindung des Inhibitors an das Enzym verläuft ebenso langsam. Nach erfolgter Bindung des Inhibitors erfolgt aber dessen Oxidation mit einer vergleichsweise sehr hohen Geschwindigkeit. Nachdem die Reaktion dann durch Substratzugabe initiiert wird, der Enzym( $\text{Fe}^{\text{II}}$ )-Inhibitor-Komplex also sofort durch entstehendes oder bereits enthaltenes 13-HPODE zum Enzym( $\text{Fe}^{\text{III}}$ )-Inhibitor-Komplex oxidiert wird, wird der gebundene Inhibitor so schnell oxidiert, daß dadurch (im Sinne von Schema 2) die Aktivität der LOX noch entsprechend verringert wird. Eine Hemmung wäre also in diesem Falle trotzdem erst nach erfolgter Inhibitoroxidation zu verzeichnen. Dies sollte anhand des folgenden Experimentes überprüft werden, indem die enzymatische Oxidationsgeschwindigkeit von Verbindung (**3**) auch nach Präinkubation des Inhibitors mit der inaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form bestimmt wurde. Zur Differenzierung zwischen Substrat- und Inhibitoroxidation wurde die Reaktion nach E-I-Inkubation durch die etwa äquimolare Zugabe von 13-HPODE initiiert. Anschließend wurde mit der entsprechenden Geschwindigkeit ohne vorherige E-I-Inkubation verglichen. Der direkte Vergleich hierbei zeigte, daß die Oxidationsgeschwindigkeit des Inhibitors nach vorangegangener E-I-Inkubation zwar tendenziell, aber im Prinzip nur unwesentlich, gesteigert war (siehe Kapitel 5.1.2.1.2.2). Insgesamt ließ sich hierdurch eine Steigerung der Geschwindigkeit um etwa den Faktor 2 beobachten, was aber in Anbetracht der relativ großen Unsicherheit der Quantifizierung derart kleiner Geschwindigkeiten zunächst als nicht eindeutig anzusehen war. Zur eindeutigen Klärung dieses Sachverhaltes wurden deshalb die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{cat}}$ ) unter beiden Bedingungen ermittelt. Hierdurch konnte die leicht aber signifikant erhöhte Umsatzrate der Verbindung (**3**) nach vorangegangener E-I-Inkubation bestätigt werden (siehe Kapitel 5.1.2.1.2.2). Gleichwohl ist die Umsetzung des Inhibitors nach vorausgegangener Inkubation mit dem Enzym zu langsam, als daß das eben geschilderte Szenario auftreten kann. Die reversible Hemmung der L-1 durch Verbindung (**3**) findet unabhängig von einer Inhibitoroxidation statt.

Interessanterweise läßt sich dadurch aber weiterhin erkennen, daß nach erfolgter Bindung des Inhibitors am Enzym der Zutritt von 13-HPODE zum Eisenion im aktiven Zentrum nicht behindert wird, folglich die Bindungsstellen von Inhibitor und 13-HPODE als Produkt der katalytischen Reaktion nicht dieselben sein können. Dies legt die Vermutung nahe, daß somit auch die Bindungsstellen von S und I nicht identisch sind, da in aller Regel die Bindungsstellen von S und P identisch sind. Hierauf wird jedoch im Detail noch an späterer Stelle eingegangen (siehe Kapitel 5.1.1.8).

Wie bereits erwähnt, unterliegen auch  $\text{N}^3\text{H}$ -Triazoline einer enzymatisch bedingten Oxidation. Folglich wurden auch aus dieser Verbindungsklasse exemplarisch einige Vertreter auf die Reversibilität der Inaktivierung hin untersucht. Verbindung (**23**) wird ebenso reversibel wie die oben beschriebenen Verbindungen von der inaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form gebunden ( $t_{1/2} = 231 \text{ min}$ ,  $k_{\text{off}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Überraschenderweise ist jedoch im Gegensatz zur offenkettigen Verbindung (**3**) auch die Interaktion mit der aktiven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form in gleicher Weise reversibel ( $t_{1/2} = 261 \text{ min}$ ,  $k_{\text{off}} = 4,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Für Verbindung (**8**) ergaben sich Halbwertszeiten von  $t_{1/2} = 251 \text{ min}$  ( $k_{\text{off}} = 4,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) für die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - bzw.  $352 \text{ min}$  ( $k_{\text{off}} = 3,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) für die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form.

Trotz vorausgegangener Inhibitoroxidation besteht hier also im Gegensatz zur offenkettigen Verbindung (3) eine reversible Hemmung des Enzyms. Setzt man voraus, daß die zyklischen und offenkettigen Amidrazon-Verbindungen primär nach dem gleichen Mechanismus mit dem Enzym interagieren, kann dafür mithin nicht ein Suizidmechanismus nach Schema 2 (Schritt [C]) zugrunde gelegt werden.

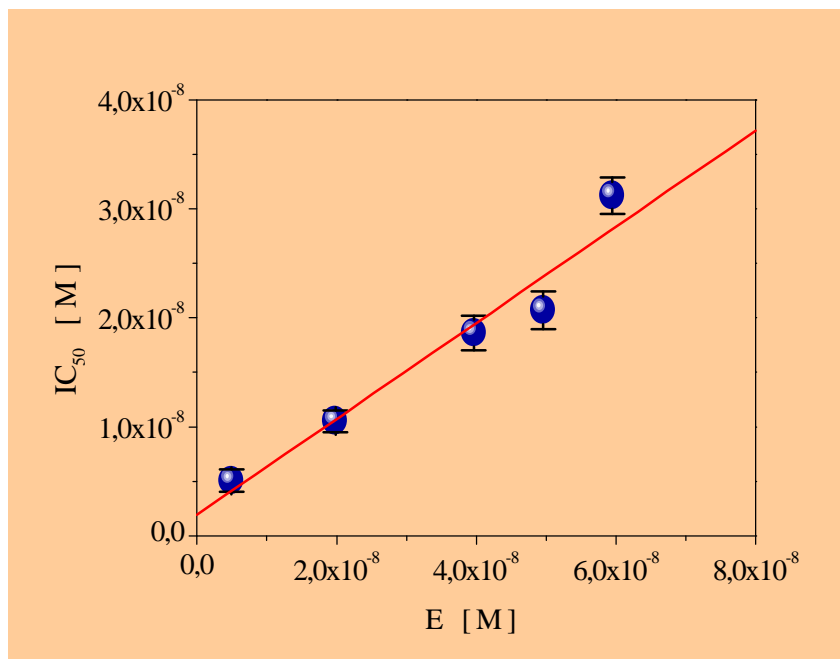
### 5.1.1.5 Hochaffine Inhibition

Den obigen Dialyseversuchen (Abbildung 5) ist zu entnehmen, daß sich die untersuchten Inhibitoren (z.B. (3) und (21)) nur sehr schwer vom Enzymprotein wieder abtrennen lassen. Derartige, sehr fest bindende Substanzen (tight binder) lassen sich nicht ohne weiteres einer klassischen Inhibitoranalyse [397-401] unterziehen, da deren Voraussetzungen, wie z.B. ein schneller und reversibler Bindungsvorgang sowie das Vorliegen eines großen Inhibitorüberschusses gegenüber dem Enzym ( $I \gg E$ ), nicht gegeben sind. [402,403]

Ein sehr einfacher Nachweis dieses hochaffinen Verhaltens ist die lineare Abhängigkeit der  $IC_{50}$ -Werte von der eingesetzten Enzymmenge bei einer definierten Substratkonzentration. Da bei diesem Inhibitor typ I mit E in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis interagiert, ist zum Erreichen des gleichen Effekts um so mehr Inhibitor erforderlich, je größer das Enzymangebot in der Lösung ist. [404,405] Daraus resultieren  $IC_{50}$ -Werte im Bereich der eingesetzten Enzymkonzentration. [406] In Abbildung 6 ist eine derartige Abhängigkeit gemäß Gleichung 2 für die Verbindung (3) gezeigt.

Dieses titrierende Verhalten der hochaffinen Verbindungen wurde ausgenutzt, um das stöchiometrische E-I-Interaktionsverhältnis zu ermitteln. In der folgenden Abbildung 7 ist die Abhängigkeit der

Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration im Ackermann-Potter-Diagramm gezeigt. In Gegenwart des Inhibitors (3) resultieren dabei Kurvenverläufe nach Gleichung 3. Aus der Parallelverschiebung der Asymptoten der Kurven unter Inhibitorzusatz relativ zur Geraden ohne Inhibitorzusatz ist das titrierende Verhalten der Verbindung zu erkennen. Klassische reversible



**Abbildung 6:** Abhängigkeit der  $IC_{50}$  von der eingesetzten Enzymkonzentration: Demonstration des hochaffinen Verhaltens nach E-I-Präinkubation für Verbindung (3);  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M, linearer Fit:  $R = 0,981$

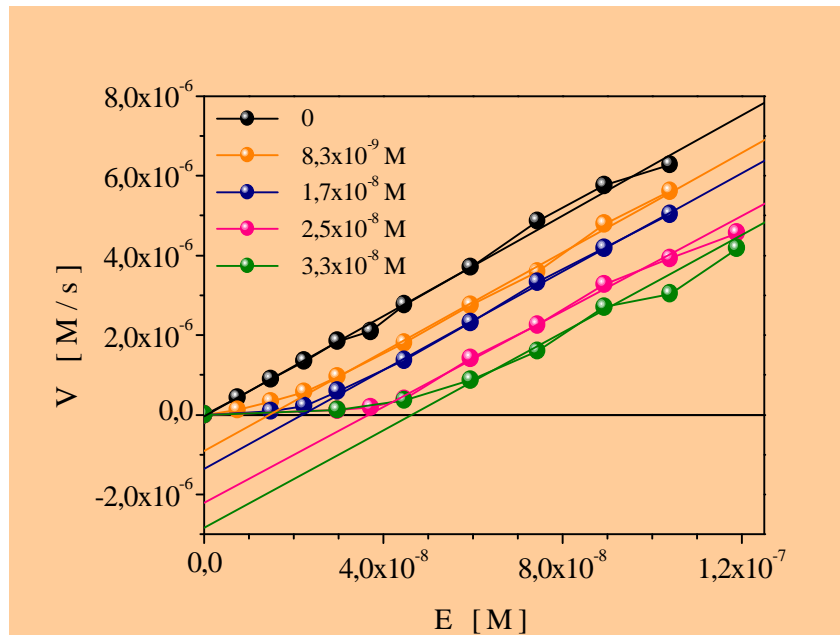
Inhibitoren würden im Gegensatz dazu eine Geraden­schar mit einem gemeinsamen Schnittpunkt im Koordinatensprung erzeugen.

Aus der Sekundärauftragung der Asymptotenschnittpunkte mit der Abszisse vs. Inhibitor­konzentration ergibt sich ein stöchiometrisches Verhältnis der E-I-Interaktion von etwa 1, was bedeutet, daß nur ein Inhibitormolekül nötig ist, um ein Enzymmolekül zu inaktivieren.

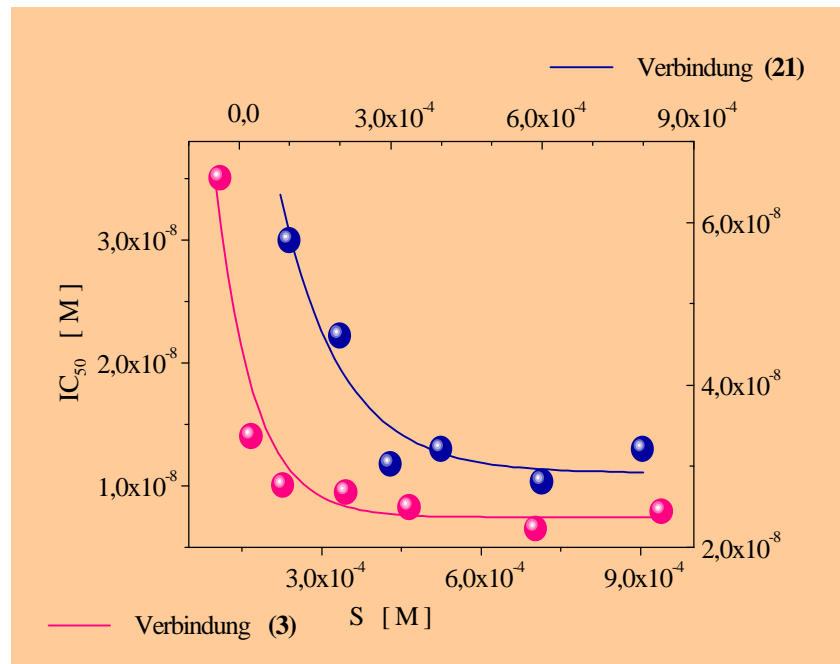
Nach Gleichung 2 resultiert ein (apparenter)  $K_i$ -Wert für den sich bildenden Enzym-Inhibitor-Komplex von  $1,9 \times 10^{-9}$  M, wobei

in der Literatur allerdings unterschiedliche Auffassungen über die Bedeutung des  $K_i$ -Terms in Gleichung 2 herrschen. Cha et al. [406-408] vertreten die Meinung, daß nach Präinkubation eines hochaffinen

Inhibitors mit dem Enzym aufgrund der bereits bestehenden sehr festen Bindung von I der erhaltene  $K_i$ -Wert von [S] unbeeinflusst ist - unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus der E-I-Interaktion. Für einen kompetitiven Mechanismus hieße das, daß nach erfolgter Inhibitorbindung aufgrund der hohen Bindungskräfte zwischen E und I das Substrat nicht mehr in der Lage ist, I zu verdrängen. Hingegen sind andere Autoren der Auffassung, daß auch hier eine Abhängigkeit der  $IC_{50}$  bzw. des



**Abbildung 7:** Ackermann-Potter-Diagramm für Verbindung (3), Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration ohne (obere Kurve: schwarz) bzw. nach Zusatz steigender Inhibitor­konzentrationen (untere Kurven);  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M,  $I = 0, 8,3 \times 10^{-9}, 1,7 \times 10^{-8}, 2,5 \times 10^{-8}, 3,3 \times 10^{-8}$  M (von links nach rechts wie angegeben)



**Abbildung 8:** Abhängigkeit des  $IC_{50}$ -Wertes von der eingesetzten Substratkonzentration nach vorangegangener E-I-Inkubation; obere Skala: Verbindung (21) (rechte Kurve, blau), untere Skala: Verbindung (3) (linke Kurve, rot);  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M



$K_i$ -Wertes von [S] analog den von Cheng und Prusoff aufgestellten Beziehungen für klassische Inhibitoren besteht (Gleichungen 4 bis 6) [409], es sich somit in Gleichung 2 nur um einen Wert für die scheinbare Inhibitions-konstante  $K_{iapp}$  handelt. [404,405,420-422]

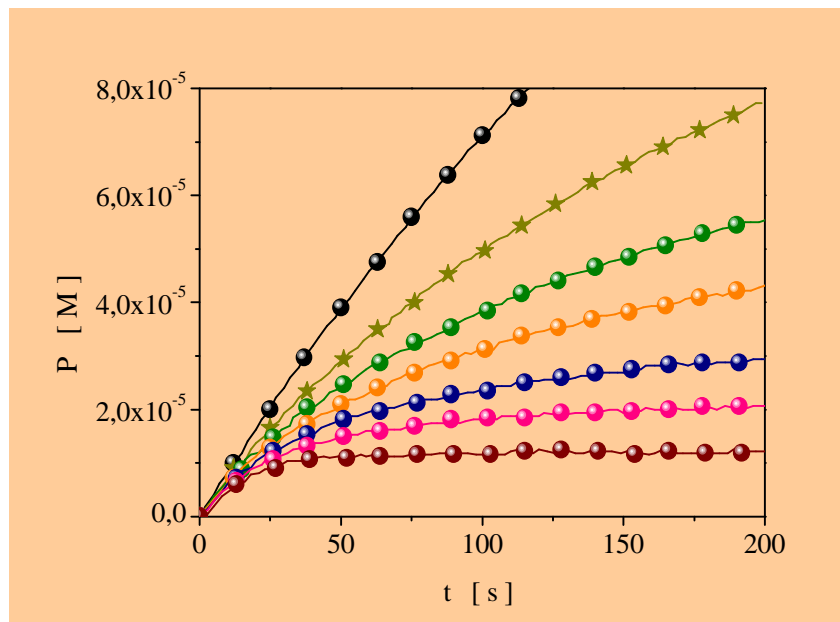
Wie in der folgenden Abbildung 8 dargestellt, konnten wir bei unseren Untersuchungen eine eindeutige Abhängigkeit der  $IC_{50}$  von [S] für die Verbindungen (3) und (21) beobachten. Wider Erwarten war jedoch keine Verdrängung des Inhibitors durch S (Kompetition) zu verzeichnen, was sich in einer Erhöhung der  $IC_{50}$ -Werte mit steigenden [S] zeigen würde. Das Bild einer abfallenden Hyperbel läßt eher auf einen unkompetitiven oder auf einen gemischt nonkompetitiven Mechanismus schließen (Gleichungen 7 bis 10). [410]

Das Erscheinungsbild eines un- oder nonkompetitiven Mechanismus ist zunächst unerwartet. Einerseits kann man aufgrund der enzymatischen Oxidation des Inhibitors (3) (siehe Kapitel 5.1.2.1.2) dessen Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum des mononukleären Enzyms und somit einen kompetitiven Effekt gegenüber dem Substrat erwarten, andererseits wurde aber bereits in vorangegangenen Untersuchungen eine nonkompetitive, vermutlich hochaffine E-I-Interaktion für Verbindung (3) durch verschiedene spezifische Methoden belegt (Methoden nach Henderson und Dixon, siehe [133]). Hierauf soll jedoch noch einmal an späterer Stelle eingegangen werden (siehe Kapitel 5.1.1.7-10). Ein weiteres Indiz gegen eine primäre Kompetition zum Substrat ist auch der im vorangegangenen Kapitel erwähnte mögliche 13-HPODE-Zutritt zum aktiven Zentrum der LOX nach erfolgter Inhibitorbindung, vorausgesetzt, S und 13-HPODE greifen an der gleichen Stelle am Enzym an.

### 5.1.1.6 Zeitabhängigkeit der Inhibition

Wie schon in einigen Untersuchungen festgestellt werden konnte, besteht sowohl für Phenylhydrazon (z.B. (1)) als auch für Amidrazon (z.B. (3)) eine beträchtliche Zeitabhängigkeit der Hemmpotenz gegenüber dem Enzym, was auch exemplarisch für das Triazolin (21) bestätigt werden konnte. Dies läßt sich recht gut anhand der folgenden Abbildung 9 veranschaulichen.

Wird die katalytische Reaktion nach Vorlage von I und S durch Enzymzugabe gestartet, so erhält

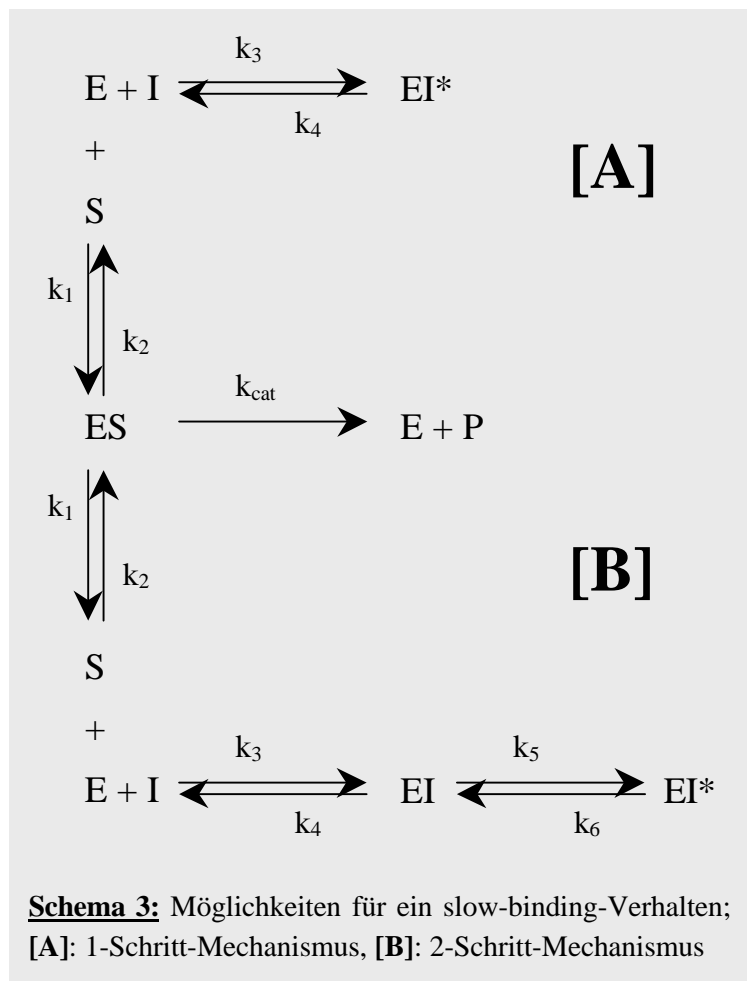


**Abbildung 9:** Produktbildungskurven der enzymatischen Reaktion in Gegenwart von Verbindung (3) ohne E-I-Präinkubation; E =  $5,0 \times 10^{-9}$  M, S =  $4,0 \times 10^{-4}$  M, I = 0,  $8,3 \times 10^{-8}$ ,  $1,3 \times 10^{-7}$ ,  $1,7 \times 10^{-7}$ ,  $2,1 \times 10^{-7}$ ,  $2,5 \times 10^{-7}$ ,  $3,3 \times 10^{-7}$  M (von oben nach unten)

man aufgrund des langsamen Einsetzens der Hemmung biphasische Produktbildungs-kurven (Abbildung 9). [411] Diese sind, entsprechend der Gleichung 11, charakterisiert durch eine initiale exponentielle Phase, gefolgt von einer linearen steady state-Phase. Eine solchermaßen zeitabhängige Hemmung kann vielerlei Ursachen haben. Grundsätzlich können hier verschiedene Mechanismen [412-414], inklusive des postulierten Suizidmechanismus mit irreversibler Enzymmodifikation [415-418], zugrunde gelegt werden. Vermittels Dialyseuntersuchungen (siehe Kapitel 5.1.1.4) konnte exemplarisch die prinzipielle Reversibilität der L-1-Inaktivierung durch die Verbindungen (3) und (21) aufgezeigt werden. Denkbar in diesem Zusammenhang ist unter anderem auch ein Inhibitor-unabhängiges vorgelagertes Gleichgewicht zwischen zwei oder mehreren Enzymformen. Durch Vorversuche, in denen die L-1 für unterschiedliche Zeitintervalle im Meßmedium vor der Inhibitorzugabe vorinkubiert wurde, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Das „slow-binding“-Verhalten hätte durch diesen Vorinkubationsschritt zurückgedrängt werden müssen. Andererseits ist auch eine Enzym-unabhängige Inhibitor-Umlagerung im wäßrigen Medium nicht abzulehnen. Ein derartiger Prozeß als Ursache der zeitabhängigen Enzyminhibition konnte jedoch durch einen analogen Versuchsaufbau ebenso ausgeschlossen werden (siehe auch Kapitel 5.3). Ebenso ist eine Reaktion des Inhibitors mit dem Substrat denkbar aber wohl wenig wahrscheinlich. [419] Somit bleiben der Literatur zufolge noch zwei allgemeine Modellvorstellungen übrig (Schema 3):

[420-423]

Nach Mechanismus [A] sind Assoziation sowie Dissoziation zwischen dem Inhibitor und dem Enzymprotein sehr langsam, während Mechanismus [B] zufolge zunächst sehr schnell ein initialer Kollisionskomplex zwischen E und I gebildet wird, welcher erst anschließend einer langsamen Isomerisierung - dem eigentlichen Inaktivierungsschritt - unterliegt. Mechanismus [B] sollte der Regelfall sein, während [A] eher die Ausnahme darstellt, mitunter aber auch zu beobachten ist. [424-426] Eine recht einfache Möglichkeit zur Differenzierung zwischen den beiden Mechanismen ist die folgende: Wird



**Schema 3:** Möglichkeiten für ein slow-binding-Verhalten; [A]: 1-Schritt-Mechanismus, [B]: 2-Schritt-Mechanismus

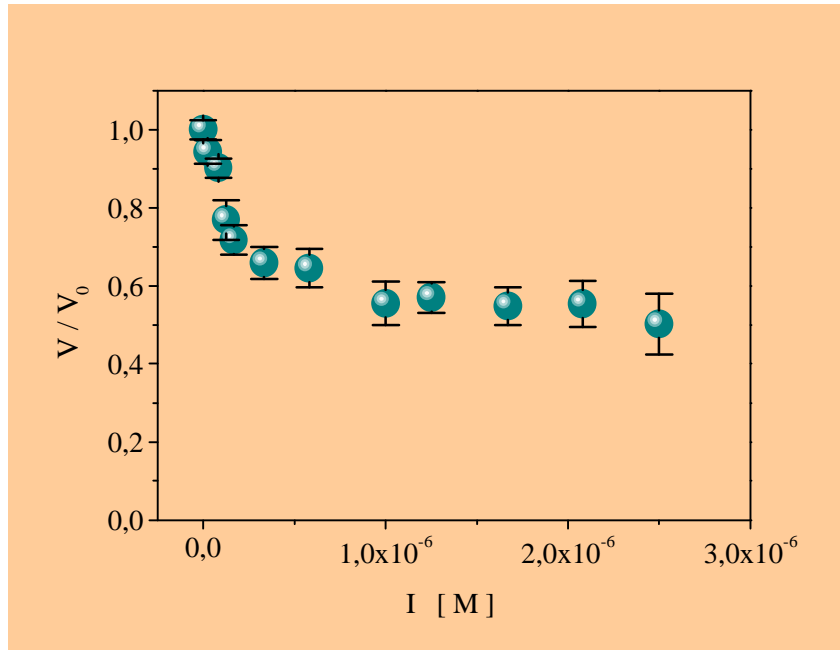
zunächst schnell ein E-I-Komplex gebildet [B], so sollten die Initialanstiege dieser Produktbildungskurven abhängig von der Inhibitorkonzentration sein. Dahingegen besteht bei

Mechanismus [A] eine derartige Abhängigkeit nicht, da EI viel zu langsam gebildet wird, als daß dadurch noch ein Einfluß auf die Initialgeschwindigkeit  $v_i$  der Reaktion möglich wäre. Wie den folgenden Abbildungen 11 und 12 zu entnehmen ist, wird die Initialgeschwindigkeit dieser Produktbildungskurven mit steigenden

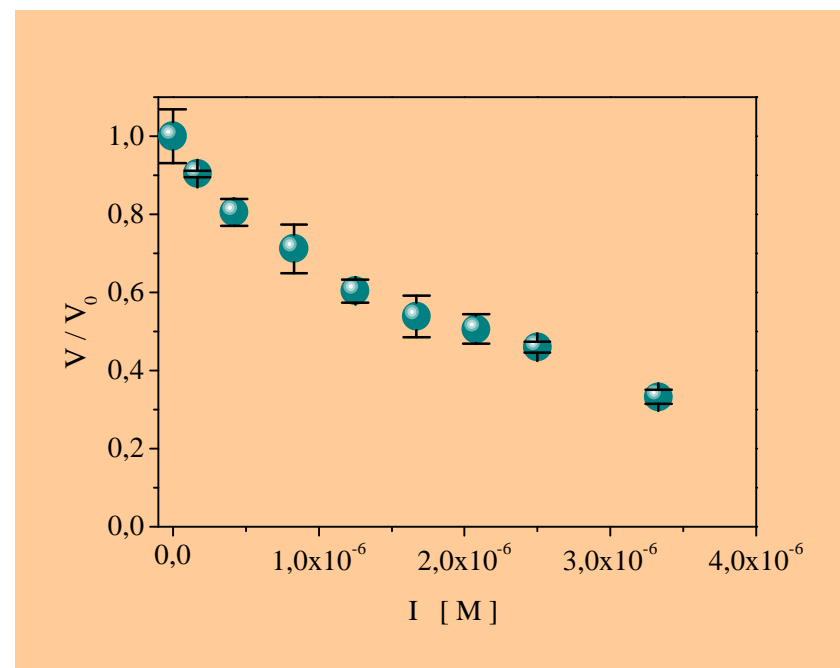
Inhibitorkonzentrationen kleiner, so daß hier generell der 2-Schritt-Mechanismus [B] zugrunde gelegt werden kann. Dies steht auch im Einklang mit den Literaturdaten für das

Hexanalphenylhydrazon (**1**), wofür ebenfalls ein 2-Schritt-Mechanismus vorgeschlagen wurde. [348] Allerdings ist bei unseren Verbindungen (**3**) und (**21**)  $v_i$  wiederum nur teilweise von [I] abhängig. Steigende Konzentrationen des Inhibitors führen im Gegensatz zu Verbindung (**9**) zu keiner weiteren Zunahme der Hemmung, was eine partielle Inaktivierung (bis etwa 50 %) für EI im ersten Bindungsschritt anzeigt (Abbildung 10).

Weiterhin sollte ein hyperboler Zusammenhang zwischen der scheinbaren (kinetischen) Inaktivierungskonstanten 1. Ordnung  $k_{\text{obs}}$  und [I] anstelle eines linearen Zusammenhanges (Gleichung 12) bei Mechanismus [A], entsprechend der Gleichung 13 (siehe Anhang), zu beobachten sein. [410,420-422] Diese Konstante beschreibt den zeitlichen Prozeß der Enzym-inaktivierung bei einer definierten Inhibitorkonzentration.



**Abbildung 10:** Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Reaktion ohne vorangegangene E-I-Inkubation entsprechend den Produktbildungskurven aus Abbildung 9 für Verbindung (**3**),  $E = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $S = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

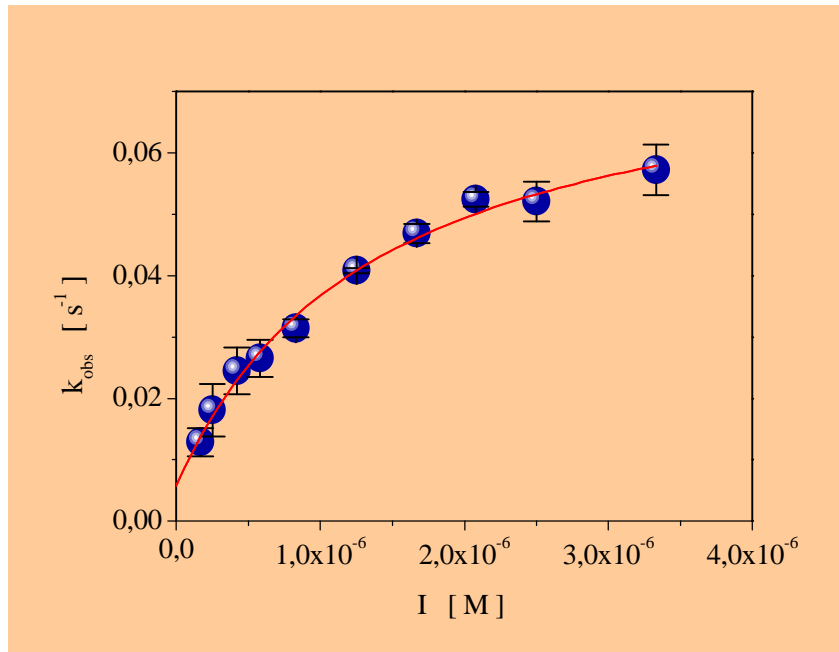


**Abbildung 11:** Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Reaktion ohne vorangegangene E-I-Inkubation für Verbindung (**9**),  $E = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $S = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

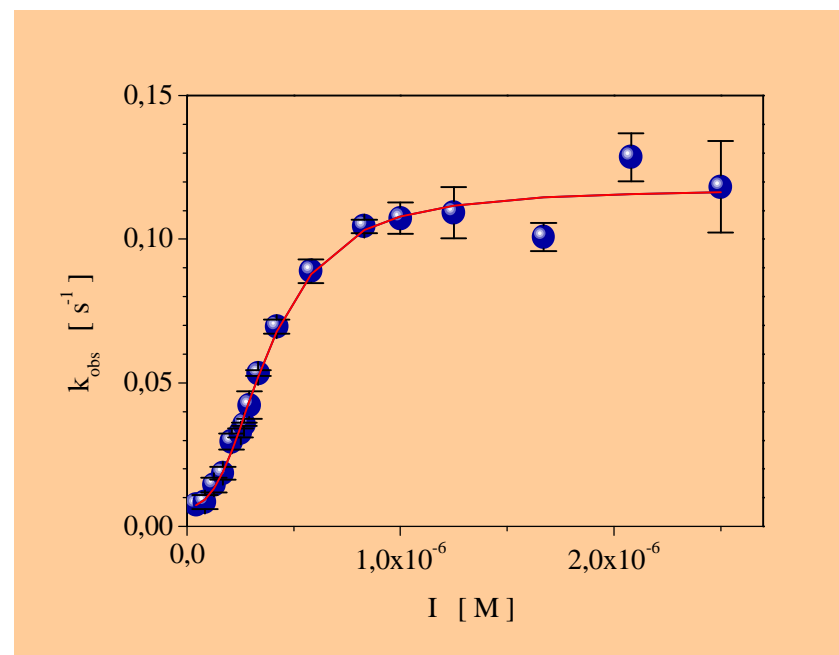
Die nach Gleichung 13 resultierende Hyperbel läßt sich beim Phenylhydrazon (9) gut den erhaltenen Meßwerten anpassen (Abbildung 12). Für Verbindungen (3) (siehe Abbildung 13) und (21) hingegen entspricht die gewählte Hyperbelfunktion aber offenbar nur schlecht der gefundenen Werteschar. Ein sigmoidaler Kurvenverlauf durch die willkürliche Einführung eines Exponenten B für [I] in Gleichung 13 (Gleichung 14) analog dem Hill-

Koeffizienten für [S] in der Hill-Gleichung (Gleichung 15) läßt sich besser an die vorhandenen Meßwerte anpassen. Hiernach resultiert für die Inaktivierungskonstante  $k_5$  ( $= k_{\text{inact}}$ , Schema 3) ein Wert von  $0,11 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$  für Verbindung (3) und von  $0,13 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$  für Verbindung (21). Für die Zerfallskonstante  $k_6$  ( $= k_{\text{off}}$ ) ergeben sich rechnerisch Werte von  $7,01 \pm 4,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für Verbindung (3) und von  $9,31 \pm 4,00 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für Verbindung (21), sowie eine scheinbare Dissoziationskonstante für EI  $K_{\text{iapp}}$  von  $3,87 \pm 0,23 \times 10^{-7} \text{ M}$  für (3) und  $1,97 \pm 0,10 \times 10^{-7} \text{ M}$  für (21). Da aus der Abhängigkeit der  $\text{IC}_{50}$  vs. [S] (Abbildung 8) auf das Vorliegen eines unkompetitiven oder gemischt nonkompetitiven Mechanismus geschlossen werden kann, ergibt sich somit nach den Beziehungen von Cheng und Prusoff (Gleichungen 4 bis 6) ein  $K_i$ -Wert für den EI-Komplex für Verbindung (3) von  $3,52 \times 10^{-7} \text{ M}$  bzw. von  $1,79 \times 10^{-7} \text{ M}$  für Verbindung (21).

Die Tatsache, daß nur durch die Verwendung der Sigmoidalfunktion 14 Ordinaten-schnittpunkte im positiven Bereich der Achse zu verzeichnen sind ( $= k_{\text{off}}$ -Werte), weist auf ihren adäquaten Einsatz hin, wurde doch schon in



**Abbildung 12:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von [I] für Verbindung (9), Fit nach Gleichung 13;  $E = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $S = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

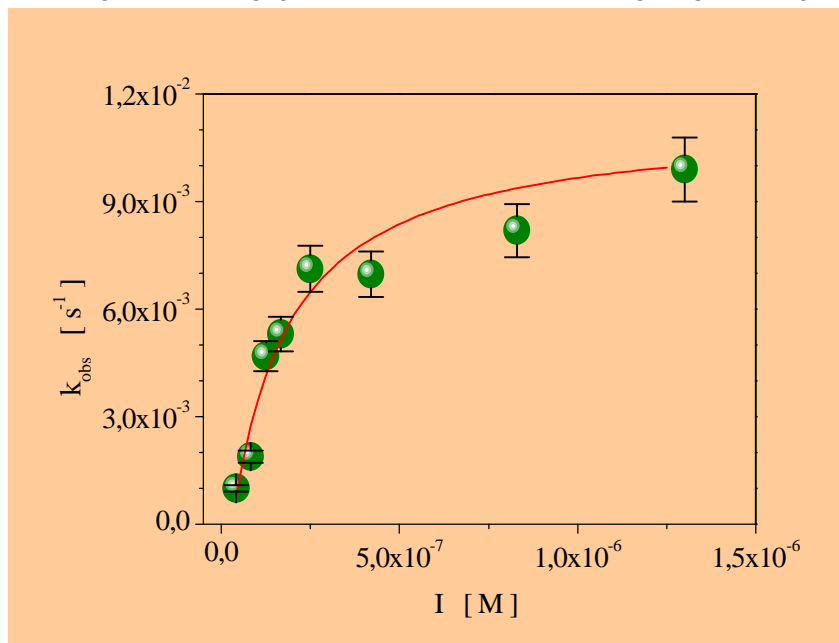


**Abbildung 13:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von [I] für Verbindung (3), Fit nach Gleichung 14;  $E = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $S = 4,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

Abbildung 5 die Reversibilität der E-I-Interaktion nachgewiesen. Eine Quantifizierung der Zerfallskonstante  $k_6$  (Ordinatenschnittpunkt der Hyperbel) über Gleichung 14 ist aufgrund des sigmoidalen Charakters der Funktion sicherlich stark fehlerbehaftet, was sich auch in der großen Fehlerbreite der kalkulierten  $k_{\text{off}}$ -Werte niederschlägt. Der direkte Vergleich offenbart die große Diskrepanz zu den aus den Dialyseversuchen resultierenden Werten. Die im Kapitel 5.1.1.4 ermittelten  $k_{\text{off}}$ -Werte sind um etwa zwei Größenordnungen kleiner als die nach Gleichung 14 kalkulierten Werte.

Für den Exponenten B resultiert nach Gleichung ein Wert von etwa 2 ( $2,40 \pm 0,34$  für Verbindung (3) bzw.  $2,04 \pm 0,2$  für Verbindung (21)). Im Analogieschluß zur Bedeutung des Hill-Koeffizienten ist mit Hilfe dieses Exponenten eine Aussage über die Anzahl der Bindungsstellen oder vielmehr das Ausmaß der Kooperativität zwischen verschiedenen Bindungsstellen von I am Enzymmolekül möglich. [427] Demnach wäre neben der hochaffinen ersten Bindungsstelle noch ein weiterer Bindungsort von I am Enzymprotein zu vermuten. Aus vorangegangenen Experimenten (siehe Abbildungen 6 und 7) wissen wir jedoch, daß nach E-I-Präinkubation schon ein einzelnes Inhibitormolekül der Verbindung (3) ausreicht, um ein Enzymmolekül vollständig zu inaktivieren. Offenbar ist der Mechanismus der Inaktivierung von noch komplexerer Natur als bisher angenommen. Der Exponent B wurde deshalb zunächst lediglich als Mittel zur exakten Hyperbelcharakterisierung eingeführt. Interessanterweise zeigt sich beim Phenylhydrazon (9) kein derartiger sigmoidaler Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und  $[I]$ , so daß sich hier gewisse Unterschiede im Inaktivierungsmechanismus der L-1 aufzeigen.

Für derart langsam agierende Inhibitoren existiert noch eine weitere experimentelle Strategie zur Kalkulation der Inaktivierungskonstanten. Im wesentlichen wird dabei E mit I für verschiedene Zeitintervalle vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Substratzugabe initiiert. Die dabei ermittelten Aktivitätswerte werden semilogarithmisch gegen die Inkubationszeit  $t$  aufgetragen. Es gilt wieder Gleichung 1. Die Anstiegswerte dieser Geraden repräsentieren also Größen für  $k_{\text{obs}}$ . [428] Deutlich ist hier ebenso der hyperbole (nicht lineare) Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und  $[I]$  zu verzeichnen (Abbildung 14), was die These des Vorliegens eines Mehrschrittmechanismus (siehe Schema 3) unterstützt. Überdies spricht hierfür auch die Abhängigkeit der Ordinaten-schnittpunkte der Regressionsgeraden aus der halb-logarithmischen Auftragung der

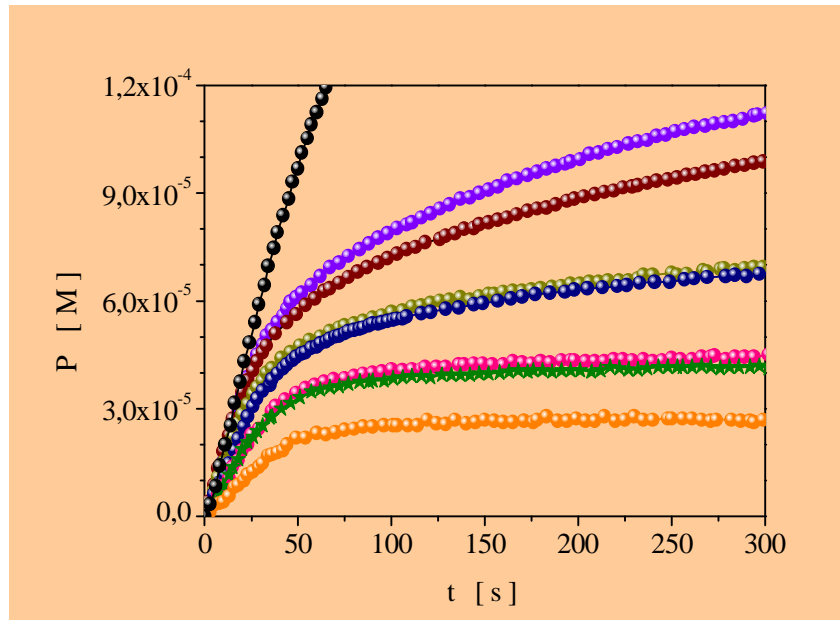


**Abbildung 14:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von  $[I]$  für Verbindung (21) entsprechend den Bedingungen aus Abbildung 16;  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M

Enzymaktivität gegen die Inkubationszeit, wobei wiederum lediglich eine partielle Abhängigkeit zu verzeichnen ist. Der initiale EI-Komplex behält auch hier ein Mindestmaß seiner Aktivität, was auch durch noch so hohe Inhibitorkonzentrationen nicht beeinflusst werden kann (vergleiche Abbildung 10). Aufgrund der zu geringen Meßwertzahl und der experimentell bedingten größeren Schwankungsbreite der einzelnen Werte wurde hier darauf verzichtet, zwischen einem sigmoidalen und einem hyperbolen Verhalten zu differenzieren.

Die Berechnung der Inaktivierungskonstante ( $k_{\text{inact}}$ ) auf diese Weise ergab für Verbindung (3) einen Wert von  $3,0 \pm 0,20 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  und von  $1,4 \pm 0,12 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  für Verbindung (21). Die ermittelten Werte weichen somit um den Faktor drei bis zehn signifikant von den entsprechenden ohne E-I-Präinkubation ermittelten Werten ab (siehe oben). Offenbar bewirkt die gleichzeitige Gegenwart von Substrat (oder Produkt) eine vergleichsweise schnellere Enzyminaktivierung durch den Inhibitor, was sich in den entsprechend höheren Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung niederschlägt.

Wie eingangs schon erwähnt, wurde zu Vergleichszwecken das zyklische Amidrazonderivat BW 755c (2) mit zu den Untersuchungen herangezogen. Auch für diese Verbindung wurde, ähnlich den Verbindungen (3), (9) und (21), eine starke Zeitabhängigkeit der Hemmpotenz (Abbildung 15) sowie ein hyperboler (oder sigmoidaler) Zusammenhang zwischen  $k_{\text{obs}}$  und  $[I]$  (vergleiche Abbildungen 12 bis 14) gefunden, was ebenfalls auf einen Mehrschrittmechanismus der E-I-Interaktion schließen läßt. Der ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert betrug unter unseren Testbedingungen  $1,9 \times 10^{-6} \text{ M}$  und ist mit den Werten früherer Untersuchungen sowie anderer Arbeitsgruppen vergleichbar ( $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ ).



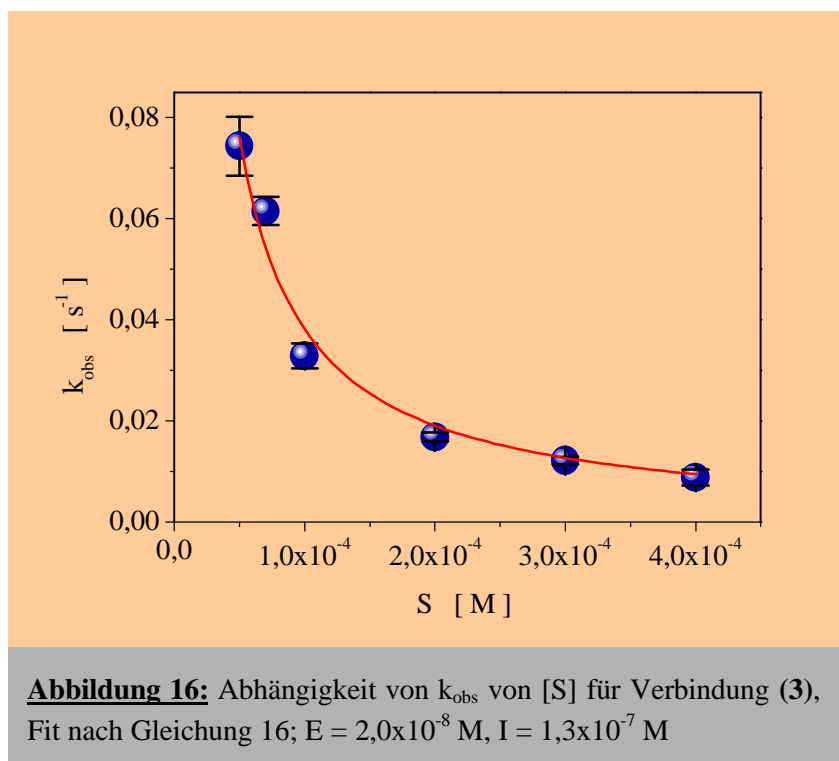
**Abbildung 15:** Produktbildungskurven für Verbindung (2) nach E-I-Präinkubation für verschiedene Zeitintervalle;  $E = 2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $S = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I = 0$  (linke Kurve) bzw.  $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$  (rechte Kurven) mit  $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7$  Minuten (von oben nach unten)

### 5.1.1.7 Der Modus der Inhibitorbindung

In aller Regel agieren sogenannte zeitabhängige Substanzen als kompetitive Inhibitoren, welche am aktiven Zentrum des Enzyms angreifen. Nichtsdestotrotz sind aber prinzipiell auch noch andere Bindungsmechanismen vorstellbar (un- bzw. nonkompetitiv, siehe auch Kapitel 5.1.1.5).

Um nun den Interaktionstyp derartiger Inhibitoren zu analysieren, bedient man sich des Einflusses variabler Substratkonzentrationen auf die scheinbare Inaktivierungskonstante  $k_{\text{obs}}$ . Für einen kompetitiven Typ ist hier eine Abnahme, bei einem unkompetitiven Modus hingegen eine Zunahme von  $k_{\text{obs}}$  mit steigender Substratkonzentration zu erwarten, während konträr dazu bei einem nonkompetitiven Interaktionsmodus  $k_{\text{obs}}$  unabhängig von  $[S]$  sein sollte (Gleichungen 16 bis 18). Das Resultat dieser Untersuchungen ist in der folgenden Abbildung 16 zu sehen.

Der Nachweis der enzymatischen Umsetzung von Verbindung **(3)** (siehe Kapitel 5.1.1.1 sowie 5.1.2.1.2) legt eine Wechselwirkung dieser Verbindung mit dem aktiven Zentrum der LOX nahe. Ebenso ist demzufolge zunächst auch eine Konkurrenz zwischen I und S während des Bindungsvorganges am Enzym zu vermuten, was hier a priori ein kompetitives Erscheinungsbild erwarten läßt. Aus Abbildung 16 ist deutlich ersichtlich, daß



steigende Substratkonzentrationen die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Isomerisierung) herabsetzen, worin sich eine Verringerung von  $k_{\text{obs}}$  nach Gleichung 16 widerspiegelt. In Gleichungen 16 bis 18 ist  $K$  lediglich vereinfachend als empirische Konstante zur exakten Kurvencharakterisierung zu sehen. [410] Eindeutig ergibt sich somit das Erscheinungsbild eines kompetitiven Inhibitorstyps (Abbildung 16). Ein nahezu identischer Effekt wurde sowohl für das Triazolol (**(21)**) als auch für das Phenylhydrazon (**(9)**) sowie des weiteren separat für einige weitere Vertreter (z.B. Verbindungen **(8)**, **(23)** und **(2)**) aus diesen Substanzklassen ermittelt, so daß demnach insgesamt von einem kompetitiven primären Bindungsschritt für diese Verbindungen ausgegangen werden kann. Da jedoch in den vorher beschriebenen Untersuchungen (Kapitel 5.1.1.5) ein kompetitives Verhalten im Verlauf der Enzym-Inaktivierung im Grunde ausgeschlossen wurde, wurde im folgenden verstärkt das Augenmerk auf die Art bzw. den Ort der E-I-Interaktion gerichtet.

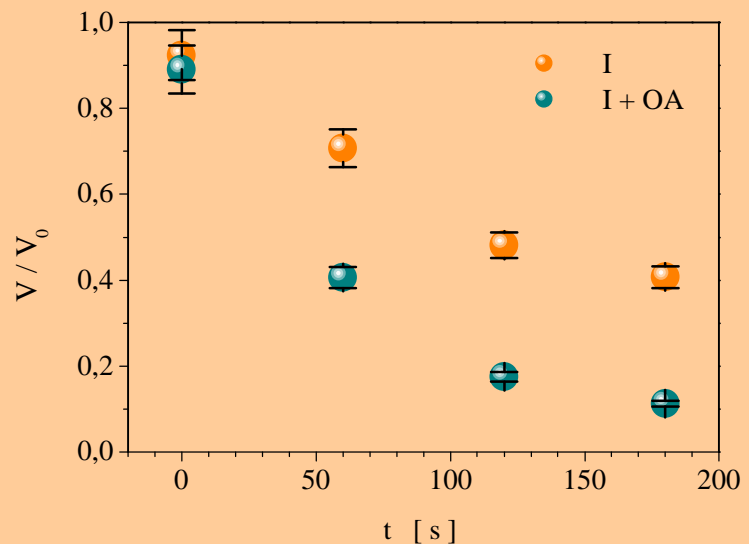


Bei einer wirklichen Konkurrenz zwischen S und I während des Bindungsvorganges (Kompetition) sollte der Zusatz eines weiteren reversiblen, schwachen und kompetitiven Inhibitors während der E-I-Präinkubation einen protektiven Effekt gegenüber der Inaktivierung durch den relativ starken Inhibitor aufzeigen. Ebenso sollte sich die Anwesenheit von S im Inkubationsmedium auswirken. Durch beide Möglichkeiten sollte bei Vorliegen eines kompetitiven Vorganges die Bindung des Inhibitors behindert bzw. zeitlich verzögert werden. Als Substratanalogon bietet sich hierfür die Ölsäure (OA) an, welche in

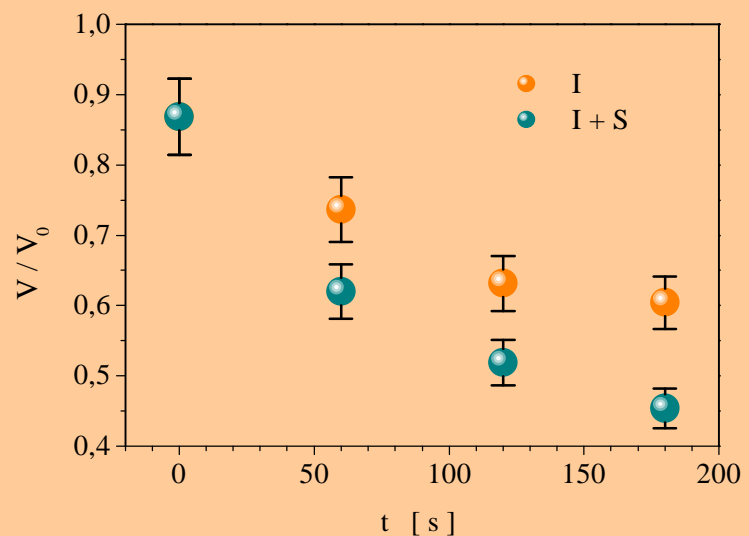
der Literatur als rein kompetitiver Inhibitor von Lipoxygenasen beschrieben ist (siehe auch Kapitel 3.2.3.2). [429-431]

In den Abbildungen 17-19 sind die Resultate der folgenden Experimente gezeigt. Für verschiedene Zeitintervalle wurde I mit E vorinkubiert und der Effekt einer definierten Menge an OA (Abbildung 17) oder S (Abbildung 18) während der Präinkubation auf das Ausmaß der LOX-Hemmung durch I dokumentiert. Entgegen

unseren ersten Erwartungen hat sowohl der Zusatz von S in geringen Konzentrationen als auch von OA während der E-I-Inkubation nicht etwa ein Zurückdrängen der Inhibition, sondern eine Verstärkung der Hemmung des Enzyms durch die Verbindungen (3) und (21) zur Folge. Anstelle einer Protektion ist eindeutig ein potenzierender Effekt zu konstatieren. Gleichwohl ist dieser Effekt erwartungsgemäß sättigbar (Abbildung 19). Eine Erhöhung der Konzentration an



**Abbildung 17:** Einfluß von OA ( $4,2 \times 10^{-5}$  M) während der E-I-Präinkubation auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung (3) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; E =  $2,0 \times 10^{-8}$  M, S =  $2,0 \times 10^{-4}$  M, I =  $4,2 \times 10^{-8}$  M

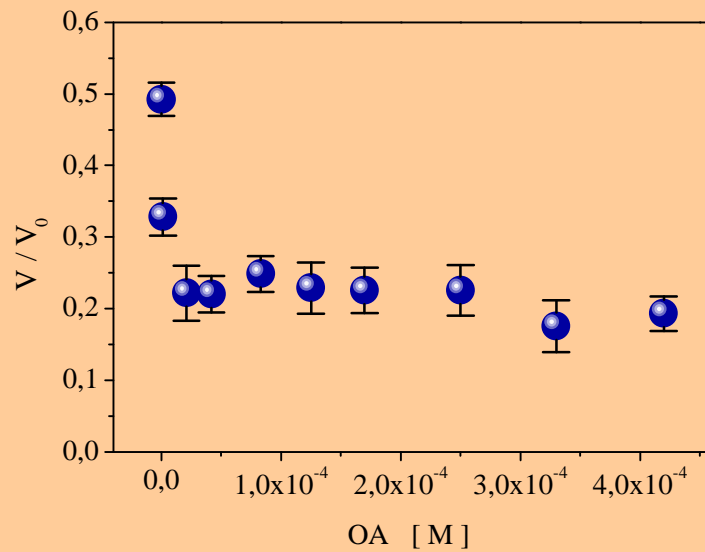


**Abbildung 18:** Einfluß von S ( $4,2 \times 10^{-5}$  M) während der E-I-Präinkubation auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung (21) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; E =  $2,0 \times 10^{-8}$  M, S =  $2,0 \times 10^{-4}$  M, I =  $5,8 \times 10^{-8}$  M



OA bewirkt ab einer gewissen Konzentration keine weitere Verstärkung der Inhibition durch die Inhibitoren (3) und (21).

Dies steht offensichtlich wiederum in Widerspruch zum oben beobachteten kompetitiven Mechanismus der Inhibition und läßt sich allenfalls erneut nur mit einem un- bzw. non-kompetitiven Mechanismus in Übereinklang bringen. Schon im Kapitel 5.1.1.5 wurde aufgezeigt, daß nach vorangegangener E-I-



**Abbildung 19:** Einfluß steigender OA-Konzentrationen während der E-I-Präinkubation auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung (3);  $E = 2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $S = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I = 1,2 \times 10^{-8} \text{ M}$

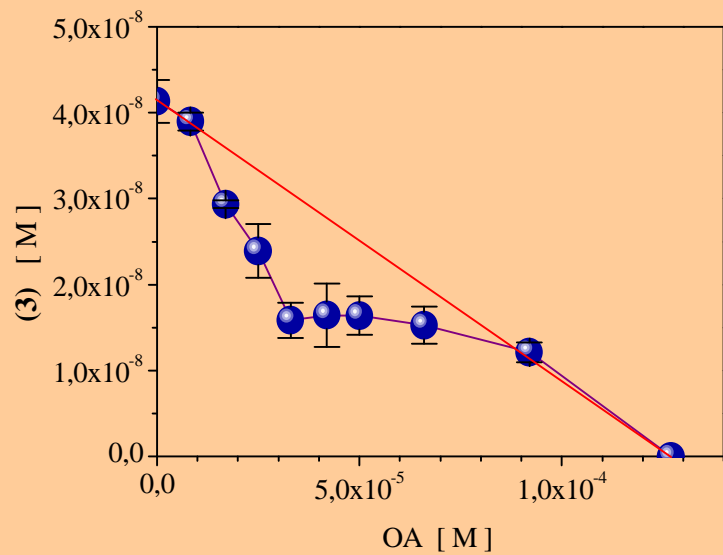
Inkubation das Ausmaß der Hemmung deutlich zunimmt (Abbildung 8), was ebenfalls einem kompetitiven Inaktivierungsschritt widerspricht. Ein kompetitiver Effekt zum Substrat (bzw. zu OA) wird offenbar nur ohne Präinkubationsschritt sichtbar (Abbildung 16), wenn also I und S in echter Konkurrenz nebeneinander vorliegen. Es liegt demzufolge vermutlich keine Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle, sondern eher eine Konkurrenz um den Zutritt zu den jeweiligen Bindungsstellen vor. Im folgenden soll dies näher untersucht und der Frage nachgegangen werden, ob es sich für I und S (bzw. OA) um identische oder aber um unterschiedliche Bindungsstellen an der L-1 handelt.

### 5.1.1.8 Die Bindungsstelle der Inhibitoren

Recht anschaulich sollte sich dieses Problem in einem Isobolendiagramm darstellen lassen. Hierdurch läßt sich auf relativ einfachem Wege ermitteln, inwieweit die Gegenwart einer zweiten Substanz einen Einfluß auf die Bindung resp. inhibitorische Wirkung eines Inhibitors hat. Der Vorteil dieser Methode gegenüber vielen anderen oft zu diesem Zweck herangezogenen ist die generell mögliche Analyse der Interaktion mehrerer Stoffe unabhängig vom jeweils zugrunde liegenden Wirkmechanismus. [432-434] Hierbei werden für einen bestimmten Effekt (z.B. 50 % Hemmung) die ermittelten Konzentrationswerte für zwei Verbindungen ( $D_a$  und  $D_b$ ) separat auf der x- bzw. y-Achse aufgetragen. Die Isobole verbindet die Punkte für isoeffektive Kombinationen dieser beiden Stoffe. Aufgrund der Annahme, daß zwischen den beiden Substanzen keinerlei Interaktion besteht, beide Substanzen also am selben definierten Bindungsort angreifen und auch dort ihre Wirkung entfalten (mutually exclusive agents), sollten die Werte für jede isoeffektive Dosiskombination ( $d_a$  und  $d_b$ ) auf einer Geraden liegen (Addition der Effekte bei gleicher Bindungsstelle:  $Z = 1$ ). Es gilt Gleichung 19. Jedwede Abweichung von dieser Geraden repräsentiert

entweder einen synergistischen Effekt ( $Z < 1$ ) oder einen antagonistischen Effekt ( $Z > 1$ ). Es resultiert dabei eine Isobolenkrümmung nach links (Synergismus) bzw. rechts (Antagonismus).

In der nebenstehenden Abbildung 20 ist nun ein derartiges Isobolendiagramm für das Amidrazon (3) und OA dargestellt. Eindeutig ist eine signifikante Abweichung von der Geraden erkennbar, woraus sich das Bild eines Synergismus zwischen diesen beiden Stoffen

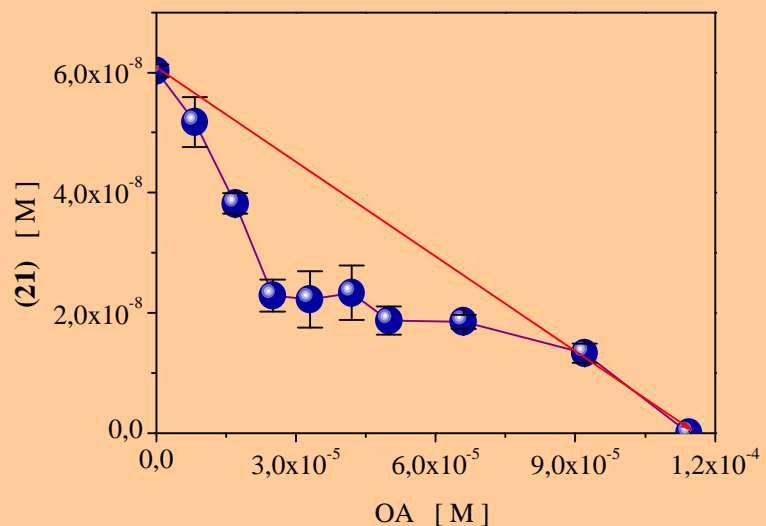


**Abbildung 20:** Isobolendiagramm zwischen OA und Verbindung (3) nach vorangegangener Inkubation der beiden Verbindungen mit der L-1;  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M,  $Z = 0,59$

ergibt. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für Verbindung (21) und OA diagnostiziert (Abbildung 21), was de facto bedeutet, daß die Bindungsstellen von I ((3) bzw. (21)) und OA bzw. S - trotz initialer Konkurrenz - offenbar nicht identisch sind. Dies steht gut in Übereinstimmung zur eingangs gewonnenen Erkenntnis, daß auch die Bindungsstellen von I und 13-HPODE nicht identisch sein können (siehe Kapitel 5.1.1.4 sowie 5.1.2.1.2).

Der Summenwert in Gleichung 19 entspricht dem Interaktionsindex als Maß für die relative Abweichung vom erwarteten Effekt. Je kleiner (größer) dieser Wert ist, desto größer ist auch der synergistische (antagonistische) Effekt dieser Substanzkombination. Danach ergeben sich Werte für  $Z$  von 0,59 für Verbindung (3) bzw. 0,53 für Verbindung (21).

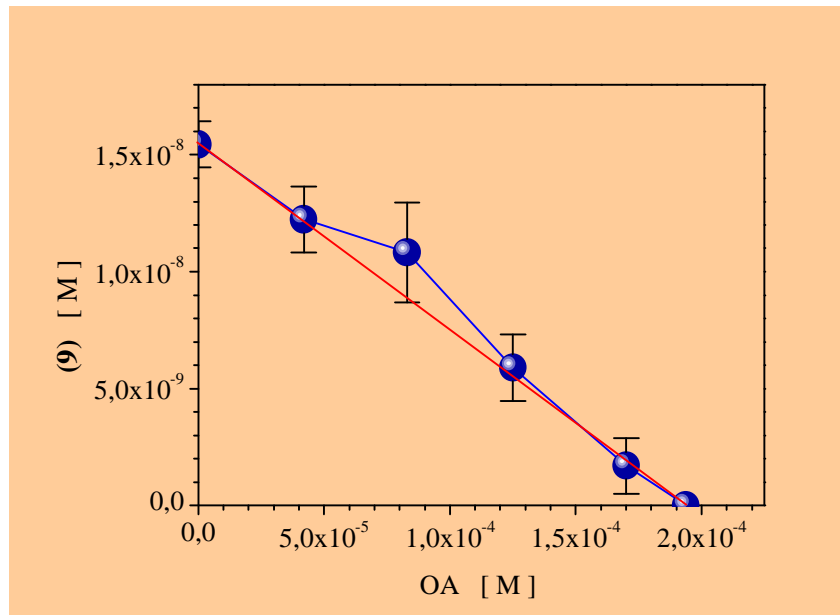
Die Frage, die sich an dieser Stelle nun stellt, ist: Inwieweit lassen sich diese Ergebnisse auf



**Abbildung 21:** Isobolendiagramm zwischen OA und Verbindung (21) nach vorangegangener Inkubation der beiden Verbindungen mit der L-1;  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M,  $Z = 0,53$

die Klasse der strukturell doch sehr ähnlichen Phenylhydrazone übertragen? Schon im obigen Kapitel 5.1.1.5 konnten gewisse Unterschiede im Mechanismus der Inaktivierung zwischen dem Hydrazon (9)

und den beiden Amidrazonen (**3**) bzw. (**21**) konstatiert werden. In der folgenden Abbildung 22 ist das Isobolendiagramm zwischen OA und dem Hydrazon (**9**) als repräsentativem Vertreter aus der Reihe der Arylhydrazone gezeigt. Recht eindeutig ist die vorherrschende Linearität in dieser Auftragung zu erkennen. Im Gegensatz zum untersuchten Amidrazon (**3**) bzw. Triazolol (**21**) ist hier weder ein synergistischer noch ein antagonistischer Effekt zu diagnostizieren. Folglich kon-



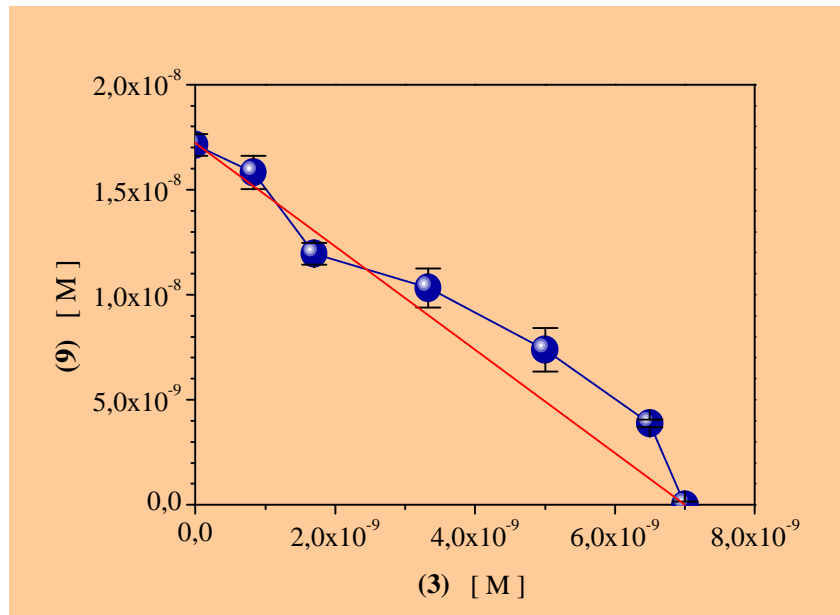
**Abbildung 22:** Isobolendiagramm zwischen OA und Verbindung (**9**) nach vorangegangener Inkubation der beiden Inhibitoren mit der L-1; E = 2,0x10<sup>-8</sup> M, S = 2,0x10<sup>-4</sup> M

kurriert die Hydrazonverbindung mit der Ölsäure (bzw. dem Substrat) um die gleiche Bindungsstelle am Enzym. Dies steht in guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Untersuchungen von Bombard et al. [348,349], welche fanden, daß S einen protektiven Effekt gegenüber der Inaktivierung des Enzyms durch Verbindung (**9**) bzw. die analoge Verbindung (**1**) aufweist. Das Hydrazon bindet also vermutlich an der gleichen Bindungsstelle am L-1-Protein wie Ölsäure bzw. Linolsäure auch, ist also im eigentlichen Sinne ein alternatives Substrat der enzymatischen Umsetzung.

Völlig anders sieht es hingegen bei den untersuchten Verbindungen (**3**) und (**21**) aus. Nicht nur, daß die Bindungsstelle des Inhibitors definitiv nicht mit der des Substrates (bzw. der Ölsäure) übereinstimmen kann (siehe Abbildungen 16 bis 21), es bleibt weiterhin festzustellen, daß trotz hoher struktureller Ähnlichkeit zwischen den Verbindungen (**9**) und (**3**) bzw. (**21**) die inhibitorischen Bindungsstellen von Phenylhydrazonen und Amidrazonen mutmaßlich ebenfalls nicht identisch sind. Hierauf wird jedoch noch einmal weiter unten eingegangen. Da aber sowohl offenkettige Amidrazone als auch teilweise die untersuchten Triazolol-Derivate als Substrate des Enzyms fungieren können, besteht an der L-1 wohl mindestens eine weitere katalytisch aktive Bindungsstelle für diese Verbindungen. Lipoxygenasen sind mononukleäre Enzyme, besitzen also nur ein aktives Zentrum (siehe Kapitel 3.1). Als Erklärung für das eben beschriebene Verhalten bieten sich im Prinzip nur zwei Möglichkeiten an. Entweder ist der Raum um das aktive Zentrum (active site) groß genug für zwei distinkte Bindungsareale oder aber die Bindungsstellen für S und I liegen auf zwei unterschiedlichen Seiten des L-1-Moleküls (siehe unten sowie Kapitel 3.1.1).

Eine interessante Frage an dieser Stelle ist die nach einer möglichen Wechselwirkung zwischen einem Hydrazon und einem Amidrazon. Da einerseits die Amidrazone offenbar nicht an der eigentlichen Substratbindungsstelle andocken (Abbildungen 16 bis 21), andererseits das untersuchte Phenylhydrazon

zu einer Blockade genau dieser Bindungsstelle in der Lage zu sein scheint (Abbildung 22), läßt sich hier möglicherweise ein recht interessanter Effekt beobachten. Exemplarisch wurde dies anhand der Verbindungen (9) und (3) überprüft. Für beide Verbindungen wurde ein Isobolendiagramm aufgenommen. Wie aus der folgenden Abbildung 23 ersichtlich ist, beherrscht ein vorwiegend linearer Zusammenhang die aufgenommene Werteschar. Lediglich im



**Abbildung 23:** Isobolendiagramm zwischen Verbindung (9) und Verbindung (3) nach vorangegangener Inkubation der beiden Inhibitoren mit der L-1; E =  $2,0 \times 10^{-8}$  M, S =  $2,0 \times 10^{-4}$  M

unteren Abschnitt läßt sich ein schwach ausgeprägter antagonistischer Effekt vermuten. Mit einem Wert für den Interaktionsindex Z von 1,09 ist dieser jedoch nahe 1, woraus geschlußfolgert werden kann, daß zwischen beiden Verbindungen keine bedeutende Interaktion besteht.

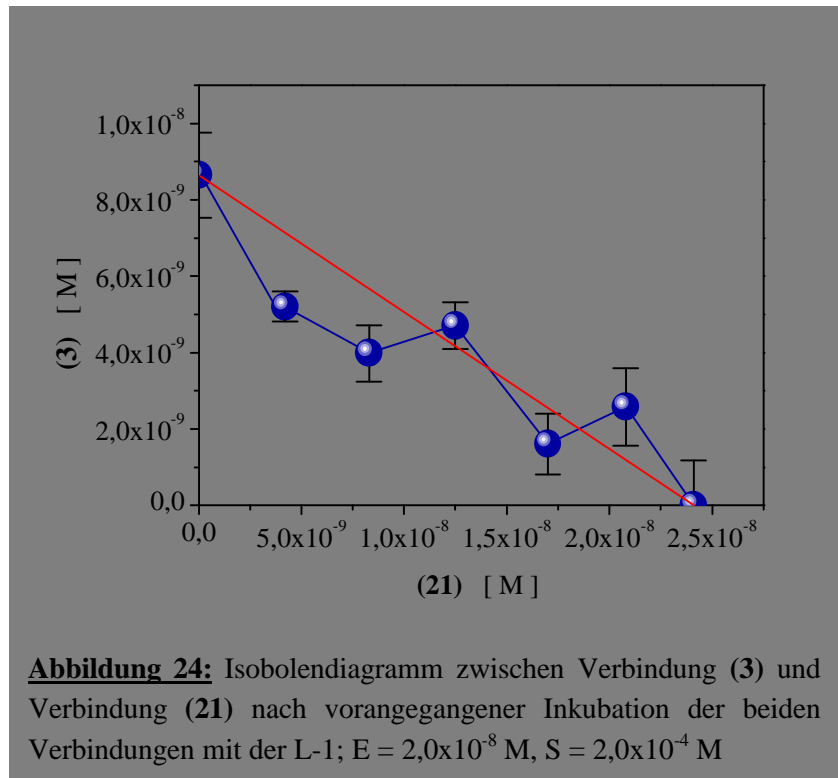
Die vorliegenden Ergebnisse - der synergistische Effekt zwischen Ölsäure und Verbindung (3) bzw. (21) sowie das Fehlen desselben beim Hydrazon (9) auf der einen Seite, jedoch eine fehlende Interaktion zwischen Hydrazon (9) und Amidrazon (3) auf der anderen Seite - können nur auf zwei unterschiedlichen Wegen erklärt werden. Einmal ist es natürlich denkbar, daß beide Substanzklassen, Hydrazone und Amidrazone, trotzdem die gleiche Bindungsstelle belegen. Die Bindung des Hydrazons verhindert dabei die gleichzeitige Bindung eines Substratmoleküls am Enzym. Durch die Bindung der etwas größeren Amidrazone bzw. Triazoline hingegen wird möglicherweise eine geringfügige Änderung der Konformation des Enzym-moleküls ausgelöst, wodurch die gleichzeitige Bindung von S ermöglicht wird. Die beiden Inhibitoren (3) und (21) haben in diesem ESI-Komplex eine höhere Affinität als zu E selbst, wodurch der synergistische Effekt sichtbar wird (siehe Abbildungen 20 und 21). Die Bindung des Hydrazons schließt naturgemäß die gleichzeitige Bindung eines Amidrazon- bzw. Triazolinmoleküls aus, und umgekehrt (Kompetition untereinander, Abbildung 23). Als zweite Variante bietet sich die These völlig verschiedener Bindungsstellen an. Die unterschiedlichen Effekte der Gegenwart von Ölsäure auf die Hemmung der L-1 durch das Hydrazon bzw. das Amidrazon oder Triazolin werden hiernach leichter verständlich. Eine Bindung des Hydrazons schließt dabei die gleichzeitige Bindung eines Amidrazons bzw. Triazolins durch eine weiträumige Behinderung aus bzw. verhindert deren inhibitorische Wirkung (Kompetition untereinander im weiteren Sinne). Hydrazone und Substrat konkurrieren hingegen um die gleiche Bindungsstelle. Die nach außen sichtbaren Unterschiede zwischen beiden Varianten sind

allerdings nur sehr gering und der Übergang zwischen diesen beiden Möglichkeiten sicherlich fließend ausgeprägt.

Um abschließend der sich hier nun erneut stellenden Frage nachzugehen, inwieweit die offenkettigen Amidrazone sowie die entsprechenden Triazoline nach dem gleichen Inaktivierungsmechanismus agieren, wurde hierfür ebenfalls - wie oben bereits beschrieben - ein Isobolendiagramm aufgenommen. Als Repräsentanten für beide Verbindungsklassen wurden erneut die bisher beschriebenen Verbindungen **(3)** und **(21)** ausgewählt.

Falls also eine Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle zwischen den beiden Substanzen besteht (mutually exclusive inhibitors), sollte keinerlei Abweichung von der theoretischen Geraden zu diagnostizieren sein. Wie in der nebenstehenden Abbildung 24 recht klar zu erkennen ist, besteht keine eindeutige Abweichung von der theoretisch zu erwartenden Geraden.

Lediglich im oberen Kurvenbereich besteht eine signifikante, wenngleich auch nur gering-



füchtige, synergistische Abweichung. Der Wert für Z als Maß für den synergistischen Effekt beträgt für diesen Kurvenabschnitt im Minimum etwa 0,89 und ist somit nahe 1. Es kann wohl geschlußfolgert werden, daß zwischen beiden Substanzen keinerlei bedeutende Interaktion besteht, somit beide Verbindungen um die gleiche Bindungsstelle am Enzym konkurrieren und beiden Verbindungen der gleiche Mechanismus der Inhibition unterstellt werden kann.

### 5.1.1.9 N<sup>1</sup>-Substituierte Amidrazone

Recht anschaulich läßt sich der soeben beschriebene synergistische Effekt zwischen I und S (oder OA) auch anhand der methylierten offenkettigen Verbindung **(15)** darstellen. Unter den Standardbedingungen des Screeningsystems besitzt diese Substanz lediglich eine minimale Hemmaktivität gegenüber der L-1. Diese ist etwa 7000-fach geringer als die der analogen unsubstituierten offenkettigen Verbindung **(3)** (siehe Anhang). Vergleichbar, wenngleich nicht so extrem ausgeprägt, sind die Umstände bei der Hydroxymethylverbindung **(14)**. Gleichwohl ist trotz ausreichender E-I-Präinkubation nach kurzer Zeit ein klar erkennbares Abknicken der Produktbildungskurven zu beobachten - ähnlich den im Kapitel

5.1.1.6 dargestellten Kurven (z.B. Abbildung 9). Dieses Verhalten konnte auch für zahlreiche andere Substanzen beobachtet werden - unter anderem bei dem länger bekannten BW 755c (**2**) - so daß deshalb der Ursache dieses Verhaltens anhand einiger Beispiele auf den Grund gegangen werden sollte.

Typischerweise trat dieser Knick etwa 20 bis 120 Sekunden nach Beginn der Reaktion sowie bei relativ hohen Konzentrationen an I auf, da er vor allem bei denjenigen Verbindungen zu beobachten war, welche unter den Standardbedingungen des Testsystems nur eine geringe bis mäßig gute Inaktivierung der L-I bewirkten. Der zunächst naheliegende Verdacht, daß hier durch Ausdehnung der Präinkubationszeit eine Verstärkung der Hemmung resp. eine Überführung in „normale“ Produktbildungskurven zu erreichen ist, bestätigte sich nicht. Eine Verlängerung der E-I-Präinkubationszeit auf bis zu sieben Minuten brachte entweder eine Anzahl nahezu identischer (z.B. Verbindung (**15**)) oder aber stark unterschiedlicher (z.B. Verbindung (**2**), Abbildung 15) Produktbildungskurven hervor.

In beiden Fällen waren allenfalls leichte Veränderungen im Initialanstieg der Kurven, nicht jedoch in der scheinbaren Inaktivierungsgeschwindigkeit ( $k_{\text{obs}}$ ) erkennbar. Der Zeitpunkt der Isomersierung (Abknicken der Produktbildungskurven) blieb von der Präinkubationszeit unbeeinflusst. Ein nur unzureichend eingestelltes Gleichgewicht zwischen I, E und EI kann hierfür folglich nicht die Ursache sein, da durch eine Ausdehnung der Vorinkubation genug Zeit zur Einstellung dieses Gleichgewichts sein sollte (Präinkubation bis 420 s, Abknicken der Kurven bereits nach 120 s). Ein eventueller Einfluß des sich in Substratgegenwart ändernden Redoxstatus der L-I konnte durch separate Versuche mit der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-I ebenso ausgeschlossen werden. Als einzige auslösende Komponente bleibt somit nur noch das Substrat selbst, welches erst nach erfolgter Vorinkubation zugegeben wird.

Da dieser biphasische Prozeß offenbar nur in Gegenwart von Substrat abläuft bzw. durch dessen Gegenwart ausgelöst wird, ist zu schlußfolgern, daß hier der eigentliche Hemmeffekt auf die langsame Ausbildung eines ESI-Komplexes zurückzuführen ist. Das ist jedoch wiederum nur möglich, falls S und I separate Bindungsstellen besitzen.

Dies galt es zu prüfen. Falls die enorme Wirkverstärkung bei diesen Substanzen (Abknicken der Produktbildungskurven, siehe z.B. Abbildungen 9 und 15) letztlich auf die Gegenwart des Substrates zurückzuführen ist, sollte die gleichzeitige Anwesenheit höherer Substratmengen im Medium einen fördernden Einfluß auf den Inaktivierungsschritt (z.B. auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit) haben.

Eine direkte Variation der Substratmenge im Reaktionsmedium zeigte für Verbindung (**15**) lediglich eine geringfügige Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von [S]. Tendenziell war gleichwohl eine Zunahme von  $k_{\text{obs}}$  mit [S] zu verzeichnen (Abbildung 25). Zu beachten ist, daß dieses Resultat vom Prinzip her gegenläufig zu dem oben beschriebenen Verhalten der hochpotenten Verbindungen (**3**) und (**21**) ist (siehe Abbildung 16).

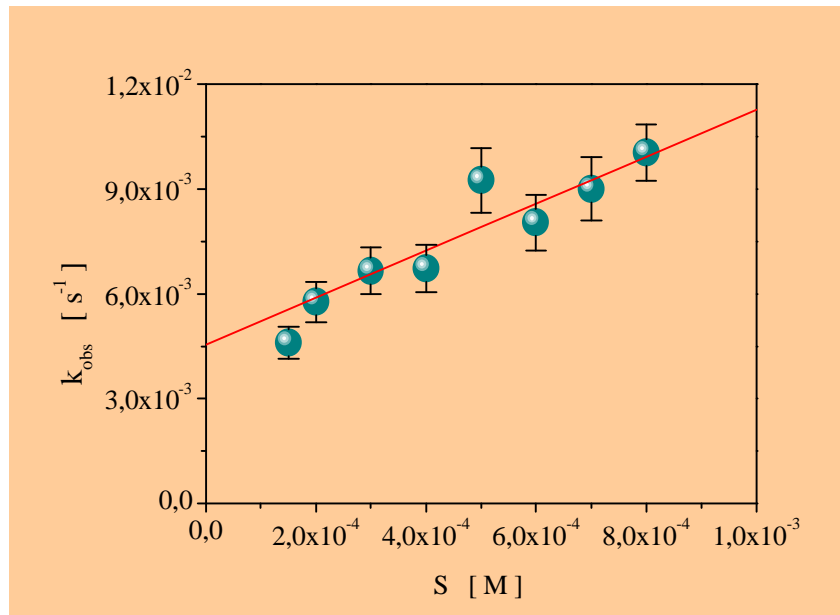
Da die Abhängigkeit der Inaktivierungsgeschwindigkeit von [S] im untersuchten Konzentrationsintervall nur geringfügig ausgeprägt war und eine Ausdehnung desselben nicht weiter möglich war, wurde wiederum auf das Substratanalogon Ölsäure zurückgegriffen. Dadurch wurde es möglich, unter Imitierung eines ESI-Komplexes die Aktivität dieses Komplexes zu einer definierten Zeit direkt zu beobachten (da der Zusatz von OA im Gegensatz zu S während der E-I-Präinkubation keinen meßbaren

O<sub>2</sub>-Verbrauch auslöst). Die gleichzeitige Anwesenheit von OA während der E-I-Präinkubation sollte gemäß den obigen Überlegungen eine Verstärkung der Inhibition durch Verbindung (15) bewirken. Zunächst wurde getestet, ob der Zusatz von OA zum E-I-Präinkubationsmedium einen Einfluß auf den inhibitorischen Effekt ( $v_i$ ) der Verbindung hat.

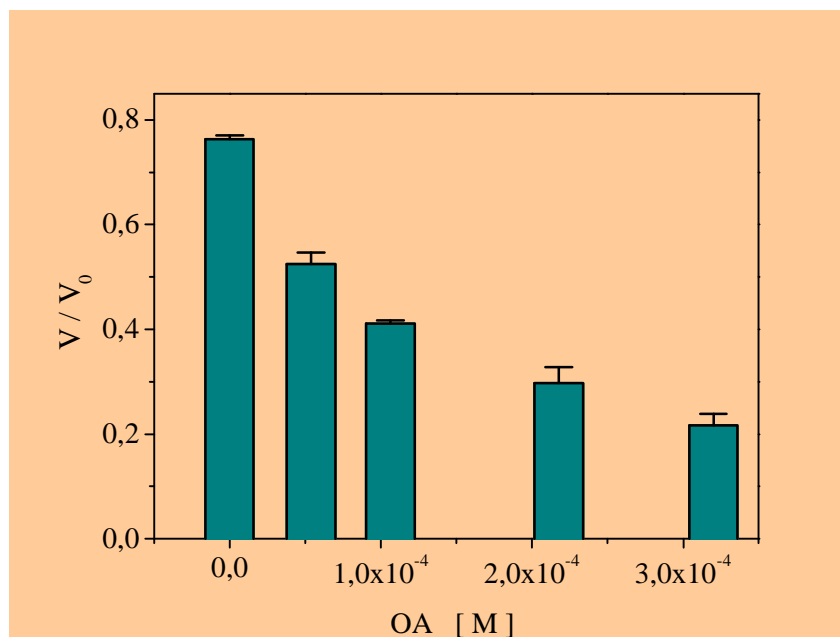
Wie in der folgenden Abbildung 26 für die Verbindung (15) gezeigt, ist dadurch in der Tat in

Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration eine Potenzierung der Inhibition zu erreichen. Interessanterweise konnte jedoch trotz Verwendung sehr hoher Konzentrationen an OA ( $4,5 \times 10^{-4}$  M) noch immer ein biphasischer Reaktionsverlauf beobachtet werden. Vermutlich waren die eingesetzten Ölsäuremengen noch zu gering, um wirklich in einen Sättigungsbereich zu gelangen. Eine weitere Erhöhung der zugesetzten Ölsäuremenge war jedoch aufgrund der inhibitorischen Eigenwirkung dieser Substanz nicht möglich. Es ist andererseits auch nicht völlig auszuschließen, daß dieser Effekt durch Ölsäure im Gegensatz zur Linolsäure nur unzureichend erreicht wird. Nichtsdestotrotz ist der enorme potenzierende Effekt der Ölsäure auf die Inhibition durch das methylierte Amidrazon deutlich zu erkennen. Dies ist im Grunde genommen nur durch die Ausbildung eines inaktiven ESI-Komplexes (bzw. EOAI-Komplexes) zu erklären, was ergo die Existenz separater Bindungsstellen für I und S (bzw. OA) voraussetzt.

Wie läßt sich nun aber der oben beschriebene synergistische Effekt mit der Ölsäure als Substratanalogon (Förderung der Inaktivierung; siehe Ab-



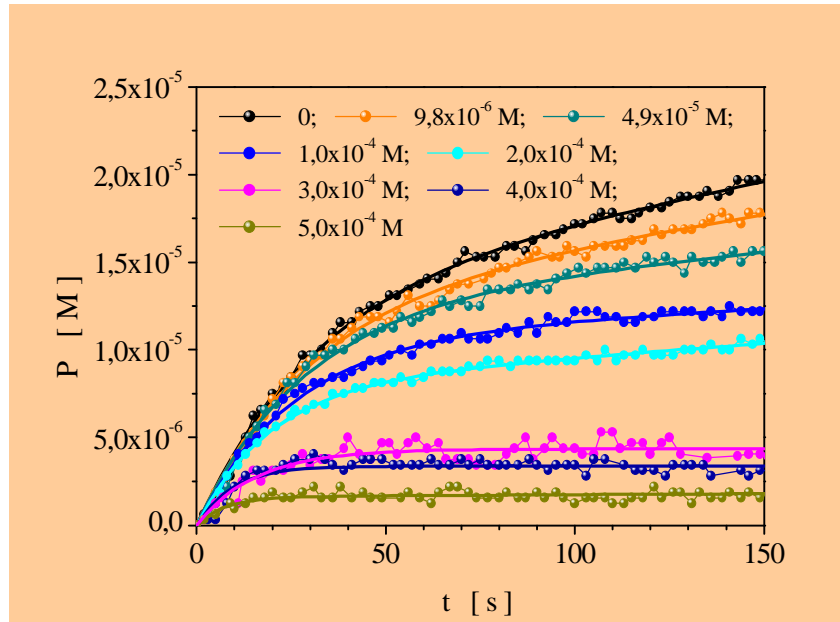
**Abbildung 25:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von  $[S]$  für Verbindung (15);  $E = 5,0 \times 10^{-9}$  M,  $I = 5,8 \times 10^{-6}$  M



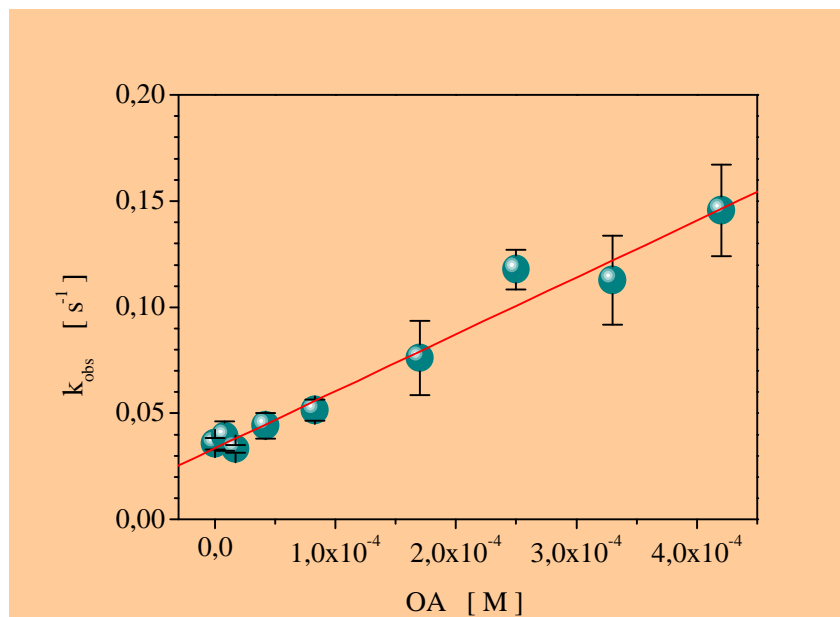
**Abbildung 26:** Einfluß steigender OA-Konzentrationen während der E-I-Präinkubation auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung (15);  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M,  $I = 2,5 \times 10^{-5}$  M



bildungen 17-21, 25, 26) mit dem eingangs beobachteten kompetitiven Effekt gegenüber dem Substrat (Schutz vor der Inaktivierung; siehe Abbildung 16) in Einklang bringen? Um dieser Frage nachzugehen, wurde in Anlehnung an obige Versuche das folgende Experiment unternommen. Bei einem definierten E-I-Verhältnis und konstanter Substratkonzentration wurde der Effekt steigender OA-Konzentrationen auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der L-1 durch Verbindung (3) untersucht. Nach dem in Abbildung 16 beobachteten Resultat wäre auch in diesem Falle ein kompetitives Verhalten zu erwarten. Zwar ist OA ebenfalls ein (schwacher) Inhibitor der L-1, jedoch sollte sich dies lediglich in einer mäßigen Beeinflussung der Initialanstiege der Produktbildungskurven äußern, nicht jedoch in einer Beeinflussung der langsamen Inaktivierung durch Verbindung (3). In Abbildung 27 ist nun das Resultat derartiger Untersuchungen zu sehen. Konträr zum oben beschriebenen kompetitiven Effekt der LA bewirkt die OA-Gegenwart konzentrationsabhängig offenbar eine schnellere Inaktivierung durch das gleiche Amidrazon. Mit steigender OA-Konzentration setzt der Isomerisierungsprozeß (Abknicken der Kurven) bei konstanter Inhibitorkonzentration immer schneller ein. Erwartungsgemäß wird auch der Initialanstieg der Kurven kleiner, was jedoch vollständig auf die inhibitorische Wirkung der Ölsäure ( $IC_{50} = 5,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) zurückzuführen ist. In der Auftragung  $k_{\text{obs}}$  vs. [OA] ergibt



**Abbildung 27:** Einfluß steigender OA-Konzentrationen auf die Produktbildungskurven in Gegenwart der Verbindung (3);  $E = 2,0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $S = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I = 1,3 \times 10^{-7} \text{ M}$ , OA =  $0$ ,  $9,8 \times 10^{-6}$ ,  $4,9 \times 10^{-5}$ ,  $1,0 \times 10^{-4}$ ,  $2,0 \times 10^{-4}$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$ ,  $4,0 \times 10^{-4}$ ,  $5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$  (wie angegeben von oben nach unten)



**Abbildung 28:** Einfluß steigender OA-Konzentrationen auf  $k_{\text{obs}}$  für Verbindung (3);  $E = 5,0 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $S = 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I = 1,3 \times 10^{-7} \text{ M}$



sich eine ansteigende, nahezu lineare Abhängigkeit (Ab-bildung 28). Gemäß der Literatur [410] ist vom Erscheinungsbild für einen derartigen (unkompetitiven) Effekt allenfalls eine ansteigende Hyperbel gemäß Gleichung 18 (siehe Anhang) zu erwarten. Das bedeutet, daß die verwendeten OA-Mengen vermutlich noch zu gering waren, um annähernd in den Sättigungsbereich der Kurve zu gelangen. Der Einsatz höherer OA-Konzentrationen war jedoch wiederum aufgrund der inhibitorischen Eigenwirkung der Ölsäure nicht möglich. Auf jeden Fall bewirkt OA offenbar einen gänzlich anderen Effekt am Enzym bezüglich der Inhibition durch die Amidrazone als die Linolsäure selbst.

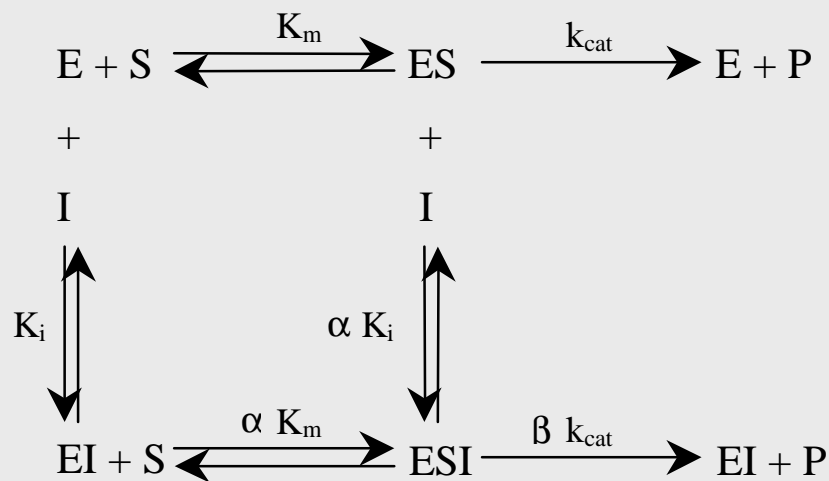
#### 5.1.1.10 Partielle Inhibition

Ein Enzyminhibitor wird unter anderem in Abhängigkeit vom Erscheinungsbild beispielsweise in der Dixon-Auftragung als linearer oder hyperbolischer Typ klassifiziert. Beim linearen Typ tendiert die Geschwindigkeit  $v$  bei hohen Inhibitorkonzentrationen gegen null, wohingegen beim hyperbolischen Typ die Geschwindigkeit der Reaktion gegen einen bestimmten, aber von null verschiedenen Wert tendiert. Der sich bildende ESI-Komplex ist noch, jedoch in einem geringeren Ausmaß, aktiv:  $\beta < 1$  (Schema 4). Man spricht in diesem Falle auch von partiellen Inhibitoren.

Partielle Inhibitoren sind in ihrem Erscheinungsbild den vollständigen (linearen) Inhibitoren sehr ähnlich und als solche den allgemeinen klassischen kinetischen Zusammenhängen unterworfen (bei  $I \gg E$  sowie bei schneller E-I-Interaktion). Allerdings ergeben sich durch die zusätzliche Umsatzkonstante  $k_{cat}'$  ( $= \beta k_{cat}$ , siehe Schema 4) des ESI-Komplexes vielfältige Variationsmöglichkeiten, was die Erkennung und Beurteilung des zugrunde liegenden Hemmtyps oftmals erschwert. Charakteristisch hierbei ist, daß alle Auftragungen vs.  $[I]$  keine Geraden sondern Hyperbeln ergeben („hyperbolischer Typ“). Gemäß den Lehrbüchern der Enzymologie wird wiederum zwischen allen drei prinzipiellen Interaktionsmöglichkeiten unterschieden. [z.B. 401] Während un- bzw. nonkompetitive Hemmungen als vollständige und

partielle Typen auftreten können, sollte das für den Fall einer Konkurrenz mit dem Substrat jedoch nicht gelten, da hier ein aktiver ESI-Komplex per definitionem ausgeschlossen ist.

Im vorangegangenen Kapitel 5.1.1.6 konnte bereits festgestellt



**Schema 4:** Mechanismus einer partiellen Inhibition

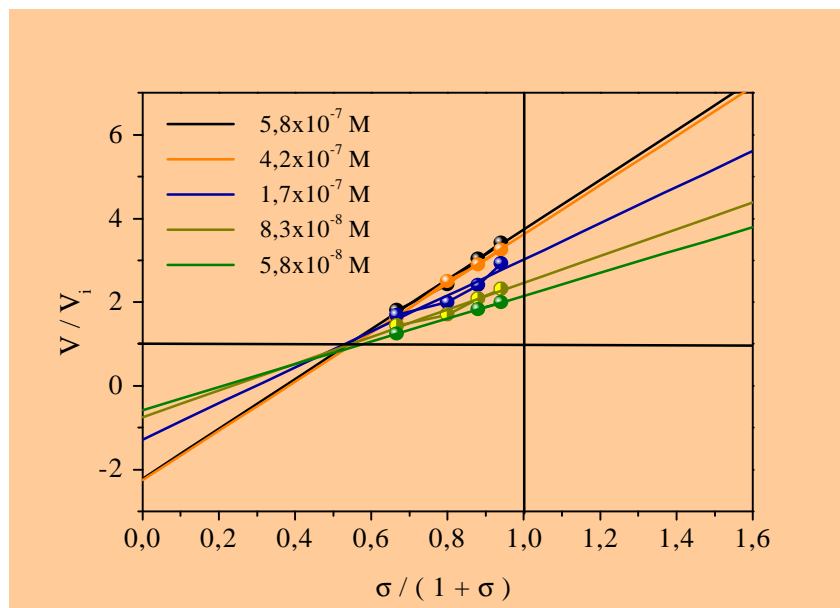
werden, daß ohne E-I-Präinkubation  $v_i$  nur zu einem Teil von  $[I]$  abhängig ist (siehe Abbildung 10).

Verbindung (3) wurde exemplarisch diesbezüglich näher untersucht. Da diese Untersuchungen ohne vorherige E-I-Inkubation durchgeführt und somit nur der erste, schnelle Schritt der E-I-Interaktion erfaßt wurde, konnten die klassischen Untersuchungsmethoden (für  $I \gg E$ ) hierfür angewendet werden.

Gemäß den Auftragungen nach Lineweaver-Burk sowie Dixon bzw. den daraus abgeleiteten Sekundärauftragungen (siehe Lehrbücher der Enzymkinetik), resultierte für Verbindung (3) ein partieller, gemischt nichtkompetitiver Typ der Inhibition. In diesem ersten und schnellen Schritt der E-I-Interaktion bindet der Inhibitor also sowohl an E als auch an den ES-Komplex und bewirkt somit einmal eine Verminderung der Affinität des Enzyms - als EI-Komplex - zu S als auch eine Verminderung der Umsatzgeschwindigkeit des Substrates hieraus ( $k_{cat}$ ). Aus dem Kurvenverlauf in den Sekundärauftragungen ist ersichtlich, daß die Affinität des Inhibitors zum ES-Komplex größer als zum Enzym selbst ist, was in Übereinstimmung zu den Resultaten der vorangegangenen Kapitel steht.

Ergänzend hierzu wurde das Ergebnis mittels zweier erst kürzlich beschriebener Methoden überprüft und konnte hierdurch bestätigt werden. [435-437] In der Auftragung der reziproken Restaktivität ( $V_0/V_i$ ) gegen die spezifische Geschwindigkeit  $\sigma$  (Abbildung 29) ergibt sich für verschiedene Inhibitorkonzentrationen eine Geradenschar gemäß Gleichung 20 (siehe Anhang) mit positivem Anstieg ( $\alpha < 1$ ). Aus der Sekundärauftragung der y-Schnittpunkte bei  $x = 1$  vs.  $[I]$  sind die Werte für  $\beta$  sowie für  $K_i$  bzw.  $K_i'$  erhältlich (siehe Anhang). Es resultiert somit für den EI-Komplex ein  $K_i$ -Wert von etwa  $3,2 \times 10^{-7}$  M ferner für den ESI-Komplex ein Wert für  $K_i'$  von  $2,5 \times 10^{-8}$  M, was einem Betrag für  $\alpha$  von etwa 0,077 entspricht.

Verglichen mit dem Kapitel 5.1.1.6 ermittelten Wert für  $K_i$  von  $3,5 \times 10^{-7}$  M läßt sich eine sehr gute Übereinstimmung feststellen. Aus den stark unterschiedlichen Werten der Inhibitionskonstanten für EI bzw. ESI ist ersichtlich, daß die Affinität des Inhibitors zum ES-Komplex etwa dreizehn mal höher ist, als zum Enzym selbst. Die Aktivität des entstehenden ESI-Komplexes ist zusätzlich



**Abbildung 29:** Auftragung von  $V/V_0$  vs.  $\sigma$  nach Baici [436] zur Charakterisierung der partiellen Hemmung der Verbindung (3);  $E = 7,5 \times 10^{-9}$  M,  $I = 5,8 \times 10^{-8}$ ,  $8,3 \times 10^{-8}$ ,  $1,7 \times 10^{-7}$ ,  $4,2 \times 10^{-7}$ ,  $5,8 \times 10^{-7}$  M (wie angegeben von unten nach oben)

um etwa 50 % reduziert ( $\beta = 0,57$ ).

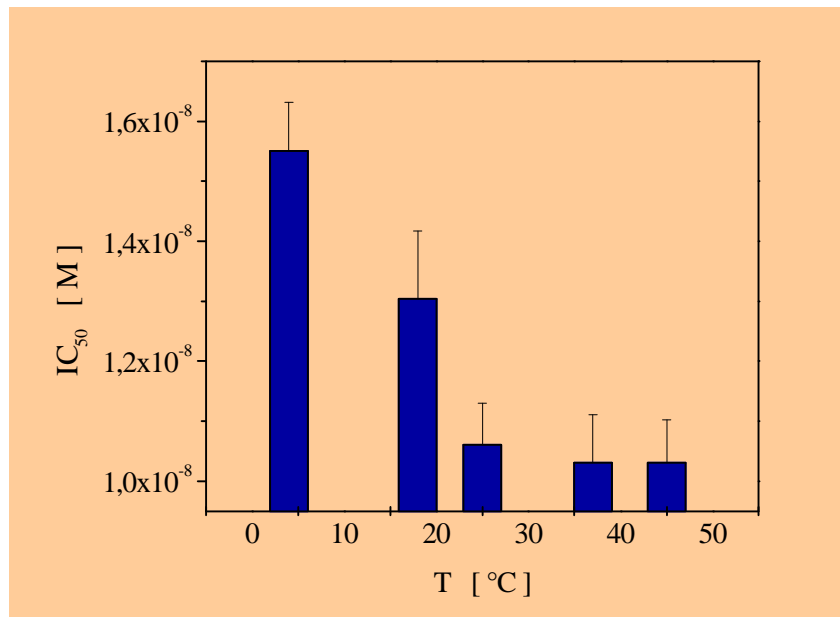
Vermittels der zweiten Möglichkeit, der Auftragung des Geschwindigkeits-Bruchs gegen die reziproke InhibitorKonzentration, [435,436] konnte obiges Resultat qualitativ bestätigt werden. Der allererste Schritt der E-I-Interaktion verläuft demzufolge nach einem partiellen, gemischt-nonkompetitiven Mechanismus.

### 5.1.1.11 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung

Im Verlauf der Untersuchungen war eine geringfügige Änderung der inhibitorischen Potenz der untersuchten Verbindungen nach Variation der Temperatur des Systems aufgefallen. Weitere Experimente hierzu über einen größeren Temperaturbereich konnten dies bestätigen (Abbildung 30). Eindeutig ist eine sehr geringfügige Abnahme der  $IC_{50}$  mit steigender Temperatur auszumachen, wobei ein Maximum der Wirkung für Verbindung (3) ab etwa 25 °C zu verzeichnen ist. Es stellt sich nunmehr die Frage, welcher Prozeß der relativ komplexen Interaktion der Substanzen mit dem Enzym durch die Temperatur beeinflusst wird. Der Verdacht, daß die Ursache hierfür im langsamsten Schritt der Interaktion, der Isomerisierung von E(S)I zu E(S)I\*, zu suchen ist, konnte bestätigt werden. Je höher die Temperatur des Systems ist, desto eher erfolgt ein „Abknicken“ der Produktbildungskurven und desto

schneller erfolgt ergo die eigentliche Inaktivierung ( $k_{inact}$ ) des Enzyms durch Verbindung (3). Die zyklische Verbindung (21) zeigt ebenfalls eine derartige Abhängigkeit, was die These des Vorliegens eines vergleichbaren Inaktivierungsmechanismus untermauert.

Allgemein bekannt ist die Tatsache, daß in der Regel mit Erhöhung der Temperatur um 10 °C eine Beschleunigung einer chemischen Reaktion um etwa den Faktor zwei bis vier eintritt



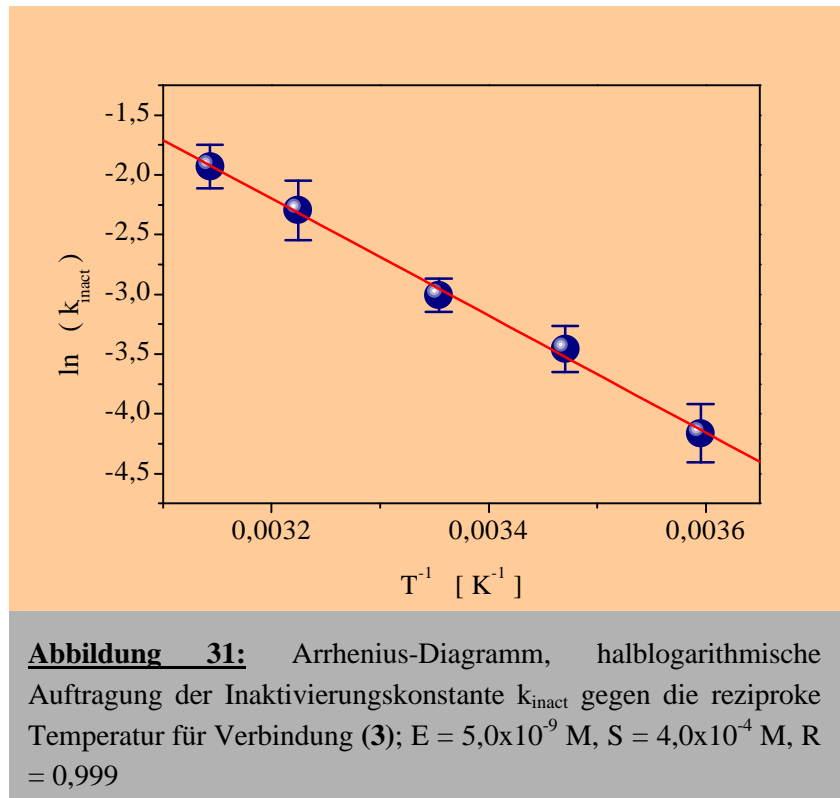
**Abbildung 30:** Abhängigkeit der  $IC_{50}$  nach E-I-Präinkubation für Verbindung (3) von der Temperatur; E =  $2,0 \times 10^{-8}$  M, S =  $2,0 \times 10^{-4}$  M

(sog. RGT-Regel, van't Hoff'sche Regel). Enzyme sind hiervon bis zu einem bestimmten Grad keine Ausnahmen - die meisten von ihnen besitzen zwischen 25 und 40 °C ihr Optimum an Aktivität. [410] Nach Arrhenius besteht zwischen der Geschwindigkeit der Reaktion und der Aktivierungsenergie derselben ein mathematischer Zusammenhang, der aus der nach ihm benannten Auftragung (Gleichung 21) ermittelt werden kann. [438,439]

Auch für die L-1 wurde schon vor geraumer Zeit die Aktivierungsenergie für die Dioxygenierung der Linolsäure ermittelt. Diese wird mit einem Wert von etwa 18 bis 23,5 kJ mol<sup>-1</sup> angegeben [440] und ist

denen anderer LOX-Reaktionen vergleichbar, wobei derart niedrige Aktivierungsenergien augenscheinlich charakteristisch für Lipoxygenasereaktionen sind. [441,442] Aber nicht nur die Aktivierungsenergien der katalysierten Substratumsetzung, sondern ebenso die Inaktivierungsenergien einer E-I-Interaktion lassen sich auf diese Weise errechnen. So wurde beispielsweise die Energie der Inaktivierungsreaktion der L-1 durch die Acetylenfettsäure ETYA mit einem Wert von  $22,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  ermittelt. [362] Erwartungsgemäß liegt der Wert der Suizid-Inaktivierung durch dieses Quasi-Substrat im Bereich der Aktivierungsenergie der Umsetzung des „normalen“ Substrates.

Exemplarisch sollte nunmehr auch die Aktivierungsenergie der Inaktivierung der L-1 durch Verbindung (3) kalkuliert werden. Dazu wurde die Inaktivierungskonstante  $k_{\text{inact}}$  (=  $k_5$ , Schema 3) bei verschiedenen Temperaturen ermittelt. Aus der nebenstehenden Arrhenius-Auftragung dieser Werte (Abbildung 31) ergibt sich somit für das offenkettige Amidrazon (3) eine Aktivierungsenergie für den langsamen Schritt der Inaktivierung von etwa  $47,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Diese Energie ist damit etwa doppelt so hoch wie die der Fettsäureumsetzung.



### 5.1.1.12 Zusammenfassung der inhibitorischen Eigenschaften

In einer früheren Arbeit wurde bereits versucht, den Mechanismus der E-I-Interaktion für das offenkettige Amidrazon (**3**) aufzuklären. [133] Aufgrund der Zeitabhängigkeit der Inaktivierung sowie des offenkundig titrierenden Verhaltens dieser Verbindung wurde auf das Vorliegen eines sogenannten hochaffinen, zeitabhängigen Inhibitortyps (slow, tight binding) geschlossen. Eine enzymatische Umsetzung der Verbindung konnte dort zunächst (aufgrund der äußerst geringen Geschwindigkeit der Reaktion) nicht nachgewiesen werden. Dies mußte in späteren Untersuchungen mit extrem hohen Enzymkonzentrationen revidiert werden. Die offensichtlich generell schlechte Substrateigenschaft der Inhibitoren (Kapitel 5.1.2) ließ die Anwendbarkeit des postulierten Suizidmechanismus (Schema 2) jedoch weiterhin anzweifeln. Die erneute, detaillierte Analyse des Mechanismus der E-I-Interaktion anhand der offenkettigen Verbindung (**3**) sowie der zyklischen Verbindung (**21**) bestätigte das Vorliegen eines hochaffinen und zeitabhängigen Inhibitortyps.

#### Analyse der zeitabhängigen Inhibition

Die Aufklärung der zeitabhängigen Prozesse offenbarte das Vorliegen eines 2-Schritt-Mechanismus (Schema 3). Der Inhibitor bindet zunächst in einem sehr schnellen und vollständig reversiblen Schritt an das Enzym („normale“ Interaktion), welches hierbei maximal zu etwa 50 % gehemmt wird (Abbildung 10). Auch bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen behält der initiale ESI-Komplex einen Teil seiner Aktivität, was nichts anderes heißt, als daß I in diesem E(S)I-Komplex den Zutritt von S zum aktiven Zentrum nicht vollständig blockieren kann. Inhibitor und Substrat müssen demzufolge separate Bindungsstellen besitzen. Das als Vergleich untersuchte Hydrazon (**9**) interagiert ebenfalls nach einem 2-Schritt-Mechanismus, verursacht jedoch keine partielle Hemmung der L-1 (Abbildung 11). Die genaue Untersuchung der partiellen Hemmung ergab einen gemischt nonkompetitiven Typ der Interaktion (Abbildung 29), wobei der Inhibitor sowohl an das Enzym selbst, als auch an den Enzym-Substrat-Komplex bindet. Die Affinität des Inhibitors zum ES-Komplex ist dabei im Falle der Verbindung (**3**) etwa 13 mal höher, als zum Enzym selbst (Schema 4). Im Anschluß an diesen ersten Bindungsschritt erfolgt im gebildeten EI- bzw. ESI-Komplex eine langsame Konformationsänderung (Isomerisierung) zu EI\* bzw. ESI\*, was dazu führt, daß das Inhibitormolekül sehr fest vom Enzymprotein gebunden wird (tight binding). Dieser Isomerisierungsschritt ist mit einer drastischen Verstärkung der Hemmwirkung verbunden und äußert sich in einem Abknicken der normalerweise linearen Produktbildungskurven (Abbildung 9).

Die Bestimmung der Inaktivierungskonstanten  $k_{\text{inact}}$  (unter presteady state-Bedingungen) offenbarte große Unterschiede bezüglich der Substratgegenwart während des Inaktivierungsschrittes. Die Gegenwart von Linolsäure beschleunigt den oben erwähnten langsamen Isomerisierungsschritt um den Faktor vier (bei Verbindung (**3**)) bis zehn (bei Verbindung (**21**)), was heißt, daß die Isomerisierung von ESI zu ESI\* etwa vier- bis zehnmals schneller als die Isomerisierung von EI zu EI\* ist (Abbildungen 13 und 14).

Für die Auftragung von  $k_{\text{obs}}$  vs.  $[I]$  ist in der Literatur für einen 2-Schritt-Mechanismus ein hyperboler Zusammenhang beschrieben worden. Im Falle der untersuchten Amidrazone konnte jedoch eindeutig ein sigmoidales Verhalten detektiert werden (Abbildung 13). Die kalkulierten Werte für den Exponenten  $B$  in Gleichung 14 lagen für beide Amidrazone bei etwa 2. In Analogie zur Bedeutung des Hill-Koeffizienten der Hill-Gleichung (Gleichung 15) ist hiernach für die Inhibitorbindung ein kooperatives Verhalten mit einer zweiten Bindungsstelle zu vermuten. Dies bedeutet, daß nach erfolgter Bindung eines Inhibormoleküls am Enzym die Bindung eines zweiten Inhibormoleküls erleichtert wird. Das zum Vergleich untersuchte Hydrazon (**9**) weist einen hyperbolen Zusammenhang auf ( $B = 1$ , Abbildung 12), zeigt also wiederum ein anderes kinetisches Verhalten, als die untersuchten Amidrazone.

Derart langsam wirkende Inhibitoren agieren in der Regel nach einem kompetitiven Mechanismus mit dem Enzym. Gleichwohl sind un- oder nonkompetitive Bindungsmechanismen nicht von vornherein auszuschließen. Diesbezügliche Untersuchungen für eine Vielzahl verschiedener Amidrazone ergaben eindeutig das Vorliegen eines kompetitiven Inhibortyps. Steigende Substratkonzentrationen verringern die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Inhibitoren (Abbildung 16). Dies steht in klarer Übereinstimmung zur oben erwähnten Substrateigenschaft der Inhibitoren.

Einerseits wirkt die Substratgegenwart sich zwar begünstigend auf die Hemmwirkung der Amidrazone aus (vergleiche Abbildungen 13 und 14), andererseits verlangsamen steigende Substratkonzentrationen auch wieder die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Abbildung 16). Dieser augenscheinliche Widerspruch läßt sich dennoch leicht auflösen. Grundsätzlich fördert das Substrat die Inaktivierung des Enzyms durch die Ausbildung eines ESI-Komplexes, welcher einer schnelleren Isomerisierung unterliegt, als der EI-Komplex. Auch ist die Affinität der Inhibitoren zu ES wesentlich höher als zu E. Gleichzeitig konkurrieren jedoch I und S auch um den eigentlichen Zutrittsweg zum aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch die Isomerisierung zum finalen ESI\*-Komplex verzögert wird. Hierin liegt der kompetitive Anteil der komplexen E-I-Interaktion.

In der Literatur sind derartige Fälle der Abhängigkeit des beobachtbaren Inhibitionstyps von der Enzym-Inhibitor-Präinkubation nicht unbekannt. So verschiebt sich beispielsweise die rein kompetitive Inhibition einiger pflanzlicher Aminoxidasen durch Methylglyoxal-bis-guanylhydrazon nach vorangegangener E-I-Inkubation zu einer nonkompetitiven Inaktivierung. [443,444]

Eine große Anzahl von Versuchen wurde mit dem Substratanalogon Ölsäure unternommen. Als solches sollte es die gleichen Effekte vermitteln, wie die Linolsäure. Steigende OA-Konzentrationen verursachten jedoch eine Zunahme der Geschwindigkeit der Inaktivierung der L-1 durch die Verbindung (**3**) (Abbildungen 27 und 28). Offenbar besteht im Gegensatz zum Substrat im Falle der Ölsäure keine Konkurrenz zum Inhibitor um den Zutritt zur Bindungsstelle. OA ruft also im direkten Vergleich andere Effekte am Enzym hervor als die Linolsäure.

Ölsäure ist in der Literatur als kompetitiver LOX-Inhibitor beschrieben. Gerade in jüngster Zeit sind hierzu einige bedeutende Untersuchungen veröffentlicht worden, welche eine reine Kompetition der Ölsäure in Frage stellen. Oleylsulfat, per se ein Substrat-Analogon, interagiert beispielsweise nicht nach einem rein kompetitiven Mechanismus mit der L-1 bzw. der humanen 15-LOX. Es konnte nachgewiesen

werden, daß es eine zusätzliche regulatorische Bindungsstelle am Enzym besetzt, wobei letztlich noch nicht endgültig geklärt ist, ob Linolsäure und Oleylsulfat gleichzeitig (distinkt) im aktiven Zentrum binden, oder ob es wirklich an einer völlig anderen Stelle des Enzymproteins angreift. [445] Oleylsulfat besitzt eine höhere Affinität ( $> 100$ -fach) zur allosterischen Bindungsstelle ( $K_i = 7,0 \times 10^{-7}$  M) als zur katalytischen Bindungsstelle der L-1. Die Vermutung liegt nahe, daß der Hemmwirkung der Ölsäure ein ähnliches Bindungsverhalten zugrunde liegt. Gleichartige Ergebnisse wurden auch für die 5-LOX aus Tomaten berichtet, wonach eine allosterische Bindung von Natrium-Dodecylsulfat am Enzym dessen Aktivität drastisch zu steigern vermag. Möglicherweise handelt es sich hierbei auch um einen Alternativweg zur Aktivierung der 5-LOX durch FLAP (siehe auch Kapitel 3.2.4.1). [446] Im Falle der L-1 ist diese Möglichkeit jedoch fraglich, da bisher die Aktivierung einer 15-LOX, insbesondere der L-1, durch FLAP nicht nachgewiesen wurde. In bezug auf die Interpretation der durchgeführten Experimente bedeutet dies, daß prinzipiell noch weitere Möglichkeiten beachtet werden müssen. Die Konkurrenz zwischen I und S (Abbildung 16) könnte demnach theoretisch auch dadurch verursacht werden, daß S an einer allosterischen Bindungsstelle bindet, wodurch die Inhibitorbindung behindert wird. Um den gegenteiligen Effekt der Ölsäure zu erklären, ist alternativ hierzu auch die Bindung von OA an einer regulatorischen Bindungsstelle denkbar, wodurch die Hemmung der L-1 durch die Amidrazone begünstigt wird. Umgekehrt ließen sich die beobachteten Effekte natürlich auch dadurch erklären, daß die Inhibitoren an einer allosterischen Bindungsstelle angreifen und S und OA durch Bindung an der katalytischen Bindungsstelle jeweils unterschiedliche Effekte auslösen.

Aufgrund des Substratcharakters eines großen Teils der untersuchten Inhibitoren ist jedoch prinzipiell davon auszugehen, daß die Amidrazone am aktiven Zentrum des Enzyms angreifen. Die beschriebene partielle Hemmung im ersten Schritt der E-I-Interaktion kann nur durch die Existenz von zwei distinkten Bindungsstellen für S und I am aktiven Zentrum der LOX erklärt werden. Substrat und Inhibitoren können also nicht die gleiche Bindungsstelle besitzen. Die zwischen einzelnen Inhibitoren und Ölsäure aufgenommenen Isobolendiagramme untermauerten, daß die Amidrazon-Verbindungen **(3)** und **(21)** definitiv nicht an der katalytischen Bindungsstelle der Fettsäure angreifen. Die gleichzeitige Bindung von I und OA ruft einen starken Synergismus hervor (Abbildungen 20 und 21). Da die Ölsäure vermutlich vorrangig über eine allosterische Bindungsstelle mit dem Protein interagiert, können die Amidrazone nicht an dieser allosterischen Bindungsstelle angreifen. Das zum Vergleich untersuchte Hydrazon **(9)** zeigte interessanterweise keinen synergistischen Effekt mit OA (Abbildung 22), wies also erneut ein anderes kinetisches Verhalten als die Amidrazone auf. Das bedeutet nicht, daß das Hydrazon **(9)** und OA die gleiche Bindungsstelle besetzen müssen, vielmehr daß die Bindung des Hydrazons die gleichzeitige Bindung von OA ausschließt (Konkurrenz im weiteren Sinne). Im Zusammenhang mit der Konkurrenz auch gegenüber der Linolsäure bedeutet dies, daß das Hydrazon **(9)** vermutlich an der katalytischen Substratbindungsstelle angreift, demnach ein echtes Alternativsubstrat darstellt. Da die Amidrazone ein völlig anderes Verhalten aufweisen (Konkurrenz gegenüber S, Synergismus mit OA), galt es zu klären, inwieweit diese Verbindungen mit der Bindungsstelle der Hydrazone interagieren. Dazu wurde zwischen den Verbindungen **(3)** und **(9)** ein Isobolendiagramm aufgenommen (Abbildung 23). Es zeigte keine

ausgeprägte Abweichung von der theoretischen Geraden, was den Schluß nahe legt, daß es sich im Falle beider Verbindungen um identische Bindungsstellen handelt, bzw. die Bindung der einen Substanz am Enzym verhindert die Bindung der anderen Verbindung.

Wenn beide Verbindungen an der gleichen Bindungsstelle am Enzym angreifen, so können die unterschiedlichen Effekte der Ölsäure eigentlich nur über einen Angriff an einer allosterischen Bindungsstelle erklärt werden. Inwieweit die synergistischen Effekte zwischen den Amidrazonen und Ölsäure aber wirklich auf deren Bindung an weiteren, allosterischen oder aber an der katalytischen Bindungsstelle zurückzuführen ist, kann nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden. Die Kombination der eben beschriebenen Resultate legt jedoch nahe, daß die Wirkung der Ölsäure nahezu ausschließlicly über deren Bindung an einer allosterischen Bindungsstelle vermittelt wird.

In Anbetracht der Tatsache, daß zwischen Amidrazonen und Hydrazonen grundlegende Differenzen im Inhibitionsmechanismus existieren, stellte sich prinzipiell die Frage, inwieweit die zyklischen und offenkettigen Amidrazone nach dem gleichen Mechanismus mit dem Enzym interagieren. Aus der Beobachtung, daß für die zwischen den Verbindungen **(3)** und **(21)** aufgenommene Isobolen-Werteschar keine eindeutige Abweichung von dem linearen Zusammenhang besteht (Abbildung 24), wurde geschlossen, daß beide Verbindungen an der gleichen Bindungsstelle angreifen und demnach nach dem gleichen Mechanismus die L-1 hemmen. Das im allgemeinen sehr ähnliche kinetische Verhalten beider Verbindungen bei der Interaktion mit dem Enzym unterstützt diese Annahme.

Die langsame Isomerisierung von E(S)I zu E(S)I\* ist stark von der Temperatur abhängig. Für diesen Schritt wurde anhand der Verbindung **(3)** die Aktivierungsenergie kalkuliert, die mit  $47,6 \text{ kJ mol}^{-1}$  etwa doppelt so hoch wie die der Linolsäureumsetzung ist.

#### Analyse der hochaffinen Inhibition

Die gesonderte Analyse der hochaffinen Interaktion fand nach vorheriger Inkubation des Inhibitors mit dem Enzym statt, um zu gewährleisten, daß die Gleichgewichtseinstellung zwischen EI und EI\* abgeschlossen ist (steady state-Annahme). Die standardmäßige IC<sub>50</sub>-Bestimmung im Sreeningsystems erfolgte nach einer dreiminütigen E-I-Präinkubation unter der Annahme, daß das Gleichgewicht auf der Seite von EI\* liegt (siehe Schema 5). Die Bildung von EI\* diente als Maß der inhibitorischen Potenz der jeweiligen Inhibitoren. Für die beiden Inhibitoren **(3)** und **(21)** wurde exemplarisch überprüft, ob die gewählte Präinkubationszeit von drei Minuten zur Gleichgewichtseinstellung ausreicht. Beide Inhibitoren zeigten nach der dreiminütigen E-I-Inkubation einen maximalen inhibitorischen Effekt. Es konnte weiterhin beobachtet werden, daß der Redoxstatus des Enzyms weder auf das Ausmaß noch auf die Geschwindigkeit der Inaktivierung einen Einfluß hat.

Obwohl der Inhibitor im finalen EI\*- bzw. ESI\*-Komplex sehr fest gebunden ist, ist dieser Schritt gleichwohl prinzipiell reversibel. Beträchtliche Unterschiede ergeben sich durch den Redoxstatus des Enzyms im jeweiligen Komplex. Die beiden Inhibitoren **(3)** und **(21)** hemmen die Fe<sup>II</sup>-Form des Enzyms in reversibler Weise. Die aktive Fe<sup>III</sup>-Form der LOX wird durch Verbindung **(21)** ebenfalls reversibel gehemmt. Verbindung **(3)** verursacht hingegen eine irreversible Inaktivierung der aktiven Form des



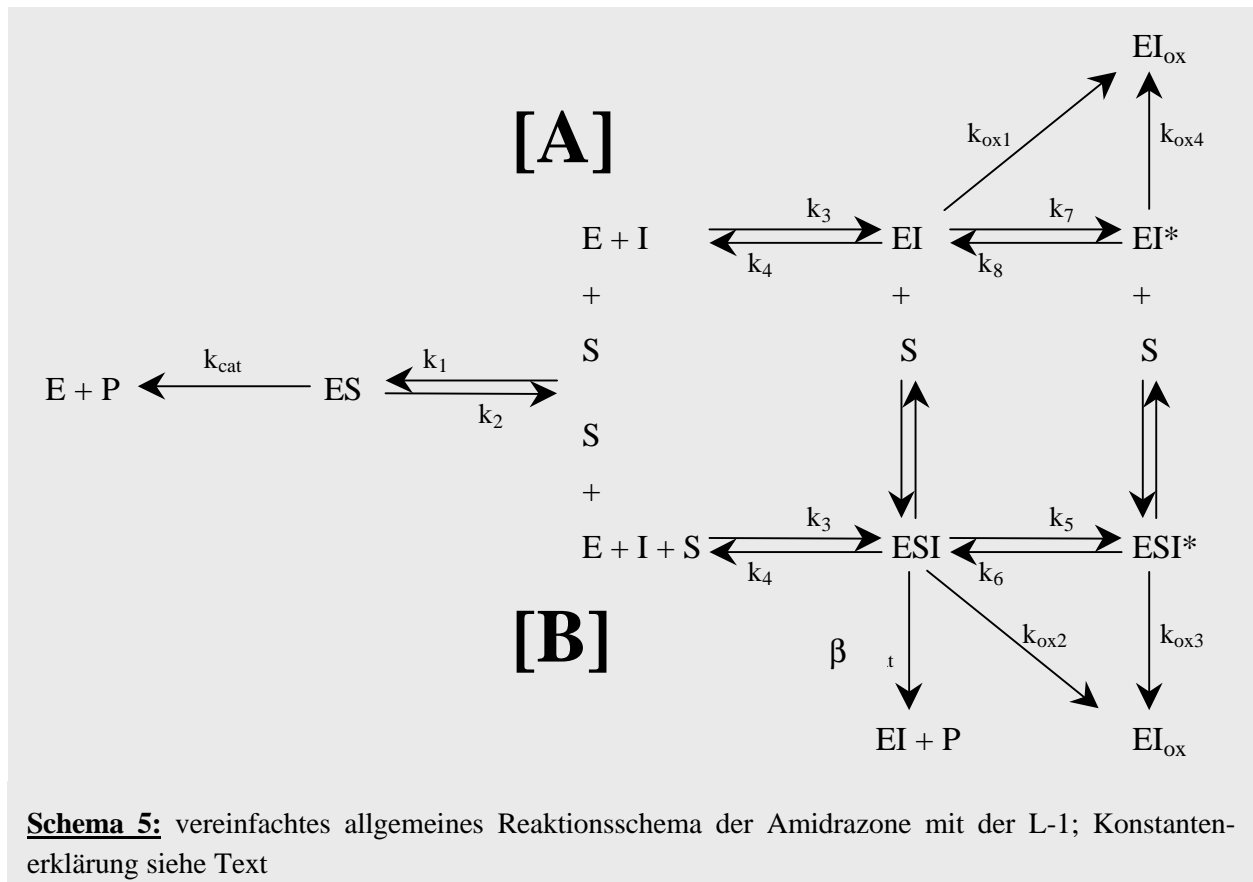
Enzyms (Abbildung 5). Möglicherweise steht dieser irreversible Schritt mit der Umsetzung der Verbindung (**3**) durch das Enzym in Zusammenhang. N<sup>3</sup>-unsubstituierte Triazoline, welche ebenfalls als Substrate der LOX fungieren (siehe Kapitel 5.1.2.1.2), verursachen wiederum eine reversible Hemmung sowohl der Fe<sup>II</sup>- als auch der Fe<sup>III</sup>-Form des Enzyms. Zumindest hier steht die Substrateigenschaft der Verbindungen nicht in Zusammenhang mit einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms, was bedeutet, daß die enzymatische Inhibitoroxidation nicht zwingend eine irreversible Enzymmodifikation nach sich zieht.

Das titrierende Verhalten derart hochaffiner Inhibitoren wurde im Falle von Verbindung (**3**) ausgenutzt, um die Stöchiometrie der Interaktion zu ermitteln. Es zeigte sich, daß nach hinreichender Vorinkubation mit dem Enzym rechnerisch nur noch ein Inhibitormolekül notwendig ist, um die L-1 vollständig zu inaktivieren (Abbildungen 6 und 7). Verbindung (**3**) gehört damit zu den hochpotenten Enzyminhibitoren, die ein theoretisches Maximum an zu erwartender Hemmung erreichen.

Die hochaffine Inhibition wurde mechanistisch untersucht und zeigte ein gemischt nonkompetitives Verhalten. Steigende Substratkonzentrationen erhöhen die inhibitorische Wirkung der Verbindungen (Abbildung 8), was in Übereinstimmung zu den oben beschriebenen Resultaten steht. Die Affinität der Inhibitoren zu ES ist höher als zu E. Die nachträgliche Zugabe von S zu EI\* bewirkt die Überführung in den ESI\*-Komplex. Die Zugabe von S oder OA zum Präinkubationsmedium verursacht durch die Ausbildung eines ESI- (bzw. EOAI-) Komplexes einen verstärkten Hemmeffekt durch die Inhibitoren (Abbildungen 17 und 18). Diese Potenzierung durch S (Abbildungen 8 und 18) oder OA (Abbildung 17) ist naturgemäß sättigbar (Abbildung 16).

Ebenso wie bei den Phenylhydrazonen (z.B. (**9**)) ist auch bei den Amidrazonen die Ausbildung einer cis/trans-Isomerie mit Bevorzugung des einen Isomers durch das Enzym erkennbar. Die einzelnen Isomere von zwei untersuchten Amidrazonen zeigten für das trans-Isomer eine leicht erhöhte Hemmaktivität gegenüber der L-1. Für Phenylhydrazone ist im Falle von Verbindung (**1**) nach einer einminütigen Vorinkubation mit dem Enzym von einer zehnfach stärkeren Hemmpotenz der cis-Form berichtet worden. Durch die Einführung des höherwertigen N-Substituenten am Hydrazonkohlenstoffatom ist die damit eintretende Konfigurationsumkehr zu beachten. Qualitativ sind die erhaltenen Ergebnisse damit deckungsgleich zu den Literaturdaten für Phenylhydrazone, nur sind die Unterschiede bei den untersuchten Amidrazonen (**3**) und (**22**) lediglich geringfügig ausgeprägt.

Der Prozeß der Interaktion der Inhibitoren mit der L-1 ist im folgenden Schema 5 stark vereinfacht dargestellt. Da separat abgeklärt wurde, daß der Redoxstatus außer auf die  $k_{off}$ -Werte keinen Einfluß auf das Inhibitionsverhalten der Verbindungen hat, wurde hier nicht zwischen der Fe<sup>II</sup>- und der Fe<sup>III</sup>-Form der LOX differenziert. Ebenso wurde nicht zwischen ES(I) und EOA(I)-Komplexen unterschieden. Aus mechanistischer Sichtweise erwies sich die Interaktion der Inhibitoren mit dem Enzym als von relativ komplexer Natur. Prinzipiell muß unterschieden werden zwischen der Präinkubation des Inhibitors mit dem Enzym [**A**] und der Situation der E-I-Interaktion in gleichzeitiger Gegenwart des Substrates [**B**]. Die Affinitäten der Inhibitoren in den einzelnen Komplexen sind stark unterschiedlich. Generell besteht eine höhere Affinität zu den entsprechenden ES-Komplexen, wobei in der Regel auch ein Angriff an E erfolgt.



Einzelne Inhibitoren greifen jedoch offenbar nahezu ausschließlich an die jeweiligen ES- bzw. EOA-Komplexe an, so z.B. Verbindung **(15)**. Durch ihre nur sehr geringe Affinität zum Enzym selbst (Abbildung 26) werden sie unter Umständen im Screeningsystem nicht als (potente) Inhibitoren der LOX erkannt. In Konkurrenz zu den oben charakterisierten Reaktionswegen mit dem Enzym besteht für die oxidablen Verbindungen vom Typ **(3)** bzw. **(9)** noch die Möglichkeit der parallel ablaufenden Inhibitoroxidation. Dies wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Als abschließende Frage stellt sich noch: Was sind die Ursachen für derart hochaffine Bindungen resp. hohe Bindungsenergien zwischen Inhibitor und Enzym? Früher vermutete man, daß es sich bei derart hochaffinen Interaktionen um Übergangszustands-Analoga handelt (transition state analogs). Es stellte sich jedoch bald heraus, daß eine Ähnlichkeit zum katalytischen Übergangszustand keine Voraussetzung für eine hochaffine Bindung ist. [447] Beispiele hierfür sind oftmals unter den Naturstoffen, insbesondere bei einigen Antibiotika, zu finden. So sind z.B. für Streptomycin, Erythromycin und Rifampicin keinerlei Ähnlichkeiten zum Übergangszustand zu erkennen. Ein anderes Beispiel ist die hochaffine Inhibition der DHFR durch Methotrexat, wobei es als Substrat-Analagon quasi „verkehrt herum“ im aktiven Zentrum bindet, ohne dabei Ähnlichkeiten zum Übergangszustand aufzuweisen. [448]

Hochaffine und/oder zeitabhängige Inhibitoren spielen als Bioregulatoren bzw. potentielle Pharmaka eine bedeutende und zunehmende Rolle. Mit der Erweiterung der Kenntnisse sowie der speziellen kinetischen Grundlagen für diesen Inhibitortyp kam es in den letzten Jahrzehnten in zunehmenden Maße zu einer Vielzahl von Entdeckungen diverser hochaffiner Enzyminhibitoren. So wurde z.B. Methotrexat, ein seit langem eingesetztes bedeutendes Chemotherapeutikum, erst vor etwa zwei Jahrzehnten als hochaffines,

langsam bindendes Pseudosubstrat der Dihydrofolatreduktase genau charakterisiert. [449] Gleiches gilt im übrigen für eine Reihe weiterer Folsäureanaloga. [450-452] Auch für Analoga der Pseudomoninsäure A (synonym: Mupirocin), einem topisch eingesetzten Lokalantibiotikum, wurde eine hochaffine, langsam einsetzende Inhibition der Isoleucyl-tRNA-Synthetase von Staphylokokken gefunden. [453] Ebenso wurde für Suramin, 1921 als Germanin® von Bayer eingeführt und teilweise noch immer als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) eingesetzt, eine reversible hochaffine Inhibition von Proteinphosphatasen beobachtet. [454] Desgleichen sind derartige langsame und hochaffine Bindungsmechanismen auch für Inhibitoren von Proteinasen [455], der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase [456], der Xanthin-Oxidase [457], der zinkhaltigen Endopeptidase Thermolysin [458], der Fibroblasten-Collagenase [459], der Reversen Transkriptase des HIV-1 [460], der induzierbaren NO-Synthase [461], für die ACE-Hemmung durch Captopril and Analoga [462], für die 5- $\alpha$ -Reduktase-Hemmung durch Finasterid und Analoga [463], für die Hemmung Cyt P450-abhängiger Enzyme durch Azol-Antimykotika wie Clotrimazol [464], sowie für die Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase durch Tolcapon [465] bekannt. Ähnliches wurde auch für die Hemmung der Squalen-Synthetase beobachtet, wobei die Resultate jedoch als auftretende Suizidhemmung interpretiert wurden. [466] Dies zeigt, daß die Differenzierung einer hochaffinen Interaktion von einer Mechanismus-orientierten Inhibition unter Umständen nicht einfach ist. Nicht zuletzt sind an dieser Stelle auch diverse klassische NSAIDs, wie z.B. Indomethazin oder Flubiprofen, als Hemmer der Cyclooxygenase zu erwähnen. Auch die relative Selektivität einiger spezifischer experimenteller COX 2-Inhibitoren gegenüber der COX 1 ist auf einen derartigen zeitabhängigen und hochaffinen Mechanismus zurückzuführen. [467,468] Andererseits ist gerade am Beispiel der Cyclooxygenase nachgewiesen worden, daß es für einige Inhibitoren zu Überschneidungen von mehreren Inaktivierungsmechanismen kommen kann. [469]

## **5.1.2 Amidrazone als Substrate der LOX**

### **5.1.2.1 Oxidation der Verbindungen**

Kardinalfrage im Zusammenhang mit der enzymatischen Oxidation der Verbindungen ist die nach den primären Oxidationsprodukten dieser Umsetzung. Für die doch sehr ähnlichen Phenylhydrazone konnte schon mehrfach nachgewiesen werden, daß sowohl enzymatisch über eine LOX-vermittelte Reaktion, als auch nichtenzymatisch  $\alpha$ -Azohydroperoxide als die primären Oxidationsprodukte entstehen. [348-351,470,471] Da in den vorangegangenen Kapiteln bereits eindeutig nachgewiesen werden konnte, daß eine Hemmung der L-1 unabhängig von einer Inhibitoroxidation eintritt, stellt sich nunmehr die Frage, ob durch die enzymatische Umsetzung der Inhibitoren trotzdem vergleichbare  $\alpha$ -Azohydroperoxide entstehen können.

Da Arylhydrazone schon allein durch O<sub>2</sub>-Begasung in indifferenten Lösungsmitteln zu den korrespondierenden  $\alpha$ -Azohydroperoxiden oxidiert werden können [472,473], sollte ein aus einem Amidrazon auf ähnliche Weise gebildetes analoges Oxidationsprodukt Rückschlüsse auf eventuelle Gemeinsamkeiten der Amidrazone und Hydrazone im Angriffsort am Enzym zulassen. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits mehrfach versucht, für zyklische [474] und offenkettige [475] Amidrazone analoge Verbindungen zu isolieren resp. nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit bot es sich an, dieser Frage anhand der untersuchten Strukturen detailliert nachzugehen. Dabei sollten mehrere Wege verfolgt werden. Zunächst sollte versucht werden, auf nichtenzymatischem Wege in größerem Maßstab die entsprechenden Oxidationsprodukte einer kleinen Auswahl an Verbindungen zu isolieren und zu charakterisieren. Diese Reaktionsprodukte sollten sodann als Anhaltspunkt zur Auffindung eventuell enzymatisch entstehender Oxidationsprodukte dienen. Da die Resultate vorangegangener Arbeiten diesbezüglich teilweise recht ernüchternd waren [390], sollte versucht werden, bereits beschriebene Peroxide von Phenylhydrazonen als Vergleich zu synthetisieren.

#### **5.1.2.1.1 Nichtenzymatische Oxidation**

Zunächst sollte also gezielt nach den entsprechenden Reaktionsprodukten geforscht werden bzw. untersucht werden, ob die eventuell entstehenden Azo-Hydroperoxide der Verbindungen sich präparativ isolieren lassen. Bei der Wahl der Oxidationsmittel wurde sich an den entsprechenden Literaturquellen orientiert. [348,350,390,470]

##### **5.1.2.1.1.1 Oxidation der Amidrazone**

Nach kräftigem Rühren der in Toluol gelösten Substanz (**3**) und UV-Bestrahlung konnte erst nach längerer Zeit das Auftreten mehrerer Produkte beobachtet werden. Aus dem Ansatz konnte jedoch nur ein

Produkt isoliert und als Oxalsäurediamid (2-Oxo-*N*-phenyl-2-piperidin-1-yl-acetamid) (**3b**) identifiziert werden. Das gesuchte Azo-Hydroperoxid (**3a**) wurde nicht gefunden (Formeln siehe Kapitel 4.3).

Nach Einleiten von reinem Sauerstoff in die benzolische Lösung von Verbindung (**6**) entsprechend den Vorschriften zur Umsetzung der analogen Arylhydrazone konnte im Gegensatz zu diesen nach 36 Stunden noch keine Umsetzung beobachtet werden. Die anschließende Bestrahlung mit UV-Licht brachte ebenso kaum Fortschritte. Erneut konnte in lediglich geringen Mengen nur ein farbloses Produkt isoliert und als das oben beschriebene Oxalsäurediamid (**3b**) charakterisiert werden.

Als Vergleich zu den obigen  $N^3$ -substituierten Verbindungen sollten auch die  $N^3$ -unsubstituierten Substanzen (**4**) und (**7**) untersucht werden. Für Verbindung (**4**) wurde wieder das entsprechende Oxalsäurediamid (2-Amino-2-oxo-*N*-(2-chlorphenyl)acetamid) (**4a**) isoliert. Im Falle von Verbindung (**7**) konnte ein der oben gezeigten Verbindung (**3b**) analoges Oxalsäurediamid nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde statt dessen das Triazin-Derivat (**7a**) gefunden.

Weitere Verbindungen konnten nicht isoliert werden. Oftmals ließ sich auch beobachten, daß die in aller Regel vorhandenen Zwischenprodukte nach geraumer Zeit in die entsprechenden Oxalsäurediamide (z.B. (**3b**) oder (**4a**)) überführt werden, was ein weiteres Aufarbeiten der Produktgemische häufig hinfällig werden ließ.

Bereits aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß das  $N^3$ -monophenylierte Amidrazon des 2-Oxo-adipinsäuremonomethylesters (**24**) relativ leicht an der Luft in ein nicht näher charakterisiertes rotgefärbtes Endprodukt überführt wird. [392] Ebenso wird das  $N^1,N^3$ -Diphenylbenzamidrazon (**25**) durch HgO in das entsprechende Azoimin (**25a**) überführt. [388,476] Die dehydrierende Oxidation verschiedener Phenylhydrazone zu den entsprechenden Azoverbindungen unter Einwirkung von HgO ist in der Literatur beschrieben. [477,478] Es sollte deshalb an dieser Stelle überprüft werden, inwieweit ein den obigen Strukturen vergleichbares Amidrazon des Essigsäureanilids (**5**) durch das Einleiten von  $O_2$  umgesetzt wird. Doch auch hier war nach zehn Tagen im Gegensatz zu den obigen Verbindungen (**24**) und (**25**) noch keine nennenswerte Umsetzung zu beobachten. Es konnte kein Oxidationsprodukt isoliert werden.

#### 5.1.2.1.1.2 Oxidation der Triazoline

Da für die offenkettigen Arylhydrazone eine große Empfindlichkeit schon gegenüber dem Sauerstoff der Luft beschrieben ist, wurde deshalb zunächst auch hier die Oxidierbarkeit der Triazoline anhand von Verbindung (**8**) durch kräftiges Rühren in einem inerten Lösungsmittel untersucht. Doch weder hierdurch noch nach Einleiten von Luft oder Sauerstoff in die Lösung ließ sich eine Umsetzung verzeichnen, was auf eine höhere Stabilität der zyklischen Verbindung gegenüber den offenkettigen Hydrazonen aber auch einigen Amidrazonen (siehe oben) hinweist.

Eine Oxidation von Verbindung (**11**) mittels Verwendung von  $Fe^{III}$ -Salzen führte ebenfalls zu keinerlei auswertbaren Ergebnissen. Sofort nach Zugabe einer äquimolaren Menge des Eisen(III)-Salzes zur methanolischen Triazolinlösung kam es innerhalb von wenigen Sekunden zur intensiven blau-schwarz-

Verfärbung der Lösung. Die neuerliche Zugabe einer äquimolaren Menge an  $\text{FeCl}_3$  nach 24 Stunden erbrachte zwar eine vollständige Umsetzung des Ausgangsstoffes, zeigte indes aber bis auf zwei Nebenflecken sehr geringer Intensität auf dem Chromatogramm kein weiteres Produkt an. Lediglich auf dem Startfleck ließ sich noch weitere Substanz erkennen. Doch auch durch vielfache Variation des Laufmittelgemisches ließ sich keine Erhöhung des Rf-Wertes erreichen, was den Schluß nahe legt, daß es sich möglicherweise hierbei um ein oder mehrere Fe-Salze bzw. Fe-Komplexe des Triazolins oder seiner Oxidationsprodukte handelt. Auch hier konnten keine Produkte identifiziert werden.

Weiterhin wurde die dehydrierende Umsetzung von Verbindung **(11)** mit  $\text{HgO}$  unternommen. Nach zwei Stunden war eine intensive Rotfärbung der Lösung zu erkennen, als einziges Oxidationsprodukt konnte jedoch nur das farblose Triazol **(11a)** identifiziert werden. Eine derartige Triazolbildung aus den entsprechenden Triazolinen unter der mechanistisch bisher noch nicht geklärten Abspaltung einer Alkylgruppe ist in der Literatur bereits beschrieben [479,480] und konnte bei einigen Verbindungen schon durch Stehenlassen an der Luft, bei anderen durch thermische Behandlung ( $150\text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank) nach einigen Stunden beobachtet werden. Die vergleichbaren in 5-Position des Triazolinringes mono- bzw. unsubstituierten Verbindungen sind hingegen erst gar nicht als Triazoline, sondern nahezu ausschließlich als die korrespondierenden Triazole faßbar. [481] Eine adäquate Behandlung der entsprechenden  $\text{N}^3$ -substituierten Verbindungen, wie z.B. **(21)**, führte hingegen erwartungsgemäß auch nach 24 h bei  $150\text{ }^\circ\text{C}$  zu keinerlei beobachtbarer Triazolbildung.

#### 5.1.2.1.1.3 Oxidation der Hydrazone

Da die soeben beschriebenen Oxidationsversuche der offenkettigen Amidrazone bzw. der Triazoline nur zu mäßigen Erfolgen führten, vielmehr eine Bildung der entsprechenden postulierten Hydroperoxide hierdurch nicht nachgewiesen werden konnte, sollten die Oxidationsversuche zu Vergleichszwecken auf die Hydrazone ausgeweitet werden, deren korrespondierende Hydroperoxide bereits beschrieben sind. Als Edukte für die folgenden Umsetzungen wurden die Verbindungen **(9)** und **(10)** ausgewählt.

In Anlehnung an die entsprechenden Literaturvorschriften [349-351,470] wurde versucht, durch kräftiges Rühren in Toluol in Verbindung mit dem Einleiten von Luft eine diesbezügliche Umsetzung zu erreichen. Im Falle von Verbindung **(10)** führte diese Behandlung schon nach etwa sechs Stunden trotz unvollständigen Stoffumsatzes zu einem vermehrten Auftreten von Nebenprodukten, welche nicht weiter charakterisiert werden konnten. Für Verbindung **(9)** zeigte sich hingegen auch nach 24 Stunden (im Gegensatz zu den angegebenen ein bis acht Stunden) nur ein mäßiger Stoffumsatz, was aber mutmaßlich der Verwendung von Luft anstelle reinen Sauerstoffs geschuldet werden muß. Umsetzungsprodukte konnten nicht identifiziert werden.

Ein zweiter Ansatz nach Lösen der Substanz in Benzol und Einleiten von reinem Sauerstoff anstelle von Luft ergab nach etwa 24 Stunden ein kristallines gelbes Hauptprodukt, welches als das erwartete  $\alpha$ -Azohydroperoxid **(9a)** identifiziert werden konnte.

Obwohl eine große Anzahl verschiedener Amidrazon-Verbindungen unter oxidativen Bedingungen untersucht wurde, konnten keine postulierten  $\alpha$ -Azohydroperoxide isoliert werden. Im Falle der offenkettigen Verbindungen waren stets nur Zerfallsprodukte zu detektieren. Die analoge Behandlung eines Phenylhydrazons ergab das hierfür beschriebene  $\alpha$ -Azohydroperoxid. Die Umsetzung der zyklischen Verbindungen resultierte in der Bildung der korrespondierenden Triazole. Die untersuchten Triazole zeigten noch eine geringfügige Hemmaktivität an der L-1 (siehe Anhang).

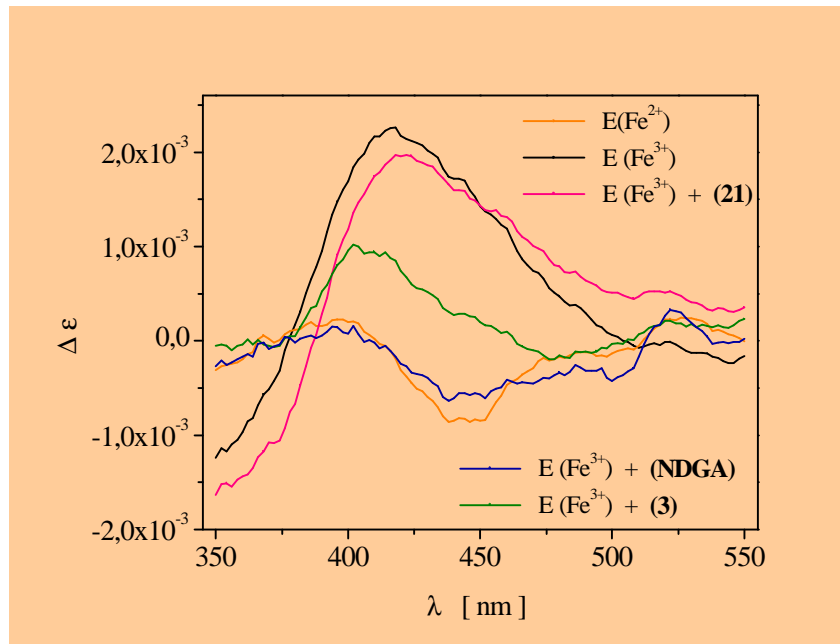
### 5.1.2.1.2 Enzymatische Oxidation

#### 5.1.2.1.2.1 Der Redoxzustand der inaktivierten L-1

##### 5.1.2.1.2.1.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Wie durch die oben erläuterten Versuche anschaulich gezeigt werden konnte, interagieren die untersuchten Amidrazone und Triazole als Inhibitoren nicht nach einem Suizidmechanismus (im Sinne von Schema 2) mit der L-1. Für einen Teil der Verbindungen konnte jedoch ebenso deren Eignung als Substrat des Enzyms festgestellt werden (siehe unten). Im folgenden soll nun geklärt werden, inwieweit die katalytische Umsetzung des Inhibitors einen Einfluß auf die Inaktivierung des Enzyms hat. Zunächst sollte dazu, vor allem auch im Hinblick auf die eingangs erwähnte Theorie der capto-dativen Substitution der Substanzen und in Verbindung mit der damit beabsichtigten Radikalstabilisierung, die Oxidationsstufe des katalytisch wichtigen Eisenions der inaktivierten L-1 nach Interaktion mit dem offenkettigen Amidrazon (**3**) bzw. Triazolin (**21**) ermittelt werden.

Es ist seit längerem bekannt, daß sich die  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Spezies der L-1 durch einen positiven Cotton-Effekt bei 425 nm auszeichnet. Das heißt, durch die



**Abbildung 32:** CD-Spektren der L-1,  $\text{Fe}^{2+}$ -Form: untere Kurve (orange),  $\text{Fe}^{3+}$ -Form: obere Kurve (schwarz),  $\text{Fe}^{3+}$ -Form + Verbindung (**21**): obere Kurve (rot),  $\text{Fe}^{3+}$ -Form + Verbindung (**3**): mittlere Kurve (grün),  $\text{Fe}^{3+}$ -Form + NDGA: untere Kurve (blau);  $E = 2,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $I = 3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

unterschiedliche Absorption von rechts- und linkspolarisiertem Licht wird die Ebene des die Probe durchstrahlenden zirkular polarisierten Lichtes gedreht. [482] Die  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form der L-1 zeigt einen derartigen Effekt in diesem Wellenlängenbereich nicht. [483]

In der oben gezeigten Abbildung 32 sind die CD-Spektren der L-1 unter verschiedenen Bedingungen gezeigt. Da aus separaten Versuchen [122] bereits bekannt war, daß eine etwa dreiminütige Vorinkubation des Inhibitors mit dem Enzym zu dessen Inaktivierung ausreicht, wurden die Spektren jeweils nach einer fünfminütigen E-I-Vorinkubationsphase aufgenommen. Gut läßt sich anhand dieser Methode zwischen der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ - (obere Kurve) und der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Spezies (untere Kurve) des Enzyms unterscheiden. Zum Vergleich ist der Effekt des Redoxinhibitors NDGA gezeigt. Erwartungsgemäß führt der Zusatz von NDGA zu einer vollständigen Reduktion des aktiven Enzyms zur  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form. Der Zusatz des Triazolins (**21**) zum aktiven Enzym hingegen bewirkt offenbar keinerlei Veränderung des CD-Spektrums. Es erfolgt demnach auch keine Übertragung eines einzelnen Elektronens auf das  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Ion der L-1 unter Bildung eines Inhibitorradikals (siehe Kapitel 3.2.1).

Anders sieht es hingegen bei der offenkettigen Verbindung (**3**) aus. Der Verlauf der erhaltenen Meßkurve läßt sich weder eindeutig der oxidierten noch der reduzierten Form des Enzyms zuordnen. Es ist eine, wenn auch nur teilweise, Reduktion der aktiven  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Spezies der LOX zur  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form auszumachen. Bedauerlicherweise ließ sich die Qualität der oben gezeigten CD-Spektren auch durch intensive Bemühungen nicht weiter verbessern. Eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration z.B. führte bereits in der Küvette zu Präzipitationserscheinungen. Das mehrmalige Scannen ( $n = 30$ ) der Proben brachte diesbezüglich ebenfalls keine weitere Verbesserung der Spektren.

Da es sich insgesamt nur um sehr geringfügige Änderungen im Kurvenverlauf handelt, wurde vor einer endgültigen Interpretation diesbezüglich zunächst nach weiteren methodischen Ansätzen gesucht (siehe folgendes Kapitel).

#### 5.1.2.1.2.1.2 Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen

Eine weitere Möglichkeit der Unterscheidung zwischen den Redoxstufen der L-1 ist über die Beobachtung der intrinsischen Fluoreszenz des Proteins zugänglich. Die Intensität des emittierten Lichtes der angeregten Tryptophanreste ( $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 330 \text{ nm}$ ) der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form ist um ca. 30 % geringer als bei der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form. [156,230,231,484] Anhand dieser Tatsache sollte es möglich sein, zwischen beiden Redoxzuständen des Enzyms zu unterscheiden. Falls durch die Zugabe einer Substanz zur  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form der L-1 eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist, sollte dies auf die Reduktion zur  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form zurückzuführen sein. Dies ist natürlich wiederum nur dann beobachtbar, falls nicht sofort eine Reoxidation des Enzyms eintritt (wie es für ein echtes Substrat mit einem geschlossenen katalytischen Kreislauf, [**B**], nach Schema 1 bzw. 2 eigentlich zu erwarten wäre).

Den oben gezeigten CD-Spektren zufolge (Abbildung 32) ist a priori eine (möglicherweise teilweise) Reduktion des aktiven Enzyms durch Verbindung (**3**) zu erwarten. Diese Erwartung konnte durch die Fluoreszenz-Messungen nicht bestätigt werden.



Der jeweilige Inhibitor wurde mit der aktiven Form der L-1 für 5 min vorinkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität bei 320 nm gemessen. Als positive Kontrolle ist wiederum der Effekt des Redoxhemmers NDGA gezeigt. Ausgehend von der Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 bewirkt der Zusatz von NDGA erwartungsgemäß eine vollständige Reduktion zur Fe<sup>II</sup>-Form. Die anschließende Zugabe von Linolsäure bzw. 13-HPODE im Überschuß unter Berücksichtigung des Verdünnungseffektes bewirkt die Überführung wieder zurück in die Fe<sup>III</sup>-Form.

Das Ergebnis eines identischen Experimentes für Verbindung **(3)** bedarf indes einer ausführlichen Erklärung. Es zeigte sich, daß nach Zusatz dieser Verbindung (sowie einer Anzahl weiterer offenkettiger und zyklischer Substanzen) die Fluoreszenzintensität sowohl der Fe<sup>II</sup>- als auch der Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 nach Inhibitorzusatz stark abnahm. Offensichtlich verursachte das Inhibitormolekül ein Quenching des emittierten Lichtes, wodurch die Auswertung erschwert war. Um bezüglich des Redoxzustandes der L-1 hiermit eine Aussage treffen zu können, wurde das folgende indirekte Verfahren zu Hilfe genommen. Wird durch die Zugabe des Inhibitors das Eisenion der aktiven L-1 reduziert, sollte die anschließende Zugabe von 13-HPODE eine Reoxidation zur Fe<sup>III</sup>-Form bewirken (siehe auch Kapitel 5.1.1.4 und 5.1.2.1.2.2). Dies sollte sich in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität äußern. Wird anderenfalls der Redoxzustand des Enzyms nicht durch den Inhibitor beeinflusst, so sollte der nachfolgende Zusatz eines Redoxhemmers (z.B. NDGA) das Eisenion der noch aktiven Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 zur Fe<sup>II</sup>-Form reduzieren, was sich in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität bemerkbar machen sollte. Beide Möglichkeiten setzen den ungehinderten Zutritt von 13-HPODE bzw. NDGA zum Eisenion der LOX nach erfolgter Inhibitorbindung voraus. Dies wurde überprüft.

Der Zusatz von 13-HPODE zur Lösung der L-1 mit dem Inhibitor **(3)** bewirkt keine Änderung der Fluoreszenzintensität, folglich auch keine Oxidation zur Fe<sup>III</sup>-Form. Der separate Zusatz von NDGA hingegen verursacht einen drastischen Anstieg der Fluoreszenzintensität, was eindeutig auf eine Reduktion des Fe<sup>III</sup>-haltigen Enzyms hinweist. Verbindung **(3)** ist somit nicht zur Reduktion der aktiven Lipoxygenase befähigt. Das gleiche Resultat wurde ebenso für eine Anzahl weiterer Verbindungen gefunden, so daß diese Aussage verallgemeinert werden kann. Des weiteren wurde, gewissermaßen als Negativkontrolle, der Einfluß des Triazolins **(21)** untersucht, welches nachweislich kein Substrat des Enzyms ist und dem CD-Spektrum zufolge auch eindeutig nicht zur Reduktion des Fe<sup>III</sup>-Ions im aktiven Zentrum der L-1 befähigt ist. Auch dieser Befund konnte durch die oben gezeigten Fluoreszenz-Untersuchungen bestätigt werden. Der Zusatz des Triazolins **(21)** bewirkt erwartungsgemäß keine Reduktion des Fe<sup>III</sup> der L-1.

So sind nicht nur die am N<sup>1</sup> substituierten offenkettigen Amidrazone **(14)** und **(15)**, sowie das am N<sup>3</sup> substituierte Triazolin **(21)** erwartungsgemäß zur Reduktion der Fe<sup>III</sup>-haltigen L-1 nicht befähigt, auch die an sich oxidablen Strukturen **(3)**, **(7)**, **(8)** und **(26)** haben ebenso keinen Einfluß auf den Redoxzustand der LOX. In Zusammenhang mit den aus dem vorigen Kapitel beschriebenen Resultaten zum O<sub>2</sub>-Verbrauch der Inhibitorumsetzung muß demnach ein vollständig geschlossener Kreislauf, möglicherweise sogar im Sinn von Schema 2, vorliegen. Nach erfolgter Umsetzung des Inhibitors durch die aktive L-1 muß das Enzym wieder in der aktiven Fe<sup>III</sup>-Form vorliegen. Die Reduktion der prosthetischen Gruppe der LOX ist

nicht Bestandteil des Inaktivierungsmechanismus durch die untersuchten Amidrazonverbindungen (vergleiche auch Kapitel 3.2.1).

#### 5.1.2.1.2.2 Amidrazone als Substrate der Dioxygenierungsreaktion?

##### 5.1.2.1.2.2.1 Sauerstoff-Verbrauchsmessungen

Wie eingangs schon beschrieben, konnte kürzlich durch Bombard et al. [348,349] beobachtet werden, daß unter anderem das Hexanalphenylhydrazon (**1**) sowie das Benzaldehydphenylhydrazon (**9**) als Vertreter einer Reihe von Arylhydrazonen katalytisch von der L-1 zu den entsprechenden  $\alpha$ -Azohydroperoxiden (z.B. (**9a**)) oxidiert werden, worauf sich zum großen Teil der beschriebene postulierte Suizidmechanismus begründet (siehe Schema 1 und 2). Pro Inhibitormolekül wird dabei de facto 1 Molekül Sauerstoff verbraucht. Dieser Umstand wurde als Ausgangspunkt für unsere weiteren Untersuchungen genommen. Da es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu den Amidrazonen (**3**) und (**27**) nahelag, eine ebensolche Umsetzung durch die LOX zu vermuten, sollte im folgenden zunächst die Stöchiometrie des Sauerstoff-Verbrauchs überprüft werden.

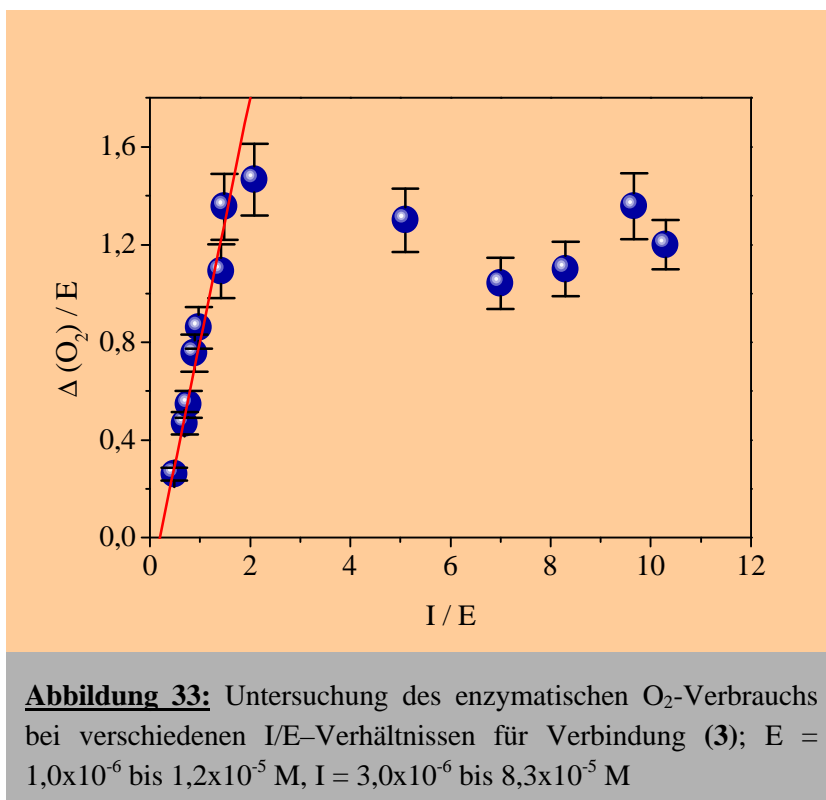
Nach Vorlage der LOX in verschiedenen Konzentrationen ( $0,3$  bis  $6,0 \times 10^{-6}$  M) und Aktivierung zur  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form durch Zugabe von Linolsäure im geringfügigen Überschuß wurde die Oxidation des Inhibitors ( $3,0 \times 10^{-6}$  bis  $6,5 \times 10^{-5}$  M) näher untersucht. In diesen Untersuchungen konnte bestätigt werden, daß für das Phenylhydrazon (**9**) der Literatur entsprechend etwa 1 Molekül  $\text{O}_2$  pro Inhibitormolekül verbraucht wird:  $\Delta(\text{O}_2)/[\text{I}] = 1,02 \pm 0,04$ . Es wurden dabei maximal  $3,11 \pm 0,74$  Inhibitormoleküle pro Enzymmolekül umgesetzt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bombard et al. [348,349] konnte jedoch keinerlei Oxidation des Inhibitors durch die inaktive  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form des Enzyms beobachtet werden. Die katalytische Oxidation des Hydrazons mittels der an sich inaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Spezies der L-1 wird auf zwei Wegen erklärt. Entweder wird die Umsetzung durch verunreinigende Spuren der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form initiiert und die dabei entstehenden Peroxidprodukte bewirken eine kaskadenartige Aktivierung der restlichen Enzymmoleküle, oder aber die zugegebenen Inhibitorlösungen enthalten bereits ausreichende Mengen an Peroxiden bzw. an radikalischen Zwischenprodukten als Oxidationsmittel, wodurch eine initiale Aktivierung des Enzyms erfolgt. Dies konnte jedoch durch uns im Falle von Verbindung (**9**) nicht bestätigt werden.

Ein Kontrollexperiment wurde unter Verwendung von Linolsäure als Substrat in Konzentrationen von  $5,0 \times 10^{-6}$  bis  $8,0 \times 10^{-5}$  M durchgeführt, woraus erwartungsgemäß [485,486] ebenfalls eine 1:1-Stöchiometrie der Oxidation hervorging. Pro Mol Linolsäure ergab sich ein Verbrauch an  $\text{O}_2$  von  $0,99 \pm 0,05$  Mol.

Für die offenkettige Amidrazonverbindung (**3**) offenbarte sich ebenso annähernd eine 1:1-Stöchiometrie der Inhibitor-oxidation, wobei hier eine exakte Quantifizierung aufgrund der sehr langsamen Umsetzung problematisch war und nur durch die Verwendung höherer Enzymkonzentrationen (bis zu  $1,2 \times 10^{-5}$  M) eine ausreichende Genauigkeit zu erreichen war. Pro Inhibitormolekül wurden  $0,92 \pm 0,09$  Moleküle  $\text{O}_2$

verbraucht, wobei maximal jedoch nur etwa  $1,35 \pm 0,51$  Inhibitormoleküle pro Enzymmolekül umgesetzt wurden (Abbildung 33).

Es wurde des weiteren angestrebt, die charakteristische Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{cat}}$  der Inhibitorumsetzung zu quantifizieren sowie alsdann mit der Inaktivierungskonstante  $k_{\text{inact}}$  zu vergleichen. Die Inaktivierungskonstante  $k_{\text{inact}}$  entspricht hierbei dem schon im Kapitel 5.1.1.6 ermittelten Wert für  $k_5$  (siehe Schema 3).



**Abbildung 33:** Untersuchung des enzymatischen  $\text{O}_2$ -Verbrauchs bei verschiedenen I/E-Verhältnissen für Verbindung (3);  $E = 1,0 \times 10^{-6}$  bis  $1,2 \times 10^{-5}$  M,  $I = 3,0 \times 10^{-6}$  bis  $8,3 \times 10^{-5}$  M

Die Umsetzungskonstante des Inhibitors  $k_{\text{cat}}$  wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen ermittelt. Einmal wurde  $k_{\text{cat}}$  durch Ermittlung der Geschwindigkeit der Oxidation in Abhängigkeit von  $[I]$  unter Verwendung der Michaelis-Menten-Beziehung (Gleichung 22, siehe Anhang) sowie der Gleichung 23 bei einer definierten Enzymkonzentration bestimmt. Alternativ hierzu wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit nach Gleichung 23 in Abhängigkeit von  $[E]$  bei einer konstanten (sättigenden) Inhibitorkonzentration ermittelt. Die auf beiden Wegen erhaltenen Ergebnisse waren statistisch identisch und wurden gemittelt. Für das Hydrazon (9) resultierte dabei ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $0,49 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$ , für Verbindung (3) hingegen lediglich ein Wert von  $7,28 \pm 1,34 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

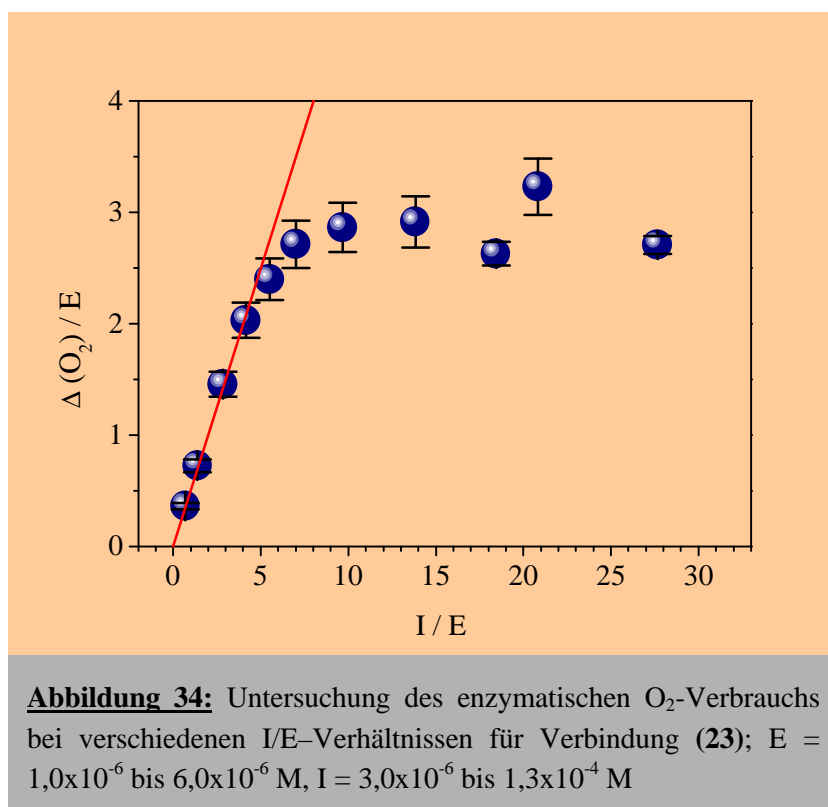
Im obigen Kapitel 5.1.1.4 wurde bereits erwähnt, daß nach vorangegangener Inkubation des Inhibitors mit E eine nachträgliche Aktivierung der L-1 durch 13-HPODE möglich ist, wodurch  $k_{\text{cat}}$  unter Umständen separat für den  $\text{EI}^*$ -Komplex ermittelt werden kann. Unter diesen Bedingungen resultierte ein geringfügig erhöhter  $k_{\text{cat}}$ -Wert für (3) von etwa  $1,41 \pm 0,32 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , d. h. die enzymatische Umsetzung des Inhibitors aus  $\text{EI}^*$  erfolgt mit etwa der doppelten Geschwindigkeit als aus dem  $\text{EI}$ -Komplex, wobei dieser Unterschied aufgrund der großen Fehlerbreite lediglich als tendenziell anzusehen ist. Weiterhin ist hierbei zu beachten, daß die Isomerisierungskonstante von  $\text{EI}$  zu  $\text{EI}^*$  ( $k_5 = 3,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), welche gleichzeitig den Inaktivierungsschritt beschreibt, etwa um den Faktor 4 größer als die Oxidationskonstante ( $k_{\text{cat}} = 7,28 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) aus  $\text{EI}$  ist (die Isomerisierung zu  $\text{ESI}^*$  ist sogar ca. 15 mal schneller ( $k_5 = 0,11 \text{ s}^{-1}$ ) als die Oxidation des Hemmers). Da es sich hierbei um zwei direkt miteinander konkurrierende Prozesse handelt, beschreibt der erhaltene Wert von  $7,28 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  somit vermutlich lediglich eine Überlagerung der Oxidationsreaktionen von I aus  $\text{EI}$  sowie aus  $\text{EI}^*$  und wird vornehmlich durch die schnellere Umsetzung aus  $\text{EI}^*$  bestimmt. Aus der Tatsache, daß der Wert für  $k_{\text{cat}}$  ohne E-I-Präinkubation trotzdem geringfügig aber signifikant vom Wert für  $k_{\text{cat}}$  nach Präinkubation abweicht, läßt darauf schließen, daß a) auch eine

Umsetzung des Inhibitors aus EI möglich ist, sowie b) die Umsetzungskonstante für I aus dem EI-Komplex heraus in praxi noch wesentlich geringer sein muß (unterhalb von  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Um hierfür den exakten Wert angeben zu können, müßte man die Isomerisierung von EI zu EI\* verhindern, was jedoch derzeit nicht möglich scheint.

Wie eingangs schon erwähnt, konnte auch für N<sup>3</sup>-unsubstituierte Triazoline, wie z.B. (23), eine enzymatische Umsetzung nachgewiesen werden. Trotz des offenkundigen Fehlens eines vergleichbaren N<sup>1</sup>H in pseudo-bis-Allylstellung fungieren diese Verbindungen als Substrate der Lipoxygenase-Reaktion, wobei die unsubstituierte N<sup>3</sup>H-Position augenscheinlich diese Substrateigenschaft der Verbindungen bedingt. Die Oxidation der Triazoline erfolgte dabei weitgehend mit einer den korrespondierenden offenkettigen Verbindungen vergleichbaren Geschwindigkeit. Einige wenige Ausnahmen wurden andererseits mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit umgesetzt. So ist die Umsetzungskonstante für Verbindung (8) mit  $0,26 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  (siehe folgendes Kapitel) schon in der Größenordnung der Oxidationsgeschwindigkeit des Phenylhydrazons (9) einzuordnen. Die sich hier nun stellende Frage muß somit lauten: Ist die gefundene 1:1-Stöchiometrie des O<sub>2</sub>-Verbrauchs bei der Oxidation der offenkettigen Amidrazone auf die Umsetzung der zyklischen Amidrazone übertragbar?

Bei der Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs dieser Substanzklasse anhand von Verbindung (23) offenbarte sich jedoch überraschenderweise eine Stöchiometrie der Oxidation von lediglich  $0,49 \pm 0,05$ . Pro Inhibitmolekül werden also rein rechnerisch nur etwa 0,5 Moleküle O<sub>2</sub> zur Umsetzung benötigt. Maximal werden dabei unter den gewählten Bedingungen pro Enzymmolekül  $2,95 \pm 0,15$  Moleküle Sauerstoff verarbeitet bzw. entsprechend etwa sechs Moleküle Inhibitor umgesetzt (Abbildung 34).

Dieses zunächst unerwartete Resultat wurde anhand einer weiteren Verbindung überprüft. Doch auch die Untersuchungen für das Triazolin (8) bestätigten das Stöchiometrie-Verhältnis von etwa 0,5 ( $0,41 \pm 0,08$ ), wobei hier maximal  $2,3 \pm 0,17$  Moleküle Sauerstoff resp. fünf bis sechs Moleküle Inhibitor pro Enzymmolekül umgesetzt werden. Eine Inhibitoroxidation zu den korrespondierenden Azoperoxiden gemäß Schema 2 ist somit für diese Verbindungen auszuschließen.



### 5.1.2.1.2.2.2 Fluoreszenz-Messungen

Aufgrund der relativ starken Eigenfluoreszenz der Triazoline sowie unter der Prämisse, daß eine Oxidation des Inhibitormoleküls mit einer entsprechenden Abnahme der Fluoreszenz dieses Moleküls verbunden ist, bot sich hier die Gelegenheit, relativ spezifisch und unabhängig vom O<sub>2</sub>-Verbrauch die Umsetzung der Inhibitoren direkt zu untersuchen. Zunächst ist zwar nicht definitiv vorhersagbar, welcher Prozeß genau die Ursache für einen auftretenden Fluoreszenzverlust ist, de facto kann jedoch mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß eine chemische Modifikation am Fluorophor, dem Triazolinring, eingetreten ist. Dem wurde im folgenden nachgegangen.

Analog den im vorigen Kapitel beschriebenen Untersuchungsmethoden via O<sub>2</sub>-Verbrauch wurde dabei einmal bei konstanter Enzym- und variabler Inhibitorkonzentration sowie ergänzend dazu bei variabler Enzym- und konstanter Inhibitorkonzentration im Sättigungsbereich gearbeitet. Über eine Kalibriergerade der Inhibitorkonzentration gegen die Fluoreszenzintensität und unter Nutzung der Gleichungen 22 und 23 konnte so die Umsetzungskonstante  $k_{\text{cat}}$  ermittelt werden. Exemplarisch wurde hierfür wiederum die Verbindung (**8**) ausgewählt. Als Vergleich wurde die entsprechende Umsetzungskonstante via O<sub>2</sub>-Verbrauch ermittelt. Über die Ermittlung der Abnahme der Fluoreszenzintensität wurde ein Wert für  $k_{\text{cat}}$  von  $0,26 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ , über die Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs ein Wert von  $0,15 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$  kalkuliert. Hierbei ist natürlich noch der oben beschriebenen 2:1-Stöchiometrie der Inhibitorumsetzung in bezug auf den O<sub>2</sub>-Verbrauch Rechnung zu tragen. Da für zwei Inhibitormoleküle rein rechnerisch nur ein O<sub>2</sub>-Molekül aufzuwenden ist, ist  $k_{\text{cat}}$ , ermittelt über die Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs, aber bezogen auf die Umsetzung des Inhibitors, de facto doppelt so hoch ( $0,30 \text{ s}^{-1}$ ).

Es konnte keine größere Differenz der mittels beider Methoden ermittelten Konstanten ( $0,26$  bzw.  $0,30 \text{ s}^{-1}$ ) festgestellt werden. Sauerstoffverbrauch sowie Fluoreszenzlöschung beschreiben ergo den selben kinetischen Prozeß. Das konnte anhand der Verbindung (**23**) bestätigt werden. Auch hier stimmt der über den O<sub>2</sub>-Verbrauch ermittelte (korrigierte) Wert für  $k_{\text{cat}}$  ( $2,77 \pm 0,08 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) sehr gut mit dem über den Fluoreszenzverlust quantifizierten Wert ( $2,79 \pm 0,10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) überein.

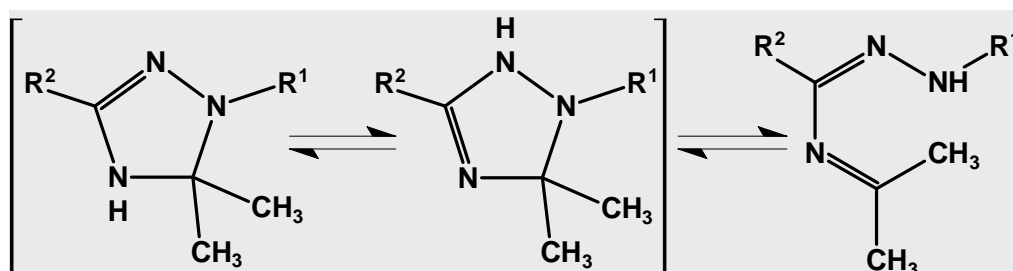
Interessanterweise wird hier aber auch sehr deutlich sichtbar, daß schon geringfügige Modifikationen in der Struktur des Inhibitormoleküls große Veränderungen in bezug auf dessen Substrateigenschaften nach sich ziehen können. So wird Verbindung (**8**) annähernd um eine Größenordnung schneller durch die L-1 umgesetzt als Verbindung (**23**) oder auch Verbindung (**28**) ( $k_{\text{cat}} = 2,72 \pm 0,10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Wiederum korreliert die gute Eignung als Substrat jedoch nicht mit einer entsprechend höheren inhibitorischen Potenz der Verbindung (**8**) ( $\text{IC}_{50} = 1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) gegenüber den Verbindungen (**23**) ( $\text{IC}_{50} = 8,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) oder (**28**) ( $\text{IC}_{50} = 1,7 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) (siehe Anhang). Der Vergleich von  $k_{\text{cat}}$  mit  $k_{\text{inact}}$  zeigt, daß die Differenz zwischen der Umsetzungsgeschwindigkeit des Inhibitors (**23**) ( $2,79 \pm 0,10 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) und der Inaktivierung des Enzyms ( $7,35 \pm 0,87 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), anders als bei der offenkettigen Verbindung (**3**), hier nur noch geringfügig ausgeprägt ist. Im Falle von Verbindung (**8**) ist deren Umsetzung ( $k_{\text{cat}} = 0,30 \text{ s}^{-1}$ ) sogar etwas schneller als der Inaktivierungsschritt an der L-1 ( $k_{\text{inact}} = 0,13 \pm 0,39 \text{ s}^{-1}$ ). Theoretisch könnte demzufolge für diese Verbindung (**8**) auch ein Suizidmechanismus nach Schema 2 (ohne nähere Definition des O<sub>2</sub>-

verbrauchenden Schrittes) zugrunde gelegt werden. Im Analogieschluß zu den vergleichbaren Verbindungen (23) und (28) ist dies aber wohl auszuschließen.

Wie zu erwarten war, konnte bei den N<sup>3</sup>-substituierten Triazolinen, wie z.B. (21) oder (29), keine Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration beobachtet werden. Das Fluoreszenzsignal war über sieben Minuten nahezu konstant. Da diese Verbindungen nicht durch das Enzym umgesetzt werden können, wurden sie als Negativkontrolle genutzt.

Obwohl bei allen Triazolinen durch die Cyclisierung der Amidrazonstruktur das für die Substrateigenschaft vermeintlich essentielle N<sup>1</sup>H der Verbindungen substituiert ist, fungieren die N<sup>3</sup>-unsubstituierten Substanzen offensichtlich trotzdem als alternative Substrate der LOX. Was ist also die Ursache für diese Substrateigenschaft der Triazoline?

Die durch Kondensation der entsprechenden Amidrazone mit Ketonen oder Aldehyden entstandenen N<sup>3</sup>-unsubstituierten Triazolin-Derivate sollten eventuell in einem Gleichgewicht mit der korrespondierenden ringoffenen Alkyldenstruktur stehen. [487] Durch die Arbeiten von Ranft [488], Froberg [392] sowie Drutkowski [481] konnte jedoch das Vorliegen der Verbindungen in der zyklischen Triazolinstruktur bewiesen werden. Lediglich unter sauren Bedingungen zerfallen diese Verbindungen in die ringoffene Form (unter Abspaltung der Carbonylkomponente, z.B. Aceton), was durch den Verlust der Eigenfluoreszenz dieser Verbindungen nach Säurezusatz visuell nachvollziehbar ist. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang das Vorliegen eines Gleichgewichtes zwischen zyklischer und offenkettiger Form „am Enzym“ gemäß Abbildung 35, was die Akzeptanz des Inhibitors als Substrat der L-1 erklären würde. Durch sukzessive Umsetzung der offenkettigen Verbindung würde dann das Gleichgewicht immer weiter verschoben, wo-durch schließlich der Inhibitor vom Enzym komplett umgesetzt würde. Dies ist an dieser Stelle nicht völlig auszuschließen. Nichtsdestotrotz wäre in diesem Falle jedoch gleichermaßen eine 1:1-Stöchiometrie in der Inhibitoroxidation zu erwarten.



**Abbildung 35:** theoretisches Gleichgewicht der Triazoline zwischen zyklischer und ringoffener Form; R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHCO, R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Für die Untersuchungen an der L-1 wurde ein alkalischer Puffer verwendet (pH 8,5), so daß die Bildung der offenkettigen Form per se nicht begünstigt wird. Durch Stabilitätsuntersuchungen konnte dies bestätigt werden, worauf jedoch in Kapitel 5.3 noch näher eingegangen wird. Weiterhin wurden die N<sup>3</sup>-substituierten Verbindungen (21) und (29) hinzugezogen. Im Verlaufe der E-I-Interaktion konnte keine Abnahme der Fluoreszenzintensität der Verbindungen beobachtet werden, was den Schluß nahe legt, daß zumindest bei diesen Verbindungen eine Umlagerung zur offenkettigen Form „am Enzym“ nicht eintritt.

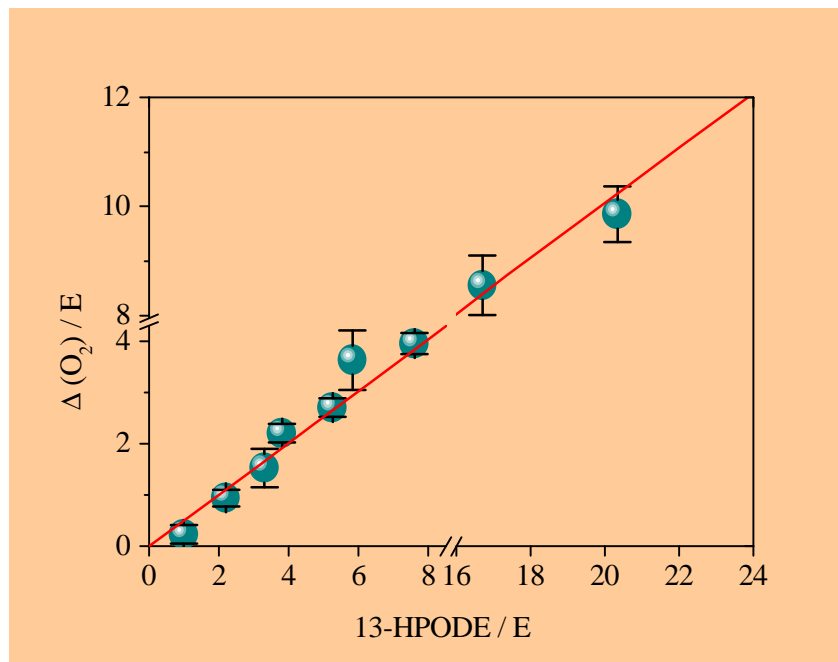
Es kann hier also definitiv ausgeschlossen werden, daß eine offenkettige Struktur das aktive Wirkprinzip der ( $N^3$ -substituierten) Triazoline darstellt.

Während für die offenkettige Amidrazonverbindung (**3**) aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Hydrazonen sowie durch die ermittelte 1:1-Stöchiometrie des Sauerstoffverbrauches eine Hydroperoxidbildung des Inhibitors analog den Phenylhydrazonen (siehe Schema 2) noch plausibel erscheint, vermag dies die Oxidation der Triazoline nicht mehr ausreichend zu erklären.

#### 5.1.2.1.2.2.3 Abhängigkeit der Inhibitorumsetzung vom 13-HPODE-Level

Im Verlaufe der Untersuchungen mußte mehrmals festgestellt werden, daß die enzymatische Umsetzung des Inhibitors, sowohl der offenkettigen als auch der zyklischen Verbindungen, stark von der zur Aktivierung zugesetzten Substratmenge resp. von der enthaltenen 13-HPODE-Konzentration abhängig ist. Das wurde am Beispiel der Verbindung (**8**) näher untersucht. Der Einsatz unterschiedlicher 13-HPODE-Enzym-Verhältnisse über einen möglichst großen Bereich bei einer konstanten, hohen Inhibitorkonzentration erbrachte das in der folgenden Abbildung 36 gezeigte Resultat. Je höher der enthaltene Anteil an 13-HPODE

im Medium ist, desto größer ist auch das Ausmaß der Inhibitor-Oxidation. Ein direkter Vergleich zwischen  $O_2$ -Verbrauch und 13-HPODE-Anteil brachte ein stöchiometrisches Verhältnis von etwa 0,5 ( $0,503 \pm 0,01$ ) zutage. Pro 13-HPODE-Molekül wird also rein rechnerisch nur ein halbes Molekül  $O_2$  vom Enzym verarbeitet. In Zusammenhang mit dem oben gezeigten stöchiometrischen Verhältnis zwischen  $O_2$ -Verbrauch und Inhibitoroxidation von ebenfalls 0,5



**Abbildung 36:** Abhängigkeit des enzymatisch bedingten  $O_2$ -Verbrauchs für Verbindung (**8**) vom 13-HPODE-Gehalt der Lösung;  $E = 6,0 \times 10^{-7}$  bis  $6,0 \times 10^{-6}$  M,  $S = 5,0 \times 10^{-6}$  bis  $5,0 \times 10^{-5}$  M,  $I = 8,3 \times 10^{-5}$  M,  $R = 0,989$

bedeutet dies ein stöchiometrisches 13-HPODE-Inhibitor-Verhältnis von etwa 1. Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß für die enzymatische Umsetzung des Triazolins (**8**) durch die L-1 pro Mol Inhibitor also ein Mol 13-HPODE hingegen nur ein halbes Mol  $O_2$  benötigt wird.

Ein vergleichbarer Effekt, wenngleich nicht so deutlich ausgeprägt, ließ sich auch für die offenkettige Verbindung (**3**) beobachten. Auch hier nimmt mit steigendem Peroxidgehalt des Mediums das Ausmaß der Inhibitorumsetzung zu.

Der Einfluß der verfügbaren Menge an 13-HPODE beschränkte sich bei allen untersuchten Verbindungen allerdings nur auf das Ausmaß der Inhibitoroxidation. Die Geschwindigkeit dieser Umsetzung wird hingegen nicht beeinflusst, was separat sowohl für die Verbindungen **(8)** und **(23)** als auch **(3)** abgeklärt wurde. Weiterhin wurde ein Kontrollexperiment mit verschiedenen Konzentrationen an OA anstelle von 13-HPODE unternommen. Es war eindeutig festzustellen, daß die Ölsäure als Substrat-Analogen an dieser Stelle keinen Einfluß auf das Ausmaß oder die Geschwindigkeit der Umsetzung der Inhibitoren hat. Die Stimulation der Inhibitorumsetzung ist also auf das 13-HPODE zurückzuführen. Die sich nunmehr anschließende Frage ist: Wird die Inhibitorumsetzung wirklich spezifisch nur durch 13-HPODE stimuliert, oder kann ein derartiger Effekt auch durch andere Peroxide ausgelöst werden? Ist das Peroxid als Redoxäquivalent notwendig oder liegt hier ein anderer Mechanismus der Aktivierung vor?

Als Vergleich wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  herangezogen. Die L-1 ( $6,0 \times 10^{-6}$  M) wurde durch eine definierte Menge an S ( $2,4 \times 10^{-5}$  M) aktiviert und der Einfluß steigender Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-4}$  M) auf die enzymatische Umsetzung der Verbindungen **(3)** und **(8)** (jeweils  $8,3 \times 10^{-5}$  M) untersucht. Weder bei der zyklischen **(8)** noch bei der offenkettigen **(3)** Verbindung bewirkte der Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine signifikante Steigerung der Inhibitoroxidation ( $\text{O}_2/\text{E}$ :  $1,34 \pm 0,12$  gegenüber  $1,34 \pm 0,12$  bei Verbindung **(3)** und  $2,39 \pm 0,24$  gegenüber  $2,59 \pm 0,24$  bei Verbindung **(8)**). Offenbar ist der eben beschriebene Effekt (siehe Abbildung 36) relativ spezifisch für das 13-HPODE, was darauf hindeutet, daß es sich hierbei nicht nur um eine simple Cooxidationsreaktion handelt (siehe unten). Bleibt an der Stelle noch hinzuzufügen, daß schon in den Abbildungen 8 und 21 gezeigt wurde, daß mit steigender Substratkonzentration bzw. durch die Substratgegenwart das Ausmaß der LOX-Hemmung durch die Verbindungen **(3)** und **(21)** zunimmt. Da hierbei anzunehmen ist, daß mit höheren Substratkonzentrationen auch eine höhere enthaltene Peroxidmenge verbunden ist, so ist zu schlußfolgern, daß nicht nur die Inhibitoroxidation sondern auch die inhibitorische Wirkung der Verbindungen mit steigendem Peroxidgehalt zunimmt. In Ergänzung zu diesen Untersuchungen wurde der Einfluß von Ölsäure auf die Inhibitoroxidation untersucht. Da der eben beschriebene Effekt des 13-HPODE offenbar nicht auf dessen Eigenschaft als Oxidationsmittel zurückzuführen ist, liegt es nahe zu vermuten, daß dieser Effekt durch Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen E, I und 13-HPODE zurückzuführen ist. Da die Ölsäure, wie in den vorigen Kapiteln eingehend beschrieben (Kapitel 5.1.1), einen zum Teil dramatischen Effekt auf die inhibitorische Wirkung der Verbindungen bewiesen hat, beeinflusst es möglicherweise auch die enzymatische Umsetzung der Verbindungen. Doch der Zusatz von OA bis zu einer Konzentration von  $2,0 \times 10^{-4}$  M bewirkte keinerlei Veränderung der Umsetzungsgeschwindigkeit der Verbindung **(3)**. Auf das Ausmaß der Inhibitorumsetzung (umgesetzte Moleküle pro Enzymmolekül) hat es ebenfalls keinen signifikanten Effekt (aufgrund der großen Schwankungsbreite bei der Quantifizierung der sehr kleinen Geschwindigkeiten). Gleichwohl ist tendenziell eine geringfügige Zunahme der Anzahl der umgesetzten Inhibitormoleküle pro Enzymmolekül zu beobachten. Obwohl dieser Effekt leider nicht signifikant ist, unterstützt er doch die obige Beobachtung der Abhängigkeit der Inhibitorumsetzung vom 13-HPODE-Level im Sinne der Ausbildung eines ternären Komplexes.



### 5.1.2.1.2.3 Amidrazone als Substrate der Cooxidase-Reaktion?

Zur Pseudoperoxidase-Aktivität (Cooxidase-Aktivität) ist im Gegensatz zur Dioxygenase-Aktivität der L-1 relativ wenig bekannt. Zahlreiche Substanzen unterschiedlicher Struktur können als Cosubstrate dieser Reaktion dienen (siehe auch Kapitel 3.1.4 und 3.2). [489] Im Falle des BW 755c (**2**) stellt man sich das dergestalt vor, daß vom Inhibitormolekül ein Elektron auf das Eisenzentrum der aktiven LOX übertragen wird, welches dann anschließend durch 13-HPODE aus der dabei gebildeten Fe<sup>II</sup>-Form zurück in die Fe<sup>III</sup>-Form überführt wird. Das 13-HPODE-Molekül zerfällt hierbei vermutlich in OH<sup>-</sup> und das korrespondierende Alkoxyradikal, welches weiteren Reaktionen unterliegt. [195,212] Dem aus dem Inhibitormolekül generierten Radikalkation bzw. nach Abgabe eines Protons gebildeten Radikal sowie dem nach einem zweiten Durchlaufen des katalytischen Kreislaufes möglicherweise daraus entstehenden Carbokation bzw. Immonium-Ion werden eine Schlüsselrolle in der Inaktivierung der LOX zugeschrieben. [365,366]

Der initiale Elektronentransfer muß jedoch offenbar nicht direkt vom Inhibitormolekül auf das Eisenzentrum des Enzyms erfolgen. In der Literatur sind auch Beispiele dafür bekannt, daß Substanzen, die als Cosubstrate der Pseudoperoxidase-Reaktion fungieren, offenbar nicht zur Reduktion der Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 befähigt sind (siehe Kapitel 3.2.1).

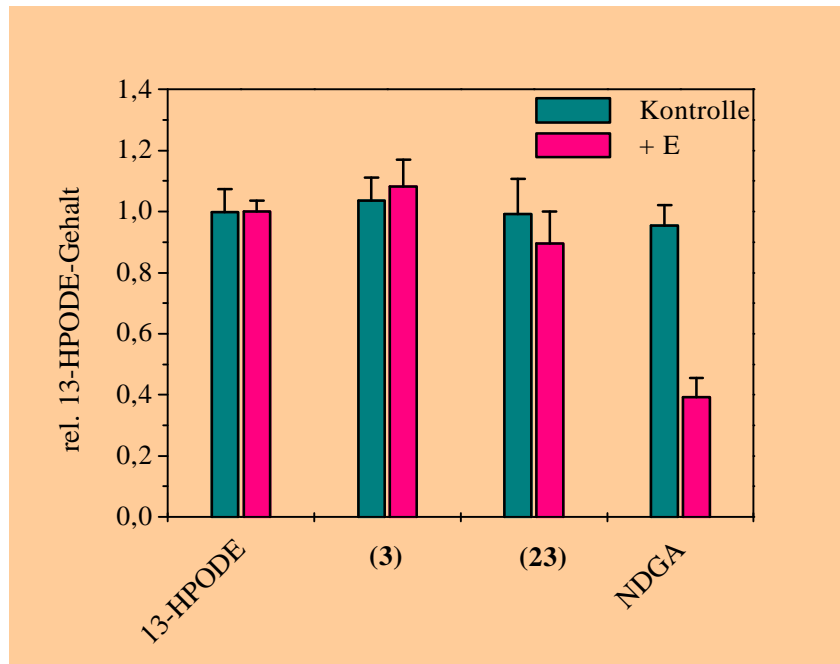
Da in den vorangegangenen Kapiteln nur untersucht wurde, ob eventuell ein sichtbarer Elektronentransfer vom Inhibitormolekül auf das Enzym stattfindet, sollte im folgenden nun überprüft werden, ob sich die untersuchten Substanzen generell als Cosubstrate der Pseudoperoxidase-Reaktion der L-1 eignen. Fungiert eine Substanz als Cosubstrat einer derartigen Pseudoperoxidase-Reaktion, so sollte es dabei mithin zu einem meßbaren Verbrauch an 13-HPODE kommen. Für das zyklische Amidrazon BW 755c (**2**) konnte dies schon durch Mansuy et al. [365,366] nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 3.3.1).

In Anlehnung an dessen Untersuchungen wurde das folgende Experiment durchgeführt. Für 30 Minuten wurden  $1,2 \times 10^{-5}$  M L-1(Fe<sup>III</sup>) mit  $1,2 \times 10^{-4}$  M 13-HPODE und  $1,2 \times 10^{-4}$  M Inhibitor inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Gehalt an 13-HPODE bestimmt und daraus ein eventuell auftretender Verbrauch ermittelt. Die Quantifizierung des Peroxids erfolgte mittels CE und elektrochemischer Detektion. Zu Vergleichszwecken wurden die Untersuchungen auf den Redoxhemmer NDGA sowie auf das oxidable Triazolol (**23**) ausgedehnt. Unter identischen Bedingungen wurde ein Blindversuch ohne Enzymzusatz durchgeführt.

Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, ist der Gehalt an 13-HPODE in Abwesenheit des Enzyms mit oder ohne Inhibitorzusatz in den ersten 30 Minuten nahezu konstant. Das bedeutet, sämtliche untersuchte Substanzen werden – zumindest in diesem Zeitraum – nicht direkt durch das Hydroperoxid der Linolsäure oxidiert. Ähnlich verhält es sich auch nach Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz. Weder allein, noch in Kombination mit den Inhibitoren (**3**) oder (**23**) konnte ein meßbarer Verbrauch an 13-HPODE konstatiert werden. Erwartungsgemäß führte jedoch im Gegensatz hierzu der Zusatz von NDGA zum Inkubationsmedium zu einer deutlichen Abnahme des Peroxidgehalts der Lösung. Dies ist so zu erklären, daß nach Reduktion zur Fe<sup>II</sup>-Form durch NDGA das Enzym wieder durch 13-HPODE zur Fe<sup>III</sup>-Form reoxidiert wird. Dieser Kreislauf wird innerhalb der 30 Minuten im Falle des NDGA mehrmals

durchlaufen, wodurch eine größere Menge an 13-HPODE verbraucht wird. Da für die Verbindungen **(3)** und **(23)** kein Verbrauch an 13-HPODE konstatiert werden konnte, können diese Substanzen somit auch, anders als das BW 755c, keine Cosubstrate der Pseudoperoxidase-Reaktion der L-1 sein.

Es konnte festgestellt werden, daß diese Substrate keinen enzymatischen Verbrauch an 13-HPODE verursachen, folglich also keine Cosubstrate einer Cooxidase-Reaktion der LOX sind. Die im vorigen Kapitel



**Abbildung 37:** Nachweis eines enzymatischen 13-HPODE-Verbrauchs während der Inhibitorumsetzung: Effekt der Zugabe der Inhibitoren **(3)**, **(23)** bzw. NDGA zu einer 13-HPODE-Lösung ohne (Kontrolle, blaue Balken) bzw. nach Zusatz (rote Balken) der L-1;  $E = 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $I = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $13\text{-HPODE} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$

beschriebenen Resultate bezüglich der beobachteten Abhängigkeit der Inhibitorumsetzung vom 13-HPODE-Gehalt des Milieus (siehe Abbildung 36) stehen somit diesen Erkenntnissen augenscheinlich entgegen. Da jedoch ebenso separat nachgewiesen werden konnte, daß z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  einen derartigen Effekt (Stimulation der Inhibitorumsetzung) nicht auslöst, sind hierfür folglich andere Ursachen zu suchen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  selbst kann als Cosubstrat der Pseudoperoxidase-Reaktion der L-1 fungieren. Da 13-HPODE bei diesem Prozeß nicht verbraucht wird und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Inhibitorumsetzung keinen Effekt auslöst, liegt dieser Verstärkung kein Peroxid-verbrauchender Prozeß zugrunde. Statt dessen ist es denkbar, daß durch die Bindung von 13-HPODE am Enzym ein gewisser Schutz vor der mit der Inhibitorumsetzung einhergehenden Inaktivierung besteht.

#### 5.1.2.1.2.4 Nachweis der enzymatischen Oxidationsprodukte

Ausgehend von der Annahme, daß es sich bei den primären Oxidationsprodukten der katalytischen Umsetzung der untersuchten Verbindungen möglicherweise um die postulierten Hydroperoxide handelt, wurde nach selektiven Methoden zum Nachweis derartiger Verbindungen gesucht. Zum Nachweis von Hydroperoxiden oder Radikalen in biologischen Systemen existiert eine Vielzahl verschiedener Methoden, welche mehr oder weniger aussagekräftige Resultate liefern. [490-495] Folgende Methoden wurden im einzelnen angewendet.

#### 5.1.2.1.2.4.1 Die Phosphinoxid-Methode

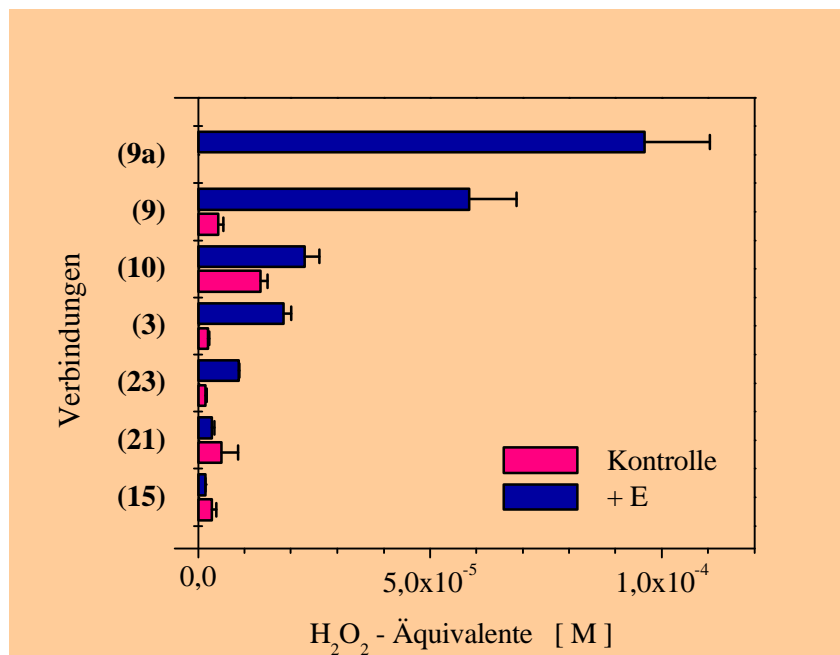
Eine sehr elegante Methode zum spezifischen Nachweis von Hydroperoxiden in biologischen Materialien ist von Tokumaru et al. [496] beschrieben worden. Für aromatische Phosphin-Verbindungen ist bekannt, daß sie durch Oxidation leicht in die entsprechenden charakteristisch fluoreszierenden Phosphinoxide überführt werden. Als für derartige Untersuchungen ausreichend stabil hat sich hierbei das Diphenylnaphthylphosphin DPNP erwiesen.

Falls aus den untersuchten Inhibitoren durch die L-1 die entsprechenden Hydroperoxide generiert werden und diese ausreichend stabil sind, sollte hierdurch ein spezifischer Nachweis möglich sein. Durch die Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im erwarteten Konzentrationsbereich wurde zunächst sichergestellt, daß in unserem System ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Peroxidmenge und dadurch detektierter Fluoreszenzintensität besteht. Sodann wurden verschiedene Inhibitoren im zehnfachen Überschuß mit der aktiven L-1 für etwa fünf Minuten vorinkubiert. Ein dabei auftretender Sauerstoffverbrauch wurde parallel registriert, wobei die Umsetzung in aller Regel nach etwa fünf Minuten beendet war. Ein Blindversuch wurde für jede einzelne Verbindung ohne Enzymzusatz bzw. für das aktive Enzym ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Hierbei wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

Die Blindwerte nahezu aller Verbindungen bewegten sich im selben Bereich an detektiertem Fluoreszenzlicht. Lediglich beim Acetonphenylhydrazon (10) lassen erhöhte Grundwerte auf eine gesteigerte Oxidation der Verbindung ohne Enzymeinfluß schließen (Abbildung 38). Diese Instabilität ist bereits in der Literatur beschrieben, weshalb dieses Hydrazon auch nur selten als Vergleichssubstanz herangezogen wird. Die Fluoreszenzintensität in Abbildung 38 ist als Peroxidmenge bezogen auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  dargestellt.

Wird der L-1 Linolsäure als

Substrat zur Verfügung gestellt, so entsteht nachgewiesenermaßen 13-HPODE, welches als Peroxid eine Oxidation des Phosphins und somit eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität bewirkt. Auch für das Benzaldehydphenylhydrazon (9) wurde die enzymatische Bildung des korrespondierenden  $\alpha$ -Azohydroperoxides bereits nachgewiesen, womit ebenfalls eine Zunahme der Phosphin-Fluoreszenz einhergeht. Ein vergleichbarer Effekt ist auch bei dem Amidrazon (3) zu beobachten. Aber auch bei der



**Abbildung 38:** DPNP-Test: Nachweis von enzymatisch generierten Oxidationsmitteln aus den angegebenen Inhibitoren, ohne Enzymzusatz = Kontrolle (rote Balken), mit Enzymzusatz (blaue Balken);  $E = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $I = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$

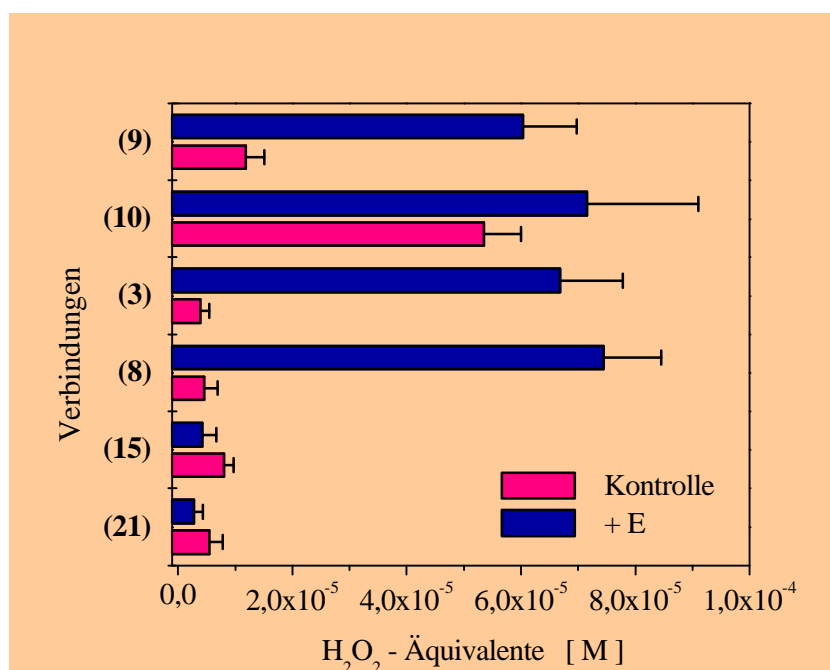
oxidablen Triazolinverbindung (**23**) ist eine deutliche Differenz zwischen Blind- und Meßwert zu beobachten, was den Schluß nahelegt, daß hierfür möglicherweise intermediär gebildete Peroxide verantwortlich gemacht werden können. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß sowohl bei der methylierten offenkettigen (**15**) als auch der entsprechenden zyklischen Verbindung (**21**) eine derartige Zunahme nicht zu erkennen ist (siehe Abbildung 38).

#### 5.1.2.1.2.4.2 Der FOX 2-Test

Als weitere Methode zur Quantifizierung organischer Peroxide ist der FOX 2-Test (ferrous oxidation with xylenol orange) beschrieben. [497-501] Wie auch in den vorherigen Methoden nutzt man hierbei die Fähigkeit von Peroxiden zur gezielten Oxidation bestimmter Farbstoffe aus. Mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde die Linearität des gemessenen Effektes von der enthaltenen Peroxidmenge unter den gewählten Bedingungen abgesichert.

Der jeweilige Inhibitor ( $1,0 \times 10^{-4}$  M) wurde mit dem aktiven Enzym ( $1,0 \times 10^{-5}$  M) für verschiedene Zeitintervalle (ein bis zehn Minuten) bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Im Anschluß daran wurde ein Aliquot der Lösung zur Reagenzlösung gegeben und die Absorptionsänderung bei 560 nm aufgezeichnet. Dabei kam es zu den folgenden Ergebnissen (Abbildung 39). Sowohl bei den beiden Phenylhydrazonen (**9**) und (**10**) als auch bei dem offenkettigen Amidrazon (**3**) kam es innerhalb von 15 Minuten zu einer signifikanten Absorptionsänderung, was auf die Bildung intermediärer Peroxide oder zumindest starker Oxidationsmittel hinweist. Bei Verbindung (**10**) ist jedoch der Blindwert so hoch, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten mit und ohne Enzymzusatz besteht (siehe auch Abbildung 38).

Auch bei dem zyklischen Amidrazon (**8**) kann ein signifikanter Unterschied zwischen Blindwert und dem Wert nach Umsetzung der Verbindung durch die L-1 konstatiert werden. Als Negativproben wurden die methylierten Verbindungen (**15**) und (**21**) herangezogen, welche erwartungsgemäß keine Absorptionsänderung verursachten.



**Abbildung 39:** FOX-2-Test: Nachweis von enzymatisch generierten Oxidationsmitteln aus den angegebenen Inhibitoren, ohne Enzymzusatz = Kontrolle (rote Balken), mit Enzymzusatz (blaue Balken); E =  $1,0 \times 10^{-5}$  M, I =  $1,0 \times 10^{-4}$  M

#### 5.1.2.1.2.4.3 HPLC-Analytik

Nach der Charakterisierung und Isolierung einiger nichtenzymatischer Oxidationsprodukte der Verbindungen lag es nahe, nach enzymatischen Oxidationsprodukten mittels chromatographischer Methoden zu fahnden. Es wurde wie folgt verfahren. Die nahezu vollständige Umsetzung des jeweiligen Inhibitors ( $8,3 \times 10^{-5}$  M) durch das mit wenig Substrat ( $6,0 \times 10^{-6}$  M) aktivierte Enzym ( $6,0 \times 10^{-6}$  M) wurde polarographisch aufgezeichnet. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden im Anschluß sofort auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und zu Fraktionen von jeweils 10 ml vereinigt. Sodann wurde zweimal mit je 2 ml Lösungsmittel extrahiert. Die organische Phase wurde zur Trockne eingedampft und die Proben bis zur Analyse bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

Zunächst wurde dies am Beispiel des Phenylhydrazons (**9**) untersucht. Nach Lösung des Hydrazons (**9**) sowie des korrespondierenden  $\alpha$ -Azohydroperoxids (**9a**) in organischen Lösungsmitteln (DMF oder Methanol) konnten beide Verbindungen chromatographisch getrennt werden (Laufmittel Methanol/Wasser 85:15). Bei Verwendung von Tris-Puffer anstelle des organischen Lösungsmittels ließ sich hingegen kein  $\alpha$ -Azohydroperoxid mehr detektieren. Offenbar besitzt es für diese Art der Untersuchung nicht die notwendige Stabilität in wäßriger Lösung. Die Vermutung liegt nahe, daß die gesuchten Azohydroperoxide der Amidrazone die hierfür nötige Stabilität ebenfalls nicht besitzen.

Aus der Vielzahl der für die Verbindungen (**3**) und (**8**) chromatographisch nachweisbaren Reaktionsprodukte konnte im Zusammenhang mit den MS-Untersuchungen (siehe folgendes Kapitel) lediglich Formanilid nachgewiesen werden. Die Beobachtung, daß nach enzymatischer Umsetzung durch die L-1 keine definierte Substanz, sondern eine große Anzahl an Reaktions- bzw. Spaltprodukten entsteht, weist darauf hin, daß die wahrscheinlich vorhandenen, intermediären Zwischenverbindungen extrem instabil sein müssen.

#### 5.1.2.1.2.4.4 MS-Analytik

Eine recht sensitive und im Hinblick auf die labile Struktur der gesuchten Inhibitorperoxide verhältnismäßig schonende Analysemethode ist die Elektrosprayionisation-gekoppelte MS. Durch die sehr schonende Art der Ionisation sollte es hiermit möglich sein, auch wenig stabile Substanzen über den Molpeak nachzuweisen. Am Beispiel verschiedener Fettsäurehydroperoxide konnte dies belegt werden. [502] Dazu wurde wie im vorangegangenen Kapitel geschildert vorgegangen. Als Lösungsmittel kamen Hexan, Chloroform und Ethylacetat zur Anwendung. Zum Vergleich wurde ein Ansatz im wäßrigen Medium belassen sowie die DMF-Ausgangslösung mit untersucht. In Abhängigkeit vom jeweiligen Extraktionsmittel kam es zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigte das MS-Spektrum der  $\text{CHCl}_3$ -Phase lediglich einen 100 % - Peak bei  $m/z = 122,1$  sowie einen weiteren bei 104,1 (12 %) aber keinen Molpeak der Ausgangsverbindung (MG 322,4). Als Substanz mit einem Molgewicht von 122,1 wurde Formanilid (MG 121,14) vermutet, was durch nachfolgende HPLC- sowie GC-MS-Untersuchungen bestätigt werden konnte. In Hexan hingegen war außer dem Molpeak der Ausgangssubstanz (80 %) noch ein Peak bei  $m/z = 202,4$  (28 %) zu finden, der auf das zum Formanilid korrespondierende

Molekülbruchstück der Ausgangsverbindung hinweist, wobei Formanilid selbst hier nicht zu detektieren war. Aber auch in der Referenzlösung (DMF-Lösung der Ausgangsverbindung gleichen Alters) zeugten zusätzliche Peaks (238,3 (30 %), 202,4 (100 %), 119,2 (21 %)) von der relativen Instabilität der Verbindung (323,4 (82 %)) innerhalb des Untersuchungszeitraumes (ca. 3 Tage), da eine frische DMF-Lösung der gleichen Substanz (ca. 3 h) keine zusätzlichen Peaks im MS-Spektrum aufwies (323,4 (100 %)). Nach Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel waren neben dem Ausgangsstoff (323,4 (12 %)) noch Peaks bei  $m/z = 319,5$  (40 %), 202,3 (30 %) und 122,1 (8 %) zu finden. Die Vergleichsprobe ohne nachfolgenden Extraktionsschritt (in Puffer) ließ keinen Molpeak der Ausgangsverbindung mehr erkennen, sondern lediglich die bereits erwähnten Peaks bei 202,4 (18 %), 122,1 (100 %) und 104,1 (10 %). Weder das gesuchte Azohydroperoxid (**3a**) (MG 354,4) noch das nichtenzymatisch generierte Oxalsäurediamid (**3b**) ließen sich nachweisen, was einerseits darauf hinweist, daß im Falle einer Bildung der korrespondierenden Azohydroperoxide diese extrem instabil sein müssen, sowie daß andererseits die Umsetzung der Verbindung (**3**) im System Puffer/L-1 anders abläuft und nicht in der Bildung des Oxalsäurediamids (**3b**) resultiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden mittels Verbindung (**8**) erzielt. Über die LOX-katalysierte Umsetzung entstehen aus den Inhibitoren demnach andere Reaktionsprodukte als nach nichtenzymatischer Oxidation der Verbindungen.

#### 5.1.2.1.2.4.5 Die TMPD-Methode

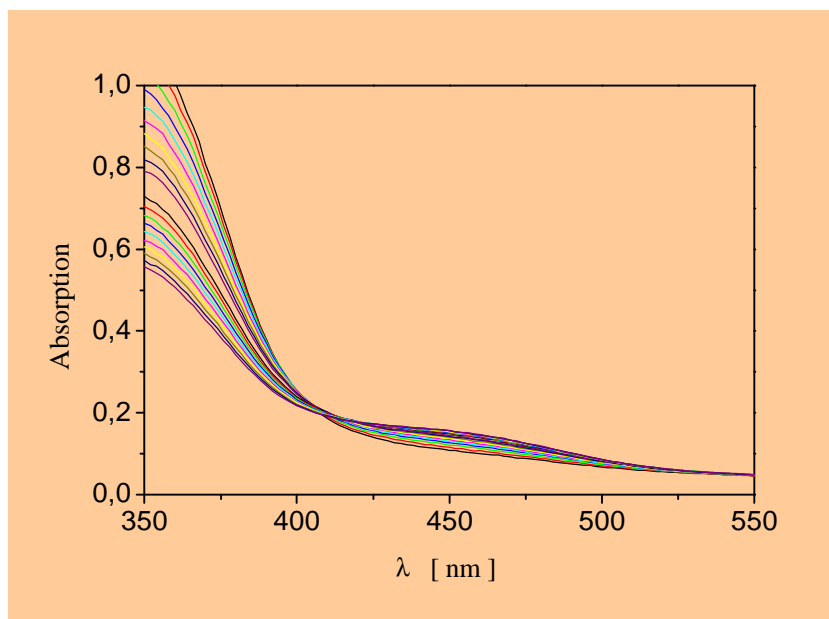
In Verbindung mit der dünnschichtchromatographischen Trennung der extrahierten enzymatischen Oxidationsprodukte der Inhibitoren sollte hiermit eine selektive Anfärbung starker Oxidationsmittel (Azohydroperoxide) möglich sein. Zum Vergleich wurde eine gealterte (5 Tage alte) methanolische Lösung der Inhibitoren aufgetragen. Hierbei konnte anhand des Laufverhaltens in Methanol als auch durch die charakteristische Anfärbung die nichtenzymatische Bildung von  $H_2O_2$  in Methanol nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen der CE-Analytik. Auch hiermit konnte  $H_2O_2$  in der gealterten methanolischen Lösung nachgewiesen werden.

Die Auftragung der extrahierten Phase nach enzymatischer Umsetzung der Verbindungen (**3**) und (**8**) ließ eine derartige  $H_2O_2$ -Bildung mittels TMPD nicht detektieren. Vermutlich verhinderte die große Reaktivität der Intermediate einen positiven Nachweis.

#### 5.1.2.1.2.4.6 UV/Vis-Spektroskopie

Eine chemische Modifikation der Verbindungen während der Interaktion mit dem Enzym sollte Veränderungen im Absorptionsverhalten im UV/Vis-Bereich nach sich ziehen. Der jeweilige Inhibitor wurde mit dem Enzym vorgelegt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Substrat oder 13-HPODE gestartet. Alternativ hierzu wurden auch E und S vorgelegt und anschließend der Inhibitor zugegeben, wobei durch die Reihenfolge der Zugabe jedoch kein Unterschied zu beobachten war.

Die Untersuchungen am Beispiel von Verbindung (3) ließen einerseits eine Abnahme der für die untersuchten Phenylhydrazone resp. Amidrazone charakteristischen Bande bei ca. 350 nm, andererseits aber damit verbunden auch die Entstehung einer nur sehr schwach ausgeprägten Bande im längerwelligen Bereich bei etwa 450 nm erkennen (Abbildung 40). Die Untersuchung der entsprechenden zyklischen Verbindung (30) zeigte ebenfalls die Entstehung einer diesmal deutlich ausgeprägten Bandenschulter bei etwa 420 nm. Mit



**Abbildung 40:** Entstehung einer neuen Bande geringer Intensität bei ca. 450 nm nach Umsetzung des offenkettigen Amidrazons durch das Enzym, UV/Vis-Spektren von Verbindung (3) in Gegenwart der aktiven L-1, Spektren im Abstand von 30 s, Abnahme der Bande bei 350 nm, Zunahme der Absorption bei 450 nm;  $E = 2,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $S = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $I = 3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

der enzymatischen Umsetzung der Verbindung (30) war eine charakteristische Rot-Verfärbung der Lösung verbunden, was auch bei einigen anderen Substanzen wie z.B. (8), (9), (23) und (28) der Fall war. Der Versuch der anschließenden Flüssigphasen-Extraktion dieser Oxidationsprodukte schlug jedoch fehl. Weder über HPLC- noch über MS-Analyseverfahren konnten die Reaktionsprodukte eindeutig identifiziert werden (siehe vorangegangene Kapitel). Auf die Abnahme der charakteristischen Bande zwischen 300 und 400 nm wird noch einmal im Kapitel 5.3 eingegangen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz umfangreicher Untersuchungen eine eindeutige Identifizierung enzymatischer Oxidationsprodukte der Amidrazone in aller Regel fehlschlug. Lediglich das Spaltprodukt Formanilid konnte im Falle der Verbindungen (3) und (8) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche deuten auf die Existenz intermediärer starker Oxidationsmittel hin. Ob es sich hierbei um die postulierten  $\alpha$ -Azohydroperoxide vom Typ (3a) bzw. (9a) handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die ebenfalls positiven Ergebnisse der „Peroxidnachweise“ im Falle einiger zyklischen Amidrazon-Verbindungen im Zusammenhang mit der nachgewiesenen 1:2-Stöchiometrie des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs bei der enzymatischen Umsetzung schließen die Bildung entsprechender Peroxide hierfür aus.

### 5.1.2.2 Zusammenfassung der Substrateigenschaften

Es wurde versucht, die Amidrazone separat von ihren Inhibitoreigenschaften als Substrate der LOX zu betrachten. Da jedoch die Bindung des Inhibitors (und möglicherweise auch in gewissem Maß dessen Oxidation) wiederum einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms ausübt, sind hierbei Überschneidungen unvermeidlich, so daß eine exakte Quantifizierung der entsprechenden Konstanten mitunter recht problematisch ist. Prinzipiell kann diese Umsetzung von allen vier möglichen gebildeten Komplexen, EI, EI\*, ESI, ESI\* heraus erfolgen (siehe Schema 5) – mit jeweils zum Teil unterschiedlichen Reaktionskonstanten. Für eine Reihe von Verbindungen wurden diese Konstanten ermittelt. Im Gegensatz zu  $k_{\text{obs1}}$  ist der Wert für  $k_{\text{ox2}}$  hingegen nicht so ohne weiteres zugänglich, da durch die gleichzeitige Zugabe von Substrat stets dessen Oxidation in den Vordergrund gerückt wird. Unter der Annahme, daß Ölsäure einen ESI\*-Komplex hinreichend imitieren kann, wurde versucht, die entsprechende Reaktionskonstante auf diesem Wege indirekt zu quantifizieren. Dabei konnte beobachtet werden, daß der Zusatz von OA, ganz im Gegensatz zur Inhibition, keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Inhibitorumsetzung hat. Lediglich das Ausmaß der Inhibitorumsetzung wird durch die OA-Gegenwart geringfügig, jedoch nicht signifikant positiv beeinflusst. Vereinfachend läßt sich hiermit sagen, daß zwischen diesen beiden Umsetzungskonstanten nicht differenziert werden muß. Somit ist  $k_{\text{ox1}} = k_{\text{ox2}}$ .

Da jedoch die jeweiligen Isomerisierungskonstanten ( $k_7$ ,  $k_5$ ) größer als  $k_{\text{ox1/2}}$  sind, ist dieser Wert sicherlich stark fehlerbehaftet. Für den EI-Komplex bedeutet dies, daß dieser Komplex etwa um den Faktor 4 schneller zum korrespondierenden EI\*-Komplex isomerisiert, als daß I in diesem Komplex durch das Enzym oxidiert wird. Da aber naturgemäß diesbezüglich keine genaueren Angaben möglich sind, sind die resultierenden Daten für  $k_{\text{ox1}}$  nur als Schätzwerte anzusehen.

Ähnlich gelagert ist der Sachverhalt in der Situation ohne vorherige E-I-Inkubation. Hier ist der Isomerisierungsschritt vom E(S)I- zum ESI\*-Komplex sogar etwa um den Faktor 14 schneller, als die Umsetzung des Inhibitors, wodurch der für die Oxidationskonstante ermittelte Wert  $k_{\text{ox1}} = k_{\text{ox2}}$  dem für  $k_{\text{ox3}}$  sehr nahe kommt, was auch durch den fehlenden Einfluß von Ölsäure auf diese Konstante bestätigt wird. Die Ermittlung der Oxidationsgeschwindigkeit nach Präinkubation des Inhibitors mit dem inaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Enzym und anschließender Initiierung der Umsetzung durch die überäquimolare Zugabe von 13-HPODE zur Aktivierung des Enzyms ergab nur eine unwesentlich, gleichwohl signifikant gesteigerte Geschwindigkeit der Inhibitorumsetzung  $k_{\text{ox4}}$ . Die Tatsache, daß trotz schnellerer Komplexisomerisierung ( $k_5$  bzw.  $k_7$ ) die Geschwindigkeiten der Inhibitoroxidation ohne bzw. nach E-I-Präinkubation signifikant voneinander abweichen, zeigt auf, daß die Umsetzung des Inhibitors (**3**) aus dem E(S)I-Komplex in Wirklichkeit noch sehr viel langsamer abläuft. Hauptsächlich findet die Inhibitoroxidation also aus dem EI\*- bzw. ESI\*-Komplex heraus statt und wird vornehmlich durch  $k_{\text{ox4}}$  bestimmt. Im Zusammenhang mit der partiellen Hemmung läßt sich demnach die Existenz von zwei katalytischen Bindungsstellen postulieren. Dies erscheint gerade aus proteinchemischer Sicht sehr interessant, da über die Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum sowie über die Anzahl der Substratbindungsstellen derzeit noch immer große Unklarheiten bestehen und die Diskussionen hierüber kontrovers geführt werden.



Die Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs pro Inhibitormolekül ergab im Falle der offenkettigen Verbindung **(3)** erwartungsgemäß eine 1:1-Stöchiometrie. Legt man eine Inhibitorumsetzung nach Schema 2 zugrunde, so läßt dies in Analogie zu den Phenylhydrazonen **(1)** und **(9)** die Entstehung enzymatisch generierter  $\alpha$ -Azohydroperoxide vermuten. Analoge Untersuchungen für die zyklischen Verbindungen **(8)** und **(23)** ergaben jedoch lediglich eine 2:1-Stöchiometrie des  $O_2$ -Verbrauchs, das heißt pro enzymatischer Umsetzung eines Inhibitormoleküls werden rein rechnerisch nur 0,5 Moleküle Sauerstoff verbraucht (Abbildung 34). Die enzymatische Bildung der korrespondierenden  $\alpha$ -Azohydroperoxide ist damit per se auszuschließen. Die über den  $O_2$ -Verbrauch ermittelten Werte der Geschwindigkeitskonstanten der Inhibitorumsetzung wurden im Falle der zyklischen Verbindungen über Fluoreszenzmessungen überprüft und zeigten eine exzellente Übereinstimmung.

Da Lipoxygenasen nicht nur die Dioxygenierung von Fettsäuren katalysieren, sondern an einer Vielzahl weiterer Reaktionen beteiligt sind (siehe Kapitel 3.1.4), wurde überprüft, inwieweit die untersuchten Amidrazone in derartige Reaktionen involviert sind. Von besonderer Bedeutung ist die Cooxidase-Reaktion der LOX. Hierbei wird 13-HPODE vom Enzym als Elektronendonator zur Oxidation einer weiteren Verbindung genutzt. Für die bekannte Amidrazon-Verbindung BW 755c **(2)** wurde die LOX-katalysierte Umsetzung über eine Cooxidase-Reaktion berichtet.

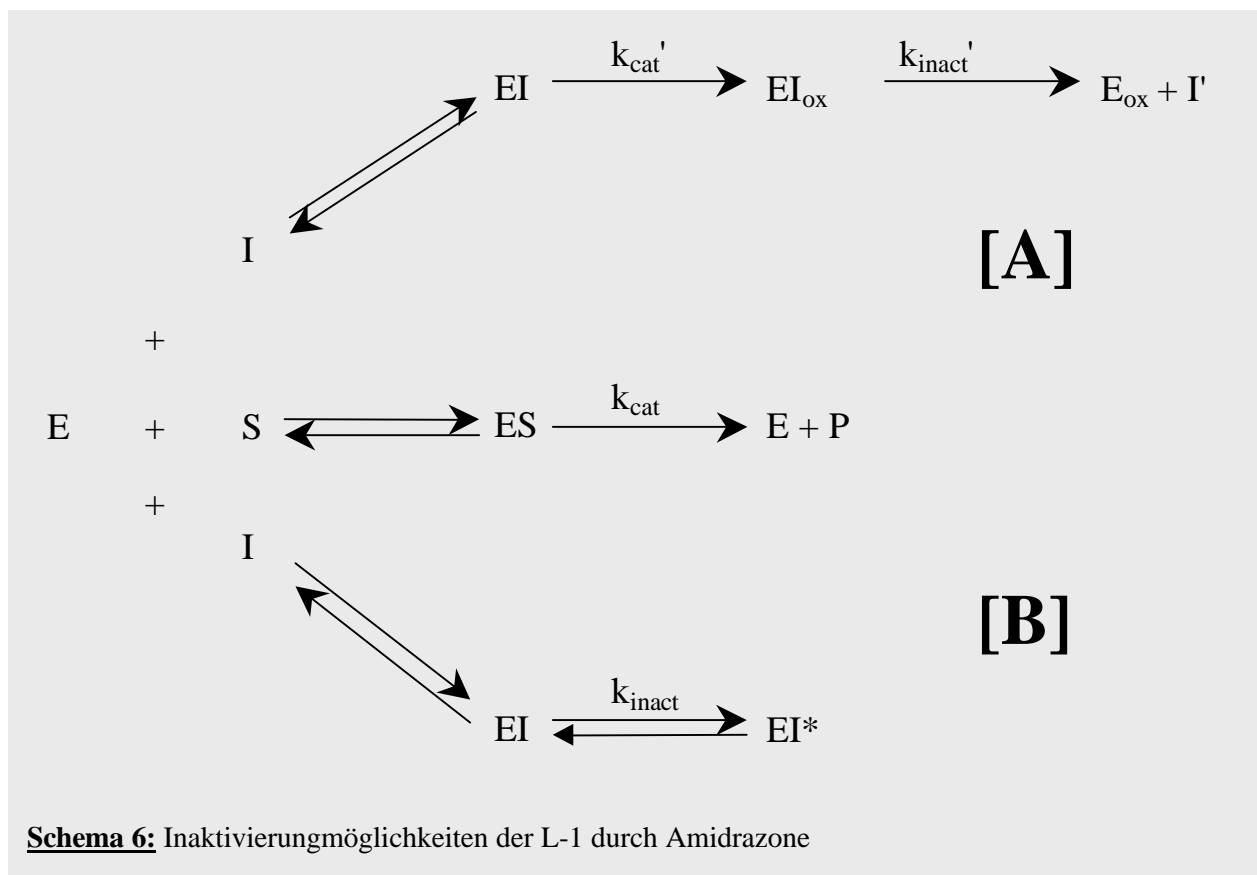
Die Beobachtung, daß im Falle der Verbindungen **(3)** und **(23)** steigende 13-HPODE-Konzentrationen im Meßmedium das Ausmaß der Inhibitoroxidation erhöhen (Abbildung 36), ließ einen derartigen Zusammenhang zunächst vermuten. Tiefergehende Untersuchungen zeigten jedoch, daß das 13-HPODE hierbei nicht verbraucht wird (Abbildung 37). Auch fördert  $H_2O_2$ , was separat untersucht wurde, im Gegensatz zu 13-HPODE die Inhibitorumsetzung nicht. Im Falle der oxidablen Verbindungen **(3)** und **(23)** konnte die Beteiligung an einer derartigen Reaktion also nicht nachgewiesen werden.

Im Verlauf der LOX-katalysierten Umsetzung der Verbindungen konnte die intermediäre Existenz starker Oxidationsmittel nachgewiesen werden (Abbildungen 38 und 39). Ob es sich hierbei um die postulierten Azohydroperoxide vom Typ **(3a)** handelt, kann nicht mit Sicherheit behauptet werden. Dessen ungeachtet konnten auch für die enzymatische Umsetzung der zyklischen Verbindungen **(8)** und **(23)** starke intermediäre Oxidationsmittel nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit der nachgewiesenen 2:1-Stöchiometrie des  $O_2$ -Verbrauchs ist hierbei die Entstehung der korrespondierenden Peroxide auszuschließen (siehe oben). Anstelle der postulierten Peroxide ist gleichfalls die Bildung mehr oder weniger stabiler Radikale denkbar, welche durch die verwendeten Untersuchungsmethoden ebenfalls vermutlich mit erfaßt würden. Wie eingangs erwähnt (siehe Kapitel 3.3), wurden die untersuchten Substanzen gezielt nach dem Prinzip der capto-dativen Substitution synthetisiert. Intention eines derartigen Substitutionsmusters ist die Bildung stabiler Radikale. Die nichtenzymatische Bildung stabiler Radikale solcher Verbindungen wurde bereits mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen. [503,504] Die Existenz stabiler 1,2,4-Triazolinylnyl-Radikale ist in der Literatur ebenfalls beschrieben worden. [505]

Obwohl eine Reihe von Fakten, wie z.B. die Abhängigkeit der Inhibition vom  $O_2$ -Gehalt des E-I-Präinkubationsmediums (Abbildungen 2 und 3) oder die inhärente Substrateigenschaft einer Anzahl von Verbindungen auch einen Suizidmechanismus nach Schema 2 unterstützen würde, konnte festgestellt

werden, daß zwischen Inhibitoroxidation und Inhibition des Enzyms kein kausaler Zusammenhang besteht. Lediglich im Falle der offenkettigen Verbindungen wird hiervon möglicherweise die Reversibilität der Inhibition beeinflusst.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Fakten läßt sich für Amidrazon-Verbindungen der folgende allgemeine Mechanismus der Interaktion mit der Lipoxygenase postulieren (Schema 6). Grundsätzlich agieren die untersuchten Amidrazone über einen langsamen und hochaffinen 2-Schritt-Mechanismus mit der LOX (Weg B). Diese Interaktion ist reversibel. Für Verbindungen, welche von der LOX sehr schnell (bzw. überhaupt) umgesetzt werden, existiert daneben noch die weitere Möglichkeit der Interaktion als Substrat des Enzyms, in deren Folge die Bildung hochreaktiver Intermediate nicht auszuschließen ist, bzw. was vielmehr eindeutig nachzuweisen war. Inwieweit diese Intermediate tatsächlich zu einer Hemmung des Enzyms beitragen, kann nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden. Grundsätzlich ist hierbei aber zwischen den zyklischen und offenkettigen Derivaten zu differenzieren. Im Falle des offenkettigen Amidrazons (**3**) ist eine irreversible Inaktivierung nach Umsetzung der Verbindung zu verzeichnen. Für die untersuchten Triazoline konnte trotz Inhibitoroxidation eine reversible Interaktion beobachtet werden. Das Verhältnis der beiden Konstanten ( $k_{\text{inact}}/k_{\text{cat}}$ ) bei den einzelnen Verbindungen entscheidet letztlich über das Ausmaß des jeweiligen Reaktionsweges.



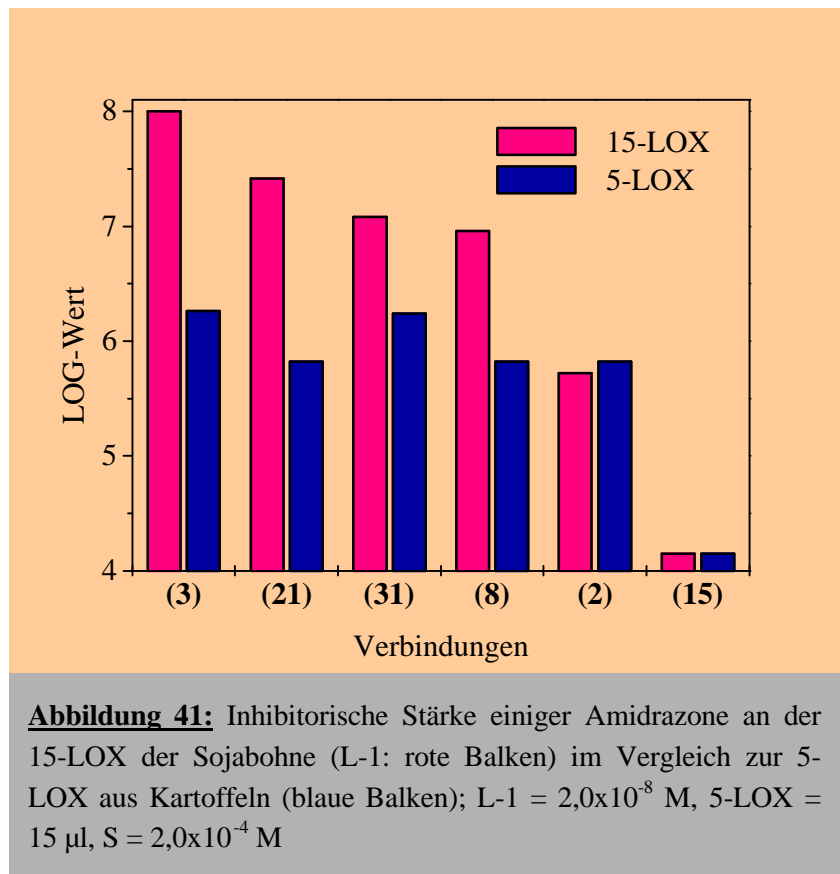
## 5.2 Untersuchungen an der 5-LOX

Aufgrund der besonderen Bedeutung speziell der 5-LOX in der Pathogenese zahlreicher Krankheitsbilder (siehe Einleitung) soll im folgenden der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei den untersuchten Substanzen um selektive Inhibitoren der 15-LOX (insbesondere der pflanzlichen L-1) handelt, oder ob hier eine Verallgemeinerung in bezug auch auf andere Lipoxygenasen getroffen werden kann.

Der zugrunde liegende Gedanke bei der Wahl eines stabilen, pflanzlichen Enzyms in einem Screeningsystem nach neuen Wirkstoffen an humanen Enzymspezies ist die Annahme, daß die derart gewonnenen Erkenntnisse zumindest qualitativ auf die sehr ähnlichen Enzyme humanen Ursprungs extrapoliert werden können. Eine Reihe von vergleichenden Studien mit einer Vielzahl von Inhibitoren unterstützen diese Annahme. Potente Inhibitoren an der pflanzlichen L-1 erwiesen sich in aller Regel auch als potente Hemmer der humanen LOX-Isoenzyme. [233,286,506,507] Doch gerade hierbei sind oft auch Ausnahmen möglich, weshalb die im folgenden beschriebenen Untersuchungen vorgenommen wurden.

Aus Kostengründen wurde sich auf eine eng begrenzte Auswahl strukturell sowie bezüglich der inhibitorischen Stärke an der L-1 möglichst unterschiedlicher Inhibitoren beschränkt. Aus eben diesen Gründen wurde deren Interaktion lediglich mit einer pflanzlichen 5-LOX näher charakterisiert. Die humanen Isoenzyme sind zudem, falls überhaupt erhältlich, äußerst instabil (im Extremfall nur wenige Stunden haltbar). In der folgenden Abbildung 41 sind die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu den Werten an der L-1 dargestellt.

Bei den beiden offenkettigen Verbindungen (3) und (31) konnte eine recht potente Inhibition der 5-LOX-Aktivität schon im oberen nanomolaren Konzentrationsbereich beobachtet werden. Die beiden zyklischen Verbindungen (21) und (8) wiesen, offenbar unabhängig von einer  $N^3$ -Substitution, eine etwas geringere inhibitorische Potenz mit jeweils vergleichbaren  $IC_{50}$ -Werten auf. Bemerkenswerterweise erwies sich die  $N^1$ -methylierte Verbindung, wenngleich auch in einem wesentlich



geringeren Ausmaß, ebenso als inhibitorisch aktiv. Zum Vergleich wurde der bekannte Lipoxygenase-Inhibitor BW 755c (**2**) mit untersucht, welcher ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich seine Wirkung entfaltet.

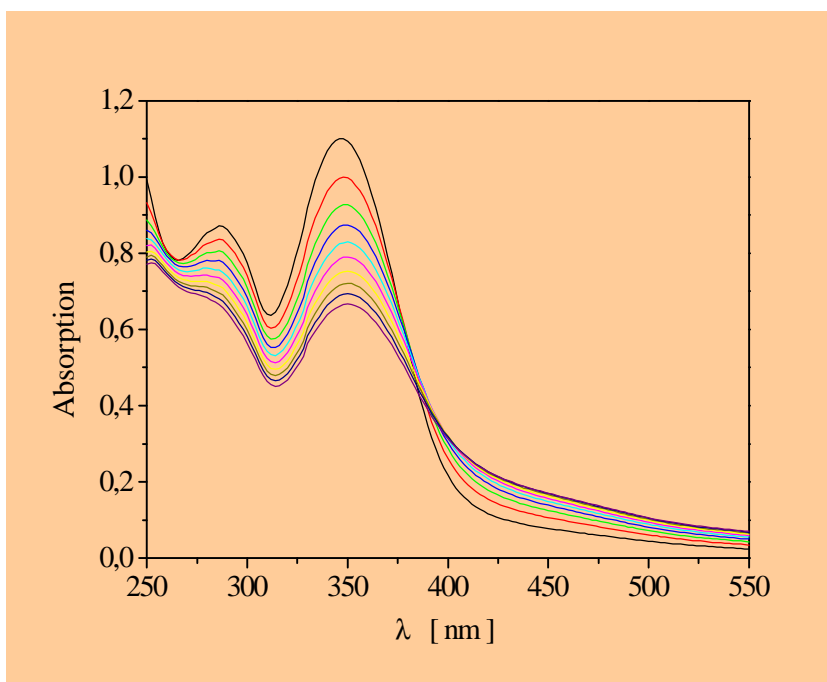
Auch hier wurden durchweg biphasische Produktbildungskurven erhalten, ähnlich den im Kapitel 5.1.1.9 beschriebenen Kurven. Für Verbindung (**3**) wurde zudem die Inaktivierungsgeschwindigkeit der 5-LOX ohne vorherige E-I-Inkubation ermittelt. Mit einem Wert für  $k_{\text{inact}}$  von  $6,9 \pm 1,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ist dieser Wert dem an der L-1 kalkulierten Wert ( $0,11 \pm 0,006$ ) ebenfalls vergleichbar, was einen ähnlichen Inaktivierungsmechanismus beider Enzyme nahelegt.

Abschließend läßt sich sagen, daß die untersuchten Verbindungen nicht nur sehr potente Hemmer von pflanzlichen Lipoxygenasen (15-LOX der Sojabohne, 5-LOX der Kartoffel) darstellen, sondern ebenfalls Inhibitoren der humanen Leukozyten-5-LOX sowie der Cyclooxygenase sind. [385,392]

### 5.3 Allgemeine Stabilität der Verbindungen

Es ist bekannt, daß die Hydrazonstruktur im untersuchten Substanztyp (z.B. (**3**)) in der Regel für ein charakteristisches Absorptionsverhalten im Bereich von 300-400 nm verantwortlich ist. Ausnahmen hiervon sind N<sup>1</sup>-substituierte Verbindungen wie z.B. (**15**). Des weiteren wird in der Literatur beschrieben, daß Verbindungen mit einer derartigen offenkettigen Hydrazonstruktur relativ leicht sowohl oxidativ als auch hydrolytisch unter bestimmten Bedingungen angegriffen werden können. [470,514] Da die enzymatischen Experimente in der Regel im alkalischen (pH 8,5) bzw. an der 5-LOX im schwach sauren Medium (pH 6,3) vorgenommen wurden, war abzusichern, daß die examinierten Inhibitoren hierin über den untersuchten Zeitraum ausreichend stabil sind. Vor allem auch im Hinblick auf den Mechanismus der Inaktivierung des Enzyms (siehe Kapitel 5.1.2.1.2.2.2) galt es, das allgemeine Verhalten der Verbindungen in den entsprechenden Lösungsmedien genauer zu untersuchen.

Chemische Veränderungen jedweder Art im interessanten Bereich der Hydrazonstruktur sollten sich in einer Änderung des Absorptionsverhaltens in diesem Wellenlängenbereich widerspiegeln. Um die Konstanz der äußeren Bedingungen zu den bisherigen Untersuchungen zu gewährleisten, wurde bei 37 °C



**Abbildung 42:** Aufnahme der UV/Vis-Spektren von Verbindung (**3**) in Tris-Puffer (pH 8,5) im Abstand von 60 s;  $I = 3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$

gearbeitet. Wiederum wurde exemplarisch Verbindung (**3**) gewählt. Die Substanz wurde wie üblich in DMF gelöst und nach Zugabe ins Puffermedium (pH 8,5) sofort im Bereich von 250-700 nm vermessen. Es zeigte sich, daß unmittelbar nach Einbringen der Verbindung ins alkalische Puffermilieu die zeitabhängige Abnahme der charakteristischen Absorptionsbande bei 350 nm erfolgte, was möglicherweise auf Veränderungen im Bereich der Hydrazonstruktur hinweist (Abbildung 42). Über eine Kalibriergerade wurde versucht, die entsprechende „Zerfallskonstante“ zu berechnen, wobei primär von einem Prozeß erster Ordnung ausgegangen wurde. Es zeigte sich jedoch sogleich, daß dies allenfalls auf den Bereich innerhalb der ersten 200 Sekunden zutrifft. Im Anschluß an diesen relativ schnellen Abschnitt läßt sich der Verlauf nicht mehr durch eine simple Reaktion erster Ordnung beschreiben, sondern geht vermutlich in einen Prozeß höherer Ordnung über. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen zwei distinkten (isomeren?) Formen. Für Verbindung (**3**) ergibt sich für den relevanten Bereich der ersten 200 Sekunden eine „Zerfallskonstante“ erster Ordnung ( $k_{\text{Zerf}}$ ) von  $1,53 \pm 1,13 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Das entspricht somit einer theoretischen Halbwertszeit von etwa 400 s bzw. etwa sieben Minuten. De facto sind jedoch aufgrund des erheblichen Abweichens von der Kinetik erster Ordnung nach zehn Minuten noch  $53,03 \pm 3,99 \%$  der Ausgangsintensität vorhanden. Da der zugrunde liegende molekulare Vorgang dieser Veränderungen zunächst noch im Dunkeln lag, wurde überprüft, inwieweit das Reaktionsmedium hierauf einen Einfluß hat. Es konnte beobachtet werden, daß ein sehr ähnliches Verhalten sowohl in reinem Wasser als auch in schwach saurem Phosphatpuffer (pH 6,3) auftrat, wobei augenscheinlich diese Vorgänge mit zunehmender Azidifizierung des Milieus schneller ablaufen. Im Falle des Phosphatpuffers wurde weiterhin klar erkennbar, daß dieser Vorgang nicht zum völligen Verschwinden der 350 nm-Bande führt, sondern konzentrationsabhängig in ein Plateau übergeht. Dies spricht für eine Gleichgewichtseinstellung zwischen der Ausgangsverbindung und einer weiteren Form.

Maßgeblich für die Stabilitätsuntersuchungen war jedoch die Befähigung der Substanzen zur Enzyminaktivierung. Aus diesem Grunde wurde als Vergleich das folgende Experiment unternommen: Vor der eigentlichen dreiminütigen E-I-Präinkubation wurde der Inhibitor separat im Puffermedium für verschiedene Zeitintervalle vorinkubiert. Anschließend wurde dessen verbleibende inhibitorische Aktivität analysiert. Wie in der folgenden Abbildung 43 eindeutig zu beobachten ist, tritt mit zunehmender Vorinkubationszeit des Inhibitors (**3**) (ohne Enzym) eine gering ausgeprägte Abnahme der inhibitorischen Potenz auf. Vergleicht man allerdings diesen schwachen Aktivitätsverlust mit dem spektroskopischen Verhalten, so tritt unverkennbar die Diskrepanz zur Abnahme der „Hydrazon-Bande“ sowohl in bezug auf die Geschwindigkeit als auch auf den Kurvenverlauf hervor.

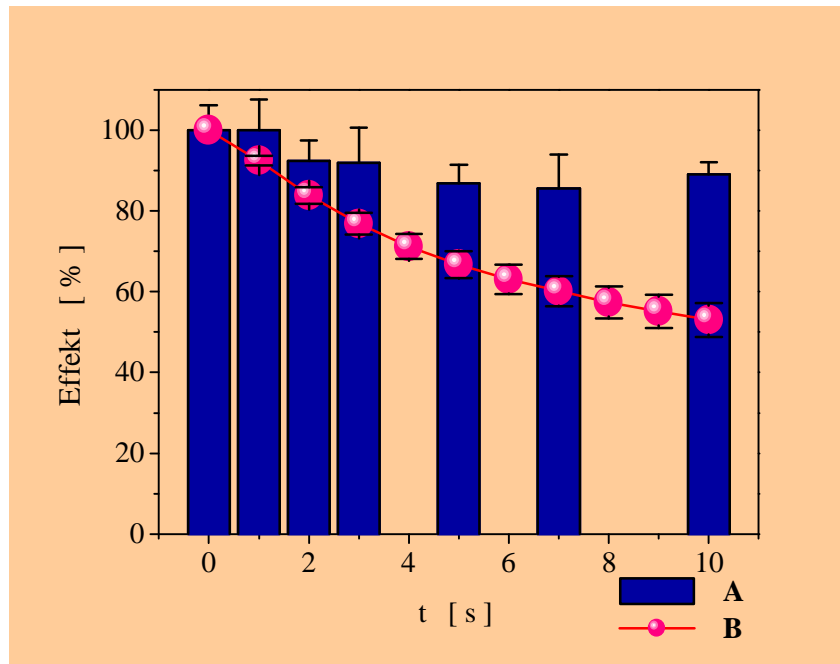
Aufgrund des nichtlinearen Zusammenhanges zwischen InhibitorKonzentration und der damit verbundenen Hemmung [133] wurden beide Vorgänge noch einmal genau auf eine diesbezügliche Korrelation hin geprüft. Aus der Absorption der Verbindung bei 350 nm wurde zu definierten Zeitpunkten die verbleibende Konzentration an Inhibitor ermittelt. Über eine separat aufgenommene  $IC_{50}$ -Kurve wurde die zu erwartende inhibitorische Potenz der jeweiligen verbleibenden Konzentrationen bestimmt. Aus der gemeinsamen Auftragung der zu erwartenden (rot) sowie der gemessenen (blau)

Aktivität der Verbindung in der unten gezeigten Abbildung 44 geht wiederum die deutliche Diskrepanz zwischen den beiden Vorgängen hervor. Die scheinbare Abnahme der Inhibitor-Konzentration korreliert nicht mit der Abnahme der Hemmung des Enzyms. Folglich ist auch die Veränderungen im Spektrum verursachende Prozeß nicht identisch mit dem den Aktivitätsverlust herbeiführenden Prozeß.

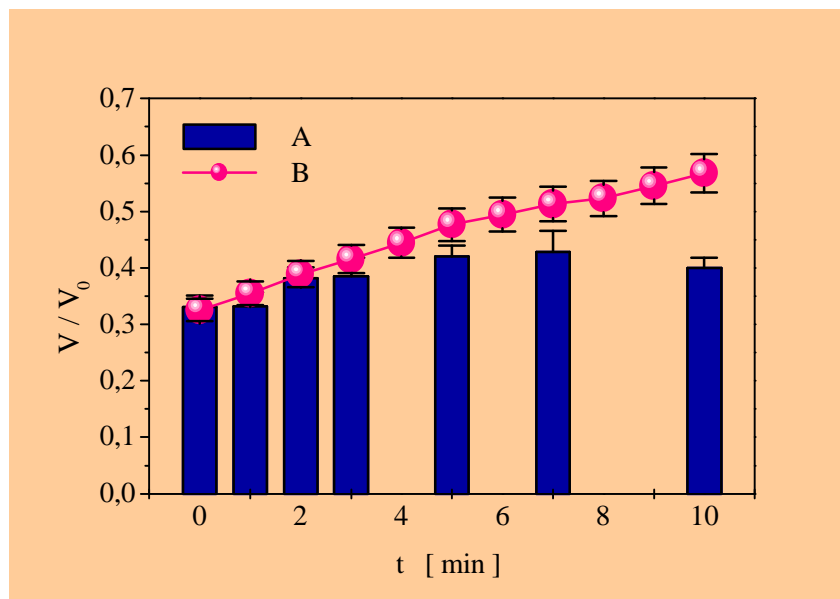
Der eben beschriebene Vorgang wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Im Chromatogramm konnten keine zusätzlichen Banden detektiert

werden. In einem weiteren Versuch wurde die DMF-Lösung in reines H<sub>2</sub>O gegeben und nach zehn Minuten mit Hexan eine Flüssigphasenextraktion durchgeführt. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde entfernt und der Rückstand einer MS-Analyse unterzogen. Zusätzliche Molpeaks konnten nicht gefunden werden, was darauf hinweist, daß die Substanz sich nicht zersetzt hat. Es kann also lediglich eine Art Isomerisierungsprozeß stattgefunden haben.

Da Verbindung (3) aus diversen Vorversuchen als extrem lipophile Verbindung bekannt war, sollte überprüft werden, ob nicht auch Präzipitationserscheinungen im wäßrigen Milieu für dieses spektroskopische Verhalten in Betracht gezogen werden müssen. Anhand der



**Abbildung 43:** relative Abnahme der inhibitorischen Potenz der Verbindung (3) mit zunehmender Vorinkubation in Tris-Puffer (blau, A) im Vergleich zur spektroskopisch zu erwartenden Konzentrationsabnahme der Verbindung (rot, B); blaue Balken:  $E = 2,0 \times 10^{-8}$  M,  $S = 2,0 \times 10^{-4}$  M,  $I = 2,5 \times 10^{-8}$  M, rote Kugeln:  $I = 5,0 \times 10^{-6}$  bis  $2,0 \times 10^{-5}$  M



**Abbildung 44:** direkter Vergleich der spektroskopisch zu erwartenden Hemmung (B) der Verbindung (3) mit der tatsächlich erzielten inhibitorischen Wirkung (A), Konzentrationen wie in Abbildung 43

hydrophileren Verbindungen (**26**) und (**39**) konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich hierbei um ein generelles Phänomen handelt. Auch spricht die oben beschriebene konzentrationsabhängige Plateaueinstellung gegen die Präzipitation der Verbindung als Ursache des Phänomens.

Aufgrund der gefundenen cis/trans-Isomerie (siehe Kapitel 5.1.1.3) lag es nahe zu vermuten, daß die Veränderungen im UV/Vis-Spektrum ihre molekularen Ursachen hierin haben. Hierfür spricht auch die obige Beobachtung, daß die Geschwindigkeit der Absorptionsabnahme mit sinkendem pH-Wert zunimmt. Die säurekatalysierte (aber auch basen- sowie unkatalysierte) cis/trans-Isomerisierung von Amidrazonen wurde in der Literatur bereits beschrieben. [508] Daraufhin wurde geprüft, ob sich diese Veränderungen auch in anderen Lösungsmitteln bzw. Gemischen mit Wasser abspielen. Es zeigte sich, daß H<sub>2</sub>O zumindest zu einem bestimmten Mengenanteil (> 5 %) enthalten sein muß, um derartige spektroskopische Veränderungen auszulösen.

Im folgenden wurden von der cis-Verbindung (**3**) die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren in unterschiedlichen Gemischen von D<sub>2</sub>O und DMSO-d<sub>6</sub> aufgezeichnet. Reines D<sub>2</sub>O konnte aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Verbindung nicht als Lösungsmittel verwendet werden. Verglichen mit den Spektren des cis- bzw. trans-Isomers in reinem DMSO-d<sub>6</sub> wiesen die Spektren im Gemisch mit variablem D<sub>2</sub>O-Anteil keinerlei Besonderheiten oder zusätzliche Signale auf. Auffällig war lediglich, daß mit steigendem Wasseranteil im Lösungsmittel der prozentuale Anteil des trans-Isomers zunahm. In reinem DMSO-d<sub>6</sub> betrug der Anteil des trans-Isomers etwa 5 %. Liegt der Wasseranteil im Lösungsmittel dagegen bei 35 %, so ist auch der Anteil des trans-Isomers entsprechend höher (37 %). Allerdings ist hierbei auch der Zeitfaktor von ausschlaggebender Bedeutung. So wurde auch schon die cis/trans-Isomerisierung von Amidrazonen nach 24 Stunden in reinem DMSO-d<sub>6</sub> unter Ausbildung eines Gleichgewichtes beobachtet. [392]

Insgesamt weisen die obigen Resultate auf die Einstellung eines neuen Gleichgewichtes zwischen cis- und trans-Form im wäßrigen Medium hin. Ob sie jedoch auch die Ursache für die Abnahme der Absorptionsintensität sind, sollte im folgenden näher untersucht werden.

Hierzu wurde zunächst die Stabilität von Verbindung (**3**), welche separat in der cis- als auch in der trans-Form vorlag, in absolutem Ethanol beobachtet. Es konnte hier innerhalb von zehn Minuten keine Abnahme der Bande bei 350 nm registriert werden. Auffällig für die trans-Verbindung war hingegen die Verschiebung des längstwelligen Maximums von 340 nm auf 354 nm sowie eine Verbreiterung der Bandenschenkel, was rein visuell durch die Farbvertiefung von blaßgelb nach intensiv gelb nachzuvollziehen war. Die Intensität der Banden war im Falle des cis-Isomers geringfügig erhöht. Tendenziell steht dies in Übereinstimmung zur vermuteten Gleichgewichtseinstellung zwischen cis- und trans-Isomer. Gestützt wird diese Annahme durch die Berechnung der UV/Vis-Spektren [509] der Verbindung (**3**) nach Geometrieoptimierung des cis-Isomers mittels PM3-Verfahren. [510-512] In apolarer Umgebung existieren von Verbindung (**3**) mehr als 100 energetisch begünstigte Konformationen, das heißt, lokale Energieminima dieser Molekülstruktur (siehe Anhang). Von den 15 energetisch günstigsten Konformeren wurde das UV/Vis-Spektrum berechnet. Die Lage der berechneten Absorptionsbanden für ein Konformer (348 und 273 nm) sowie deren relative Intensität stimmten dabei gut mit dem beobachteten Spektrum in Hexan, (Banden bei 345 und 275 nm) überein.

Die Berechnungen in wäßriger Umgebung [513] ergaben eine Verschiebung des längstwelligen Maximums von 348 nm auf etwa 320 nm bei gleichzeitiger geringfügiger Abschwächung der Intensität der Bande. Die spektroskopische Betrachtung in polaren Lösungsmitteln (z.B. Methanol) zeigte jedoch im Vergleich zu obigen Untersuchungen nahezu identische Spektren, so daß eine erhöhte Polarität des Lösungsmittels allein nicht für die beschriebene Abnahme der Intensität bei 350 nm im wäßrigen Medium verantwortlich gemacht werden kann.

Der zweite Ausgangspunkt der Untersuchungen dieses Kapitels war die moderate Abnahme der inhibitorischen Potenz der Verbindung (**3**) mit zunehmender Verweildauer im wäßrigen Medium. Da der Verlauf dieser Abnahme nicht mit dem Verlauf der Abnahme der Absorption bei 350 nm korreliert (siehe Abbildungen 43 und 44), sind für beide Prozesse vermutlich unterschiedliche Ursachen auf molekularer Ebene zu suchen. Darüber hinaus erklärt die Isomerisierung zur trans-Form nicht den beobachteten Aktivitätsverlust. So wurde demgegenüber schon im Kapitel 5.1.1.3 festgestellt, daß das trans-Isomer eine geringfügig stärkere Inhibition der L-1 hervorruft. Aufgrund der eintretenden Isomerisierung ist die gemessene Hemmaktivität für das cis-Isomer vermutlich sogar von diesem Schritt überlagert. Die Tatsache, daß trotzdem eine Differenz diesbezüglich meßbar ist, illustriert, daß einerseits dieser Isomerisierungsschritt langsam genug oder aber zumindest unvollständig erfolgt sowie daß andererseits der Unterschied in der Hemmung durch das cis- bzw. trans-Isomer möglicherweise noch stärker ausgeprägt ist.

Ergänzend zu den bisherigen Versuchen wurden die Untersuchungen auf die zyklischen Verbindungen ausgedehnt. Da hier eine cis/trans-Isomerie aufgrund der Zyklisierung nicht mehr möglich ist, sollte sich gut feststellen lassen, inwieweit die oben beschriebenen Effekte auf die Einstellung eines neuen Isomerengleichgewichtes zurückzuführen sind. Anhand von Verbindung (**8**) konnte innerhalb von zehn Minuten nur eine marginale aber nicht signifikante Abnahme der inhibitorischen Potenz beobachtet werden. Auch das Verhalten im UV/Vis-Spektrum zeichnete sich nur durch geringfügige Veränderungen aus. Bezogen auf die Intensität der Absorption bei 350 nm waren hier nach zehn Minuten in Tris-Puffer noch  $96,77 \pm 1,27$  % bzw. in Phosphatpuffer noch  $95,46 \pm 3,00$  % der Ausgangsverbindung vorhanden. Die Fixierung der Verbindung in der zyklischen (cis) Form verhindert offenbar größtenteils (wenngleich auch nicht gänzlich) den Prozeß, der die Abnahme der Absorptionsbande bei 350 nm bedingt. Um nun als nächstes zu überprüfen, ob die unsubstituierte N<sup>1</sup>- bzw. N<sup>3</sup>-Position einen Einfluß auf dieses Geschehen hat, wurden die entsprechend substituierten Verbindungen auf deren Beständigkeit im UV/Vis-Spektrum getestet. Sowohl Verbindung (**15**) (bei 253 nm) als auch (**21**) (bei 350 nm) zeigten keine Abnahme der Intensität der jeweiligen Banden. Dies steht in guter Übereinstimmung zu der im Kapitel 5.1.2.1.2.2 erwähnten Beobachtung, daß die Fluoreszenzintensität der Verbindung (**21**) in Puffer über einen Zeitraum von sieben Minuten keine erkennbare Abnahme zeigte.

Festzuhalten ist somit, daß nach dem Einbringen der offenkettigen cis-Verbindungen in ein wäßriges Medium ein Isomerisierungsschritt stattfindet und das Isomerengleichgewicht vermutlich relativ zur Seite des trans-Isomers verschoben wird. Dieser Isomerisierungsschritt ist aber nicht für die moderate Abnahme der inhibitorischen Stärke mit zunehmender Vorinkubation im wäßrigen Medium



verantwortlich. Ob diese Isomerisierung für die Abnahme der Absorption bei 350 nm mit zunehmender Verweildauer der Substanz im wäßrigen Medium verantwortlich ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden. Die Fixierung der Amidrazonstruktur in der cis-Form durch Zyklisierung zum Triazolin zieht eine drastische Abschwächung dieses Prozesses sowohl in bezug auf die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Abnahme nach sich, wenngleich dieser Prozeß dadurch nicht völlig verhindert wird. Auch die Abnahme der inhibitorischen Stärke ist innerhalb der ersten zehn Minuten nur noch marginal und nicht signifikant ausgeprägt. Nach Substitution des NH sowohl in der zyklischen als auch der offenkettigen Verbindung ist keine Abnahme der Absorption der längstwelligsten Bande zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, daß der zugrunde liegende Prozeß offenkundig stark vom wäßrigen Milieu abhängig ist und möglicherweise die Überlagerung mehrerer molekularer Vorgänge darstellt. Da eine unsubstituierte Position am N<sup>1</sup> bzw. N<sup>3</sup> hierfür von ausschlaggebender Bedeutung ist, ließe sich ein Oxidationsschritt vermuten. Ein Fehlen jeglicher Veränderungen im Chromatogramm bzw. in den relevanten Spektren (MS, NMR) läßt eine derartige Veränderung des Moleküls jedoch als ausgeschlossen erscheinen.

Zusätzlich mußte festgestellt werden, daß die untersuchten Substanzen auch in einigen organischen Lösungsmitteln - in Abhängigkeit vom jeweiligen Lösungsmittel - mehr oder minder schnell (wenige Tage bis Wochen) einem Zerfall unterliegen. In methanolischer Lösung konnte so anhand der Verbindung **(3)** die Bildung von Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Im folgenden wurde daher untersucht, ob aus dem Inhibitormolekül eventuell in wäßriger Lösung bzw. direkt am Enzym entstehendes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Anteil an der inhibitorischen Wirkung der Verbindungen haben kann. Die nichtenzymatische Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in wäßriger Lösung innerhalb kurzer Zeiträume (120 min) konnte zwar durch die in den Kapiteln 5.1.2.1.2.4.1-3 geschilderten Versuche ausgeschlossen werden, die Möglichkeit der Generierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt am Enzym sollte jedoch nicht außer acht gelassen werden.

Wasserstoffperoxid selbst hat im beschriebenen Screeningsystem bis zu einer Konzentration von 1,0x10<sup>-4</sup> M jedoch keinen Einfluß auf die Aktivität der LOX. Auch der Zusatz von Katalase (21 ng/ml), eines Peroxid-verbrauchenden Enzyms, bewirkt keine Veränderung der inhibitorischen Potenz der Verbindungen. Somit kann sich eventuell aus den Verbindungen bildendes Wasserstoffperoxid als wirksames Prinzip der Lipoxygenasehemmung der Amidrazone resp. Triazoline ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen zur Stabilität der Verbindungen in wäßrigem Medium lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Eine bis zehnminütige Vorinkubation der Verbindung **(3)** im Puffer führt zu einer geringfügigen Beeinträchtigung der inhibitorischen Aktivität des Amidrazons. Verbindungen mit Amidrazonstruktur gelten gemeinhin als leicht oxidierbar. [514] Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Verbindungen im wäßrigen Medium untersucht. Innerhalb des für die enzymkinetischen Untersuchungen relevanten Zeitraums von zehn Minuten konnte kein Zerfall der Amidrazone nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlich ist, daß sich nach Zugabe der organischen Lösungen der Verbindungen ins Puffermilieu des Testsystems ein neues cis/trans-Gleichgewicht einstellt. Dies kann jedoch für den leichten Aktivitätsverlust der Verbindungen nicht verantwortlich gemacht werden (Abbildungen 43 und 44).

## 6. Zusammenfassung

Amidrazone vom untersuchten Strukturtyp erwiesen sich als hochpotente Inhibitoren von Lipoxygenasen. Zielstellung dieser Arbeit war die Analyse des Wirkmechanismus zyklischer und offenkettiger Amidrazon-Derivate an der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen, insbesondere unter dem Aspekt des ursprünglich für die sehr ähnlichen Phenylhydrazone postulierten Suizidmechanismus der Inaktivierung. Die Verbindungen des untersuchten Strukturtyps sind nicht nur als Inhibitoren von Lipoxygenasen, sondern unter Umständen ebenso als Substrate derselben aufzufassen. Beide Eigenschaften wurden separat voneinander untersucht. Es wurde im einzelnen analysiert, inwieweit zwischen der Substrateigenschaft und dem inhibitorischen Verhalten der Verbindungen ein direkter Zusammenhang besteht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Die auf nichtenzymatischem Wege hergestellten Oxidationsprodukte der offenkettigen Amidrazone sind nur in Form von Spaltprodukten faßbar. So entstehen aus den Verbindungen **(3)** und **(4)** die entsprechenden Oxalsäurediamid-Derivate **(3b)** und **(4a)**. Aus Verbindung **(7)** wird in geringem Ausmaß das Triazin **(7a)** gebildet. Im Falle der Triazoline konnten nur die entsprechenden Triazole als Oxidationsprodukte identifiziert werden. Azohydroperoxide, wie z.B. **(9a)** für das Phenylhydrazon **(9)** konnten für die untersuchten Amidrazone weder nach enzymatischer noch nach nichtenzymatischer Oxidation nachgewiesen werden. Gleichwohl wurde die Entstehung starker Oxidationsmittel während der enzymatischen Umsetzung gezeigt. Diese sind jedoch für eine eindeutige Identifizierung zu instabil.

Obwohl eine Reihe von Fakten, wie z.B. die Abhängigkeit der Inhibition vom O<sub>2</sub>-Gehalt des E-I-Präinkubationsmediums (Abbildungen 2 und 3) oder die inhärente Substrateigenschaft einer Reihe von Verbindungen (Kapitel 5.1.2) auch einen Suizidmechanismus nach Schema 2 unterstützen würde, konnte festgestellt werden, daß zwischen Inhibitoroxidation und Inhibition des Enzyms kein kausaler Zusammenhang besteht:

- ☞ Eine hochpotente Inhibition des Enzyms erfolgt auch durch eine Reihe von enzymatisch nicht oxidablen Verbindungen, wie z.B. **(21)** und **(29)**.
- ☞ Die Oxidation des Inhibitors durch das Enzym erfolgt mit einer zum Teil 4- bis 14-fach geringeren Geschwindigkeit (im Falle von Verbindung **(3)**) als dessen Inaktivierung.
- ☞ Durch die enzymatisch oxidable Verbindung **(3)** ist eine äquipotente Hemmung der inaktiven Fe<sup>II</sup>-Form ebenso wie der aktiven Fe<sup>III</sup>-Spezies möglich.
- ☞ Konträr zum postulierten Suizidmechanismus ist die Inhibition prinzipiell reversibel, lediglich die Fe<sup>III</sup>-Form der L-1 wird durch Verbindung **(3)** irreversibel inaktiviert.

Die Inhibition der Lipoxygenase beruht auf einer zeitabhängigen, hochaffinen Interaktion nach einem 2-Schritt-Mechanismus. Im ersten und schnellen Schritt der Interaktion mit dem Enzym besteht der relativ seltene Fall einer partiellen Inhibition. Die Affinität der Inhibitoren zum Enzym-Substrat-Komplex ist in

der Regel höher als zum Enzym selbst. Diese initialen Komplexe unterliegen einer langsamen Isomerisierung, was mit einer drastischen Erhöhung der Affinität der gebundenen Inhibitoren verbunden ist. Die Bindungsstelle der Inhibitoren ist nicht identisch mit der katalytischen Substratbindungsstelle. Zwischen Hydrazonen (z.B. **(9)**) und Amidrazonen (z.B. **(3)** oder **(21)**) bestehen grundlegende Unterschiede im Mechanismus der Hemmung der L-1.

Die wichtigsten Konstanten der beiden hauptsächlich untersuchten Verbindungen **(3)** und **(21)** sind in der im Anhang aufgeführten Tabelle A-III zusammengestellt.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] B.A. Ek, D.P. Cistola, J.A. Hamilton, T.L. Kaduce, A.A. Spector: (1997) „*Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1346, 75-85;
- [2] B. Samuelsson: (1991) „*Arachidonic acid metabolism: Role in inflammation*“, *Zeitschr. Rheumatol.* 50, 3-6;
- [3] G. Dannhard: (1993) „*COX- und LOX-Inhibitoren: Entwicklung, Testung, Perspektiven*“, in „*Entzündung und verwandte Reaktionen – Neue Erkenntnisse, neue Wirkstoffe*“, R. Hirschelmann (Ed.) Jenapharm GmbH, Jena, 41-45;
- [4] P. Nuhn, P. Frohberg, M. Heinisch, T. Köhler, O. Lichtenberger, O. Rickinger: (1993) „*Entwicklung von Hemmern ausgewählter Enzyme der Arachidonsäurekaskade*“, in „*Entzündung und verwandte Reaktionen – Neue Erkenntnisse, neue Wirkstoffe*“, R. Hirschelmann (Ed.) Jenapharm GmbH, Jena, 32-40;
- [5] W.C. Song, A.R. Brash: (1991) „*Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450*“, *Science* 253, 781-784;
- [6] W.-C. Song, C.D. Funk, A.R. Brash: (1993) „*Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8519-8523;
- [7] A.R. Brash, M.S. Chang, C.D. Funk, W. Song: (1995) „*Novel Transformations of HPETEs by Cytochrome P450s*“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 744, 25-30;
- [8] W.R. Schaefer, K. Werner, H. Schweer, J. Schneider, E. Arbogast, H.P. Zahradnik: (1997) „*Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in human placenta*“, *Prostaglandins* 54, 677-687;
- [9] K.A. Harrison, R.C. Murphy: (1995) „*Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation*“, *J. Biol. Chem.* 270, 17273-17278;
- [10] M. Lagarde, N. Gualde, M. Rigaud: (1989) „*Metabolic interactions between eicosanoids in blood and vascular cells*“, *Biochem. J.* 257, 313-320;
- [11] C.N. Serhan, J.Z. Haeggström, C.C. Leslie: (1996) „*Lipid mediator networks in cell signaling: Update and impact of cytokines*“, *FASEB J.* 10, 1147-1158;
- [12] C.N. Serhan: (1994) „*Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 1-25;
- [13] C.N. Serhan, J.M. Drazen: (1997) „*Antiinflammatory potential of lipoxygenase-derived eicosanoids: A molecular switch at 5 and 15 positions?*“, *J. Clin. Invest.* 99, 1147-1148;
- [14] J.Y. Vanderhoek, R.W. Bryant, J.M. Bailey: (1980) „*Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leucocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid*“, *J. Biol. Chem.* 255, 10064-10066;
- [15] K. Fogh, T. Herlin, K. Kragballe: (1988) „*In vitro inhibition of leukotriene B<sub>4</sub> formation by exogenous 5-lipoxygenase inhibitors is associated with enhanced generation of 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE) by human neutrophils*“, *Arch. Dermatol. Res.* 280, 430-436;
- [16] S. Yamamoto: (1992) „*Mammalian lipoxygenases: Molecular structures and functions*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131;
- [17] Y. Suzuki, U. Matsukura: (1997) „*Lipoxygenase activity in maturing and germinating rice seeds with and without lipoxygenase 3 in mature seeds*“, *Plant Science* 125, 119-126;
- [18] I. Feussner, H. Kühn, C. Wasternack: (1997) „*Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate beta-oxidation?*“, *FEBS Lett.* 406, 1-5;
- [19] M.V. Kolomiets, D.J. Hannapel, H. Chen, M. Tymeson, R.J. Gladon: (2001) „*Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development*“, *Plant Cell* 13, 613-26;

- [20] G. Mita, A. Gallo, V. Greco, C. Zasiura, R. Casey, G. Zache, A. Santino: (2001) „*Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (Prunus dulcis) seed*“, *Eur. J. Biochem.* 268, 1500-1507;
- [21] M. Civelli, D. Oliva, M. Mezzetti, S. Nicosia: (1987) „*Characteristics and distribution of specific binding sites for leukotriene C<sub>4</sub> in human bronchi*“, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 242, 1019-1024;
- [22] S.T. Crooke, M. Mattern, H.M. Sarau, J.D. Winkler, J. Balcarek, A. Wong, C.F. Benett: (1989) „*The signal transduction system of the leukotriene D<sub>4</sub> receptor*“, *TIPS* 10, 103-107;
- [23] E. Mayatepek, G.F. Hoffmann: (1995) „*Leukotrienes: Biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance*“, *Pediatric Research* 37, 1-9;
- [24] K.A. Scoggan, P.-J. Jakobsson, A.W. Ford-Hutchinson: (1997) „*Production of leukotriene C<sub>4</sub> in different human tissues is attributable to distinct membrane bound biosynthetic enzymes*“, *J. Biol. Chem.* 272, 10182-10187;
- [25] R. Müller-Peddinghaus: (1997) „*Potential anti-inflammatory effects of 5-lipoxygenase inhibition – exemplified by the leukotriene synthesis inhibitor BAY X 1005*“, *J. Phys. Pharmacol.* 48, 529-536;
- [26] R.M.J. Palmer, J.A. Salmon: (1985) „*Inhibition of 5-lipoxygenase: Relevance to inflammation*“, in „*The Leukotrienes: Their biological significance*“, P.J. Piper (Ed.) Raven Press New York, 1-20;
- [27] K.H. Leung, M.M. Ip: (1986) „*Regulation of rat natural killing*“, *Cell. Immun.* 100, 474-484;
- [28] M.A. Bray: (1986) „*Leukotrienes in inflammation*“, *Agents & Actions* 19, 87-99;
- [29] W. Hagmann, A. Kirn, D. Keppler: (1986) „*Role of leukotrienes in acute inflammatory liver disease*“, in „*Modulation of liver cell expression*“, W. Reutter, P.C. Heinrich, H. Popper, D. Keppler, I.M. Arias, L. Landmann (Eds.) MTP Press Boston, 423-433;
- [30] D. Steinhilber: (1989) „*Lipoxine und Leukotriene, molekulare Signale bei Immunreaktionen*“, *Pharm. Unserer Zeit* 3, 76-81;
- [31] G.M. Nassar, K.F. Badr: (1995) „*Role of leukotrienes and lipoxygenases in glomerular injury*“, *Miner. Electrolyte Metab.* 21, 262-270;
- [32] A. Heller, T. Koch, J. Schmeck, K. von Ackern: (1998) „*Lipid mediators in inflammatory disorders*“, *Drugs* 55, 487-496;
- [33] A. Montero, K.F. Badr: (2000) „*15-lipoxygenase in glomerular inflammation*“, *Exp. Nephrol.* 8, 14-19;
- [34] K. Kragballe, J.J. Voorhees: (1983) „*Arachidonic acid and leukotrienes in dermatology*“, *J. Invest. Dermatol.* 81, 293-296;
- [35] A.W. Ford-Hutchinson: (1985) „*Leukotrienes: Their formation and role as inflammatory mediators*“, *Federation Proceedings* 44, 25-29;
- [36] A. Ford-Hutchinson, G. Letts: (1986) „*Biological actions of leukotrienes: State of the art lecture*“, *Hypertension Suppl.* 8, 44-49;
- [37] M. Donowitz: (1985) „*Arachidonic acid metabolites and their role in inflammatory bowel disease*“, *Gastroenterology* 88, 580-587;
- [38] M.J. Müller: (1995) „*Der Leukotriensignalweg – ein vielversprechender Ansatzpunkt für Inhibitoren in der Therapie entzündlicher Erkrankungen*“, *Pharmazie in unserer Zeit* 24, 264-272;
- [39] D. Steinhilber: (1999) „*5-Lipoxygenase: A target for anti-inflammatory drugs revisited*“, *Curr. Med. Chem.* 6, 71-85;
- [40] W.E.M. Lands: (1986) „*Renewed questions about polyunsaturated fatty acids*“, *Nutr. Rev.* 44, 189-195;
- [41] G. Feuerstein, J.M. Hallenbeck: (1987) „*Leukotrienes in health and disease*“, *FASEB J.* 1, 186-192;
- [42] T. Shimizu: (1988) „*Enzymes functional in the synthesis of leukotrienes and related compounds*“, *Int. J. Biochem.* 20, 661-666;
- [43] C.M. Smith, R.J. Hawsworth, F.C.K. Thien, P.E. Christie: (1992) „*Urinary leukotriene E<sub>4</sub> in bronchial asthma*“, *Eur. Resp. J.* 5, 639-699;
- [44] R. Müller-Peddinghaus, R. Fruchtmann, C. Kohlsdorfer, A. Hatzelmann, S. Raddatz, K.-H. Mohrs, H. Horstmann: (1993) „*Lipoxygenasehemmung: Ein neues antiinflammatorisches Therapieprinzip*“, in

- „Entzündung und verwandte Reaktionen – Neue Erkenntnisse, neue Wirkstoffe“, R. Hirschelmann (Ed.) Jenapharm GmbH, Jena, 32-40;*
- [45] X.S. Chen, J.R. Sheller, E.N. Johnson, C.D. Funk: (1994) *„Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene“, Nature 372, 179-182;*
- [46] C. Kroegel, V. Herzog, B. Knöchel, P. Julius, W. Luftmann, J.-C. Virchow, jr.: (1996) *„5-Lipoxygenase-Inhibitoren und Leukotrien-Rezeptorantagonisten“, Arzneimitteltherapie 14, 299-309;*
- [47] S.D. Crowther, P.J. Rees: (2001) *„Current treatment of asthma - focus on leukotrienes“, Expert. Opin. Pharmacother. 1, 1021-1040;*
- [48] H. Manev, T. Uz, K. Sugaya, T. Qu: (2000) *„Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in an aging brain“, FASEB-J. 14, 1464-1469;*
- [49] J. Ghosh, C.E. Myers: (1997) *„Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: Critical role of 5-lipoxygenase“, Biochem. Biophys. Res. Comm. 235, 418-423;*
- [50] S. Gupta, M. Srivastava, N. Ahmad, K. Sakamoto, D.G. Bostwick, H. Mukhtar: (2001) *„Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma“, Cancer 91, 737-743;*
- [51] M. Maccarrone, M.V. Catani, A. Finazzi-Agro, G. Melino: (1997) *„Involvement of 5-lipoxygenase in programmed cell death of cancer cells“, Cell Death and differentiation 4, 396-402;*
- [52] P. Krieg, A. Kinzig, M. Röss-Löschke, S. Vogel, B. Vanlandingham, M. Stephan, W.-D. Lehmann, F. Marks, G. Fürstenberger: (1995) *„12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development“, Mol. Carcinog. 14, 118-129;*
- [53] K.V. Honn, D.G. Tang, X. Gao, I.A. Butovich, B. Liu, J. Timar, W. Hagmann: (1994) *„12-Lipoxygenases and 12(S)-HETE: Role in cancer metastasis“, Cancer & Metastasis Rev. 13, 365-396;*
- [54] E. Bastida, M.C. Bertomeu, T.A. Haas, L. Almira, D. Lauri, F.W. Orr, M.R. Buchanan: (1990) *„Regulation of tumor cell adhesion by intracellular 13-HODE:15-HETE ratio“, J. Lipid. Med. 2, 281-293;*
- [55] M.R. Buchanan, P. Horsewood, S.J. Brister: (1998) *„Regulation of endothelial cell and platelet receptor-ligand binding by the 12- and 15-lipoxygenase monohydroxides, 12, 15-HETE and 13-HODE“, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids 58, 339-346;*
- [56] L.P. Shornick, M.J. Holtzman: (1993) *„A cryptic, microsomal-type arachidonate 12-lipoxygenase is tonically inactivated by oxidation-reduction conditions in cultured epithelial cells.“, J. Biol. Chem. 268, 371-376;*
- [57] K. Müller: (1994) *„5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: Attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs“, Arch. Pharm. 327, 3-19;*
- [58] Y. Li, P. Maher, D. Schubert: (1997) *„A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion“, Neuron. 19, 453-463;*
- [59] S.W. Kang, S.G. Adler, C.C. Nast, J. Lapage, J.L. Gu, J.L. Nadler, R. Natarajan: (2001) *„12-Lipoxygenase is increased in glucose-stimulated mesangial cells and in experimental diabetic nephropathy“, Kidney Int. 59, 1354-1362;*
- [60] J.Y. Vanderhoek: (1988) *„Role of the 15-lipoxygenase in the Immune System“, Annals of the New York Academy of Sciences, Biology of the Leukotrienes 524, 240-251;*
- [61] J.S. Goodwin, T. Behrens: (1988) *„Role of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in T cell activation“, Annals of the New York Academy of Sciences, Biology of the Leukotrienes 524, 201-207;*
- [62] P. Davis: (1988) *„Lipoxygenase products in immunity“, Immun. Invest. 16, 623-647;*
- [63] B.N.Y. Setty, J.E. Graeber, M.J. Stuart: (1987) *„The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition“, J. Biol. Chem. 262, 17613-17622;*
- [64] S.M. Rapoport, T. Schewe: (1986) *„The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes“, Biochim. Biophys. Acta 864, 471-495;*
- [65] K. Schnurr, M. Hellwing, B. Seidemann, P. Jungblut, H. Kühn, S.M. Rapoport, T. Schewe: (1996) *„Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases - The role of ubiquinone“, Free Rad. Biol. & Med. 20, 11-21;*

- [66] K. van-Leyen, R.M. Duvoisin, H. Engelhardt, M. Wiedmann: (1998) „*A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation*“, *Nature* 395, 392-395;
- [67] C. Grulich, R.M. Duvoisin, W. Wiedmann, K. van Leyen: (2001) „*Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte*“, *FEBS Lett.* 489, 51-54;
- [68] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, J.L. Witztum: (1989) „*Beyond cholesterol: Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*“, *N. Engl. J. Med.* 320, 915-924;
- [69] S. Yla-Herttuala, M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, E. Sigal, T. Sarkioja, J.L. Witztum, D. Steinberg: (1991) „*Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-Lipoxygenase and acetyl low-density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts*“, *J. Clin. Invest.* 87, 1146-1152;
- [70] H. Kühn, D. Heydeck, I. Hugou, C. Gniwotta: (1997) „*In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis*“, *J. Clin. Invest.* 99, 888-893;
- [71] A.W. Ford-Hutchinson: (1991) „*Arachidonate 15-lipoxygenase: Characteristics and potential biological significance*“, *Eicosanoids* 4, 65-74;
- [72] G.J. Trachte, A.M. Lefer, D. Aharony, J.B. Smith: (1979) „*Potent constriction of cat coronary arteries by hydroperoxides of arachidonic acid and its blockade by anti-inflammatory agents*“, *Prostaglandins* 18, 909-914;
- [73] M. Takahashi, N. Ozaki, S. Kawakita, M. Nozaki, Y. Saeki: (1985) „*Vascular effects of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid on canine arteries*“, *Jpn. J. Pharmacol.* 37, 325-334;
- [74] K. Fogh, J. Kiil, T. Herlin, T. Ternowitz, K. Kragballe: (1987) „*Heterogeneous distribution of lipoxygenase products in psoriatic skin lesions*“, *Arch. Dermatol. Res.* 279; 504-511;
- [75] H.F. Johnson, M.L. McNee, F.F. Sun: (1985) „*15-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a potent inflammatory mediator and agonist of canine tracheal mucus secretion*“, *Am. Rev. Resp. Dis.* 131, 917-922;
- [76] B. Garner, W. Jessup: (1996) „*Cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein: The elusive mechanism(s)*“, *Redox Report* 2, 97-104;
- [77] L. Cominacini, U. Garbin, A. De Santis, M. Campagnola A. Davoli, A.F. Pasini, G. Faccini, E. Pasqualini, L. Bertozzo, R. Micciolo, A.M. Pastorino, V.L. Cascio: (1996) „*Mechanisms involved in the in vitro modification of low density lipoprotein by human umbilical vein endothelial cells and copper ions*“, *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 13, 19-33;
- [78] J.L. Goldstein, Y.K. Ho, S.K. Basu, M.S. Brown: (1979) „*Binding site on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 333-337;
- [79] R.G. Gerrity: (1981) „*The role of the monocytes in atherogenesis*“, *Am. J. Pathol.* 103, 181-190;
- [80] M.S. Brown, J.L. Goldstein: (1983) „*Lipoprotein metabolism in the macrophage*“, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 223-226;
- [81] U.P. Steinbrecher, H. Zhang, M. Loughheed: (1990) „*Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis*“, *Free Radic. Biol. Med.* 9, 155-168;
- [82] J.L. Witztum, M.D. Steinberg: (1991) „*Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis*“, *J. Clin. Invest.* 88, 1785-1792;
- [83] A.C. Carr, M.R. McCall, B. Frei: (2000) „*Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection*“, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1716-1723;
- [84] S. Parthasarathy, E. Wieland, D. Steinberg: (1989) „*A role for endothelial cell lipoxygenases in the oxidative modification of low-density lipoprotein*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1046-1050;
- [85] S. Yla-Herttuala, M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, C.K. Glass, E. Sigal, J.L. Witztum, D. Steinberg: (1990) „*Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6959-6963;
- [86] M.K. Cathcart, A.K. McNally, G.M. Chisolm: (1991) „*Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex*“, *J. Lipid. Res.* 32, 63-70;

- [87] C.P. Sparrow, S. Parthasarathy, D. Steinberg: (1988) „*Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A<sub>2</sub> mimics cell-mediated oxidative modification*“, *J. Lipid Res.* 29, 745-753;
- [88] J.A. Berliner, J.W. Heinecke: (1996) „*The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*“, *Free Radical Biology & Medicine* 20, 707-727;
- [89] M. Laskowski, jr., M.A. Qasim: (2000) „*What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes?*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 324-337;
- [90] P. Frohberg, C. Kupfer, P. Stenger, U. Baumeister, P. Nuhn: (1995) „*Synthese und Cyclisierungsreaktionen offenkettiger N<sup>1</sup>-arylsubstituierter Amidrazone*“, *Arch. Pharm.* 328, 505-516;
- [91] M.O. Funk, jr., J.C. Andre, T. Otsuki, (1987) „*Oxygenation of trans polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase reveals steric features of the catalytic mechanism*“, *Biochemistry* 26, 6880-6884;
- [92] E.K. Pistorius, B. Axelrod: (1974) „*Iron, an essential component of lipoxygenase*“, *J. Biol. Chem.* 249, 3183-3186;
- [93] S. Slappendel, B.G. Malmström, L. Petersson, A. Ehrenberg, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1982) „*On the spin and valence state in native soybean lipoxygenase-1*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108, 673-677;
- [94] T.M. Cheesbrough, B. Axelrod: (1983) „*Determination of the spin state of iron in native and activated soybean lipoxygenase-1 by paramagnetic susceptibility*“, *Biochemistry* 22, 3837-3840;
- [95] C. Su, M. Sahlin, E.H. Oliw: (2000) „*Kinetics of manganese lipoxygenase with a catalytic mononuclear redox center*“, *J. Biol. Chem.* 275, 18830-18835;
- [96] S.T. Prigge, J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel: (1996) „*Lipoxygenases: Structure and function*“, in „*Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 1-32;
- [97] H. Kühn, B.J. Thiele: (1999) „*The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance*“, *FEBS Lett.* 449, 7-11;
- [98] A.R. Brash, W.E. Boeglin, M.S. Chang B.H. Sieh: (1996) „*Purification, and molecular cloning of an 8(R)-lipoxygenase from the coral plexaura homomalla reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases*“, *J. Biol. Chem.* 271, 20949-20957;
- [99] T. Hada, L.L. Swift, A.R. Brash: (1997) „*Discovery of a 5(R)-lipoxygenase activity in oocytes of the surf clam spisula solidissima*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1346, 109-119;
- [100] W.E. Boeglin, R.B. Kim, A.R. Brash: (1998) „*A 12(R)-lipoxygenase in human skin: Mechanistic evidence, molecular cloning and expression*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6744-6749;
- [101] D. Sun, M McDonnell, X.S. Chen, M.M. Lakkis, H. Li, S. N. Isaacs, S.H. Elsea, P.I. Patel, C.D. Funk: (1998) „*Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog*“, *J. Biol. Chem.* 273, 33540-33547;
- [102] S.T. Prigge, J.C. Boyington, M. Faig, K.S. Doctor, B.J. Gaffney, L.M. Amzel: (1997) „*Structure and mechanism of lipoxygenases*“, *Biochimie* 79, 629-636;
- [103] G.L. Bundy, E.G. Nidy, D.E. Epps, S.A. Mizsak, R.J. Wnuk: (1986) „*Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral pseudoplexaura porosa*“, *J. Biol. Chem.* 261, 747-751;
- [104] M. Yamada, A.D. Proia: (2000) „*8(S)-hydroxyicosatetraenoic acid is the lipoxygenase metabolite of arachidonic acid that regulates epithelial cell migration in the rat cornea*“, *Cornea* 19, 13-20;
- [105] Z.D. Jiang, W.H. Gerwick: (1997) „*Novel oxylipins from the temperate red algae polyneura latissima: Evidence for an arachidonate 9(S) lipoxygenase*“, *Lipids* 32, 231-235;
- [106] V. Di-Marzo, L. De-Petrocellis, C. Gianfrani, G. Cimino: (1993) „*Biosynthesis, structure and biological activity of hydroxyicosatetraenoic acids in hydra vulgaris*“, *Biochem. J.* 295, 23-29;
- [107] C.D. Funk, D.S. Keeney, E.H. Oliw, W.E. Boeglin, A.R. Brash: (1996) „*Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase*“, *J. Biol. Chem.* 271, 23338-23344;
- [108] M. Siebert, P.D. Krieg, W. Lehmann, F. Marks, G. Furstenberger: (2001) „*Enzymic characterization of epidermis-derived 12-lipoxygenase isoenzymes*“, *Biochem. J.* 355, 97-104;
- [109] H. Kühn: (1996) „*Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadienoic acid*“, *Prog. Lipid Res.* 35, 203-226;



- [110] A.R. Brash, W.E. Boeglin, M.S. Chang: (1997) „*Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6148-6152;
- [111] C.N. Serhan, M. Hamberg, B. Samuelsson: (1984) „*Lipoxins: A novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leucocytes*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5335-5339;
- [112] C.N. Serhan: (1997) „*Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): A jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity?*“, *Prostaglandins* 53, 107-137;
- [113] N. Ueda, C. Yokoyama, S. Yamamoto, B.J. Fitzsimmons, J. Rokach, J.A. Oates, A.R. Brash: (1987) „*Lipoxin synthesis by arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149, 1063-1069;
- [114] H.G. Eiben, A.J. Slusarenko: (1994) „*Complex spatial and temporal expression of lipoxygenase genes during Phaseolus vulgaris (L.) development*“, *Plant J.* 5, 123-135;
- [115] D. Hildebrand: (1996) „*Genetics of soybean lipoxygenases*“, in „*Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 33-38;
- [116] D. Shibata, J. Steczko, J.E. Dixon, M. Hermodson, R. Yazdanparast, B. Axelrod: (1987) „*Primary structure of soybean lipoxygenase-1*“, *J. Biol. Chem.* 262, 10080-10085;
- [117] J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel: (1993) „*The three dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase*“, *Science* 260, 1482-1486;
- [118] W. Minor, J. Stecko, B. Stec, Z. Otinowski, J.T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod: (1996) „*Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution*“, *Biochemistry* 35, 10687-10701;
- [119] E. Skrzypczak-Jankun, L.M. Amzel, B.A. Kroa, M.O. Funk, jr.: (1997) „*Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme*“, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 29, 15-31;
- [120] T.R. Holman, J. Zhou, E.I. Solomon: (1998) „*Spectroscopic and functional characterization of a ligand coordination mutant of soybean lipoxygenase-1: First coordination sphere analogue of human 15-lipoxygenase*“, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12564-12572;
- [121] Y. Zhang, Q.-F. Gan, E.G. Pavel, E. Sigal, E.I. Solomon: (1995) „*EPR-Definition of the non-heme ferric active sites of mammalian 15-lipoxygenase: Major spectral difference relative to human 5-lipoxygenases and plant lipoxygenases and their ligand field origin*“, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7422-7427;
- [122] C. Lambert, C. Pourplanche, V. Larreta-Garde: (1997) „*Comparison of macromolecular and molecular effects of cosolvents on the catalytic behaviour of soybean lipoxygenase-1*“, *Biocat. Biotrans.* 15, 39-55;
- [123] R.C. Scarrow, M.G. Trimitsis, C.P. Buck, G.N. Grove, R.A. Cowling, M.J. Nelson: (1994) „*X-ray spectroscopy of the iron site in soybean lipoxygenase-1: Changes in coordination upon oxidation or addition of methanol*“, *Biochemistry* 33, 15023-15035;
- [124] D.L. Sloane: (1996) „*Exploring the structure and function of mammalian lipoxygenases by site-directed mutagenesis*“, in „*Lipoxygenases and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 57-79;
- [125] S.A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M.F. Browner: (1997) „*The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity*“, *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003-1009;
- [126] R. Brinckmann, K. Schnurr, D. Heydeck, T. Rosenbach, G. Kolde, H. Kühn: (1998) „*Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme*“, *Blood* 91, 64-74;
- [127] J.-M. Kuo, A. Hwang, D.-B. Yeh: (1997) „*Purification, substrate specificity, and products of a Ca<sup>2+</sup>-stimulating lipoxygenase from sea algae (ulva lactuca)*“, *J. Agric. Food Chem.* 45, 2055-2060;
- [128] B. Axelrod, T.M. Cheesbrough, S. Laakso: (1981) „*Lipoxygenase from soybeans*“, *Methods Enzymol.* 71, 441-451;
- [129] J.P. Christopher, E.K. Pistorius, B. Axelrod: (1972) „*Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase*“, *Biochim. Biophys. Acta* 284, 54-62;
- [130] T.D. Dreesen, M. Dickens, R.B. Koch: (1982) „*Partial purification and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-stimulated lipoxygenase from soybean seeds*“, *Lipids* 17, 964-969;

- [131] F. Restrepo, H.E. Snyder, G.L. Zimmerman: (1973) „*Calcium activation of soybean lipoxygenase*“, *J. Food Sci.* 38, 779-782;
- [132] S.A. Tatulian, J. Steczko, W. Minor: (1998) „*Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1*“, *Biochemistry* 37, 15481-15490;
- [133] F. Clemens: (1998) „*Beiträge zur Untersuchung des Hemmechanismus offenkettiger Amidrazonderivate an der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen am Beispiel der Verbindung Fro A6*“, Diplomarbeit, Halle;
- [134] H. Iwase, K. Sakurada, T. Takatori, M. Nagao, H. Niijima, Y. Matsuda, M. Kobayashi: (1998) „*Calcium ions potentiate lipoxygenase activity of cytochrome c at the physiological pH*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 485-491;
- [135] K.V. Reddy, T. Hammarberg, O. Radmark: (2000) „*Mg<sup>2+</sup> activates 5-lipoxygenase in vitro: Dependency on concentrations of phosphatidylcholine and arachidonic acid*“, *Biochemistry* 39, 1840-1848;
- [136] R.A. van der Meer, J.A. Duine: (1988) „*Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is the organic cofactor in soybean lipoxygenase-1*“, *FEBS Letters* 235, 194-200;
- [137] B.J. Gaffney, D.V. Mavrophilipos, K.S. Doctor: (1993) „*Access of ligands to the ferric center in lipoxygenase-1*“, *Biophys. J.* 64, 773-783;
- [138] L-R. Ludikhuyze, I.I. van den Broeck, C.A. Weemaes, M.E. Hendrickx: (1998) „*High pressure and thermal denaturation kinetics of soybean lipoxygenase: A study based on gel electrophoresis*“, *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 31, 680-686;
- [139] E. Sudharshan, A.G.A. Rao: (1997) „*Rapid method to separate the domains of soybean lipoxygenase-1: Identification of the interdomain interactions*“, *FEBS Letters* 406, 184-188;
- [140] S.T. Prigge, J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel, (1996) „*Structure conservation in Lipoxygenases: Structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases*“, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 24, 275-291;
- [141] Q.-F. Gan, M.F. Browner, D.L. Sloane, E. Sigal: (1996) „*Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase*“, *J. Biol. Chem.* 271, 25412-25418;
- [142] P. Nuhn, A. Büge, T. Köhler, H. Lettau, R. Schneider, (1991) „*Trends bei der Entwicklung von Lipoxygenase-Hemmern*“, *Pharmazie* 46, 81-88;
- [143] J.M. Lopez-Nicolas, R. Bru, F. Garcia-Carmona: (1997) „*Kinetic characteristics of the enzymatic conversion in presence of cyclodextrins: Study of the oxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1347, 140-150;
- [144] I.A. Butovich, S.M. Lukyanova, C.C. Reddy: (1998) „*Oxidation of linoleyl alcohol by potato tuber lipoxygenase: Possible mechanism and the role of carboxylic group in substrate binding*“, *biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 344-349;
- [145] P. Reddanna, J. Whelan, K.R. Maddipati, G.R. Reddy: (1990) „*Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from potato tubers*“, *Methods Enzymol.* 187, 268-277;
- [146] X. Chen, P. Reddanna, G.R. Reddy, R. Kidd, G. Hildenbrandt, C.C. Reddy: (1998) „*Expression, purification and characterization of a recombinant 5-lipoxygenase from potato tuber*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 438-443;
- [147] J.L. Haining, R. Axelrod: (1958) „*Induction period in the lipoxygenase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide*“, *J. Biol. Chem.* 232, 193-202;
- [148] E.K. Pistorius, B. Axelrod: (1976) „*Evidence for participation of iron in lipoxygenase reaction from optical and electron spin resonance studies*“, *J. Biol. Chem.* 251, 7144-7148;
- [149] C. Rouzer, B. Samuelsson: (1986) „*The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase*“, *FEBS Lett.* 204, 293-296;
- [150] M.J. Schilstra, G.A. Veldink, J. Verhagen, J.F.G. Vliegthart: (1992) „*Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics*“, *Biochemistry* 31, 7692-7699;
- [151] G.D. Jones, L. Russell, V.M. Darley-Usmar, D. Stone, M.T. Wilson: (1996) „*Role of lipid hydroperoxides in the activation of 15-lipoxygenase*“, *Biochemistry* 35, 7197-7203;
- [152] Z.-X. Wang, S.D. Killilea, D.K. Srivastava: (1993) „*Kinetic evaluation of substrate-dependent origin of the lag phase in soybean lipoxygenase-1 catalyzed reactions*“, *Biochemistry* 32, 1500-1509;

- [153] H. Berry, H. Debat, V. Larreta-Garde: (1997) „*Excess substrate inhibition of soybean lipoxygenase-1 is mainly oxygen dependent*“, *FEBS Lett.* 408, 324-326;
- [154] M.O. Funk, S.H.-S. Kim, A.W. Alteneder: (1981) „*Factors affecting the initial rate of lipoxygenase catalysis*“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 922-929;
- [155] A.P. Kulkarni, A. Mitra, J. Chaudhuri, J.Z. Byczkowski, I. Richards: (1990) „*Hydrogen peroxide: A potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase*“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 417-423;
- [156] Y. Zhang, M.S. Gebhard, E.I. Solomon: (1991) „*Spectroscopic Studies of the non-hem ferric active site in soybean lipoxygenase: Magnetic circular dichroism as a probe of electronic and geometric structure. ligand-field origin of zero-field splitting*“, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5162-5175;
- [157] Y. Zhang, T.E. Elgren, Y. Dong, L. Que, jr.: (1993) „*A high potential ferrous complex and its conversion to an alkylperoxoiron (III) intermediate. A lipoxygenase model*“, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 811-812;
- [158] M.J. Nelson, D.B. Chase, S.P. Seitz: (1995) „*Photolysis of „purple“ lipoxygenase: Implications for the structure of the chromophore*“, *Biochemistry* 34, 6159-6163;
- [159] J.J.M.C. de Groot, G.J. Garson, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Boldingh: (1975) „*On the interaction of soybean lipoxygenase-1 and 13-L-hydroperoxylinoleic acid, involving yellow and purple coloured enzyme species.*“, *FEBS Lett.* 56, 50-54;
- [160] M.J. Nelson: (1996) „*Fatty acid radicals and the mechanism of lipoxygenase*“, in „*Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 80-94;
- [161] E.J. Corey, R. Nagata: (1987) „*Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase*“, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 8107-8108;
- [162] J.J.M.C. De Groot, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Bolding, R. Wever, B.F. Van Gelder: (1975) „*Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1*“, *Biochim. Biophys. Acta* 377, 71-79;
- [163] M.R. Egmond, P.M. Fasella, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Boldingh: (1977) „*On the mechanism of action of soybean lipoxygenase-1*“, *Eur. J. Biochem.* 76, 469-479;
- [164] M.R. Egmond, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Boldingh: (1973) „*Synthesis of 11(n-8)L-S tritium-labelled linoleic acid*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 1178-1184;
- [165] M.H. Glickman, J. Wiseman, J.P. Klinman: (1994) „*Extremely large isotope effects in the soybean lipoxygenase-linoleic acid reaction*“, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 793-794;
- [166] C.C. Hwang, C.B. Grissom: (1994) „*Unusually large deuterium isotope effect in soybean lipoxygenase is not caused by a magnetic isotope effect*“, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 795-796;
- [167] M.H. Glickman, J.P. Klinman: (1995) „*Nature of rate limiting steps in soybean L-1 reaction*“, *Biochemistry* 34, 14077-14092;
- [168] R.T. Jonas, T.D.P. Stack: (1997) „*C-H Bond activation by a ferric methoxide complex: A model for the rate-determining step in the mechanism of lipoxygenase*“, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8566-8567;
- [169] E.R. Lewis, E. Johansen, T.R. Holman: (1999) „*Large competitive kinetic isotope effects in human 15-lipoxygenase catalysis measured by a novel HPLC method*“, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1395-1396;
- [170] T. Jonsson, M.H. Glickman, S.J. Sun, J.P. Klinman: (1996) „*Experimental evidence for extensive tunneling of hydrogen in the lipoxygenase reaction: Implications for enzyme catalysis*“, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 10319-10320;
- [171] N. Moiseyev, J. Rucker, M.H. Glickman: (1997) „*Reduction of ferric iron could drive hydrogen tunneling in lipoxygenase catalysis: Implications for enzymatic and chemical mechanisms*“, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 3853-3860;
- [172] K.W. Rickert, J.P. Klinman: (1999) „*Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: Separation of primary and secondary isotope effects*“, *Biochemistry* 38, 12218-12228;
- [173] G. Lassmann, R. Odenwaller, J.F. Curtis, J.A. DeGray, R.P. Mason, L.J. Marnett, T.E. Eling: (1991) „*Electron spin resonance investigation of tyrosyl radicals of prostaglandin H synthase*“, *J. Biol. Chem.* 266, 20045-20055;

- [174] J.S. Wiesman: (1989) „ *$\alpha$ -Secondary isotope effects in the lipoxygenase reaction*“, *Biochemistry* 28, 2106-2111;
- [175] J.K. Donnelly, D.S. Robinson: (1995) „*Invited review free radicals in food*“, *Free Rad. Res.* 22, 147-176;
- [176] P. Nuhn: (1997) „*Naturstoffchemie*“, S. Hirzel-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage;
- [177] H. Kühn: (2000) „*Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases*“, *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 62, 255-270;
- [178] R.K. Hughes, S.I. West, A.R. Hornostaj, D.M. Lawson, S.A. Fairhurst, R.O. Sanchez, P. Hough, B.H. Robinson, R. Casey: (2001) „*Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers*“, *Biochem. J.* 353, 345-355;
- [179] D.L. Sloane, R. Leung, C.S. Craik, E. Sigal: (1991) „*A primary determinant for lipoxygenase positional specificity*“, *Nature* 354, 149-152;
- [180] D.L. Sloane, R. Leung, J. Barnett, C.S. Craik, E. Sigal: (1995) „*Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity*“, *Protein Eng.* 8, 275-282;
- [181] S.T. Prigge, B.J. Gaffney, L.M. Amzel: (1998) „*Comment: Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases*“, *Nat. Struct. Biol.* 5, 178-179;
- [182] M.F. Browner, S.A. Gillmor, R. Fletterick: (1998) „*Comment: Burying a charge*“, *Nat. Struct. Biol.* 5, 179;
- [183] S. Dao-Pin, D.E. Anderson, W.A. Baase, F.W. Dahlquist, B.W. Matthews: (1991) „*Structural and thermodynamic consequences of burying a charged residue within the hydrophobic core of T4 lysozyme*“, *Biochemistry* 30, 11521-11529;
- [184] I. Ivanov, K. Schwarz, H.G. Holzhütter, G. Myagkova, H. Kühn: (1998) „*-Oxidation impairs oxidizability of polyenoic fatty acids by 15-lipoxygenases: Consequences for substrate orientation at the active site*“, *Biochem. J.* 336, 345-352;
- [185] E. Hornung, M. Walther, H. Kühn, I. Feussner: (1999) „*Conversion of a cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis*“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4192-4197;
- [186] I. Feussner: (1999) „*Oxidation von Polyenfettsäuren durch Lipoxygenasen*“, *Habilitation, Halle*;
- [187] K. Schwarz, S. Borngräber, M. Anton, H. Kühn: (1998) „*Probing the substrate alignment at the active site of 15-lipoxygenases by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. Evidence for an inverse substrate orientation*“, *Biochemistry* 37, 15327-15335;
- [188] M.J. Nelson, R.A. Cowling, S.P. Seitz: (1994) „*Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase*“, *Biochemistry* 33, 4966-4973;
- [189] M.C. Feiters, R. Aasa, B.G. Malmstrom, S. Slappendal, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1985) „*Substrate fatty acid activation in soybean lipoxygenase-1 catalysis*“, *Biochim. Biophys. Acta* 831, 302-305;
- [190] M.H. Glickman, J.P. Klinman: (1996) „*Lipoxygenase reaction mechanism: Demonstrating that hydrogen abstraction from substrate precedes dioxygen binding during catalytic turnover*“, *Biochemistry* 35, 12882-12892;
- [191] M.J. Nelson: (1987) „*The nitric oxide complex of ferrous soybean lipoxygenase-1. Substrate, pH, and ethanol effects on the active-site iron*“, *J. Biol. Chem.* 262, 12137-12142;
- [192] H. Wu: (1996) „*Affecting the activity of soybean lipoxygenase-1*“, *J. Mol. Graph.* 14, 331-337;
- [193] J. Christopher, B. Axelrod: (1971) „*On the different positional specificities of peroxidation of linoleate shown by two isozymes of soybean lipoxygenase*“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 731-736;
- [194] J.P. Christopher, E.K. Pistorius, F.E. Regnier, B. Axelrod: (1972) „*Factors influencing the positional specificity of soybean lipoxygenase*“, *Biochim. Biophys. Acta* 289, 82-87;
- [195] H.W. Gardner: (1989) „*Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 274-281;
- [196] H. Kühn, H. Sprecher, A.R. Brash: (1990) „*On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The*

- number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme*“, *J. Biol. Chem.* 265, 16300-16305;
- [197] K. Schnurr, H. Kühn, S.M. Rapoport, T. Schewe: (1995) „*3,5-Di-*t*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) and probucol stimulate selectively the reaction of mammalian 15-lipoxygenase with biomembranes*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1254, 109-114;
- [198] G. Began, E. Sudharshan, A.G.A. Rao: (1999) „*Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of the fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles*“, *Biochemistry* 38, 13920-13927;
- [199] C. Pourplanche, V. Larreta-Garde, D. Thomas: (1991) „*Comparison of polarographic and chemical measurements of oxygen uptake in complex media: The example of lipoxygenase reaction*“, *Anal. Biochem.* 198, 160-164;
- [200] C. Pourplanche, C. Lambert, M. Berjot, J. Marx, C. Chopard, A.J.P. Alix, V. Larreta-Garde: (1994) „*Conformational changes of lipoxygenase (LOX) in modified environments*“, *J. Biol. Chem.* 269, 31585-31591;
- [201] H. Berry, H. Debat, V. Larreta-Garde: (1998) „*Oxygen concentration determines regioselectivity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme*“, *J. Biol. Chem.* 273, 2769-2776;
- [202] H. Arai, A. Nagao, J. Terao, T. Suzuki, K. Takama: (1995) „*Effect of d-alpha-tocopherol analogues on lipoxygenase-dependent peroxidation of phospholipid-bile salt micelles*“, *Lipids* 30, 135-140;
- [203] I. Feussner, T.J. Balkenkohl, A. Porzel, H. Kühn, C. Wasternack: (1997) „*Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons – implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination*“, *J. Biol. Chem.* 272, 21635-21641;
- [204] I. Feussner, A. Bachmann, M. Höhne, H. Kindl: (1998) „*All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro*“, *FEBS Lett.* 431, 433-436;
- [205] V.J. O’Leary, A. Graham, D. Stone, V.M. Darley-Usmar: (1996) „*Oxidation of human low density lipoprotein by soybean 15-lipoxygenase in combination with copper (II) or met-myoglobin*“, *Free Rad. Biol. Med.* 20, 525-532;
- [206] M. Perez-Gilabert, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1998) „*Oxidation of dilinoleoyl phosphatidylcholine by lipoxygenase 1 from soybeans*“, *Arch. Biochem. Biophys.* 354, 18-23;
- [207] I. Feussner, C. Wasternack: (1998) „*Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids*“, *Lipid* 100, 146-152;
- [208] M. Van der Stelt, W.F. Nieuwenhuizen, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1997) „*Dioxygenation of N-linoleoyl amides by soybean lipoxygenase-1*“, *FEBS Lett.* 411, 287-290;
- [209] H.W. Gardner, M. Grove: (1998) „*Soybean lipoxygenase-1 oxidizes 3Z-nonenal*“, *Plant Physiol.* 116, 1359-1366;
- [210] R.W. Bryant, T. Schewe, S.M. Rapoport, J.M. Bailey: (1985) „*Leukotriene formation by a purified reticulocyte lipoxygenase enzyme*“, *J. Biol. Chem.* 260, 3548-3555;
- [211] E. Blee: (1996) „*Phytooxylipins: The peroxygenase pathway*“, in „*Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 138-161;
- [212] H.W. Gardner, H. Takamura, D.F. Hildebrandt, K.P.C. Croft, T.D. Simpson, Y.P. Salch: (1996) „*Oxylipin pathway in soybeans and its physiological significance*“, in „*Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*“, G. Piazza (Ed.) AOCs Press, Illinois, USA, 162-175;
- [213] A.P. Kulkarny, D.C. Cook: (1988) „*Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: A potential pathway for xenobiotic metabolism in the presence of linoleic acid*“, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 61, 305-314;
- [214] A.P. Kulkarny, D.C. Cook: (1988) „*Hydroperoxidase activity of lipoxygenase: Hydrogen peroxide-dependent oxidation of xenobiotics*“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1075-1081;
- [215] M. Perez-Gilabert, A. Sanchez-Ferrer, F. Garcia-Carmona: (1994) „*Enzymatic oxidation of phenothiazines by lipoxygenase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system*“, *Biochem. Pharmacol.* 47, 2227-2232;
- [216] V.B. O’Donnell, H. Kühn: (1997) „*Co-oxidation of NADH and NADPH by mammalian 15-lipoxygenase: Inhibition of lipoxygenase activity at near-physiological NADH concentrations*“, *Biochem. J.* 327, 203-208;

- [217] H. Sies: (1986) „*Biochemie des oxidativen Stress*“, *Angew. Chem.* 98, 1061-1075;
- [218] J.R. Kanofsky, B. Axelrod: (1986) „*Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes*“, *J. Biol. Chem.* 261, 1099-1104;
- [219] W. Chamulitrat, M.F. Hughes, T.E. Eling, R.P. Mason: (1991) „*Superoxide and peroxy radical generation from the reduction of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides by soybean lipoxygenase*“, *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 153-159;
- [220] P. Roy, M.P. Sajan, A.P. Kulkarni: (1995) „*Lipoxygenase-mediated glutathione oxidation and superoxide generation*“, *J. Biochem. Tox.* 10, 111-120;
- [221] V.E. Thody, D.R. Buckle, K.A. Foster: (1987) „*Studies on the antioxidant activity of 5-lipoxygenase inhibitors*“, *Biochem. Soc. Trans.* 15, 416-417;
- [222] J. Ruiz, A. Pérez, R. Pouplana: (1996) „*QSAR study of phenols: Relation between the phenoxy radical formation and the antiinflammatory activity via an antioxidant mechanism*“, *Quant. Struct. Act. Relat.* 15, 219-223;
- [223] A.A. Geronikaki, D.J. Hadjipavlou-Litina: (1993) „*Lipophilicity and antiinflammatory activity of some 2-(aminoacetyl-amino)thiazole derivatives*“, *Pharmazie* 48, 948-949;
- [224] A.A. Geronikaki, D.J. Hadjipavlou-Litina: (1995) „*In vitro studies of some potent antiinflammatory aminoketones derivatives of 2,4-disubstituted thiazoles. Correlation with lipophilicity, antioxidant activity and structural characteristics*“, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46, 1134-1137;
- [225] A.A. Geronikaki, D.J. Hadjipavlou-Litina, M. Tzaki: (2000) „*Synthesis of some new thienyl and 1,3-thiazolyl-aminoketones with anti-inflammatory activity*“, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 50, 266-271;
- [226] J. Van der Zee, T.E. Eling, R.P. Mason: (1989) „*Formation of free radical metabolites in the reaction between soybean lipoxygenase and its inhibitors. An ESR study*“, *Biochemistry* 28, 8363-8367;
- [227] J. Neuzil, P.K. Witting, R. Stocker: (1997) „ *$\alpha$ -Tocopheryl hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids*“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7885-7890;
- [228] V.E. Kagan, A. Shvedova, E. Serbinova, S. Khan: (1992) „*Dihydrolipoic acid - a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase*“, *Biochem. Pharmacol.* 44, 1637-1649;
- [229] C. Schmidt: (2000) „*Synthese und Reaktionsverhalten von 1-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-propenderivaten - Darstellung von Wirkstoffen zur Beeinflussung der Arachidonsäurekaskade*“, *Dissertation, Halle*;
- [230] C. Kemal, P. Louis-Flemberg, R. Krupinski-Olsen, A.L. Shorter: (1987) „*Reductive inactivation of soybean lipoxygenase-I by catechols: A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity*“, *Biochemistry* 26, 7064-7072;
- [231] B.J. Gaffney: (1996) „*Lipoxygenases: Structural principles and spectroscopy*“, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure* 25, 431-459;
- [232] J.A. Garcia-Barrado, J.L. Gata, E. Santano, J.I. Solis, M.C. Pinto, P. Macias: (1999) „*The use of fluorescein 5'-isothiocyanate for studies of structural and molecular mechanisms of soybean lipoxygenase*“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 489-493;
- [233] M.M. Gleason, C.J. Rojas, K.S. Learn, M.H. Perrone, G.E. Bilder: (1995) „*Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: Comparison with soybean 15-lipoxygenase*“, *J. Am. Phys. Soc.*, 1301-1307;
- [234] A. Valenzuela, R. Guerra, L.A. Videla: (1986) „*Antioxidant properties of the flavonoids silybin and (+)-cyanidanol-3: Comparison with butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene*“, *Planta Medica*, 438-440;
- [235] J. Robak, Z. Duniec, H. Rzakowska-Bodalska, W. Olechnowicz-Stepien, W. Cisowski: (1986) „*The effect of some flavonoids on non-enzymatic lipid oxidation and enzymatic oxidation of arachidonic acid*“, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 38, 483-491;
- [236] A.F. Welton, J. Hurley, P. Will: (1988) „*Flavonoids and arachidonic acid metabolism*“, *Plant Flavonoids In Biology And Medicine II: Biochemical, Cellular, And Medicinal Properties*, A.R. Liss, Inc., 301-312;
- [237] C. Dehmlow, N. Murawski, H. De Groot: (1996) „*Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells*“, *Life Sciences* 58, 1591-1600;

- [238] M. Strasser, P. Cooper, B. Dewald, T. Payne: (1988) „*Design and synthesis of 5-lipoxygenase inhibitors*“, *Helv. Chim. Acta* 71, 1156-1169;
- [239] H. Suzuki, D. Miyauchi, S. Yamamoto: (1997) „*A selective inhibitor of arachidonate 5-lipoxygenase scavenging peroxide activator*“, *Biochem. Pharmacol.* 54, 529-532;
- [240] C.K. Lau, P.C. Belanger, J. Scheigetz, C. Dufresne, H.W.R. Williams, A.L. Maycock, Y. Guindon, T. Bach, A.L. Dallob, D. Denis, A.W. Ford-Hutchinson, P.H. Gale, S.L. Hopple, L.G. Letts, S. Luell, C.S. McFarlane, E. MacIntyre, R. Meurer, D.K. Miller, H. Piechuta, D. Riendeau, J. Rokach, C. Rouzer: (1989) „*Synthesis and Structure-activity relationships of a novel class of 5-lipoxygenase inhibitors. 2-(phenylmethyl)-4-hydroxy-3,5-dialkylbenzofurans: The development of L-656,224*“, *J. Med. Chem.* 32, 1190-1003;
- [241] J. Alanko, E. Sievi, T. Lähdeemäki, I. Mucha, H. Vapaatalo, J. Parantainen: (1998) „*Catechol estrogens as inhibitors of leukotriene synthesis*“, *Biochem. Pharmacol.* 55, 101-104;
- [242] N. Kohyama, T. Nagata, S. Fujimoto, K. Sekiya: (1997) „*Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives*“, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 347-350;
- [243] M.L. Hammond, I.E. Kopka, R.A. Zambias, C.G. Caldwell, J. Boger, F. Baker, T. Bach, S. Luell, D.E. MacIntyre: (1989) „*2,3-Dihydro-5-benzofuranols as antioxidant-based inhibitors of leukotriene biosynthesis*“, *J. Med. Chem.* 32, 1006-1020;
- [244] M. Juch, P. Rüedi: (1997) „*Isolation, structure, and biological activities of long-chain catechols of plectranthus sylvestris (labiatae)*“, *Helv. Chim. Acta* 80, 436-448;
- [245] D.R. Buckle, J. Bumstead, G.D. Clarke, K.A. Foster, H. Parr, J.F. Taylor, V.E. Thody, R.A.B. Webster: (1988) „*Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase by 2-benzylaminophenols*“, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 33, 29-33;
- [246] K. Müller, I. Gawlik: (1995) „*Novel 10-substituted antipsoriatic anthrones as inhibitors of epidermal 12-lipoxygenase and lipid peroxidation in membranes*“, *Biochem. Pharmacol.* 50, 2077-2083;
- [247] K. Müller, I. Gawlik: (1996) „*Inactivation of mouse epidermal 12-lipoxygenase by anthralin - implications for the role of oxygen radicals*“, *Biochem. Pharmacol.* 51, 1173-1179;
- [248] E.C. Ku, A. Raychaudhuri, G. Ghai, E.F. Kimble, W.H. Lee, C. Colombo, R. Dotson, T.D. Oglesby, J.W. Wasley: (1988) „*Characterization of CGS 8515 as a selective 5-lipoxygenase inhibitor using in vitro and in vivo models*“, *Biochim. Biophys. Acta* 959, 335-342;
- [249] E.C. Ku, A. Raychaudhuri, G. Ghai, E.F. Kimble, W.H. Lee, C. Colombo, R. Dotson, D. White, T.D. Oglesby, J.W. Wasley: (1989) „*Characterization of CGS 8515 as a selective 5-lipoxygenase (5-LO) inhibitor*“, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 19, 86-89;
- [250] K.T. Kruse-Elliott, N.C. Olson: (1993) „*CGS 8515 and indomethacin attenuate cytokine-induced cardiopulmonary dysfunction in pigs*“, *J. Am. Phys. Soc.*, 1076-1086;
- [251] C.H. Reynolds: (1988) „*Inactivation of soybean lipoxygenase by lipoxygenase inhibitors in the presence of 15-hydroperoxyicosatetraenoic acid*“, *Biochem. Pharmacol.* 37, 4531-4537;
- [252] M. Maccarrone, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, A. Finazzi-Agro: (1995) „*Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants*“, *Lipids* 30, 51-54;
- [253] E.N. Delicado, A.S. Ferrer, F.G. Carmona: (1997) „*A kinetic study of the one-electron oxidation of trolox c by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1335, 127-134;
- [254] C.E. Cooper, J.B. Porter: (1997) „*Ribonucleotide reductase, lipoxygenase and the intracellular low-molecular-weight iron pool*“, *Biochem. Soc. Transactions* 25, 75-80;
- [255] B. Summers, B.P. Gunn, J.G. Martin, H. Mazdiyasi, A.M. Goetze, P.R. Young, J.B. Bouska, R.D. Dyer, D.W. Brooks, G.W. Carter: (1987) „*In vivo characterization of hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase*“, *J. Med. Chem.* 30, 2121-2126;
- [256] J.B. Summers, B.P. Gunn, J.G. Martin, H. Mazdiyasi, A.O. Stewart, P.R. Young, A.M. Goetze, J.B. Bouska, R.D. Dyer, D.W. Brooks, G.W. Carter: (1988) „*Orally active hydroxamic acid inhibitors of leukotriene biosynthesis*“, *J. Med. Chem.* 31, 3-5;

- [257] J.B. Summers, K.H. Kim, H. Mazdiyasi, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, A.O. Stewart, R.D. Dyer, G.W. Carter: (1990) „*Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: Quantitative structure activity relationships*“, *J. Med. Chem.* 33, 992-998;
- [258] E.J. Corey, J.R. Cashman, S.S. Kantner, S.W. Wright: (1984) „*Rationally designed, potent competitive inhibitors of leukotriene biosynthesis*“, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1503-1504;
- [259] F.A.J. Kerdesky, J.H. Holms, S.P. Schmidt, R.D. Dyer, G.W. Carter: (1985) „*Eicosatetraenhydroxamates: inhibitors of 5-lipoxygenase*“, *Tetrahedron Lett.* 26, 2143-2146;
- [260] J.B. Summers, H. Mazdiyasi, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, R.D. Dyer, G.W. Carter: (1987) „*Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase*“, *J. Med. Chem.* 30, 574-580;
- [261] R.D. Abeyasinghe, P.J. Roberts, C.E. Cooper, K.H. MacLean, R.C. Hider, J.B. Porter: (1996) „*The environment of the lipoxygenase iron binding site explored with novel hydroxypyridinone iron chelators*“, *J. Biol. Chem.* 271, 7965-7972;
- [262] M.J. Nelson, D.G. Batt, J.S. Thompson, S.W. Wright: (1991) „*Reduction of the active-site iron by potent inhibitors of lipoxygenase*“, *J. Biol. Chem.* 266, 8225-8229;
- [263] S.R. Desmarais, D. Riendeau, M.J. Gresser: (1994) „*Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by a diaryl-N-hydroxyurea by reduction of the ferric enzyme*“, *Biochemistry* 33, 13391-13400;
- [264] J.-P. Falgouty, D. Denis, D. Macdonald, J.H. Hutchinson, D. Riendeau: (1995) „*Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5-lipoxygenase using photaffinity labeling and enzyme immobilization*“, *Biochemistry* 34, 13603-13611;
- [265] M.J. Nelson, B.A. Brennan, D.B. Chase, R.A. Cowling, G.N. Grove, R.C. Scarrow: (1995) „*Structure and kinetics of formation of catechol complexes of ferric soybean lipoxygenase-1*“, *Biochemistry* 34, 15219-15229;
- [266] C. Pham, J. Jankun, E. Skrzypczak-Jankun, R.A. Flowers, II, M.O. Funk, jr.: (1998) „*Structural and thermochemical characterization of lipoxygenase-catechol complexes*“, *Biochemistry* 37, 17952-17957;
- [267] R. Dupont, J.F. Goossens, N. Cotelle, L. Vrielynck, H. Vezin, J.P. Henichart, P. Cotelle: (2001) „*New bis-catechols 5-lipoxygenase inhibitors*“, *Bioorg. Med. Chem.* 9, 229-235;
- [268] A.O. Stewart, P.A. Bhatia, J.G. Martin, J.B. Summers, K.E. Rodrigues, M.B. Martin, J.H. Holms, J.L. Moore, R.A. Craig, T. Kolasa, J.D. Ratajczyk, H. Mazdiyasi, F.A.J. Kerdesky, S.L. DeNinno, R.G. Maki, J.B. Bouska, P.R. Young, C. Lanni, R. L. Bell, G.W. Carter, C.D.W. Brooks: (1997) „*Structure-activity relationships of N-hydroxyurea 5-lipoxygenase inhibitors*“, *J. Med. Chem.* 40, 1955-1968;
- [269] T. Kolasa, C.D.W. Brooks, K.E. Rodrigues, J.B. Summers, J.F. Dellaria, K.I. Hulkower, J. Bouska, R.L. Bell, G.W. Carter: (1997) „*Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as scaffolds for the design of 5-lipoxygenase inhibitors*“, *J. Med. Chem.* 40, 819-824;
- [270] G.W. Carter, P.R. Young, D.H. Albert, J. Bouska, R. Dyer, R.L. Bell, J.B. Summers, D.W. Brooks: (1991) „*5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton*“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 929-937;
- [271] T. Kirchner, B. Aparicio, D.C. Argentieri, C.Y. Lau, D.M. Ritchie: (1997) „*Effects of tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase/5-lipoxygenase, on events associated with NSAID-induced gastrointestinal inflammation*“, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56, 417-423;
- [272] J.A. Blain, G. Shearer: (1965) „*Comparison of antioxidants in primary and secondary oxidations*“, *J. Sci. Food Agric.* 17, 533-536;
- [273] P. Borgeat, B.F. De Lacos, S. Picard, J. Drapeau, P. Vallerand, E.J. Corey: (1982) „*Studies on the mechanism of formation of the 5S, 12S-dihydroxy-6,8,10,14(E,Z,E,Z)-icosatetraenoic acid in leucocytes*“, *Prostaglandins* 23, 713-724;
- [274] W.F. Nieuwenhuizen, A. Van der Kerk-Van Hoof, J.H. Van Lenthe, R.C. Van Schaik, K. Versluis, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1997) „*Lipoxygenase is irreversibly inactivated by the hydroperoxides from the enynic analogues of linoleic acid*“, *Biochemistry* 36, 4480-4488;
- [275] W.F. Nieuwenhuizen, J.H. van Lenthe, E.J. Blomsma, A.C. Van der Kerk-Van Hoof, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1997) „*Chemical and quantum mechanical studies of the free radical C-C bond formation in the lipoxygenase-catalyzed dimerisation of octadeca-9,12-diynoic acid*“, *Free Rad. Biol. & Med.* 22, 1101-1108;



- [276] W.F. Nieuwenhuizen: (1997) „**Irreversible inhibition of lipoxygenase by triple bond analogues of linoleic acid**“, *Proefschrift, Universiteit Utrecht, Nederlande*;
- [277] T.W. Hart: (1988) „**Prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and related arachidonic acid metabolites**“, *Natural Product Reports*, 1-45;
- [278] E.J. Corey, P.T. Lansbury, jr.: (1983) „**Stereochemical course of 5-lipoxygenation of arachidonate by rat basophil leukemic cell (RBL-1) and potatoe enzymes**“, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4093-4094;
- [279] E.J. Corey, P.T. Lansbury, jr., J.R. Cashman, S.S. Kantner: (1984) „**Mechanism of irreversible deactivation of arachidonate 5-lipoxygenase by 5,6-Dehydroarachidonate**“, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1501-1503;
- [280] W.F. Nieuwenhuizen, M.J. Schilstra, A. Van der Kerk-Van Hoof, L. Brandsma, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1995) „**Fe(III)-Lipoxygenase converts its suicide-type inhibitor octadeca-9,12-diynoic acid into 11-oxooctadeca-9,12-diynoic acid**“, *Biochemistry* 34, 10538-10545;
- [281] M.J. Schilstra, W.F. Nieuwenhuizen, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1996) „**Mechanism of lipoxygenase inactivation by the linoleic acid analogue octadeca-9,12-diynoic acid**“, *Biochemistry* 35, 3396-3401;
- [282] W.E.M. Lands, A.M. Hanel: (1983) „**Inhibitors and activators of prostaglandin biosynthesis**“, in „**Prostaglandins and related substances**“, Pace-Asciak, Granström (Eds.) Elsevier Science Publishers B.V., 203-223;
- [283] E.J. Corey, M. D'Alarcao, S.P.T. Matsuda: (1986) „**A new irreversible inhibitor of soybean lipoxygenase; relevance to mechanism**“, *Tetrahedron Lett.* 27, 3585-3588;
- [284] C.H. Clapp, A.M. McAskill, R. Moser: (1995) „**Action of soybean lipoxygenase-1 on 12-iodo-cis-9-octadecenoic acid and 12-bromo-cis-9-octadecenoic acid**“, *Biochemistry* 34, 264-272;
- [285] C.H. Clapp, J. McKown, H. Xu, A.M. Grandizio, G. Yang, J. Fayer: (2000) „**The action of soybean lipoxygenase-1 on 12-iodo-cis-9-octadecenoic acid: the importance of C11-H bond breaking**“, *Biochemistry* 39, 2603-2611;
- [286] D.P. Wallach, V.R. Brown: (1980) „**A novel preparation of human platelet lipoxygenase: Characteristics and inhibition by a variety of phenyl hydrazones and comparisons with other lipoxygenases**“, *Biochim. Biophys. Acta* 663, 361-372;
- [287] J. Baumann, G. Wurm: (1982) „**Soybean lipoxygenase-1 inhibition by ketone hydrazones**“, *Agents Actions* 12, 360-364;
- [288] A.M. Cuadro, J. Valenciano, J.J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, C. Sunkel, M.F. de Casa-Juana, M.P. Ortega: (1998) „**Synthesis and biological evaluation of 2,6-di-tert-butylphenol hydrazones as 5-lipoxygenase inhibitors**“, *Bioorg. Biomed. Chem.* 6, 173-180;
- [289] J.P. Mahy, S. Gaspard, D. Mansuy: (1993) „**Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxidase reactions of prostaglandin synthase: Formation of iron(III)-phenyl complexes**“, *Biochemistry* 32, 4014-4021;
- [290] M.J. Gibian, K. Singh: (1986) „**Irreversible inhibition of soybean lipoxygenase by phenyldiazene, autoxidizing phenylhydrazine and related materials**“, *Biochim. Biophys. Acta* 878, 79-92;
- [291] E. De Carolis, D. Denis, D. Riendeau: (1996) „**Oxidative inactivation of human 5-lipoxygenase in phosphatidylcholine vesicles**“, *Eur. J. Biochem.* 253, 416-423;
- [292] W. Smith, W. Lands: (1972) „**Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase**“, *J. Biol. Chem.* 247, 1038-1047;
- [293] P. Needleman, J. Turk, B.A. Jaschlik, A.R. Morrison, J.B. Lefkowitz: (1986) „**Arachidonic acid metabolism**“, *Annu. Rev. Biochem.* 55, 69-102;
- [294] R.A. Lepley, F.A. Fitzpatrick: (1994) „**Irreversible inactivation of 5-lipoxygenase by leukotriene A4. Characterization of product inactivation with purified enzyme and intact leukocytes**“, *J. Biol. Chem.* 269, 2627-2631;
- [295] T. Kuninori, J. Nishiyama, M. Shirakawa, A. Shimoyama: (1992) „**Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by n-alkohols and alkyl thiols**“, *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 49-55;
- [296] Z. Zhu, M.O. Funk, jr.: (1996) „**Lipoxygenase-1 inhibition with a series of half-product analogs**“, *Bioorgan. Chem.* 24, 95-109;

- [297] S. Sakuma, Y. Fujimoto, S. Tagano, M. Tsunimori, H. Nishida, T. Fujita: (1997) „*Effects of nonanal, trans-2-nonenal and 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal on cyclooxygenase and 12-lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets*“, *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 150-153;
- [298] P. Presenz: (1997) „*Lipoaminosäuren und Lipopeptide als potentielle 5- und 12-Lipoxygenase-Inhibitoren*“, *Pharmazie* 52, 164-165;
- [299] M.Y. Bobrov, A.V. Archakov, G.S. Kogteva, E.V. Fomina-Ageeva, G.N. Zinchenko, N.M. Gretskaya, D.V. Kuklev, V.V. Bezuglov: (1996) „*Kinetics of oxidation of ethanalamides of arachidonic (anandamide) and eicosapentaenoic acids by soybean 15-lipoxygenase*“, *Bioorg. Khim.* 22, 878-880;
- [300] V.V. Bezuglov, A.V. Archakov, M.Y. Bobrov, G.S. Kogteva, E.M. Manevich: (1996) „*Serotoninamide of arachidonic acid as an irreversible inhibitor of soybean 15-lipoxygenase*“, *Bioorg. Khim.* 22, 875-877;
- [301] Y. Fujimoto, M. Tsunomori, T. Sumiya, H. Nishida, S. Sakuma, T. Fujita: (1995) „*Effects of Fatty acyl Coenzyme A Esters on Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets*“, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 255-258;
- [302] V.V. Bezuglov, Y. Manevich, A.V. Archakov, M.Y. Bobrov, D.V. Kuklev, G.N. Petrukhina, V.A. Makarov, G.A. Buznikov: (1997) „*Artificially functionalized polyenoic fatty acids as new lipid bioregulators*“, *Russ. J. Bioorg. Chem.* 23, 190-198;
- [303] F. Haviv, J.D. Ratajczyk, R.W. De Net, Y.C. Martin, R.D. Dyer, G.W. Carter: (1986) „*Structural requirements for the inhibition of 5-lipoxygenase by 15-hydroxyeicosa-5,8,11,13-tetraenoic acid analogues*“, *J. Med. Chem.* 30, 254-263;
- [304] M. Profita, A. Sala, L. Riccobono, E. Pace, A. Paterno, S. Zarini, L. Siena, A. Mirabella, G. Bonsignore, A.M. Vignola: (2000) „*15(S)-HETE modulates LTB<sub>4</sub> production and neutrophil chemotaxis in chronic bronchitis*“, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, 1249-1258;
- [305] K. Petrich, P. Ludwig, H. Kühn, T. Schewe: (1996) „*The suppression of 5-lipoxygenation of arachidonic acid in human polymorphonuclear leucocytes by the 15-lipoxygenase product (15S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13Z)-eicosatetraenoic acid: Structure-activity relationship and mechanism of action*“, *Biochem. J.* 314, 911-916;
- [306] H. Wagner, M. Wierer, B. Fessler: (1987) „*Effects of garlic constituents on arachidonate metabolism*“, *Planta Med.* 53, 305-306;
- [307] C. Vavreckova, I. Gawlik, K. Müller: (1996) „*Benzophenanthridine alkaloids of chelidonium majus: Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism*“, *Planta Medica* 62, 397-401;
- [308] M. Inagaki, T. Tsuru, H. Jyoyama, T. Ono, K. Yamada, M. Kobayashi, Y. Hori, A. Arimura, K. Yasui, K. Ohno, S. Kakudo, K. Koizumi, R. Suzuki, M. Kato, S. Kawai, S. Matsumoto: (2000) „*Novel antiarthritic agents with 1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide (-sultam) skeleton: Cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase*“, *J. Med. Chem.* 43, 2040-2048;
- [309] J.M. Janusz, P.A. Young, J.M. Ridgeway, M.W. Scherz, K. Enzweiler, L.I. Wu, L. Gan, R. Darolia, R.S. Matthews, D. Hennes, D.E. Kellstein, S.A. Green, J.L. Tulich, T. Rosario-Jansen, I.J. Magrisso, K.R. Wehmeyer, D.L. Kühlenbeck, T.E. Eichhold, R.L.M. Dobson, S.P. Sirko, R.W. Farmer: (1998) „*New cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase inhibitors. 1. 7-tert-Butyl-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: Discovery and variation of the 5-keto substituent*“, *J. Med. Chem.* 41, 1112-1123;
- [310] J.M. Janusz, P.A. Young, J.M. Ridgeway, M.W. Scherz, K. Enzweiler, L.I. Wu, L. Gan, R. Darolia, R.S. Matthews, D. Hennes, D.E. Kellstein, S.A. Green, J.L. Tulich, T. Rosario-Jansen, I.J. Magrisso, K.R. Wehmeyer, D.L. Kühlenbeck, T.E. Eichhold, R.L.M. Dobson, S.P. Sirko, R.W. Farmer: (1998) „*New cyclooxygenase-2/5-Lipoxygenase inhibitors. 2. 7-tert-Butyl-2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: Variations of the dihydrobenzofuran ring*“, *J. Med. Chem.* 41, 1124-1137;
- [311] R. Schindler, I. Fleischhauer, N. Höfgen, W. Sauer, U. Egerland, H. Poppe, S. Heer, I. Szelenyi, B. Kutscher, J. Engel: (1998) „*1,5-Disubstituted indazol-3-ols with anti-inflammatory activity*“, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 331, 13-21;
- [312] T. Horizoe, N. Nagakura, K. Chiba, H. Shirota, M. Shinoda, N. Kobayashi, H. Numata, Y. Okamoto, S. Kobayashi: (1998) „*ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic-induced ear inflammation model*“, *Inflamm. Res.* 47, 375-383;

- [313] H. Safayhi, T. Mack, J. Sabieraj, M.I. Anazodo, L.R. Subramanian, H.P.T. Ammon: (1992) „**Boswellic acids: Novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase**“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1143-1146;
- [314] H. Safayhi, E.R. Sailer, H.P.T. Ammon: (1995) „**Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-*-boswellic acid***“, *Mol. Pharm.* 47, 1212-1216;
- [315] H. Safayhi, E.R. Sailer, H.P.T. Ammon: (1996) „**5-Lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-*-boswellic acid (AKBA)* by a novel mechanism**“, *Phytomedicine* 3, 71-72;
- [316] E.R. Sailer, S. Schweizer, S.E. Boden, H.P.T. Ammon, H. Safayhi: (1998) „**Characterization of an acetyl-11-keto-*-boswellic acid* and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling**“, *Eur. J. Biochem.* 256, 364-368;
- [317] E.R. Sailer, R.F. Hoernlein, H.P.T. Ammon, H. Safayhi: (1996) „**Structure-activity relationships of the nonredox-type non-competitive leukotriene biosynthesis inhibitor acetyl-11-keto-*-boswellic acid***“, *Phytomedicine* 3, 73-74;
- [318] E.R. Sailer, L.R. Subramanian, B. Rall, R.F. Hoernlein, H.P.T. Ammon, H. Safayhi: (1996) „**Acetyl-11-keto-*-boswellic acid (AKBA)*: Structural requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity**“, *Brit. J. Pharmacol.* 117, 615-618;
- [319] T. Furuya, Y. Shinayama, N. Nagata, T. Tomimori, T. Satoh, K. Ohtsuki: (1997) „**Biochemical characterization of selective inhibitors for a glycyrrhizin-binding lipoxygenase from soybeans**“, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 495-500;
- [320] S.A. Beers, E.A. Malloy, W. Wu, M. Wachter, J. Ansell, M. Singer, M. Steber, A. Barbone, T. Kirchner, D. Ritchie, D. Argentieri: (1997) „**N-(5-Substituted)thiophene-2-alkylsulfonamides as potent inhibitors of 5-lipoxygenase**“, *Bioorg. Biomed. Chem.* 5, 779-786;
- [321] J.R. Galpin, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Boldingh: (1978) „**The interaction of nitric oxide with soybean lipoxygenase-1**“, *Biochim. Biophys. Acta* 536, 356-362;
- [322] R. Wiesner, J. Rathmann, H.G. Holzhütter, R. Stosser, K. Mader, H. Nolting, H. Kühn: (1996) „**Nitric oxide oxidises a ferrous mammalian lipoxygenase to a pre-activated ferric species**“, *FEBS Lett.* 389, 229-232;
- [323] H.G. Holzhütter, R. Wiesner, J. Rathmann, R. Stosser, H. Kühn: (1997) „**A kinetic model for the interaction of nitric oxide with a mammalian lipoxygenase**“, *Eur. J. Biochem.* 245, 608-616;
- [324] Y. Fujimoto, S. Tagano, K. Ogawa, S. Sakuma, T. Fujita: (1998) „**Comparison of the effects of nitric oxide and peroxynitrite on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets**“, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 59, 95-100;
- [325] M.J. Coffey, S.M. Phare, M. Peters-Golden: (2000) „**Prolonged Exposure to Lipopolysaccharide Inhibits Macrophage 5-Lipoxygenase Metabolism Via Induction of Nitric Oxide Synthesis**“, *J. Immunol.* 165, 3592-3598;
- [326] A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies: (1984) „**A novel biologically active seleno-organic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen)**“, *Biochem. Pharmacol.* 33, 3235-3239;
- [327] M. Walther, H.G. Holzhütter, R.J. Kuban, R. Wiesner, J. Rathmann, H. Kühn: (1999) „**The inhibition of mammalian 15-lipoxygenase by the anti-inflammatory drug ebselen: Dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere**“, *Mol. Pharm.* 56, 195-203;
- [328] P.J. Vickers: (1995) „**5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP)**“, *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 12, 185-194;
- [329] T.G. Brock, R.W. McNish, M. Peters-Golden: (1995) „**Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages**“, *J. Biol. Chem.* 270, 21652-21658;
- [330] S. Battu, S. Moalic, M. Rigaud, J.B. Beneytout: (1998) „**Linoleic acid peroxidation by solanum tuberosum lipoxygenase was activated in the presence of human 5-lipoxygenase-activating protein**“, *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 340-350;
- [331] A.W. Ford-Hutchinson: (1991) „**FLAP: A novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes**“, *TIPS* 12, 68-70;

- [332] T. Kolasa, P. Bhatia, C.D.W. Brooks, K.I. Hulkower, J.B. Bouska, R.R. Harris, R.L. Bell: (1997) „*Synthesis of indolylalkoxyiminoalkylcarboxylates as leukotriene biosynthesis inhibitors*“, *Bioorg. Med. Chem.* 5, 507-514;
- [333] J.H. Musser, D.M. Kubrak, J. Chang, A.L. Lewis: (1986) „*Synthesis of [(naphthalenylmethoxy)- and [(quinolinylmethoxy)phenyl]amino]oxoalkanoic acid esters. A novel series of leukotriene D<sub>4</sub> antagonists and 5-lipoxygenase inhibitors*“, *J. Med. Chem.* 29, 1429-1435;
- [334] J.H. Musser, A.F. Kreft: (1992) „*5-Lipoxygenase: Properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridged)aryl class of inhibitors*“, *J. Med. Chem.* 35, 2501-2524;
- [335] A.F. Kreft, L.A. Marshall, A. Wong: (1994) „*Structure-activity relationships in the quinoline-containing class of inhibitors of 5-lipoxygenase (5-LO) enzyme translocation and activation*“, *Drugs Future* 19, 255-264;
- [336] A. Hatzelmann, R. Fruchtmann, K.H. Mohrs, S. Raddatz, M. Matzke, U. Pleiss, J. Keldenich, R. Müller-Peddinghaus: (1994) „*Mode of action of the leukotriene synthesis (FLAP) inhibitor BAY x 1005: Implications for biological regulation of 5-lipoxygenase*“, *Agents Actions* 43, 64-68;
- [337] S. Murthy, N.S. Murthy, D. Coppoia, D.L. Wood: (1997) „*The efficacy of BAY y 1015 in dextran sulfate model of mouse colitis*“, *Inflamm. Res.* 46, 224-233;
- [338] J.H. Hutchinson, S. Charleson, J.F. Evans, J.-P. Falgueyret, K. Hoogsteen, T.R. Jones, S. Kargman, D. Macdonald, C.S. McFarlane, D.W. Nicholson, H. Piechuta, D. Riendeau, J. Scheiget, M. Therien, Y. Girard: (1995) „*Thiopyranol[2,3,4-c,d]indoles as inhibitors of 5-lipoxygenase, 5-lipoxygenase-activating protein, and leukotriene C<sub>4</sub> synthase*“, *J. Med. Chem.* 38, 4538-4547;
- [339] N. Desideri, I. Sestili, M.L. Stein, S. Manarini, G. Dell'Elba, C. Cerletti: (1997) „*N- -Carbethoxypropyl-4-quinolones: A new class of leukotriene biosynthesis inhibitors*“, *Arch. Pharm. Med. Chem.* 330, 100-106;
- [340] C.D. Brooks, A.O. Stewart, T. Kolasa, A. Absha, P. Bhatia, J.D. Ratajczyk, R.A. Craig, D. Gunn, R.R. Harris, J.B. Bouska, P.E. Malo, R.L. Bell, G.W. Carter: (1998) „*Design of inhibitors of leukotriene biosynthesis and their therapeutic potential*“, *Pure & Appl. Chem.* 70, 271-274;
- [341] D.W. Snyder, J.H. Fleisch: (1989) „*Leukotriene receptor antagonist as potential therapeutic agents*“, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29, 123-143;
- [342] A. Shaw, R.D. Krell: (1991) „*Peptide Leukotrienes: Current status of research*“, *J. Med. Chem.* 34, 1235-1243;
- [343] M. Toda, Y. Arai, M. Hayashi: (1985) „*Analogs of leukotrienes and related lipoxygenase products*“, *Adv. Prost. Thromb. Leuk. Res.* 14, 427-436;
- [344] A.F. Kreft, D.H. Klaubert, S.C. Bell, T.W. Pattison, J.P. Yardley, R.P. Carlson, J.M. Hand, J.Y. Chang, A.J. Lewis: (1986) „*Novel 1,3-Bis(aryloxy)propanes as leukotriene D<sub>4</sub> antagonists*“, *J. Med. Chem.* 29, 1134-1138;
- [345] W.M. Abraham, J.S. Stevenson, R. Garrido: (1988) „*The effect of an orally active leukotriene (LT) D<sub>4</sub> antagonist Wy-48,252 on LTD<sub>4</sub> and antigen-induced Bronchokonstriction in allergic sheep*“, *Prostaglandins* 35, 733-745;
- [346] C.D.W. Brooks, J.B. Summers: (1996) „*Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation*“, *J. Med. Chem.* 39, 2629-2654;
- [347] M. Schulz: (1998) „*Montelukast bereichert die Asthmatherapie*“, *Pharmazeutische Zeitung* 143, 2938-2944;
- [348] J.-B. Galey, S. Bombard, C. Chopard, J.-J. Girerd, F. Lederer, D.-C. Thang, N.-H. Nam, D. Mansuy, J.-C. Chottard: (1988) „*Hexanal phenylhydrazone is a mechanism-based inactivator of soybean lipoxygenase-1*“, *Biochemistry* 27, 1058-1066;
- [349] S. Bombard, C. Chopard-Casadevall, J.C. Chottard: (1993) „*A new peroxidase pathway for soybean lipoxygenase-1*“, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 130, 414-427;
- [350] A.L. Baumstark, P.C. Vasquez: (1983) „*Oxidation of Sulfides by Acyclic Alpha-Azohydroperoxides*“, *J. Org. Chem.* 48, 65-69;
- [351] A.L. Baumstark: (1986) „*Electrophilic Oxygen-Atom Transfer Chemistry of  $\alpha$ -Azohydroperoxides*“, *Bioorg. Chem.* 14, 326-343;

- [352] B. Härtel, P. Ludwig, T. Schewe, S.M. Rapoport: (1982) „*Self-inactivation by 13-hydroperoxylinoleic acid and lipohydroperoxidaseactivity of the reticulocyte lipoxygenase*“, *Eur. J. Biochem.* 126, 353-357;
- [353] S.M. Rapoport, B. Härtel, G. Hausdorf: (1984) „*Methionine sulfoxide formation: The cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase*“, *Eur. J. Biochem.* 139, 573-576;
- [354] B. Härtel, H. Kühn, S.M. Rapoport: (1985) „*Methionine sulfoxide formation – The cause of self-inactivation of lipoxygenases*“, *Proceedings of the 16<sup>th</sup> FEBS Congress, part A*, VNU Science Press, 299-304;
- [355] T. Nguyen, J.P. Falguyret, M. Abramovitz, D. Riendeau: (1991) „*Evaluation of the role of conserved His and Met residues among lipoxygenases by site-directed mutagenesis of recombinant human 5-lipoxygenase*“, *J. Biol. Chem.* 266, 22057-22062;
- [356] Q.F. Gan, G.L. Witkop, D.L. Sloane, K.M. Straub, E. Sigal: (1995) „*Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxygenase which is oxygenated by the enzyme produkt 13-HPODE: Dissociation of sulfoxide formation from self-inaktivtion*“, *Biochemistry* 34, 7069-7079;
- [357] K.M. Richards, L.J. Marnett: (1997) „*Leukocyte 12-lipoxygenase: Expression, purification, and investigation of the role of methionine residues in turnover-dependent inactivation and 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid inhibition*“, *Biochemistry* 36, 6692-6699;
- [358] N. Brot, H. Weissbach: (1988) in „*The chemistry of sulphones and sulfoxides*“, S. Patai, Z. Rapoport (Eds.) Wiley, New York, 851-872;
- [359] J. Moskovitz, H. Weissbach, N. Brot: (1996) „*Cloning and expression of a mammalian gene involved in the reduction of methionine sulfoxide residues in proteins*“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2095-2099;
- [360] K. Beatty, J. Bieth, J. Travis: (1980) „*Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor and  $\alpha$ -1-antichymotrypsin*“, *J. Biol. Chem.* 255, 3931-3934;
- [361] N. Brot, H. Weissbach: (1983) „*Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins*“, *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 271-281;
- [362] H. Kühn, Holzhütter, T. Schewe, C. Hiebsch, S.M. Rapoport: (1984) „*The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids*“, *Eur. J. Biochem.* 139, 577-583;
- [363] H.G. Viehe, R. Merenyi, L. Stella, Z. Janousek: (1979) „*Captodative Substituenteneffekte bei der Synthese mit Radikalen und Radikalophilen*“, *Angew. Chem.* 91, 982-997;
- [364] P. Provost, Y. Merhi: (1996) „*BW 755c, a dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, reduces mural platelet and neutrophil deposition and vasoconstriction after angioplasty injury in pigs*“, *J. Pharm. Exp. Ther.* 277, 17-21;
- [365] D. Mansuy, C. Cucurou, B. Biatry, J.P. Battioni: (1988) „*Soybean lipoxygenase-catalyzed oxidations by linoleic acid hydroperoxide: Different reducing substrates and dehydrogenation of phenidone and BW 755c*“, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 151, 339-346;
- [366] C. Cucurou, J.P. Battioni, D.C. Thang, N.H. Nam, D. Mansuy: (1991) „*Mechanisms of inactivation of lipoxygenases by phenidone and BW 755c*“, *Biochemistry* 30, 8964-9870;
- [367] K. Rauscher, J. Voigt, I. Wilke, K.-T. Wilke: (1968) „*Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*“, Deutscher Verlag, Leipzig, 4. Auflage;
- [368] J. Mädler: (1988) „*In vitro-Testung potentieller Lipoxygenaseinhibitoren*“, Diplomarbeit, Halle;
- [369] B. Lindner: (1989) „*In vitro-Testung potentieller Lipoxygenaseinhibitoren*“, Diplomarbeit, Halle;
- [370] K. Koch: (1991) „*In vitro-Testung potentieller Lipoxygenaseinhibitoren*“, Diplomarbeit, Halle;
- [371] R. Fleischer: (1995) „*QSAR-Analyse von substituierten Amidrazonen durch statistische und Molecular-Modeling-Verfahren*“, Diplomarbeit, Halle;
- [372] H.-H. Rüttinger, A. Radschuweit: (2000) „*Determination of peroxides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection*“, *J. Chromatogr. A* 868, 127-134;
- [373] G. Ple: (1975) „*Diamino-1,2 ethylenes. Action de reactifs electrophiles. Voie d'accès a des enediamines C-substituees par des groupes anilide, thioanilide, sulfones et a des dialkylaminonitrocyclobutanes*“, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2213-2216;

- [374] F. Piozzi, G. Favini: (1955) „*The sandmeyer isatin synthesis: Cyclization of isonitrosoacetanilides with polyphosphoric acid*“, *Atti Acad. Nazl. Lincei, Rend., Classe Sci. Fis., Mat. E Nat.* 18, 647-654; CA50:10076h;
- [375] T. Tezuka, K. Sasaki, N. Narita, M. Fujita, K. Ito, T. Otsuka: (1989) „*Thermal high yield aromatic arylation with  $\alpha$ -azohydroperoxide (part 1). A novel free radical aromatic arylation reaction*“, *Tetrahedron Lett.* 30, 963-966;
- [376] J. Vago, J. Paal-Lukacs: (1989) „*On the stability and decomposition of phenyl(phenylazo)methyl hydroperoxide*“, *Tetrahedron Lett.* 30, 5773-5776;
- [377] G. Jander, E. Blasius: (1995) „*Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*“, S. Hirzel Verlag Stuttgart;
- [378] G. Borkow, R.S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G.I. Dmitrienko, M.A. Parniak: (1997) „*Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone*“, *Biochemistry* 36, 3179-3185;
- [379] C.M. Lanthier, M.A. Parniak, G.I. Dmitrienko: (1997) „*Inhibition of carboxypeptidase A by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone*“, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 1557-1562;
- [380] L. Massieu, A. Rivera, R. Tapia: (1994) „*Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-g-glutamyl hydrazone in the developing rat*“, *Neurochem. Res.* 19, 183-188;
- [381] W.R. Davis, J. Tomsho, S. Nikam, E.M. Cook, D. Somand, J.A. Peliska: (2000) „*Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-catalyzed DNA strand transfer reactions by 4-chlorophenylhydrazone of mesoxalic acid*“, *Biochemistry* 39, 14279-14291;
- [382] T. Köhler: (1985) „*Beiträge zur Auffindung von Inhibitoren der Phospholipase A<sub>2</sub>*“, Dissertation, Halle;
- [383] R. Keilhau: (1991) „*Struktur-Wirkungsbeziehungen  $\alpha,\alpha$ -Captodativ substituierter Formyliden-phenylhydrazine*“, Dissertation, Halle;
- [384] P. Froberg: (1994) „*1-Arylhydrazono-2-oxoadipinsäure-1-chloride als Ausgangsverbindungen für die Synthese potentieller Inhibitoren ausgewählter Enzyme der Arachidonsäurekaskade*“, Dissertation, Halle;
- [385] U. Kürschner, A. Simon: (1998) „*Testung potentieller COX-Hemmer an ausgewählten in-vitro/in-vivo Modellen*“, Diplomarbeit, Halle;
- [386] J.A. Furch, D.G. Kuhn, D.A. Hunt, M. Asselin, S.P. Baffic, R.E. Diehl, Y.L. Palmer, S.H. Trotto: (1998) in „*Amidrazones: A new class of coleopteran insecticides*“, D.R. Baker, J.G. Fenyes, G.S. Basarab, D.A. Hunt (Eds.) ACS Symposium Series 686, 178-184;
- [387] S. Kadler: (1990) „*Beiträge zum Hemmechanismus von Amidrazonen an Lipoxygenase aus Sojabohne*“, Diplomarbeit, Halle;
- [388] P. Harenberg: (1987) „*Beiträge zur Synthese von Amidrazonen als potentielle Lipoxygenasehemmer*“, Dissertation, Halle;
- [389] M. Heinisch: (1988) „*Zum Verlauf der Oxydation ausgewählter Amidrazone*“, Diplomarbeit, Halle;
- [390] W. Pöppel: (1994) „*Beiträge zur Darstellung, Reaktivität und spektroskopischen Charakterisierung potentiell lipoxygenase-inhibierender Amidrazone*“, Dissertation, Halle;
- [391] M.R. Egmond, M. Brunori, P.M. Fasella: (1976) „*The steady-state kinetics of the oxygenation of linoleic acid catalysed by soybean lipoxygenase*“, *Eur. J. Biochem.* 61, 93-100;
- [392] P. Froberg, persönliche Mitteilungen
- [393] S.G. Waley: (1980) „*Kinetics of suicide substrates*“, *Biochem. J.* 185, 771-773;
- [394] S.G. Waley: (1985) „*Kinetics of suicide substrates*“, *Biochem. J.* 227, 843-849;
- [395] C. Walsh: (1982) „*Suicide substrates: Mechanism-based enzyme inactivators*“, *Tetrahedron* 38, 871-909;
- [396] C.E. Catalano, S.J. Benkovic: (1989) „*Inactivation of DNA polymerase I (Klenow fragment) by adenosine 2',3'-epoxide 5'-triphosphate: Evidence for the formation of a tight-binding inhibitor*“, *Biochemistry* 28, 4374-4382;
- [397] A. Cornish-Bowden: (1974) „*A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors*“, *Biochem. J.* 137, 143-144;

- [398] A. Schellenberger: (1989) „*Enzymkatalyse*“, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1. Auflage;
- [399] J. Lasch: (1987) „*Enzymkinetik*“, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1. Auflage;
- [400] J. Lüthje: (1990) „*Enzymkinetik*“, Urban & Schwarzenberg, Berlin, 1. Auflage;
- [401] H. Bisswanger: (2000) „*Enzymkinetik: Theorie und Methoden*“, VCH, Weinheim, 3. Auflage;
- [402] K.F. Tipton: (1973) „*Commentary: Enzyme kinetics in relation to enzyme inhibitors*“, *Biochem. Pharmacol.* 22, 2933-2941;
- [403] I. Segel: (1993) „*Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*“, *Wiley Classics Library Edition*, New York, 1. Auflage;
- [404] J.F. Morrison: (1969) „*Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors*“, *Biochim. Biophys. Acta* 185, 269-286;
- [405] J.W. Williams, J.F. Morrison: (1979) „*The kinetics of reversible tight-binding inhibition*“, *Methods Enzymol.* 63, 436-467;
- [406] S. Cha: (1975) „*Tight-binding inhibitors – I: Kinetic behavior*“, *Biochem. Pharmacol.* 24, 2177-2185;
- [407] S. Cha, R.P. Agarwal, R.E. Parks: (1975) „*Tight-binding inhibitors – II: Non-steady state nature of inhibition of milk xanthine oxidase by allopurinol and alloxanthine and of human erythrocytic adenosine deaminase by cofornycin*“, *Biochem. Pharmacol.* 24, 2187-2197;
- [408] S. Cha: (1976) „*Tight-binding inhibitors – III: A new approach for the determination of competition between tight-binding inhibitors and substrates – inhibition of adenosine deaminase by cofornycin*“, *Biochem. Pharmacol.* 25, 2695-2702;
- [409] Y.-C. Cheng, W.H. Prusoff: (1973) „*Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction*“, *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108;
- [410] R.A. Copeland: (1996) „*Tight-binding inhibitors*“, in „*Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*“, VCH Publishers, Inc. New York, 225-236;
- [411] J.F. Morrison, C.T. Walsh: (1988) „*The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors*“, *Adv. Enzymol.* 61, 201-301;
- [412] S.E. Szedlaczek, R.G. Duggleby: (1995) „*Kinetics of slow and tight-binding inhibitors*“, *Methods Enzymol.* 249, 144-180;
- [413] M. Page: (1990) „*Enzyme inhibition*“, in „*Comprehensive medicinal chemistry*“, Vol. 2: „*Enzymes & other molecular targets*“, C. Hansch (Ed.) Pergamon Press, 61-83;
- [414] X. Lu, R.B. Silverman: (1998) „*Inactivation of monoamine oxidase B by cis- and trans-5-aminomethyl-3-(4-methoxyphenyl)dihydrofuran-2(3H)-ones*“, *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1851-1856;
- [415] U. Neumann, M. Gütschow: (1994) „*N-(sulfonyloxy)phthalimides and analogues are potent inactivators of serine proteases*“, *J. Biol. Chem.* 269, 21561-21567;
- [416] U. Neumann, M. Gütschow: (1995) „*3,1-Benzothiazin-4-ones and 3,1-benzoxazin-4-ones: Highly different activities in chymotrypsin inactivation*“, *Bioorg. Chem.* 23, 72-88;
- [417] J. Charlton, G.P. Kirschenheuter, D. Smith: (1997) „*Highly potent irreversible inhibitors of neutrophil elastase generated by selection from randomized DNA-valine phosphonate library*“, *Biochemistry* 36, 3018-3026;
- [418] U. Neumann, M. Gütschow: (1997) „*Inhibition of cathepsin G by 4H-3,1-benzoxazin-4-ones*“, *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1935-1942;
- [419] R.A. Copeland, K.Y. Horiuchi: (1998) „*Kinetic effects due to nonspecific substrate-inhibitor interactions in enzymatic reactions*“, *Biochem. Pharmacol.* 55, 1785-1790;
- [420] J.F. Morrison: (1982) „*The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions*“, *TIBS*, 102-105;
- [421] M.J. Sculley, J.F. Morrison: (1986) „*The determination of kinetic constants governing the slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions*“, *Biochim. Biophys. Acta* 874, 44-53;
- [422] M.J. Sculley, J.F. Morrison, W.W. Cleland: (1996) „*Slow-binding inhibition: The general case*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1298, 78-86;

- [423] S. Falk, N. Quilianova, A. Berteloot: (1999) „*Kinetic mechanisms of inhibitor binding: Relevance to the fast-acting slow-binding paradigm*“, *Biophys. J.* 77, 173-188;
- [424] K. Brocklehurst: (1979) „*The equilibrium assumption is valid for the kinetic treatment of most time-dependent protein-modification reactions*“, *Biochem. J.* 181, 775-778;
- [425] E.S. Lightcap, R.E. Silverman: (1996) „*Slow-binding inhibition of -aminobutyric acid aminotransferase by hydrazine analogues*“, *J. Med. Chem.* 39, 686-694;
- [426] A. Baici, R. Pelloso, D. Hörler: (1990) „*The kinetic mechanism of inhibition of human leukocyte elastase by MR 889, a new cyclic thiolic compound*“, *Biochem. Pharmacol.* 39, 919-924;
- [427] K.A. Connors: (1987) „*Binding constants*“, John Wiley & Sons, New York, 21-101;
- [428] K.T. Douglas, M.T. Wilson: (1984) „*Aspects of kinetic techniques in enzymology*“, in „*The chemistry of enzyme action*“, M.I. Page (Ed.) Elsevier Publishers B.V., 111-126;
- [429] L.M. Van der Heijdt, M.J. Schilstra, M.C. Feiters, H.-F. Nolting, C. Hermes, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1995) „*Changes in the iron coordination sphere of Fe(II) lipoxygenase-1 from soybeans upon binding of linoleate or oleate*“, *Eur. J. Biochem.* 231, 186-191;
- [430] L.M. Van der Heijdt, M.C. Feiters, S. Navartnam, H.-F. Nolting, C. Hermes, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1992) „*X-ray absorption spectroscopy of soybean lipoxygenase-1. Influence of lipid hydroperoxide activation and lyophilization on the structure of the non-heme iron active site.*“, *Eur. J. Biochem.* 207, 793-802;
- [431] L. Lomnitski, R. Bar-Natan, D. Sklan, S. Grossman: (1993) „*The interaction between beta-carotene and lipoxygenase in plant and animal systems*“, *Biochim. Biophys. Acta* 1167, 331-338;
- [432] T.-C. Chou: (1977) „*On the determinig of availability of ligand binding sites in steady-state systems*“, *J. Theor. Biol.* 65, 345-356;
- [433] T.-C. Chou, P. Talaly: (1981) „*Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors*“, *Eur. J. Biochem.* 115, 207-216;
- [434] M.C. Beerenbaum: (1989) „*What is synergy?*“, *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141;
- [435] A. Baici: (1987) „*Graphical and statistical analysis of hyperbolic tight-binding inhibition*“, *Biochem. J.* 244, 793-796;
- [436] A. Baici: (1981) „*The specific velocity plot: a graphical method for determining inhibition parameters for both linear and hyperbolic enzyme inhibitors*“, *Eur. J. Biochem.* 119, 9-14;
- [437] M. Yoshino: (1987) „*A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors*“, *Biochem. J.* 248, 815-820;
- [438] R. Brdicka: (1990) „*Grundlagen der physikalischen Chemie*“, 15. Auflage, DVW, Berlin, 714-731;
- [439] P.W. Atkins: (1990) „*Physikalische Chemie*“, VCH Weinheim, 716-729;
- [440] A.L. Tappel, W.O. Lundberg, P.D. Boyer: (1953) „*Effect of temperature and antioxidants upon lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate*“, *Arch. Biochem. Biophys.* 42, 293-304;
- [441] W. Halangk, T. Schewe, C. Hiebsch, S.M. Rapoport: (1976) „*Some properties of the lipoxygenase from rabbit reticulocytes*“, *Acta Biol. Med. Germ.* 36, 405-410;
- [442] H. Kühn, R. Götze, T. Schewe, S.M. Rapoport: (1981) „*Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin: A model for lipoxygenases*“, *Eur. J. Biochem.* 120, 161-168;
- [443] H. Yanagisawa, E. Hirasawa, Y. Suzuki: (1981) „*Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotyls*“, *Phytochemistry* 20, 2105-2108;
- [444] A. Padiglia, R. Medda, J.Z. Pedersen, A. Lorrari, P. Pec, I. Frebort, G. Floris: (1998) „*Inhibitors of plant copper amine oxidases*“, *J. Enz. Inhib.* 13, 311-325;
- [445] R. Mogul, E. Johansen, T.R. Holman: (2000) „*Oleyl sulfate reveals allosteric inhibition of soybean lipoxygenase-1 and human 15-lipoxygenase*“, *Biochemistry* 39, 4801-4807;
- [446] O.V. Kharchenko, H.I. Kulinichenko, I.A. Butovich: (1999) „*Kinetic mechanisms of linoleic acid oxidation by 5-lipoxygenase from solanum tuberosum L.*“, *Ukr. Biokhim. Zh.* 71, 40-44;



- [447] V.L. Schramm: (1998) „*Enzymatic transition states and transition state analog design*“, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 693-720;
- [448] J.T. Bolin, D.J. Filman, D.A. Matthews, R.C. Hamlin, J. Kraut: (1982) „*Crystal structures of Escherichia coli and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. I. General features and binding of methotrexate*“, *J. Biol. Chem.* 257, 13650-13662;
- [449] J.W. Williams, J.F. Morrison, R.G. Duggleby: (1979) „*Methotrexate, a high-affinity pseudosubstrate of dihydrofolate reductase*“, *Biochemistry* 18, 2567-2574;
- [450] D.L. Boger, N.-E. Haynes, M.S. Warren, J. Ramcharan, P.A. Kitos, S.J. Benkovic: (1997) „*Functionalized analogues of 5,8,10-trideazafolate: Development of an enzyme-assembled tight-binding inhibitor of GARTfase and a potential irreversible inhibitor of AICARTfase*“, *Bioorg. Med. Chem.* 5, 1839-1846;
- [451] V. Cody, N. Galitsky, J.R. Luft, W. Pangborn, A. Rosowsky, R.L. Blakley: (1997) „*Comparison of two independent crystal structures of human dihydrofolate reductase ternary complexes reduced with nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and the very tight-binding inhibitor PT523*“, *Biochemistry* 36, 13897-13903;
- [452] S.P. Sanghani, R.G. Moran: (1997) „*Tight-binding of folate substrates and inhibitors to recombinant mouse glycylamide ribonucleotide formyltransferase*“, *Biochemistry* 36, 10506-10516;
- [453] A.J. Pope, K.J. Moore, M. McVey, L. Mensah, N. Benson, N. Osbourne, N. Broom, M.J.B. Brown, P. O'Hanlon: (1998) „*Characterization of isoleucyl-tRNA synthetase from staphylococcus aureus*“, *J. Biol. Chem.* 273, 31691-31701;
- [454] Y.-L. Zhang, Y.-F. Keng, Y. Zhao, L. Wu, Z.-Y. Zhang: (1998) „*Suramin is an active site-directed, reversible, and tight-binding inhibitor of protein-tyrosine phosphatases*“, *J. Biol. Chem.* 273, 12281-12287;
- [455] R.R. Annand, J.R. Dahlen, C.A. Sprecher, P. de Dreu, D.C. Foster, J.A. Mankovich, R.V. Talanian, W. Kisiel, D.A. Giegel: (1999) „*Caspase-1 (interleukin-1 -converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9*“, *Biochem. J.* 342, 655-665;
- [456] M.K. Ellis, A.C. Whitfield, L.A. Gowans, T.R. Auton, W. McLean-Provan, E.A. Lock, D.L. Lee, L.L. Smith: (1996) „*Characterization of the interaction of 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-4,4,6,6-tetramethylcyclohexane-1,3,5-trione with rat hepatic 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*“, *Chem. Res. Tox.* 9, 24-27;
- [457] K. Okamoto, T. Nishino: (1995) „*Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight-binding inhibitor*“, *J. Biol. Chem.* 270, 7816-7821;
- [458] J. Shen: (1997) „*A theoretical investigation of tight-binding thermolysin inhibitors*“, *J. Med. Chem.* 40, 2953-2958;
- [459] K.B. Taylor, L.J. Windsor, N.C.M. Caterina, M.K. Bodden, J.A. Engler: (1996) „*The mechanism of inhibition of collagenase by TIMP-1*“, *J. Biol. Chem.* 271, 23938-23945;
- [460] J. Barnard, G. Borkow, M.A. Parniak: (1997) „*The thiocarboxanilide nonnucleoside UC781 is a tight-binding inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase*“, *Biochemistry* 36, 7786-7792;
- [461] E.P. Garvey, J.A. Oplinger, E.S. Furfine, R.J. Kiff, F. Laszlo, B.J.R. Whittle, R.G. Knowles: (1997) „*1400W Is a slow, tight-binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo*“, *J. Biol. Chem.* 272, 4959-4963;
- [462] R. Shapiro, J.F. Riordan: (1984) „*Inhibition of angiotensin converting enzyme: Mechanism and substrate dependence*“, *Biochemistry* 23, 5225-5233;
- [463] M.L. Moss, P. Kuzmic, J.D. Stuart, G. Tian, A.G. Peranteau, S.V. Frye, S.H. Kadwell, T.A. Kost, L.K. Overton, I.R. Patel: (1996) „*Inhibition of human steroid 5 $\alpha$ -reductases type I and II by 6-aza-steroids: Structural determinants of one-step vs two-step mechanism*“, *Biochemistry* 35, 3457-3464;
- [464] M.A. Gibbs, K.L. Kunze, W.N. Howald, K.E. Thummel: (1999) „*Effect of inhibitor depletion on inhibitory potency: Tight binding inhibition of CYP3A by clotrimazole*“, *Drug Metabol. Disp.* 27, 596-599;
- [465] N. Borges, M.A. Vieira-Coelho, A. Parada, P. Soares-Da-Silva: (1997) „*Studies on the tight-binding nature of tolcapone inhibition of soluble and membrane-bound rat brain catechol-O-methyltransferase*“, *J. Pharm. Exp. Therap.* 282, 812-817;

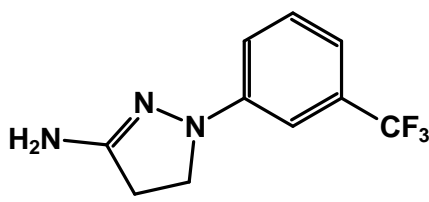
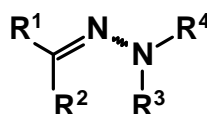
- [466] S. Lindsey, H.J. Harwood, jr.: (1995) *Inhibition of mammalian squalene synthetase activity by zaragozic acid a is a result of competitive inhibition followed by mechanism-bases irreversible inactivation*“, *J. Biol. Chem.* 270, 9083-9096;
- [467] R.A. Copeland, J.M. Williams, J. Giannaras, S. Nurnberg, M. Covington, D. Pinto, S. Pick, J. M. Trzaskos: (1994) „*Mechanism of selektive inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase*“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11202-11206;
- [468] L.J. Marnett, A.S. Kalgutkar: (1998) „*Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents*“, *Current Opinion in Chem. Biol.* 2, 482-490;
- [469] M.S. Tang, L.J. Askonas, T.M. Penning: (1995) „*Bromoacetamido analogs of indomethacin and mefenamic acid as affinity-labeling agents and mechanistic probes for prostaglandin H<sub>2</sub> synthase*“, *Biochemistry* 34, 808-815;
- [470] H.C. Yao, P. Resnick: (1965) „*Azo-Hydrazone conversion. III. The autoxidation of benzaldehyde phenylhydrazones*“, *J. Org. Chem.* 30, 2832-2834;
- [471] T. Tezuka, N. Narita: (1979) „*Hydroxylation of benzene with  $\alpha$ -azohydroperoxide. A novel route for generation of hydroxyl radical and its reaction in anhydrous media*“, *J. Am. Chem. Soc.* 101, 7413-7415;
- [472] R. Criegee, G. Lohaus: (1951) „*Die Konstitution der Hydrazoneperoxide von Busch*“, *Chem. Ber.* 84, 219-224;
- [473] M. Schulz, U. Missol, H. Bohim: (1974) „*Synthese von trans-a-Hydroxy-dialkyldiazonen aus a-Alkylazo-alkylhydroperoxiden*“, *J. Prakt. Chem.* 316, 47-53;
- [474] M. Schulz, R. Kluge, B.V. Höll, J. Drewelies: (1989) „*Oxidationsreaktionen cyclischer Amidrazone*“, *Chem. Ber.* 122, 1983-1987;
- [475] W. Pöppel: (1994) „*Beiträge zur Darstellung, Reaktivität und spektroskopische Charakterisierung potentiell lipoxygenase-inhibierender Amidrazone*“, *Dissertation, Halle*;
- [476] M. Busch, R. Ruppenthal: (1910) „*Die isomeren Hydrazidine von Pechmanns*“, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 43, 3001-3011;
- [477] M. Busch, W. Dietz: (1915) „*Zur Kenntnis des Methenyldiphenylhydrazidins (Phenylimino-phenylhydrazino-methan)*“, *J. Prakt. Chem.* 91, 325-329;
- [478] M. Busch, G. Friedenberger, W. Tischbein: (1924) „*Zur Kenntnis der Hydrazone-Isomerie: Isomere Hydrazone von Phenylaminen und deren Konfigurationsbestimmung*“, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 57, 1783-1792;
- [479] J.K. Fraser, D.G. Neilson, L.R. Newlands, K.M. Watson, M.I. Butt: (1975) „*Formation of 1,2,4-Triazoles from the reaction of N-arymandelamidrazones with aldehydes and with trialkyl orthoesters*“, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2280-2284;
- [480] V.V. Pinson, V.A. Khrustalev, K.N. Zelenin, Z.M. Metvejeva: (1984) „*Synthese und Struktur von 1-Methyl-2,3-dihydro-1,2,4-triazolium Salzen und ihrer freien Basen*“, *Khim. Geterotsikl. Soed.* 10, 1415-1421;
- [481] G. Drutkowski: (1999) „*Synthese von 1-Aryl-5,5-dialkyl-1,2,4-triazolinen als Lipoxygenase-Hemmstoffe*“, *Diplomarbeit, Halle*;
- [482] W. Schmidt: (1994) „*Optische Spektroskopie*“, *VCH Weinheim, 1. Auflage*, 325-344;
- [483] L.J.M. Spaapen, G.A. Veldink, T.J. Liefkens, J.F.G. Vliegthart, C.M. Kay: (1979) „*Circular dichroism of lipoxygenase-1 from soybeans*“, *Biochim. Biophys. Acta* 574, 301-311;
- [484] M.R. Egmond, A. Finazzi-Agro, P.M. Fasella, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart: (1975) „*Changes in the fluorescence and absorbance of lipoxygenase-1 induced by 13-Ls-hydroperoxylinoic acid and linoleic acid*“, *Biochim. Biophys. Acta* 397, 43-49;
- [485] M. Bakovic, H.B. Dunford: (1995) „*Oxygenation reactions of prostaglandins endoperoxide synthase and soybean lipoxygenase. Surprising stoichiometry in the formation of hydroperoxy and hydroxy derivatives of cis,cis-eicosa-11,14-dienoic acid*“, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 53, 423-431;
- [486] A.-L. Tsai, G. Wu, R. Kulmacz: (1997) „*Stoichiometry of the interaction of prostaglandin H synthase with substrates*“, *Biochemistry* 36, 13085-13094;

- [487] J. Oszczapowicz: (1991) in „*The chemistry of amidines and imidates*“, S. Patai (Ed.) Vol. 2, J. Wiley, New York, 671-687;
- [488] D. Ranft: (1998) „*N<sup>1</sup>-Substituierte Hetarylcarbonsäureamidrazone als lipoxygenaseinhibierende und antimycobacterielle Verbindungen*“, Dissertation, Halle;
- [489] J. Baumann, F. von Bruchhausen, G. Wurm: (1983) „*Decreasing inhibitory potency of prostaglandin synthetase inhibitors during their cooxidative metabolism. Studies on aminophenols, pyrazolon derivatives and 1,3-diphenylisobenzofuran*“, *Pharmacology* 27, 267-280;
- [490] W. Korytowski, G.J. Bahowski, A.W. Girotti: (1993) „*Analysis of cholesterol and phospholipid hydroperoxides by high-performance liquid chromatography with mercury drop electrochemical detection.*“, *Anal. Biochem.* 213, 111-119;
- [491] B. Frei, Y. Yamamoto, D. Niclas, B.N. Ames: (1988) „*Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hydroperoxides in human blood plasma.*“, *Anal. Biochem.* 175, 120-130;
- [492] A.E. Holley, T.F. Slater: (1991) „*Measurement of lipid hydroperoxides in normal human blood plasma using HPLC-chemiluminescence linked to a diode array detector for measuring conjugated dienes.*“, *Free Radical Res. Commun.* 15, 51-63;
- [493] A.E. Holley, K.H. Cheeseman: (1993) „*Measuring free radical reactions in vivo*“, *Br. Med. Bull.* 49, 494-505;
- [494] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset: (1995) „*Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*“, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28, 25-30;
- [495] C. Soler-Rivas, J.C. Espin, H.J. Wichers: (2000) „*An easy test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs*“, *Phytochem. Anal.* 11, 330-338;
- [496] S. Tokumaru, I. Tsukamoto, H. Iguchi, S. Kojo: (1995) „*Specific and sensitive determination of lipid hydroperoxides with chemical derivatization into 1-naphthylidiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography*“, *Analyt. Chim. Acta* 307, 97-102;
- [497] J. Nourooz-Zadeh, J. Tajaddini-Sarmadi, S.P. Wolff: (1994) „*Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xyleneol orange assay in conjunction with triphenylphosphine*“, *Anal. Biochem.* 220, 403-409;
- [498] S.P. Wolff: (1994) „*Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion xyleneol orange for measurement of hydroperoxides*“, *Methods Enzymol.* 233, 182-189;
- [499] K.M. Burat, O. Bozkurt: (1996) „*Improvement of calibration curve for determining peroxide values of food lipids by the modified ferrous oxidation-xyleneol orange method*“, *J. AOAC Int.* 79, 995-997;
- [500] E. Södergren, J. Nourooz-Zadeh, L. Berglund, B. Vessby: (1998) „*Re-evaluation of the ferrous oxidation in xyleneol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides*“, *J. Biochem. Biophys. Methods* 37, 137-146;
- [501] J. Nourooz-Zadeh: (1999) „*Ferrous oxidation in presence of xyleneol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma*“, *Methods Enzymol.* 300, 58-62;
- [502] C. Schneider, P. Schreier, M. Herderich: (1997) „*Analysis of lipoxygenase-derived fatty acid hydroperoxides by electrospray ionization tandem mass spectrometry*“, *Lipids* 32, 331-336;
- [503] O. Lichtenberger: (1991) „*Zusammenhang zwischen Elektronenstruktur und pharmakologischer Wirksamkeit von Phenylhydrazonen und Amidrazonen als Inhibitoren der Lipoxygenase*“, Dissertation, Halle;
- [504] I.C. Schulze: (2001) „*Synthese von Inhibitoren der Lipoxygenase und ESR-spektroskopische Untersuchung eines stabilen Radikals mit Amidrazonstruktur*“, Diplomarbeit, MLU Halle;
- [505] F.A. Neugebauer, H. Fischer: (1995) „*2,5-Dihydro-1H-1,2,4-triazol-2-yl radicals: Synthesis and properties*“, *Tetrahedron* 51, 12883-12898;
- [506] T. Schewe, H. Kühne, S.M. Rapoport: (1986) „*Positional specificity of lipoxygenases and their suitability for testing potential drugs*“, *Prostaglandins, Leukotrienes & Medicine* 23, 155-160;
- [507] S. Gohlke: (1988) „*Beiträge zur Entwicklung eines Testsystems zur Auffindung von Antiphlogistika/Antianaphylaktika mit Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften*“, Dissertation, Halle;

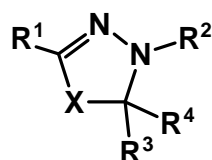
- [508] I.D. Cunningham, A.F. Hegarty: (1986) „*Acid, base, and uncatalysed isomerisation of Z- to E-amidine. A mechanistic study*“, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 537-540;
- [509] SPARTAN, Vers. 5.1, Wavefunction Inc. Irvine, CA;
- [510] J.J.P. Stewart: (1989) „*Optimization of parameters for semi-empirical methods. I-Method*“, *J. Comp. Chem. 10*, 209-220;
- [511] J.J.P. Stewart: (1989) „*Optimization of parameters for semi-empirical methods. II-Applications*“, *J. Comp. Chem. 10*, 221-264;
- [512] J.J.P. Stewart: (1990) „*Semi-empirical molecular orbital methods*“, in „*Reviews in computational chemistry*“, K.B. Lipkowitz, D.D. Boyd (Eds.) VCH Weinheim, 45-81;
- [513] W.J. Hehre, R.W. Dixon, M.J. Leonard: (1993) „*A continuum solvation model for the AM1 semi-empirical method*“, *Israel J. Chem. 33*, 427-434;
- [514] D.G. Neilson, R. Roger, J.W.M. Heatlie: (1970) „*The chemistry of amidrazones*“, *Chem. Rev. 70*, 151-159;

# Anhang

Liste der untersuchten Substanzen

Verbindung					IC <sub>50</sub> [M]
(2)	 (BW 755c)				1,6x10 <sup>-6</sup>
 Verbindungen					
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(1)	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2,0x10 <sup>-7</sup> [348]
(3)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,0x10 <sup>-8</sup> (cis) 8,0x10 <sup>-9</sup> (trans)
(4)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,1x10 <sup>-7</sup>
(5)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,7x10 <sup>-8</sup>
(6)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,0x10 <sup>-8</sup>
(7)	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	3-COCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,1x10 <sup>-6</sup>
(9)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,6x10 <sup>-8</sup>
(10)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,8x10 <sup>-7</sup>
(12)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH		H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,0x10 <sup>-8</sup> [387]
(13)	4-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,0x10 <sup>-6</sup> [388]
(14)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	HOCH <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,4x10 <sup>-6</sup>
(15)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	7,0x10 <sup>-5</sup>
(17)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	2,6-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3,4x10 <sup>-7</sup>
(18)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	2,6-Cl <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	8,3x10 <sup>-7</sup>
(19)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	1-Naphthyl	35 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(20)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	4-Trifluormethyl- chromen-2-on-8-yl	61 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(22)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,2x10 <sup>-8</sup> (cis) 1,1x10 <sup>-8</sup> (trans)
(24)	CH <sub>3</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	
(25)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	3,9x10 <sup>-6</sup>

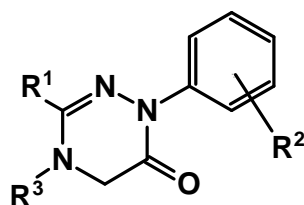
(26)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	4-COOH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	15 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(27)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,7x10 <sup>-8</sup>
(31)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	8,4x10 <sup>-8</sup>
(37)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	2-Naphthyl	3,4x10 <sup>-7</sup>
(38)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	4Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1,1x10 <sup>-6</sup>
(39)	HOCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,1x10 <sup>-6</sup>
(42)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	NH <sub>2</sub>	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	6,1x10 <sup>-8</sup>
(44)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1,0x10 <sup>-8</sup>
(45)	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,6x10 <sup>-8</sup>
(46) <sup>A</sup>	2-Pyridyl-1-oxid	NH <sub>2</sub>	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,6x10 <sup>-7</sup>
(50) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	NH <sub>2</sub>	H	4-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	5,2x10 <sup>-7</sup>
(53) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	NH <sub>2</sub>	2-Benzothiazolymethylen		31 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(54) <sup>A</sup>	2-Pyridyl	NH <sub>2</sub>	2-Benzoxazolymethylen		0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(55) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	NH <sub>2</sub>	2-Benzoxazolymethylen		0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(56) <sup>A</sup>	2-Pyridyl	CN	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2,9x10 <sup>-6</sup>
(57) <sup>A</sup>	2-Pyridyl	CN	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4,2x10 <sup>-6</sup>
(58) <sup>A</sup>	2-Pyridyl	CH <sub>3</sub> OCO	H	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	25 % bei 8,3x10 <sup>-5</sup>
(86)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	2-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	7,9x10 <sup>-8</sup>
(87)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	H	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,4x10 <sup>-7</sup>



### Verbindungen

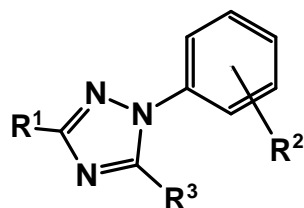
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(8)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,1x10 <sup>-7</sup>
(11)	CH <sub>3</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8,2x10 <sup>-7</sup>
(21)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4,3x10 <sup>-8</sup>
(23)	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	3-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8,5x10 <sup>-8</sup>
(28)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1,7x10 <sup>-7</sup>
(29)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4,2x10 <sup>-8</sup>
(30)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,9x10 <sup>-7</sup>
(32)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,1x10 <sup>-7</sup>
(33)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	9,1x10 <sup>-8</sup>
(34)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2,0x10 <sup>-7</sup>
(35)	CH <sub>3</sub> CO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	7,8x10 <sup>-7</sup>
(36)	CH <sub>3</sub> CO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	7,4x10 <sup>-7</sup>

(40)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OCO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>		9,8x10 <sup>-8</sup>
(41)	CH <sub>3</sub> CO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	5,8x10 <sup>-7</sup>
(43)	CH <sub>3</sub> CO	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,2x10 <sup>-6</sup>
(47) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>		1,4x10 <sup>-7</sup>
(48) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4,3x10 <sup>-7</sup>
(49) <sup>A</sup>	2-Pyrazinyl	4-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,6x10 <sup>-7</sup>
(59) <sup>A</sup>	2-Pyridyl	2-Benzothiazolyl	NH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>		43 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(60)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	S	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8,1x10 <sup>-6</sup>



Verbindungen

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(16)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	H	H	5,5x10 <sup>-6</sup>
(51)	2-Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	H	CH <sub>3</sub>	54 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(52)	CH <sub>3</sub> CO	4-Cl	CH <sub>3</sub>	4,0x10 <sup>-5</sup>

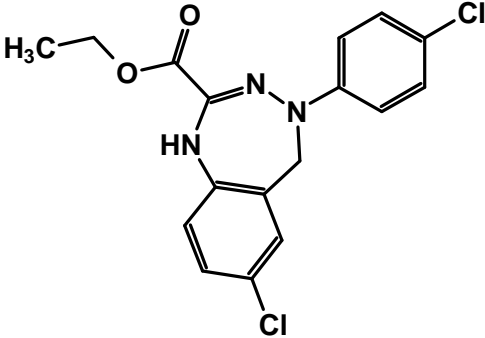
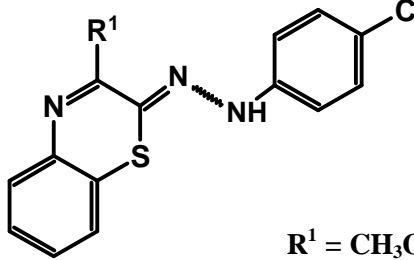
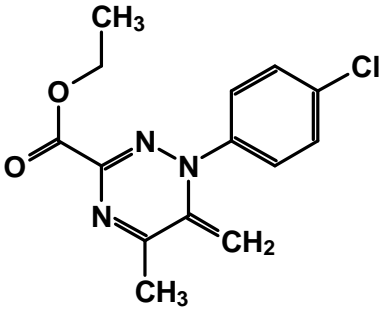
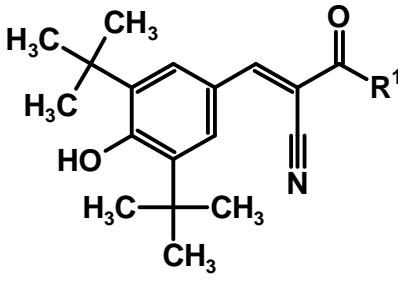


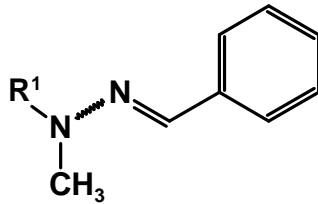
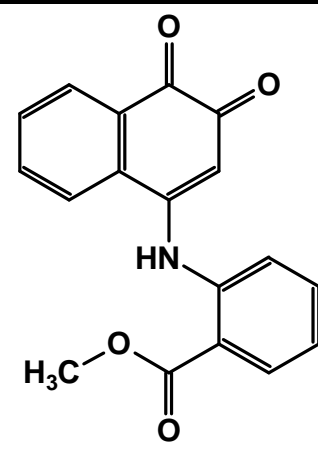
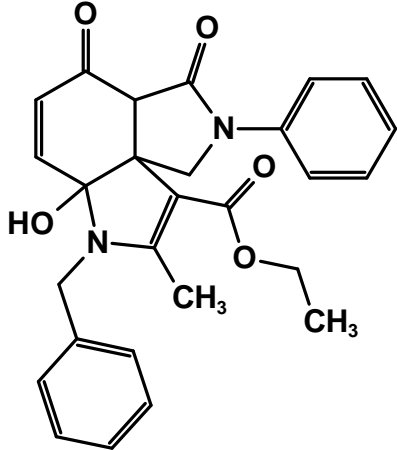
Verbindungen

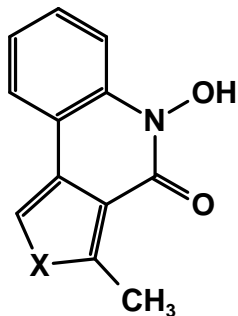
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(11a)	CH <sub>3</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO	3-F	CH <sub>3</sub>	1,8x10 <sup>-4</sup>
(61)	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCO	3-COCH <sub>3</sub>	H	40 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>

Verbindungen		IC <sub>50</sub> [M]
(62)	<p style="text-align: center;">R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub></p>	4,2x10 <sup>-7</sup>



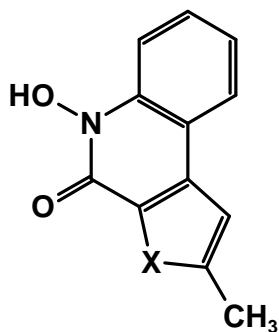
(63)		30 % bei $2,5 \times 10^{-4}$
(64)	 <p style="text-align: center;"><math>R^1 = \text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_3</math></p>	$6,1 \times 10^{-8}$
(65)		$1,0 \times 10^{-5}$
 <p style="text-align: center;"><b>Verbindungen</b></p>		
	$R^1$	$\text{IC}_{50}$ [M]
(66) <sup>B</sup>	$\text{HN}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	17 % bei $2,5 \times 10^{-4}$
(67) <sup>B</sup>	$\text{HN}(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$	45 % bei $2,5 \times 10^{-4}$
(68) <sup>B</sup>	$\text{OCH}_3$	0 % bei $2,5 \times 10^{-4}$

		
Verbindungen		
	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(69) <sup>c</sup>	1,2-Naphthochinon-4-yl	15 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(70) <sup>c</sup>	1,4-Naphthochinon-3-yl	33 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(71) <sup>c</sup>	5,6-Dimethyl-1,4-benzochinon-3-yl	7 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
Verbindung		IC <sub>50</sub> [M]
(72) <sup>c</sup>	 (CGS 8515)	0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(73) <sup>c</sup>		0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>



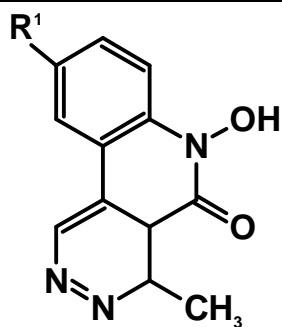
Verbindungen

	X	IC <sub>50</sub> [M]
(74) <sup>D</sup>	O	26 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(75) <sup>D</sup>	NH	2,5x10 <sup>-4</sup>
(76) <sup>D</sup>	NCH <sub>3</sub>	18 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>



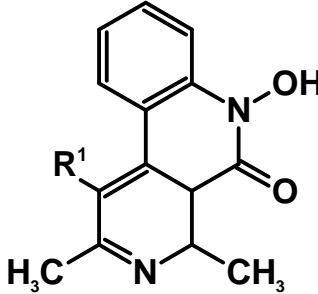
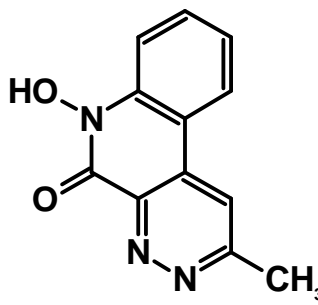
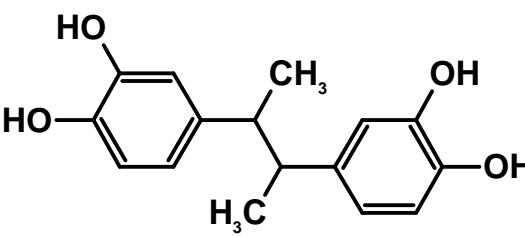
Verbindungen

	X	IC <sub>50</sub> [M]
(77) <sup>D</sup>	O	8,0x10 <sup>-5</sup>
(78) <sup>D</sup>	NH	12 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>



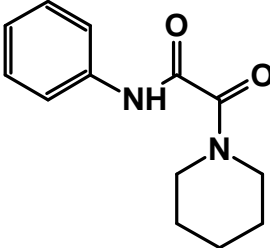
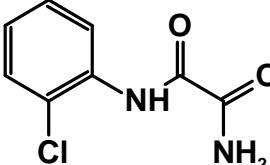
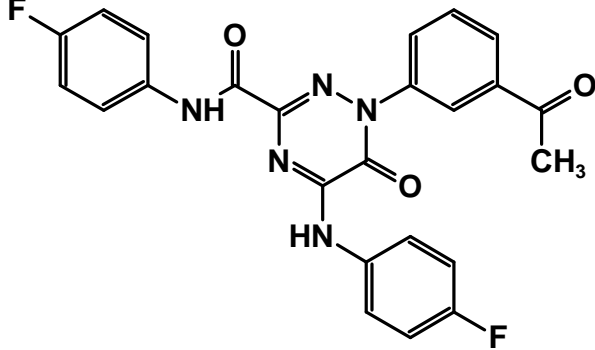
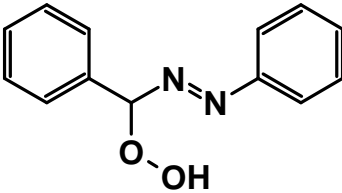
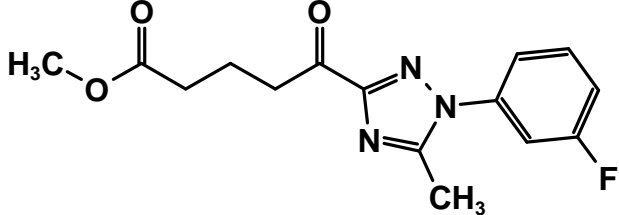
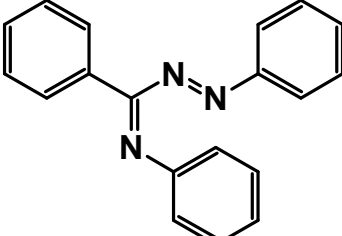
Verbindungen

	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(79) <sup>D</sup>	H	21 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(80) <sup>D</sup>	Cl	0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>

		
Verbindungen		
	R <sup>1</sup>	IC <sub>50</sub> [M]
(81) <sup>D</sup>	H	23 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(82) <sup>D</sup>	COOH	0 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
Verbindungen		IC <sub>50</sub> [M]
(83) <sup>D</sup>		5 % bei 2,5x10 <sup>-4</sup>
(84)	 (NDGA)	8,9x10 <sup>-6</sup>
(85)	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH (OA)	5,1x10 <sup>-4</sup>

Substanzquellen: <sup>A</sup> D. Ranft [488], <sup>B</sup> F. Rolle (Prof. A. Büge, Halle), <sup>C</sup> H. Buff (Prof. U. Kuckländer, Düsseldorf), <sup>D</sup> J. Fabian (Prof. K. Görlitzer, Braunschweig)

Liste der isolierten Oxidationsprodukte

Substanz	Formel
(3b)	 <p>Chemical structure of N-(benzylideneamino)pyrrolidine-2-carboxamide. It features a benzene ring attached to a nitrogen atom, which is double-bonded to a carbon atom. This carbon atom is also double-bonded to an oxygen atom and single-bonded to a nitrogen atom that is part of a five-membered pyrrolidine ring.</p>
(4a)	 <p>Chemical structure of N-(2-chlorophenyl)acetamide. It consists of a benzene ring with a chlorine atom at the ortho position, attached to a nitrogen atom. This nitrogen atom is part of an acetamide group (-NH-C(=O)-CH<sub>3</sub>).</p>
(7a)	 <p>Chemical structure of a complex heterocyclic compound. It features a central six-membered ring with two nitrogen atoms and a carbonyl group. The ring is substituted with a 4-fluorophenylamino group, a 4-fluorophenyl group, and a 4-(4-acetylphenyl)phenyl group.</p>
(9a)	 <p>Chemical structure of N-(benzylideneamino)benzyl hydroperoxide. It consists of a benzene ring attached to a carbon atom, which is double-bonded to a nitrogen atom. This nitrogen atom is also double-bonded to another carbon atom, which is part of a hydroperoxide group (-O-OH).</p>
(11a)	 <p>Chemical structure of a complex heterocyclic compound. It features a central five-membered ring with two nitrogen atoms and a carbonyl group. The ring is substituted with a 4-fluorophenyl group and a methyl group. The ring is also attached to a 4-methoxyphenyl group.</p>
(25a) nach [388]	 <p>Chemical structure of N-(benzylideneamino)benzylidenebenzylamine. It consists of a benzene ring attached to a carbon atom, which is double-bonded to a nitrogen atom. This nitrogen atom is also double-bonded to another carbon atom, which is part of a benzylidene group.</p>

## Verwendete Gleichungen

**Gleichung 1:** Abhängigkeit der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  einer Reaktion 1. Ordnung von der Geschwindigkeitskonstante  $k$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

**Gleichung 2:** Abhängigkeit der  $IC_{50}$  eines hochaffinen Inhibitors I von der eingesetzten Enzymkonzentration

$$IC_{50} = \frac{1}{2} \cdot [E] + K_{iapp}$$

**Gleichung 3:** Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reaktion  $v$  in Gegenwart eines hochaffinen Inhibitors I von der eingesetzten Enzymkonzentration [E] nach Ackermann und Potter [403,406-408]

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{2 \cdot (K_m + [S])} \cdot \left[ - (K_i + [I] - [E]) + \sqrt{(K_i + [I] + [E])^2 - 4 \cdot [I] \cdot [E]} \right]$$

**Gleichung 4:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen kompetitiven Inhibitor nach Cheng und Prusoff [409]

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

**Gleichung 5:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen nonkompetitiven Inhibitor nach Cheng und Prusoff [409]

$$K_i = IC_{50}$$

**Gleichung 6:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen unkompetitiven Inhibitor nach Cheng und Prusoff [409]

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

**Gleichung 7:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen hochaffinen kompetitiven Inhibitor

$$IC_{50} = K_i \cdot \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) + \frac{1}{2} \cdot [E]$$

**Gleichung 8:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen hochaffinen nonkompetitiven Inhibitortyp

$$IC_{50} = K_i + \frac{1}{2} \cdot [E]$$

**Gleichung 9:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen hochaffinen unkompetitiven Inhibitortyp

$$IC_{50} = K_i \cdot \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right) + \frac{1}{2} \cdot [E]$$

**Gleichung 10:** Beziehung zwischen  $K_i$  und  $IC_{50}$  für einen hochaffinen gemischt nonkompetitiven Inhibitortyp

$$IC_{50} = \frac{[S] + K_m}{\frac{K_m}{K_i} + a \cdot K_i} + \frac{1}{2} \cdot [E]$$

**Gleichung 11:** Beschreibung der Produktbildungskurve in Gegenwart eines zeitabhängigen Inhibitors I

$$[P] = v_s \cdot t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} \cdot [1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)]$$

**Gleichung 12:** Beziehung zwischen  $k_{obs}$  und der Inhibitorkonzentration nach Mechanismus A in Schema 3

$$k_{obs} = k_4 + \left( 1 + \frac{[I]}{K_{iapp}} \right)$$

**Gleichung 13:** Beziehung zwischen  $k_{obs}$  und der Inhibitorkonzentration nach Mechanismus B in Schema 3

$$k_{obs} = k_6 + \left( \frac{k_5 \cdot [I]}{K_{iapp} + [I]} \right)$$

**Gleichung 14:** sigmoidal angepasste Beziehung zwischen  $k_{obs}$  und der Inhibitorkonzentration nach Mechanismus B in Schema 3

$$k_{obs} = k_6 + \left( \frac{k_5 \cdot [I]^B}{K_{iapp} + [I]^B} \right)$$

**Gleichung 15:** Hill-Gleichung

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]^B}{K' + [S]^B}$$

**Gleichung 16:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von der Substratkonzentration für einen kompetitiven, zeitabhängigen (slow-binding) Inhibitor

$$k_{\text{obs}} = \frac{K}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

**Gleichung 17:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von der Substratkonzentration für einen nonkompetitiven, zeitabhängigen (slow-binding) Inhibitor

$$k_{\text{obs}} = K$$

**Gleichung 18:** Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  von der Substratkonzentration für einen unkompetitiven, zeitabhängigen (slow-binding) Inhibitor

$$k_{\text{obs}} = \frac{K}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

**Gleichung 19:** Gleichung zur Errechnung des Interaktionsindex  $Z$

$$\frac{d_a}{D_a} + \frac{d_b}{D_b} = Z$$

**Gleichung 20:** Gleichung zur Berechnung der Parameter einer partiellen Inhibition nach Baici\*;  $\delta = S/K_m$ ,  $\beta = k_{\text{cat}}'/k_{\text{cat}}$ ,  $K_i' = \alpha x K_i$

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{I \cdot \left( \frac{1}{K_i'} - \frac{1}{K_i} \right)}{1 + b \cdot \frac{I}{K_i'}} \cdot \frac{d}{1+d} + \frac{1 + \frac{I}{K_i}}{1 + b \cdot \frac{I}{K_i'}}$$

**Gleichung 21:** Arrhenius-Gleichung; A: Häufigkeitsfaktor,  $E_A$ : Aktivierungsenergie, R: Gaskonstante

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}}$$



**Gleichung 22:** Michaelis-Menten-Beziehung der klassischen Enzymkinetik

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

**Gleichung 23:** Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Maximalgeschwindigkeit der Reaktion

$$v_{\max} = k_{cat} \cdot [E]$$

**Gleichung 24:** Gleichung zur Berechnung von  $K_i^*$

$$K_i^* = \frac{k_6}{k_5 + k_6} \cdot K_i$$

### Berechnung der UV/Vis-Spektren\*

#### • Im Vakuum

Die Berechnungen zur Konformationsanalyse der Verbindung (**3**) wurden anhand der fünf flexiblen Bindungen der Amidrazonstruktur (Ph-NHCO-C(-N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>)=N-Nh-Ph) und der zwei Zentren des Piperidinringes (axial/äquatorial-Stellungen) durchgeführt. Im Vakuum existieren insgesamt etwa 100 Konformere, d.h. lokale Minima dieser Molekülstruktur. Davon haben 14 Konformere einen maximalen energetischen Abstand bis 1,5 kcal/mol vom absoluten Minimum (Tabelle A-I). Von diesen wurden die UV/Vis-Spektren im Vakuum berechnet. Es zeigte sich, daß für lediglich ein Konformer (Nr 5) das längstwellige Absorptionsmaximum mit dem beobachteten Maximum bei etwa 350 nm übernimmt. Anhand der Röntgenstrukturdaten [392] einer sehr ähnlichen Verbindung (3-Cl-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NHCO-C(-N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>)=NNH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) wurde ein nahezu identisches Spektrum kalkuliert (Nr 15).

**Tabelle A-I:** Auflistung der energetisch günstigsten Konformere der Verbindung (**3**) im Vakuum

Konformer	Energetischer Abstand zum absoluten Minimum [kcal/mol] #	$\lambda_{\max}$ [nm]
1	0	299,1
2	0,0182	300,4
3	0,1216	304,8
4	0,1357	304,5
5	0,1913	349,2
6	0,2054	322,7
7	0,2560	300,7
8	0,9673	328,4
9	0,9813	327,7
10	1,0743	324,4
11	1,2241	322,8
12	1,2598	305,5
13	1,2744	304,4
14	1,4909	311,0
15	0,1950	349,2

#### • In wäßriger Umgebung

Die energetischen Abstände zwischen den Konformeren sind größer als im Vakuum. Bis zu etwa 1,7 kcal/mol über dem absoluten Minimum existieren nur zwei Konformere. Die längstwelligen Absorptionsmaxima liegen deutlich unterhalb von 350 nm (Tabelle A-II).

**Tabelle A-II:** Auflistung der energetisch günstigsten Konformere der Verbindung (3) in wässriger Umgebung

<b>Konformer</b>	<b>Energetischer Abstand zum absoluten Minimum [kcal/mol] #</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> [nm]</b>
1	0	299,6
2	0,6368	302,7
3	1,7347	317,6

\* Die Berechnungen wurden von Olaf Lichtenberger (Max-Planck-Institut, Halle) durchgeführt, dem ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank ausspreche.

# Hartree-Fock configuration interaction

**Tabelle A-III:** Zusammenstellung der wichtigsten Parameter der L-1-Inhibition durch die Verbindungen **(3)** und **(21)**. Erklärung siehe Schema 5 (S. 66)

Parameter		Verbindung (3)	Verbindung (21)
IC <sub>50</sub> [M]	(cis)	1,0x10 <sup>-8</sup>	3,8x10 <sup>-8</sup>
	(trans)	8,9x10 <sup>-9</sup>	-
k <sub>50</sub> [s <sup>-1</sup> ]	(k <sub>ox1-3</sub> )	7,28x10x10 <sup>-3</sup>	0
	(k <sub>ox4</sub> )	1,41x10 <sup>-2</sup>	0
k <sub>inact</sub> [s <sup>-1</sup> ]	(k <sub>5</sub> )	0,11	0,13
	(k <sub>7</sub> )	3,0x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-2</sup>
k <sub>off</sub> [s <sup>-1</sup> ]	(k <sub>8</sub> , Fe <sup>II</sup> -L-1)	5,1x10 <sup>-5</sup>	8,9x10 <sup>-5</sup>
	(k <sub>8</sub> , Fe <sup>III</sup> -L-1)	0	4,7x10 <sup>-5</sup>
K <sub>i</sub> [M]	(EI)	3,5x10 <sup>-7</sup>	1,8x10 <sup>-7</sup>
	(ESI)	2,5x10 <sup>-8</sup>	n.b.
K <sub>i</sub> * [M]	(EI*)	1,9x10 <sup>-9</sup>	n.b.
	(ESI* #)	5,1x10 <sup>-10</sup>	5,0x10 <sup>-10</sup>
B		2,40	2,03
α		0,077	n.b.
β		0,57	n.b.

# Kalkulation nach Gleichung 24 (siehe Anhang); n.b. nicht bestimmt

## *Danke!*

Bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit erhielt ich in vielfältiger Weise Hilfe. All denen, die mich in meiner Arbeit unterstützten, möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Prof. P. Nuhn, für die Überlassung des sehr interessanten Themas und der weitgehenden Handlungsfreiheit bei der Bearbeitung desselben. Besonderer Dank gebührt Herrn Prof M. Wiese für die ständige und fruchtbare Diskussionsbereitschaft sowie das entgegengebrachte Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonderer und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Froberg für ihr nicht nachlassendes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie das stets offene Ohr bei allen Fragen und Problemen. Gleichmaßen möchte ich mich bei den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für das sehr angenehme und kollegiale Verhältnis bedanken.

Allen Mitarbeitern des Fachbereichs danke ich für ihre Unterstützung.

### *Eidesstattliche Erklärung*

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die im Wortlaut oder im Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle (Saale), den 30.03.2001

Frank Clemens

# Lebenslauf

Name Frank Clemens  
Geburtsdatum 25. Februar 1973  
Geburtsort Freital

## Studium/Beruf

März 1998 – heute Anfertigung der Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts  
April 1997 – Febr. 1998 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts  
Nov. 1997 Approbation als Apotheker  
Okt. 1996 – März 1997 Pharmaziepraktikum in der Paracelsus-Apotheke in Halle  
Okt. 1992 – Sept. 1996 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

## Wehrdienst

Juli 1991 – Juni 1992 Wehrdienst in der Bundeswehr

## Schule

Sept. 1989 – Juni 1991 Erweiterte Oberschule (später Gymnasium) in Beeskow / Abitur  
Sept. 1979 – Juni 1989 Polytechnische Oberschule in Friedland

Halle, den 30.03.01