

University of Groningen

Development of novel molecules to study lipoxygenase activity in its cellular context

Guo, Hao

DOI:
[10.33612/diss.113179959](https://doi.org/10.33612/diss.113179959)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Guo, H. (2020). *Development of novel molecules to study lipoxygenase activity in its cellular context*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.113179959>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Chronische ontstekingsziekten, zoals astma en chronische obstructieve longziekte (COPD), treffen wereldwijd miljoenen mensen. Helaas zijn de therapeutische mogelijkheden voor veel patiënten beperkt, omdat ze niet reageren op de huidige therapie.¹⁻² Veel therapieën voor deze chronische ontstekingsziekten zijn slechts gedeeltelijk effectief of ineffectief. Bovendien veroorzaken ze veel bijwerkingen.³ Er is steeds meer bewijs dat processen die betrokken zijn bij ontstekingen een nauw verband hebben met kanker en aandoeningen van het centrale zenuwstelsel (CZS).⁴⁻⁵ Gezien het belang van deze processen is uitbreiding van de therapeutische mogelijkheden zeer noodzakelijk. Daarom is het belangrijk om meer inzicht te krijgen in moleculaire mechanismen die ontstekingen veroorzaken om zo nieuwe aangrijpingspunten voor nieuwe medicijnen te ontdekken.

Recente technologische ontwikkelingen in de moleculaire biologie hebben geleid tot een enorme toename van ons begrip van processen die betrokken zijn bij ontstekingen. Desondanks blijft ons begrip van het functionele gedrag van eiwitten bij ontstekingsziekten beperkt omdat de activiteit van de enzymen die deze processen reguleren slecht is bestudeerd. Een van de belangrijkste strategieën in de farmacologie is de toepassing van kleine molecuulremmers als hulpmiddelen om de rol van enzymactiviteit in zijn fysiologische context te onderzoeken. Bovendien vereist detectie van veranderingen in enzymactiviteit in celculturen of weefselmonsters in sommige gevallen geavanceerde op chemie gebaseerde detectiemethoden. Momenteel is het gebrek aan op chemie gebaseerde hulpmiddelen een knelpunt bij het bestuderen van ontstekingsprocessen. Daarom ontwikkelen wij *tools* om enzymactiviteit in zijn cellulaire context te moduleren en te detecteren. Dit biedt uiteindelijk nieuwe mogelijkheden voor het ontdekken van geneesmiddelen en voor diagnostiek.

Ons onderzoek richt zich op het enzym 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1). Dit is een enzym dat arachidonzuur en linolzuur omzet in de zogenoemde eicosanoïden die een rol spelen bij de regulatie van immuunreacties. 15-LOX-1 katalyseert de omzetting van arachidonzuur en linolzuur in respectievelijk 15(S)-HETE en 13(S)-HODE. Deze lipide-signalerende moleculen dragen bij aan ontstekingsprocessen bij astma.⁶ Bovendien spelen de lipide peroxiden die geproduceerd worden door 15-LOX-1 katalyse een sleutelrol in oxidatieve stress (hoofdstuk 3). Daarnaast vertonen ontstekingsbevorderende mediators zoals cytokines, prostaglandinen en leukotriënen een rol in CZS-ziekten zoals de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson en beroerte. 15-LOX-1 speelt een cruciale rol bij de

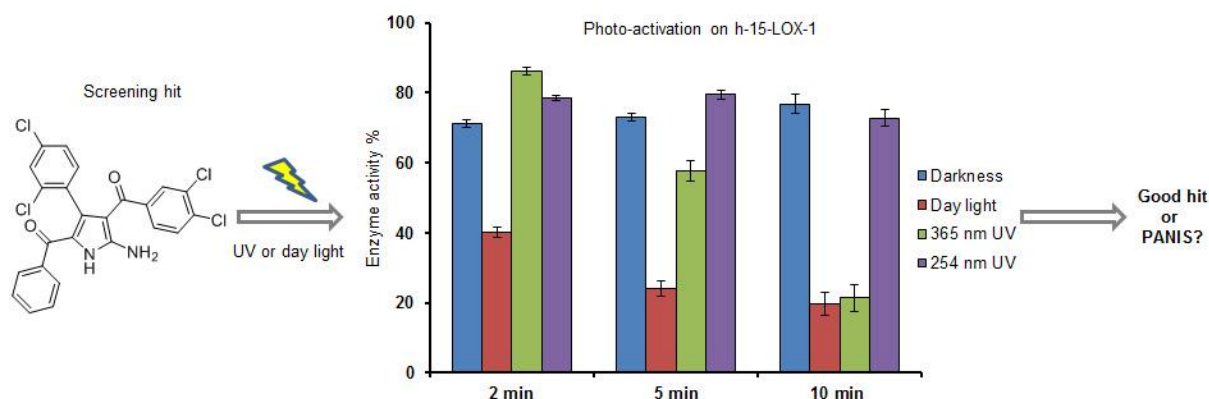
regulatie van de productie van lipide signaal moleculen met belangrijke regulerende functies in verschillende ziektebeelden. Daarom wordt 15-LOX-1 herkend als een nieuw doelwit voor het ontwikkelen van geneesmiddelen.

Onlangs heeft 15-LOX-1 meer aandacht gekregen voor de ontwikkeling van nieuwe ontstekingsremmende en pijnstillende medicijnen vanwege het succes bij de ontwikkeling van geneesmiddelen voor enzymen die actief zijn in vergelijkbare metabole reacties zoals cyclooxygenase 2 (COX 2). Belangrijk is dat de expressie van het enzym, 15-LOX-1, omhoog gaat in ontstoken weefsel, wat een selectieve werking van dit enzym in deze context suggereert. De bruikbaarheid van dit type enzymen blijkt uit de oraal actieve 5-LOX-remmer, Zileuton, die wordt gebruikt voor de behandeling van astma. Er zijn aanwijzingen dat 15-LOX-1 ook kan worden gebruikt als een doelwit voor geneesmiddelen bij luchtwegontsteking. Voor 15-LOX-1 zijn echter zeer weinig selectieve, krachtige en celpermeabele kleine molecuulremmers beschikbaar. Daarmee is het interessant dat onze groep een reeks nieuwe 15-LOX-1-remmers (deel 1) en op activiteit gebaseerde probes (deel 2) heeft geïdentificeerd en ontwikkeld. Dit biedt een goed uitgangspunt voor fundamenteel onderzoek en voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.

Deel 1: Remming van 15-LOX-1

In hoofdstuk 2 gaan we uit van het idee dat humaan 15-lipoxygenase-1 (h-15-LOX-1) een veelbelovend doelwit is voor nieuwe medicijnen tegen ontstekingen en kanker. Om nieuwe remmers te identificeren zijn we begonnen met substitutie-georiënteerde screening (SOS) voor de identificatie van remmers met nieuw substitutiepatronen. Met deze methode hebben we nieuwe moleculen met een 2-aminopyrrool kernstructuur als remmers voor h-15-LOX-1 geïdentificeerd. De waargenomen structuur-activiteitsrelaties (SAR) bleken relatief vlak te zijn. IC_{50} 's voor de meest krachtige remmer van deze serie waren niet lager dan $6,3 \mu\text{M}$ en de enzymkinetiek vertoonde een niet-competitieve remming. Op basis hiervan hebben we de hypothese gesteld dat de onderzochte 2-aminopyrrolen pan-assay interferentieverbindingen (PAINS) zijn en dat fotoactivatie en een radicaal mechanisme een rol spelen bij hun activiteit.^{7,8} Onze resultaten toonden een duidelijke fotoactivatie van h-15-LOX-1-remming onder UV en zichtbaar licht. Bovendien verminderden de onderzochte 2-aminopyrrolen de levensvatbaarheid van gekweekte menselijke hepatocarcinoomcellen HCC-1.2 op een dosisafhankelijke manier met LD_{50} waarden variërend van $0.55 \pm 0.15 \mu\text{M}$ tot $2.75 \pm 0.91 \mu\text{M}$. Tezamen geeft dit aan dat fotoactivering een belangrijke rol kan spelen in de biologische

activiteit van verbindingen met een 2-aminopyrrol kernstructuur zoals hier onderzocht (figuur 1).

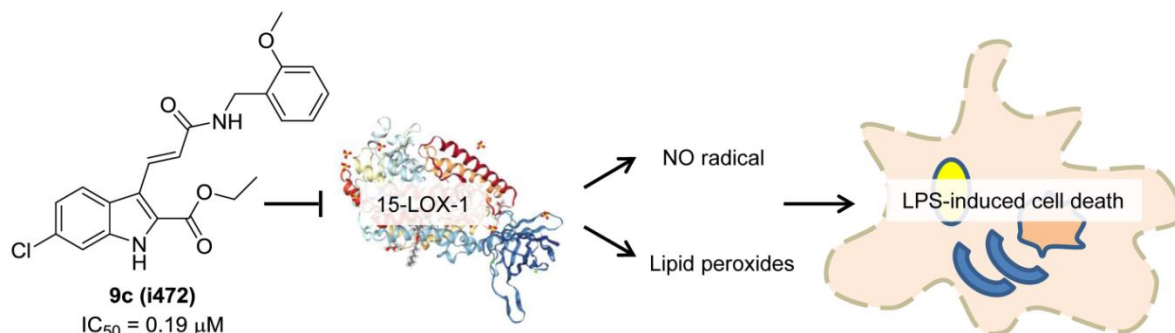


Figuur 1. Een schematische weergave van hoofdstuk 2. We gebruikten substitutie-georiënteerde screening (SOS) als een hulpmiddel om de 2-aminopyrrole kernstructuur te identificeren voor remming van h-15-LOX-1. Vervolgens hebben we de functie van fotoactivatie in de biologische activiteit onderzocht.

In hoofdstuk 3 hebben we gerapporteerd over de synthese van nieuwe remmers van 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1), een enzym dat betrokken is bij de biosynthese van inflammatoire signaal moleculen die een belangrijke regulerende rol spelen bij immuunreacties in tal van ziekten. Het wordt algemeen aanvaard dat verschillende mechanismen voor geregleerde celdood de vorming van oxidatieve mediators omvatten, zoals lipide peroxiden en stikstofoxide (NO).⁹⁻¹⁰ In dit opzicht is 15-LOX-1, door katalyse van lipide peroxidatie, een sleutelenzym. De acties van deze peroxiden zijn verbonden met nucleaire factor- κ B (NF- κ B) signalering en NO-productie. Remming van 15-LOX-1 biedt mogelijkheden om te interfereren met geregleerde celdood in ziektes waar immuunreacties bij betrokken zijn.

In het werk beschreven in hoofdstuk 3 werd een nieuwe krachtige 15-LOX-1-remmer, **9c (i472)** ontwikkeld en werden structuur-activiteitsrelaties onderzocht. We hebben aangetoond dat **9c (i472)** een remmer is van cellulaire lipoxygenase-activiteit in RAW264.7-macrofagen met behulp van activiteitsgebonden labeling. Bovendien hebben we met succes vastgesteld dat **9c (i472)** RAW 264.7-macrofagen beschermt tegen door LPS geïnduceerde celdood en aanzienlijk sterkere dosisafhankelijke effecten vertoonde in vergelijking met Eleftheriadis-14d. Verder werd aangetoond dat **9c (i472)** significante remming van NF- κ B transcriptionele activering bij LPS/INF γ -stimulatie opleverde, om de expressie van het NF- κ B-gerelateerde gen iNOS te verlagen, om dosisafhankelijke remming van NO-productie te verschaffen en om de lipideperoxidatie in RAW-macrofagen te verminderen (figuur 2). Op

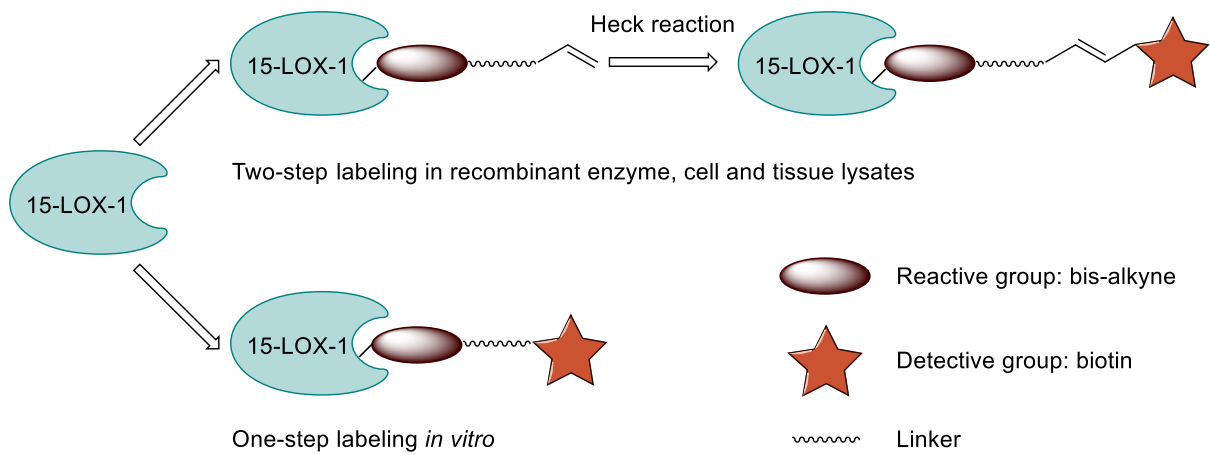
basis van deze studie maken we de weg vrij voor de ontwikkeling van nieuwe remmers die verschillende celdoodmechanismen beïnvloeden die kunnen leiden tot nieuwe therapieën om ziekten te bestrijden, zoals acuut longletsel en acute respiratory distress syndrome (ARDS).



Figuur 2. Overzicht van hoofdstuk 3. We hebben een nieuwe 15-LOX-1-remmer geïdentificeerd en toegepast in een onderzoek naar gereguleerde celdood en ontsteking.

Deel 2: Detectie van 15-LOX-1

In hoofdstuk 4 hebben we remming en detectie van lipoxygenase activiteit gecombineerd. Als eerste hebben we een reeks nieuwe 15-LOX-1-remmers ontworpen. Deze remmers hebben een indool-kernstructuur. De IC_{50} -waarde van de krachtigste remmer **9c (i472a)** bleek 20 nM te zijn. Vervolgens hebben we een molecuul gemaakt voor activiteitgebaseerde labeling van 15-LOX-1. Hiermee willen we de eerder ontwikkelde tweestaps labelingmethode vervangen. Ook in dit nieuwe molecuul voor activiteit gebaseerde labelling van 15-LOX-1 werd weer een bis-alkyn als kernstructuur gebruikt en er werd een biotinstaat opgenomen als een detectiegroep. Een reeks nieuwe moleculen voor activiteitgebaseerde detectie van 15-LOX-1 werd gesynthetiseerd en SAR-studies werden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 4 (Figuur 3). Uiteindelijk bleek verbinding **17 (D04)**, met een IC_{50} -waarde van 2,6 μM tegen 15-LOX-1, een interessante molecuul te zijn voor activiteit gebaseerde labeling. Dit molecuul werd toegepast voor labeling in levende cellen gevolgd door cellysis en detectie op Western blot. Deze op activiteit gebaseerde labeling werd gebruikt om de potentie van een reeks remmers in zijn cellulaire context te vergelijken. Met deze ontwikkeling willen we de remming van LOX-enzymen in hun cellulaire context mogelijk maken, wat kansen biedt voor de ontdekking en ontwikkeling van geneesmiddelen.

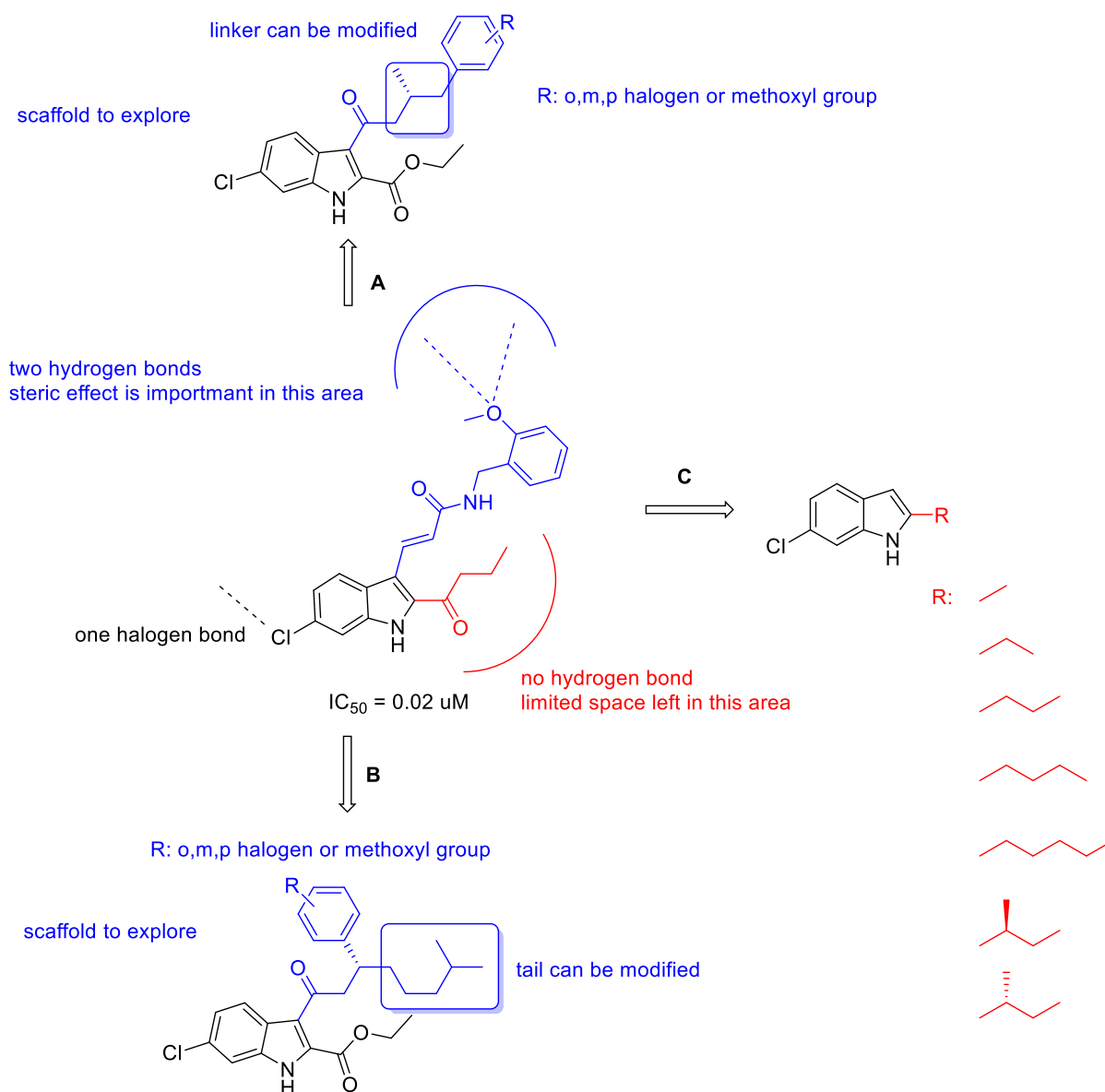


Figuur 3. De ontwikkeling van activiteitsgebaseerde labelling van 15-LOX. Voor het in twee stappen labelen van geïsoleerde eiwitten of eiwitten in een cellysaat wordt het monster gedurende twee minuten geïncubeerd met een molecuul voor activiteit gebaseerde labelling. Vervolgens wordt er een biotine aan het alkeen gekoppeld met een oxidatieve Heck-reactie die overnacht plaatsvindt. Voor een eenstapslabelling wordt een celkweek geïncubeerd met een reactieve groep die al is gelabeld met een biotine. Het actieve enzym dat in de cel gelabeld is kan nu aangetoond worden op Western blot.

Toekomstperspectief

Vier jaar studie aan het enzym 15-LOX-1 leverde veel interessante informatie op. Onze studies omvatten meerdere aspecten van dit enzym, zoals het remmingsmechanisme, activiteitsgebonden labeling en cellulaire activiteit. De voortgang van dit werk zal nieuwe mogelijkheden bieden voor het ontdekken van medicijnen en het diagnosticeren van ziektes.

Zoals we in deel 1 hebben beschreven, richten we ons op de ontwikkeling van 15-LOX-1-remmers met een krachtige remmende activiteit en fysisch-chemische eigenschappen die compatibel zijn met cellulaire activiteit. In de structuur-activiteitsrelaties (SAR) studie bleek verbinding **9c (i472a)** de krachtigste 15-LOX-1-remmer te zijn met een IC_{50} -waarde van 0,02 μ M en een CLogP-waarde van 5,2. Met de resultaten van moleculaire modellering en eerder verkregen SAR, is echter te verwachten dat sterische effecten op de indool 3-positie een belangrijke rollen spelen in de potentie 15-LOX-1 remmers. Verder is de substitutie op de indool 2-positie ook erg belangrijk voor de remming van 15-LOX-1. Interessant is dat moleculaire modellering laat zien dat er nog ruimte over is om grotere substituties aan de indool 2-positie op te nemen. Daarom verwachten we dat het veelbelovend is om nieuwe substituties te onderzoeken op zowel de 2- als de 3-positie van de indool kernstructuur (figuur 1). Uiteindelijk hopen we dat onze inspanningen de ontwikkeling van een actieve 15-LOX-1-remmer mogelijk maken. Hiermee kunnen de beperkte therapeutische opties voor ontstekingsziekten uitgebreid worden.

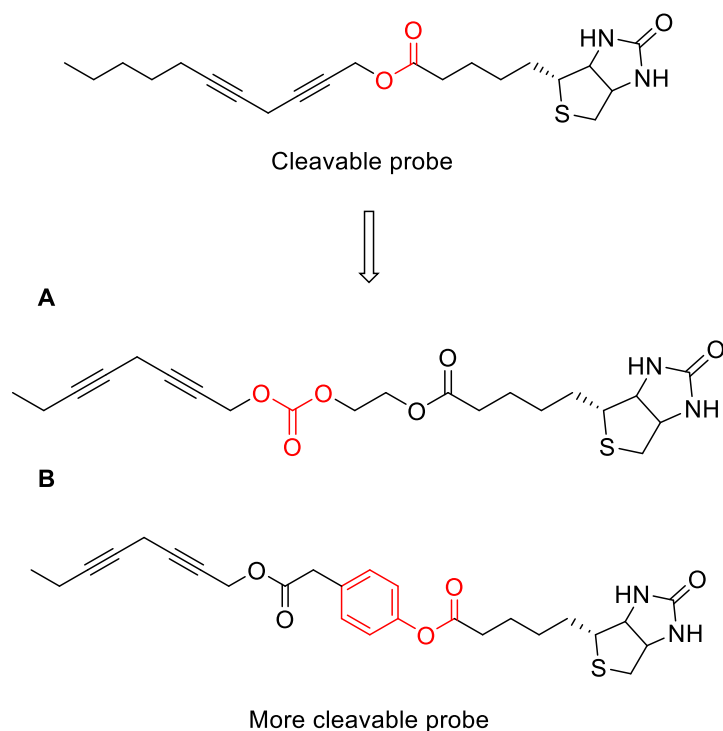


Figuur 1. Mogelijkheden voor de ontwikkeling van nieuwe 15-LOX-1-remmers. We verwachten meer nieuwe en sterische modificaties uit te voeren op zowel 2- als 3-positie van de indool-kernstructuur. Uiteindelijk kunnen de optimale modificaties van A, B en C gecombineerd worden om 15-LOX-1-remmers te ontwikkelen die geschikt zijn voor verder onderzoek.

In deel 2 hebben we een nieuw molecuul gerapporteerd voor eenstaps labeling van 15-LOX-1. Het eenstaps labellingsprotocol is minder tijdrovend dan het tweestaps labellingsprotocol. Wat nog belangrijker is, we waren in staat om de labeling toe te passen in levende cellen om de LOX-remmende potentie van nieuwe en eerder geïdentificeerde remmers te evalueren.

In de toekomst willen we nog meer geavanceerdere studies uitvoeren naar de LOX-activiteit gerelateerde labeling. We willen de covalente labeling van 15-LOX-1 bestuderen

met behulp van massaspectrometrie, maar tot nu toe waren we niet succesvol. Om dergelijke studies te vergemakkelijken, proberen we moleculen te ontwerpen met beter splitsbare linkers in vergelijking met de ester in de momenteel toegepaste moleculen. (Figuur 2). Op deze manier zou het gemakkelijker moeten worden om niet-gemerkte eiwitten te verwijderen en LOX-enzymen uit streptavidine-agarose te zuiveren.



Figuur 2. De ontwikkeling van een molecuul voor activiteitgebaseerde labelling van 15-LOX-1. De rode regio is de splitsbare linker die gemakkelijk kan worden verwijderd in een basische oplossing. (A) Nieuw voorgesteld molecuul met een splitsbare linker met een carbonaatester. (B) Nieuw voorgesteld molecuul met splitsbare linker met fenylester als vertrekkende groep.

Ons werk laat zien dat er uitwisseling is tussen verschillende mechanismen voor celdood die een rol kunnen spelen bij ontstekingen. Het belangrijkste is dat, in tegenstelling tot remming van 5-LOX, remming van 15-LOX-1 de vorming van lipide peroxiden verlaagd. Dit zou kunnen leiden tot het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor ziekten waarbij 15-LOX-1 betrokken is. Bovendien creëert en biedt activiteitsgebaseerde labeling meer mogelijkheden voor geneesmiddelenontwikkeling en enzymactiviteitsstudie. Dit biedt mogelijkheden voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen. Daarnaast biedt dit mogelijkheden om ook andere oxidatieve enzymen te bestuderen. Onze ultieme doelstelling is dat ons onderzoek zal leiden tot het ontwikkelen van nieuwe medicijnen en nieuwe diagnostica.

Referenties

1. Barnes, N. C. Effects of antileukotrienes in the treatment of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 73–76 (2000).
2. Barnes, P. J. E. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 183–92 (2008).
3. Zarghi, A.; Arfaei, S. Selective COX-2 Inhibitors : A Review of Their Structure-Activity Relationships. **10**, 655–683 (2011).
4. Joshi, Y. B.; Giannopoulos, P. F.; Praticò, D. The 12/15-lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer’s disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 181–186 (2015).
5. Chou, V. P.; Ko, N.; Holman, T. R.; Manning-Boğ, A. B. Gene-environment Interaction Models to Unmask Susceptibility Mechanisms in Parkinson’s Disease. *J. Vis. Exp.* 1–11 (2014).
6. Kühn, H.; O’Donnell, V. B. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* **45**, 334–356 (2006).
7. V. Nagarajan. Flash Photolysis of Transient Radicals. Benzophenone Ketyl Radical. *Chem. Phys. Lett.* **112**, 207–211 (1984).
8. Hodgson, B. W.; Keene, J. P.; Land, E. J.; Swallow, A. J. Light-induced fluorescence of short-lived species produced by a pulse of radiation : The benzophenone ketyl radical. *Am. Inst. Phys.* **3671**, 63 (1975).
9. Yang, W. S.; Stockwell, B. R. Ferroptosis : Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* **26**, 165–176 (2016).
10. Gaschler, M. M.; Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419–425 (2017).

