

University of Groningen

Inhibition and detection of 15-lipoxygenase-1

Eleftheriadis, Nikolaos

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:

2017

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

Citation for published version (APA):

Eleftheriadis, N. (2017). *Inhibition and detection of 15-lipoxygenase-1*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

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

Inflammatoire longziektes zoals astma en COPD hebben een ingrijpend effect op de gezondheid van patiënten. Gelukkig kunnen deze ziektes tegenwoordig verlicht worden door het gebruik van geneesmiddelen. Voor sommige patiënten zijn de huidige geneesmiddelen echter ineffectief of ze veroorzaken ernstige bijwerkingen. Het uitbreiden van de therapeutische mogelijkheden is daarom een belangrijke doelstelling. Dit doel kan, onder andere, bereikt worden door het ontwikkelen van nieuwe moleculen die aangrijpen op enzymen die betrokken zijn bij inflammatoire longziektes.

Recent onderzoek toont aan dat ontstekingsprocessen een grote rol spelen in aandoeningen van het centraal zenuwstelsel (CZS). In verscheidene acute, chronische en psychiatrische aandoeningen van het CZS spelen pro-inflammatoire cytokinen, prostaglandinen en leukotrienen een centrale rol. Daarnaast zijn er verhoogde waarden van IL-1, IL-6 en TNF α geconstateerd in hersenweefsel van patiënten met Alzheimer en Parkinson. Verder suggereren verschillende dierenstudies een link tussen IL-1 en beroerte, multiple sclerose en depressie. Deze bevindingen hebben geleid tot een zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen die inflammatie in het CZS tegen kunnen gaan.

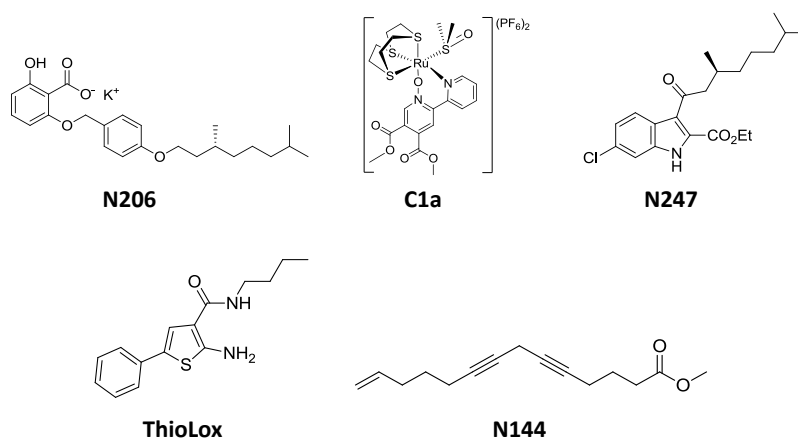
Het enzym humaan 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1) speelt een cruciale rol in de biosynthese van inflammatoire signaalmoleculen. 15-LOX-1 wordt hierdoor gezien als een regulator van verschillende inflammatoire longziekten zoals astma, COPD en chronische bronchitis. Recentelijk is ook een rol aangetoond in ziektes van het CZS, zoals Alzheimer, Parkinson en beroerte. Nieuwe, krachtige remmers en moleculaire, activiteit-gestuurde sondes van 15-LOX-1 zijn dringend nodig om de rol van het enzym verder te onderzoeken en om de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen mogelijk te maken. Dit proefschrift bestaat uit twee delen. In **deel A**, bestaande uit hoofdstukken 2, 3, 4 en 5, wordt het ontwerp van nieuwe remmers gepresenteerd. In **deel B**, hoofdstuk 6, wordt de synthese van activiteit-gestuurde sondes van 15-LOX-1 beschreven.

Deel A – Remming van 15-LOX-1

In **hoofdstuk 2** wordt de synthese en karakterisering van 6-benzoyloxysalicylaten als een nieuwe klasse van remmers van h-15-LOX-1 beschreven. Enzymremming en de kinetiek van de remming zijn vastgesteld en computer gegenereerde moleculaire modellen zijn gebruikt om een remmer met een geheel nieuwe structuur **37a** (N206) in kaart te brengen. Deze stof bleek een competitieve remmer van h-15-LOX-1 te zijn met een bindingsconstante (K_i waarde) van 1,7 μ M. Verbinding **37a** is de R-enantiomeer van mengsel **8a**. De S-enantiomeer, verbinding **37b**, is een zesmaal minder sterke remmer. Middels moleculaire modellen is te zien dat stof **37a** het overgrote deel van de substraatbindingsplek in beslag neemt en dat de alifatische staart van S-enantiomeer **37b** er niet

goed in past. Deze structuur-activiteitrelaties bieden een basis voor het verbeteren van de remmers en het verkennen van 15-LOX-1 als aangrijpingspunt voor geneesmiddelen.

Verscheidene types van ruthenium (II) (Ru(II)) complexen worden in **hoofdstuk 3** gepresenteerd als nieuwe remmers van 15-LOX-1. Wij zijn de eersten die een studie presenteren waarin Ru(II) complexen als nieuwe remmers van 15-LOX-1 worden aangemerkt. Twee verschillende complextypes met de algemene formules $[\text{Ru}(\text{[9]aneS}_3)(\text{dmsO})(N,N\text{- or }N,O\text{-donor ligand})](\text{PF}_6)_2$ en $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(O,O\text{-ligand})]\text{Cl}$ werden getest. Van de zeven geteste Ru(II) complexen waren twee niet eerder gesynthetiseerd (**C1a** en **C1b**). Beide nieuwe complexen zijn volledig gekarakteriseerd en ook zijn de kristalstructuren bepaald. De gerapporteerde data brengen vier Ru(II) complexen aan het licht als remmers van 15-LOX-1. De corresponderende, niet aan Ru(II) gebonden, vrije liganden waren niet in staat het enzym te remmen. Analyse van de remmingskinetiek van een Ru(II) complex (**C1a**) toonde niet-competitieve remming aan, wat erop duidt dat dit complex bindt aan substraat-gebonden enzym. In deze studie identificeren we lipoxygenases als een nieuwe klasse van enzymen die worden geremd door Ru(II) complexen, wat belangrijk is voor een beter begrip van de werking van ruthenium bevattende geneesmiddelen.

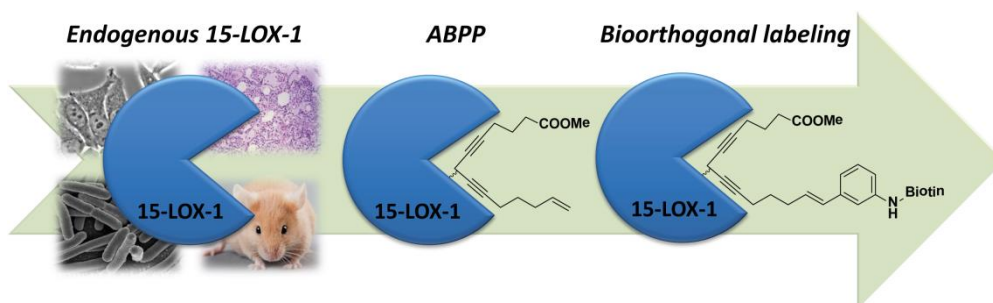


Figuur 1. 15-LOX-1 remmers in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 4** gebruikten we een efficiënte strategie om nieuwe remmers van 15-LOX-1 te identificeren. Onze aanpak begon met een substitutie-georiënteerde fragment-screen (SOS) waarbij de fragmentbibliotheek bestond uit heterocycli met een grote verscheidenheid aan substituenten. Nadat bleek dat vier stoffen uit de fragmentbibliotheek 15-LOX-1 remden, werden van twee remmers de structuur-activiteitrelatie en de remmingskinetiek bepaald, welke duiden op competitieve remming. Deze bevindingen werden gebruikt ter ondersteuning van moleculaire modellen voor de

binding van dit type remmers in het actieve centrum van h-15-LOX-1. Gebaseerd op deze modellen is het substitutiepatroon van de remmer verder geoptimaliseerd wat leidde tot de ontwikkeling van remmer **14d** met een K_i van 36 nM en een goede ligand-efficiëntie. Deze remmer is geëvalueerd in celstudies met RAW 264.7 macrofagen en in *ex vivo* studies met 'precies-gesneden longplakjes' van muizen. De remmer zorgde voor een verhoging van de expressie van IL-10 in zowel de macrofagen als het muizenlongweefsel.

Gebaseerd op de substitutie-georiënteerde fragment-screening (SOS) hebben we remmers van 15-LOX-1 ontworpen om de rol van dit enzym te bestuderen in verschillende ontstekingsziekten en neurologische aandoeningen. Dit hebben we beschreven in **hoofdstuk 5**. We hebben de SOS aanpak gebruikt met multicomponentreacties om tot een thiofeen bevattende 15-LOX-1 remmer te komen, die we **ThioLox** hebben genoemd. Door analyse van de enzymkinetiek en moleculaire modellen toonden we aan dat het ging om competitieve remming. **ThioLox** heeft een berekende K_i van 3,30 μ M, een zeer goede ligandefficiëntie en ook voordelige fysisch-chemische eigenschappen. De remmer is geëvalueerd *ex vivo* in 'precies-gesneden longplakjes' van muizenlongweefsel en bracht daar een sterk anti-inflammatoir effect teweeg. Daarnaast werden, gezien de acceptabele fysisch-chemische eigenschappen, studies naar een neuroprotectief effect uitgevoerd met HT-22 zenuwcellen. Hierin werd een sterk beschermende werking aangetoond. **ThioLox** biedt daarmee een startpunt om 15-LOX-1 aan te grijpen met een competitieve remmer met een beperkte grootte en een beperkte mate van lipofiliciteit.



Figuur 2. Tweestapsidentificatie van 15-LOX-1 met een activiteit-gestuurde sonde.

Deel B – Detectie van 15-LOX-1

In **Hoofdstuk 6** staat een studie beschreven naar activiteit-gestuurde labeling van 15-LOX-1. Wij zijn de eersten die een activiteit-gestuurde sonde rapporteren die op een efficiënte manier zowel recombinant 15-LOX-1 als ook 15-LOX-1 in cellysaten en weefselmonsters detecteert. Hiervoor werden allereerst irreversibele 15-LOX-1 remmers ontworpen en gesynthetiseerd. Onderzoek naar de enzymkinetiek van de nieuwe remmers resulteerde in een schatting van de sterkte van de remming

en ook werden hiermee inactivatieparameters en het remmingsmechanisme achterhaald. Vervolgens werd een terminale alkeen geïntroduceerd als chemisch label die kon worden gebiotinyleerd met de oxidatieve Heck reactie. Er is voor een alkeen label gekozen, omdat dit eenvoudig in de synthese van de bis-alkyn sondes paste. Wij zijn de eersten die de oxidatieve Heck reactie gebruiken voor de detectie van activiteit-gelabelde eiwitten, waarmee we een belangrijke toepassing van deze recent ontwikkelde bio-orthogonale reactie demonstreren. Activiteit-gestuurde labeling experimenten werden uitgevoerd met het recombinant enzym, cellen en weefselslysatens. In alle gevallen toonden we aan, middels controle experimenten met hitte-inactivatie en/of farmacologische inhibitie, dat labeling van 15-LOX-1 gerelateerd kon worden aan de activiteit van het enzym.