

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.

## Περίληψη

Οι φλεγμονώδεις ασθένειες του αναπνευστικού συστήματος όπως το άσθμα ή η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), μπορεί να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ασθενών και να μειώσουν ουσιαστικά την ποιότητα ζωής τους. Ευτυχώς, σήμερα οι ασθένειες αυτές μπορεί να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με διάφορα θεραπευτικά μέσα. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητο η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, διότι για πολλούς ασθενείς τα παρόντα διαθέσιμα φάρμακα είναι είτε αναποτελεσματικά ή προκαλούν σοβαρές παρενέργειες. Έτσι, η σχεδίαση και ανάπτυξη νέων φαρμάκων που στοχεύουν τα εμπλεκόμενα ένζυμα στις φλεγμονώδεις παθήσεις των πνευμόνων είναι εξαιρετικά σημαντική.

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στις ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε πολλές οξείες, χρόνιες ή ψυχιατρικές ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, προφλεγμονώδεις μεταβολίτες όπως κυτοκίνες, προσταγλανδίνες και λευκοτριένια, έχουν βρεθεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα των ιντερλευκινών-1 και -6 (IL-1, IL-6) καθώς και του TNFα έχουν εντοπιστεί στον εγκεφαλικό ιστό ασθενών που έχουν διαγνωστεί με πάρκινσον ή αλτσχάιμερ. Τέλος, διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα επιδεικνύουν σύνδεση της ιντερλευκίνης-1 (IL-1) με το εγκεφαλικό επεισόδιο, τη σκλήρυνση κατά πλάκας και της κατάθλιψης. Όλα αυτά τα ευρήματα οδηγούν σε έρευνες για νέα θεραπευτικά μέσα που μπορούν να στοχεύσουν τη φλεγμονή στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Η ανθρώπινη 15-λιποξυγενάση-1 (15-LOX-1) είναι μια σημαντική λιποξυγενάση που απαντάται στα θηλαστικά, παίζει κρίσιμο ρόλο στην βιοσύνθεση των φλεγμονωδών μορίων και αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα σε πολλές φλεγμονώδεις ασθένειες των πνευμόνων όπως το άσθμα, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και χρόνια βρογχίτιδα, καθώς και σε διάφορες ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως το πάρκινσον, αλτσχάιμερ και εγκεφαλικό επεισόδιο. Επομένως, η ανάγκη για την σημαντική αναστολή του συγκεκριμένου ενζύμου καθώς και ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του είναι επιτακτική. Έτσι ο συγκεκριμένος ρόλος που το ένζυμο επιτελεί θα πρέπει πλήρως να διαλευκανθεί, ώστε να καταστεί δυνατή η προσπάθεια ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Η παρούσα διδακτορική διατριβή χωρίζεται σε δύο μέρη. Το Α μέρος περιλαμβάνει τα κεφάλαια 2, 3, 4 και 5, στα οποία παρουσιάζεται ο σχεδιασμός καινούργιων μορίων-αναστολέων, ενώ το Β μέρος, το οποίο περιλαμβάνει το κεφάλαιο 6, περιγράφεται η σύνθεση μορίων-ανιχνευτών βασιζόμενων στην δραστηριότητα της 15-LOX-1.

### Μέρος Α – Αναστολή της 15-λιποξυγενάσης

Στο κεφάλαιο 2 περιγράφουμε την σύνθεση και το χαρακτηρισμό των 6-βενζυλο-σαλικυλικών οξέων (6-benzoyloxysalicylates) σαν νέα τάξη αναστολέων της 15-LOX-1. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες

ενζυμικής αναστολής, κινητικές μελέτες καθώς και μοριακή μοντελοποίηση, ώστε να χαρακτηριστεί ο νέος αναστολέας **37a** (N206), ο οποίος αποδέχτηκε να είναι συναγωνιστικός αναστολέας της 15-LOX-1 με  $K_i$  1.7  $\mu$ M. Η ένωση **37a** είναι το R εναντιομερές από το ρακεμικό μίγμα του **8a**, ενώ το S εναντιομερές, η ένωση **37b**, αποδείχτηκε να είναι 6 φορές λιγότερη ενεργή. Η μελέτη μοριακής μοντελοποίησης υποδεικνύει ότι η ένωση **37a** καταλαμβάνει όλο το ελεύθερο χώρο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ενώ στο S εναντιομερές **37b** καταδεικνύει μια αναντιστοιχία της αλειφατικής αλυσίδας με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι σχέσεις δομής δραστηριότητας των μορίων αυτής της μελέτης μπορεί να αποτελέσουν την βασική αρχή για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων της 15-LOX-1.

Στο κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται διάφορα σύμπλοκα ρουθηνίου (II) ως αναστολείς της 15-LOX-1. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που υποδεικνύει τα σύμπλοκα ρουθηνίου (II) ως αναστολείς αυτού του ενζύμου. Τα σύμπλοκα αυτά είναι δύο διαφορετικών τύπων με γενική μορφή:  $[\text{Ru}(\text{[9]aneS}_3)(\text{dmsO})(N,N\text{- or }N,O\text{-donor ligand})](\text{PF}_6)_2$  και  $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(O,O\text{-ligand})]\text{Cl}$ . Από τα επτά σύμπλοκα που μελετήθηκαν, τα δύο έχουν συντεθεί και παρουσιαστεί για πρώτη φορά (**C1a** και **C1b**). Τα δύο αυτά νέα σύμπλοκα έχουν πλήρως χαρακτηριστεί όπως έχουν προσδιοριστεί και οι κρυσταλλικές δομές τους. Τέσσερα σύμπλοκα βρέθηκαν να αναστέλλουν αποτελεσματικά το ένζυμο σε χαμηλή συγκέντρωση, χωρίς να παρατηρηθεί αναστολή του για τα αντίστοιχα ligands τους. Η ενζυμική κινητική μελέτη έδειξε ανταγωνιστική αναστολή, η οποία φανερώνει ότι ο αναστολέας προσδέεται στο σύμπλοκο υποστρώματος-ενζύμου. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει για πρώτη φορά τις λιποξυγενάσες ως νέα κατηγορία ενζύμων η οποία μπορεί να ανασταλεί από σύμπλοκα ρουθηνίου (II), το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την καλύτερη κατανόηση της δράσης των φαρμάκων με ρουθίνιο.

Στο κεφάλαιο 4, ακολουθήσαμε μια πρωτοποριακή στρατηγική προκειμένου να ανακαλύψουμε καινούρια μόρια-αναστολείς του ενζύμου 15-LOX-1, το οποίο αποτελεί ένα νέο στόχο για τη δημιουργία φαρμάκων σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες. Η προσέγγισή μας ξεκίνησε αναζητώντας το κατάλληλο μοτίβο υποκαταστατών, με μία εκτενή έρευνα στις ετεροκυκλικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους με διαφορετικούς υποκαταστάτες σε ποικίλες θέσεις. Αρχικά, τέσσερις ενώσεις έδειξαν να αναστέλλουν το ένζυμο, εκ των οποίων διαλέξαμε τις δύο και προχωρήσαμε σε μελέτες δομής δραστηριότητας καθώς και κινητικές μελέτες οι οποίες έδειξαν συναγωνιστική αναστολή. Επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματά μας χρησιμοποιώντας μοριακή μοντελοποίηση, σύμφωνα με την οποία ο αναστολέας μας προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Βασιζόμενοι στον προτεινόμενο αυτό τρόπο σύνδεσης του αναστολέα μας με το ένζυμο, προχωρήσαμε σε εκ νέου βελτίωση του μελετώντας την σχέση δομής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα την σύνθεση του αναστολέα **14d** ο οποίος αναστέλλει το ένζυμο με τιμή  $K_i$  36 nM, παρουσιάζοντας επίσης και πολύ καλές τιμές απόδοσης αναστολέα. Ο αναστολέας **14d** αξιολογήθηκε σε κυτταρικές

μελέτες, χρησιμοποιώντας τα μακροφάγα RAW 264.7, καθώς και σε *ex vivo* μελέτες σε ιστούς από πνεύμονα ποντικού, παρουσιάζοντας αντιφλεγμονώδη δράση με σημαντική αύξηση της ιντερλευκίνης-10.

Βασιζόμενοι στην τεχνική αναζήτησης κατάλληλου μοτίβου υποκαταστατών, την οποία αναπτύξαμε προηγουμένως, στο κεφάλαιο 5 παρουσιάζουμε τον σχεδιασμό μιας νέας σειράς αναστολέων για τη 15-LOX-1, αλλά αυτή την φορά όχι μόνο με στόχο την μελέτη του ρόλου αυτού του ενζύμου στην φλεγμονή αλλά και στις διάφορες νευρολογικές παθήσεις. Εφαρμόζοντας την παραπάνω τεχνική σε συνδυασμό με χημεία πολλαπλών συστατικών (MCR chemistry) σχεδιάσαμε ένα νέο αναστολέα της 15-LOX-1, τον οποίο ονομάσαμε **ThioLox**. Οι ενζυμικές κινητικές μελέτες καθώς και η μοριακή μοντελοποίηση υπέδειξαν συναγωνιστική αναστολή. Το **ThioLox** παρουσιάζει αναστολή του ενζύμου με  $K_i$  3.3  $\mu$ M, με πολύ καλές τιμές απόδοσης αναστολέα και τις επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες. *Ex vivo* μελέτες του αναστολέα σε ιστούς από πνεύμονα ποντικού υπέδειξαν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Εν συνεχεία, λόγω των επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του αναστολέα μας, πραγματοποιήθηκαν νευροπροστατευτικές μελέτες σε νευρικά κύτταρα HT-22, στα οποία παρατηρήθηκε ισχυρή προστασία. Το **ThioLox** μπορεί να αποτελέσει έναυσμα στην μελέτη αναστολής της 15-LOX-1 από συναγωνιστικούς αναστολείς με περιορισμένο μέγεθος και λιποφιλικότητα.

## Μέρος Β – Ανίχνευση της 15-λιποξυγενάσης

Μια μελέτη για την ανίχνευση της 15-LOX-1 παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 6. Για πρώτη φορά δημιουργήσαμε έναν ανιχνευτή της 15-LOX-1, βασιζόμενος στη δραστικότητα του ενζύμου. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση τόσο σε ανασυνδυασμένο ένζυμο όσο και σε κυτταρικές σειρές καθώς επίσης και σε δείγματα από ιστούς. Για το σκοπό αυτό, αρχικά σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν μη-αναστρεπτοί αναστολείς και πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές κινητικές μελέτες ώστε να προσδιοριστούν οι κινητικοί παράμετροι αναστολής των νέων αναστολέων. Σε μερικούς αναστολείς εισήχθηκε ένας διπλός δεσμός, ο οποίος είχε ως σκοπό την βιοτινυλίωση αυτών χρησιμοποιώντας την οξειδωτική αντίδραση Heck (oxidative Heck). Επιπλέον, η επιλογή της χρησιμοποίησης του διπλού δεσμού βοήθησε στην εύκολη σύνθεση αυτών των ανιχνευτών. Στην μελέτη αυτή, παρουσιάζεται για πρώτη φορά η εφαρμογή της οξειδωτικής αντίδρασης Heck για την ανίχνευση πρωτεϊνών βασιζόμενων στην δραστικότητά τους, επιδεικνύοντας την μελλοντική χρήση της για αντίστοιχες μελέτες. Η ανίχνευση της 15-LOX-1 δεν παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε μετουσιωμένο ένζυμο ενώ αναστάλθηκε σημαντικά όταν προηγήθηκε αναστολή του. Πιστεύουμε ότι η δημιουργία αυτών των ανιχνευτών θα ανοίξει νέους ορίζοντες στην μελέτη αυτού του ενζύμου, καθώς θα βοηθήσει στην κατανόηση του ρόλου του σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα.



# Appendix

Acknowledgements

List of Publications

About the Author

