

Aus dem Institut für Biochemie
der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rekombinante Expression und proteinchemische Charakterisierung einer potentiellen
viralen (Mimivirus *Acanthamoeba polyphaga*) Lipoxygenase

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tatjana Gehring

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.09.2019

Vorwort

(Teil-)Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter meiner Mitwirkung (siehe Anteilserklärung) in „Cytokine-Dependent Expression Regulation of ALOX15“. *J Cytokine Biol.* 2016;1:106. doi:10.4172/jcb.1000106 und in “Do lipoxygenases occur in viruses? Expression and characterization of a viral lipoxygenase-like genomic sequence did not provide evidence for the existence of viral lipoxygenases”. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids.* 2018;138:14-23 veröffentlicht.

Gliederung

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Abbildungsverzeichnis | 7 |
| Tabellenverzeichnis | 13 |
| Zusammenfassung | 15 |
| Abstract | 17 |
| Abkürzungsverzeichnis | 19 |
| Buchstabencodes der proteinogenen Aminosäuren | 22 |
| | |
| 1. Einleitung | 23 |
| 1.1. Lipoxygenasen | 23 |
| 1.1.1. Lipoxygenasereaktion | 23 |
| 1.1.2. Klassifizierung und Eigenschaften von Lipoxygenasen | 25 |
| 1.1.2.1. Klassifizierungskonzepte für Lipoxygenasen (spezifitätsbasiertes Klassifizierungsschema, verwandtschaftsbasiertes Klassifizierungsschema) | 25 |
| 1.1.2.2. Protein-chemische Eigenschaften von Lipoxygenasen | 26 |
| 1.1.2.3. Enzymatische Eigenschaften von Lipoxygenasen | 28 |
| 1.1.3. Vorkommen und biologische Rolle von Lipoxygenasen | 30 |
| 1.1.3.1. Vorkommen von Lipoxygenasen in den Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten) | 30 |
| 1.1.3.2. Biologische Rolle von Lipoxygenasen bei Säugetieren | 32 |
| 1.2. Viren | 37 |
| 1.2.1. Definition und Klassifizierung der Viren | 37 |
| 1.2.2. Struktur und Funktion der Viren | 39 |
| 1.2.2.1. Viren als Triebkraft der Genomevolution lebender Systeme | 39 |
| 1.2.2.2. Viren als Krankheitserreger für Pro- und Eukaryonten | 40 |
| 1.2.3. Megaviren als Übergangsformen zwischen belebten und unbelebten biologischen Strukturen | 41 |
| 1.2.3.1. Klassifizierung der Megaviren und deren Aufbau | 41 |
| 1.2.3.2. Mimiviren als Subfamilie der Megaviren (Vorkommen und Bedeutung) | 45 |
| 1.3. Lipoxygenasen bei Viren | 47 |
| 1.4. Fragestellung | 49 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2. | Materialien und Methoden | 50 |
| 2.1 | Materialien | 50 |
| 2.1.1 | Geräte und Hilfsmittel | 50 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 52 |
| 2.1.3 | Nährmedien, Puffer und sonstige Lösungen | 54 |
| 2.1.4 | Proteine und Kits | 56 |
| 2.1.5 | Plasmide und Oligonukleotide | 56 |
| 2.1.6 | Nukleotid- und Proteinsequenzen | 57 |
| 2.1.7 | Bakterienstämme | 57 |
| 2.1.8 | Eukaryontische Stämme | 57 |
| 2.2. | Methoden | 57 |
| 2.2.1. | Datenbankrecherchen | 57 |
| 2.2.2. | Klonierung der mutmaßlichen Mimivirus-LOX | 58 |
| 2.2.3. | Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit dem rekombinanten Expressionsplasmid und Plasmidamplifizierung | 61 |
| 2.2.4. | Sequenzierung des Expressionsplasmids | 61 |
| 2.2.5. | Prokaryontische Expression der mutmaßlichen Mimivirus-LOX in <i>E. coli</i> . | 62 |
| 2.2.6. | Eukaryontische Expression der mutmaßlichen Mimivirus-LOX in HEK293-Zellen | 63 |
| 2.2.7. | Quantifizierung von pro- und eukaryontischer Expression | 64 |
| 2.2.8. | Enzymatische Charakterisierung der Mimivirus-LOX | 65 |
| 2.2.8.1. | LOX-Aktivitätsassay unter normoxischen Bedingungen | 65 |
| 2.2.8.2. | LOX Aktivitätsmessungen unter hyperoxischen Bedingungen | 66 |
| 2.2.8.3. | HPLC-Analytik | 66 |
| 2.2.9. | Enzymreinigung | 67 |
| 2.2.9.1. | Affinitätschromatographie | 67 |
| 2.2.9.2. | Gelfiltration (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) | 67 |
| 2.2.10. | Protein-chemische Charakterisierung der potentiellen Mimivirus-LOX | 68 |
| 2.2.10.1. | Bestimmung des Eisengehaltes | 68 |
| 2.2.10.2. | Massenspektroskopie der tryptischen Spaltpeptide | 68 |
| 2.2.11. | Sequenzalignments | 69 |
| 3. | Ergebnisse | 69 |
| 3.1. | Datenbanksuche nach Lipoxygenase-ähnlichen Sequenzen in viralen | |

| | | |
|----------|---|-----|
| | Genomen | 69 |
| 3.1.1. | Dreistufige Suchstrategie | 69 |
| 3.1.1.1. | Lipoxygenase-ähnliche Sequenzen (Verbalsuche) | 69 |
| 3.1.1.2. | Filterkriterien zur Reduktion falsch positiver Suchergebnisse (Molekulargewicht, Eisencluster) | 70 |
| 3.1.1.3. | Aminosäuresequenzalignments der potentiellen Mimivirus-LOX mit humanen ALOX-Isoformen | 73 |
| 3.2. | Rekombinante Expression der putativen Mimivirus-LOX in <i>E. coli</i> | 75 |
| 3.2.1. | Synthese und Amplifizierung der Mimivirus-LOX-cDNA | 75 |
| 3.2.2. | Konstruktion, Klonierung und Analyse der rekombinanten Prokaryontischen Expressionsplasmide | 77 |
| 3.2.3. | Expression des rekombinanten Proteins und dessen Affinitätsreinigung . | 82 |
| 3.2.3.1. | Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe des pQE9-Vektors | 82 |
| 3.2.3.2. | Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe des pET28-Vektors | 82 |
| 3.2.3.3. | Protein-chemische Charakterisierung der gereinigten rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX | 84 |
| 3.2.3.4. | Enzymatische Charakterisierung des gereinigten rekombinanten Proteins (HPLC basierter Aktivitätsassay) | 92 |
| 3.3. | Rekombinante Expression der putativen Lipoxygenasesequenz in eukaryontischen Zellen | 96 |
| 3.3.1. | Konstruktion und Klonierung des eukaryontischen Expressionsplasmids | 96 |
| 3.3.2. | Eukaryontische Expression des rekombinanten Proteins | 101 |
| 3.3.2.1. | Testung der Expression des rekombinanten Proteins durch Immunoblotting | 101 |
| 3.3.2.2. | Testung der rekombinanten Expression mittels Aktivitätsassay | 101 |
| 3.4. | Charakterisierung eines ko-gereinigten unbekanntes bakteriellen Proteins | 103 |
| 3.4.1. | Elektrophoretische Trennung der rekombinant exprimierten potentiellen Mimivirus-LOX vom kogereinigten bakteriellen Protein | 103 |
| 4. | Diskussion | 105 |
| 4.1. | Vorkommen und biologische Rolle von Lipoxygenasen | 105 |
| 4.2. | Vorkommen von LOXn bei Viren | 107 |
| 4.2.1. | LOX-ähnliche Sequenzen bei Viren | 107 |
| 4.2.2. | Humanpathogene Viren besitzen keine LOX-Gene | 110 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.3. | Das putative Mimivirus-LOX-Gen kodiert nicht für eine aktive LOX | 112 |
| 4.3.1. | Die in <i>E. coli</i> exprimierte potentielle Mimivirus-LOX bildet einen hochmolekularen Komplex mit einem unbekanntem <i>E. coli</i> -Protein | 112 |
| 4.3.2. | Das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA bildet mit der potentiellen Mimivirus-LOX einen nicht-kovalenten Komplex | 114 |
| 4.3.3. | Biologische Bedeutung des bifunktionale Polymyxin Resistance Protein Arn-A | 115 |
| 4.3.4. | Die potentielle Mimivirus-LOX zeigt keine Fettsäureoxygenaseaktivität unter normoxischen Bedingungen | 116 |
| 4.3.5. | Die potentielle Mimivirus-LOX zeigt keine Fettsäureoxygenaseaktivität unter hyperoxischen Bedingungen | 118 |
| 4.3.6. | Die potentielle Mimivirus-LOX konnte in HEK-Zellen nicht exprimiert werden | 118 |
| 4.4. | Virus-abhängiger horizontaler Gentransfer und dessen Rolle bei der Verbreitung von LOXn in irdischen Lebensformen | 119 |
| 4.4.1. | Biologische Rolle des horizontalen Gentransfers | 119 |
| 4.4.2. | Mechanismen des horizontalen Gentransfers | 120 |
| 4.4.3. | Mögliche Verbreitung von LOX-Genen durch horizontalen Gentransfer . | 123 |
| 5. | Ausblick | 124 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 126 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 147 |
| | Anteilsklärung..... | 148 |
| | Tabellarischer Lebenslauf (CV) | 149 |
| | Publikationen | 150 |
| | Danksagung | 151 |

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.: Lipoxigenasereaktion. Die vier Elementarreaktionen der durch Lipoxigenasen katalysierten Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al., 2010. ... 24

Abb 1.2.: Kristallstruktur der humanen ALOX5. Gelb: Parallel und anti-parallel zueinander verlaufende β -Faltblätter der N-terminalen Domäne. Grün: Helices der C-terminalen katalytischen Domäne. Rot: Eisen-ligandierende Asn. Magenta: Flexible Verbindung zwischen den Domänen. Blau: Modifikationen, die für die Kristallstrukturanalyse vorgenommen wurden. Die Abb. wurde modifiziert nach Kuhn et al. 2015 27

Abb. 1.3.: Arachidonsäurekaskade. Kaskade enzymatischer Reaktionen, die zur Bildung bioaktiver Oxygenierungsprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren führt. Diese Reaktionsfolge wird initiiert durch die Aktivierung der zytosolischen Phospholipasen A2, die freie Fettsäuren aus den zellulären Phospholipiden freisetzt. Die Abb. wurde modifiziert nach Pardutz and Schoenen 2010. Der Reaktionsweg der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit der Darstellung nicht berücksichtigt. 29

Abb. 1.4.: Darstellung der LOX-Kinetik. Die LOX-Reaktion beginnt mit der lag-Phase, in der die Reaktionsgeschwindigkeit der Fettsäureoxygenierung mit der Zeit ansteigt. Es folgt eine lineare Phase, in der die Reaktionsrate mehr oder weniger konstant bleibt. Als letztes schließt sich die Selbstinaktivierung (suicidal inactivation) an, in der die Reaktionsrate mit der Zeit wieder abfällt. Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al. 2015. 30

Abb. 1.5.: Domänen des irdischen Lebens und Verbreitung von LOX-Sequenzen in diesen Domänen. LUCA steht dabei für die hypothetische Lebensformlast universal common ancestor (universeller gemeinsamer Vorfahre, siehe auch Kapitel 1.2.3.1.) Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al. 2010. 32

Abb. 1.6.: Biologische Rolle der LOXn. Erläuterungen siehe Text. Die Abb. wurde modifiziert nach Kuhn et al. 2015. 33

Abb. 1.7.: Eicosanoidbiosynthese. Erläuterungen siehe Text. Die Abb. wurde modifiziert nach Haeggström and Funk, 2011. 36

Abb. 1.8.: Schematische Darstellung der Aussonderung der Megaviren durch Filtration. Ursprünglich wurden Viren von lebenden Mikroorganismen dadurch abgegrenzt, dass sie Filter mit kleinen Porengrößen passieren können, durch die lebende Zellen nicht hindurch passen. Dadurch wurde zwangsläufig die Entdeckung von Viren verhindert, die größer sind als die Poren der verwendeten Filter (z.B. 0,2-0,45 μm). Die Abb. wurde modifiziert nach Colson et al. 2012 38

Abb. 1.9.: Schematische Darstellung der Struktur der Viren. A Icosahedrales Virus ohne Lipidhülle
B Helikales Virus mit Lipidhülle. Die Abb. wurde modifiziert nach Chappell et Dermody 2015. 39

Abb. 1.10.: Virale und zelluläre Reiche der irdischen Biosphäre und assoziierte parasitäre Beziehungen. Die Dicke der Linien spiegelt grob die Prävalenz dieser Beziehungen und die Intensität der Flüsse wider. Die Abb. wurde modifiziert nach Koonin and Dolja 2013 40

Abb. 1.11.: Zwei-Bereich-Modell des irdischen Lebens. Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen REOs (ribosome encoding organisms) und CEOs (capsid encoding organisms). Die Abb. wurde modifiziert nach Colson et al. 2012 44

Abb. 1.12.: Elektronenmikroskopaufnahmen des Megavirus Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus.
a) Einzelnes Mimiviruspartikel, b) Mimiviren im Zytoplasma von Acanthamoeba Polyphaga (Aherfi 2016)
..... 45

Abb. 1.13.: Darstellung des Genoms der Mimiviren als Sammlung von Genen verschiedener Mikroorganismen. Der Genpool des Mimivirus entstand durch Genaquisition und Genkonservierung. Die Abb. wurde modifiziert nach Moliner et al. 2010. 46

Abb. 3.1: Aminosäuresequenz der potentiellen LOX des Mimivirus aus Acanthamoeba polyphaga. Die potentiellen Eisenliganden sind grün (N-terminaler Eisencluster) bzw. gelb (C-terminaler Eisencluster) hinterlegt. Der erste potentielle Eisencluster wird gebildet durch die Aminosäuren **His-Met-Arg-Lys-Thr** oder durch **Thr-Leu-Ala-Lys-Thr-His**. Alternativ wäre auch die Sequenz **His-Met-Arg-Lys-Thr** ein Kandidat für den ersten Eisencluster. Alle drei Sequenzbereiche könnten über die Aminosäuren Asn, His und Thr prinzipiell zur Eisenligandierung beitragen. Der zweite potentielle Eisencluster wird gebildet durch die Aminosäuren **His-Ser-Lys-Asn-His**. Der ungefähre Abstand der beiden potentiellen Eisenligandencluster beträgt 160-170 Aminosäuren. Als 5. potentieller Eisenligand könnte wie bei vielen anderen LOXn das C-terminale Ile (blau hinterlegt) fungieren. 72

Abb. 3.2: Aminosäurealignment der humanen ALOX15 mit der potentiellen LOX des Mimivirus aus Acanthamoeba polyphaga. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Pubmed Datenbank extrahiert und das Aminosäurealignment wurde mit dem Programm DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt. Die potentiellen Eisenliganden der Mimivirus-LOX, die mit den Eisenliganden der humALOX15 alignen, sind blau hinterlegt. Dies betrifft auch die N-terminale Aminosäure der beiden Proteine (Ile in beiden Fällen). Für die humane ALOX15 konnte dieses Ile als fünfter direkter Eisenligand identifiziert werden 74

Abb. 3.3: Analytische Agarosegelelektrophorese des rekombinanten Synthesepasmids verschiedener Präparationsansätze. Nachweis des putativen LOX-Inserts (1,7 kb; untere Bande) und des linearisierten pBME-Vektors (2,96 kb; obere Bande) nach Präparation und Probespaltung der

synthetisierten DNA-Sequenz aus vier unterschiedlichen Bakterienklonen (Minipräparationen). Der Ablauf der Minipräparationen, der Restriktionsspaltung und der Agaroseelektrophorese wurde wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben durchgeführt. 76

Abb. 3.4. Schematische Darstellung des pQE9-Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text. .. 77

Abb. 3.5. Schematische Darstellung des pET28-Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text. 78

Abb. 3.6. Restriktionsspaltung ausgewählter rekombinanter Expressionsplasmide mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III. Das Restriktionsfragment mit dem Molekulargewicht von 1,7 kbp entspricht dem Mimivirus-LOX Insert. Die Fragmente mit 3,5 kbp bzw. 5,4 kbp repräsentieren die Insert-freien Vektoren. 79

Abb. 3.7. Aminosäurealignment des Mimivirus-LOX Inserts der Bakterienklone 2 und 8 auf der Basis der erhaltenen Nukleinsäuresequenzen. Das Alignment beschränkt sich auf die 240 N-terminalen ASn der potentiellen Mimivirus-LOX. Die restlichen ASn, einschließlich der C-terminalen Sequenz der potentiellen Mimivirus-LOX sowie die N-terminalen Sequenzen, die während der Klonierungsstrategie vor das Startmethionin der potentiellen Mimivirus-LOX vorgeschaltet wurden (inklusive der N-terminalen Hexa-His-tag Sequenz), sind bei diesem Alignment nicht berücksichtigt. 80

Abbildung 3.8: Immunoblotanalyse der Elutionsfraktion Elu 1 der Ni-Agarose Affinitätschromatographie. Die potentielle Mimivirus-LOX wurde in *E. coli* (Stamm DE3) unter Verwendung des rekombinanten pET-28b-Expressionsplasmids exprimiert (siehe Material und Methoden). Der Lysatüberstand wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt, und ein Aliquot der Elutionsfraktion Elu 1 wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Hilfe eines Anti-his-tag-Antikörpers gefärbt. Dabei ergab sich eine immunoreaktive Bande im theoretisch vorhergesagten Molekulargewichtsbereich von 67 kDa. 83

Abb. 3.9: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Ni-Agarose Affinitätschromatographie. Die potentielle Mimivirus-LOX wurde in *E. coli* (Stamm DE3) unter Verwendung des rekombinanten pET28-Expressionsplasmids exprimiert (siehe Material und Methoden). Der Lysatüberstand wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt, und Aliquots der verschiedenen Elutionsfraktionen (Elu 1-6) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei ergaben sich zwei Hauptproteinbanden mit geschätzten Molekulargewichten von 67 kDa (obere Bande) und 60 kDa (untere Bande). 84

Abb. 3.10. Size-Exclusion-Chromatographie der potentiellen Mimivirus-LOX. Drei gepoolte Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (3 ml) wurden zur Gelfiltration auf eine Superdex 200 10 Säule (GE Healthcare; Uppsala, Sweden) gegeben. Die Chromatographie wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Das Elutionsprofil der aufgetragenen Proteine wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 280 nm im Eluat der Säule verfolgt. 0,5 ml-Fractionen wurden

aufgefangen. Die Pfeile über der Kurve kennzeichnen die Elution der Molekulargewichtsstandards. CAB (Conalbumin, 75 kDa), OVA (Ovalbumin, 44 kDa), CAH (Karboanhydrase, 29 kDa), RNA (Ribonuklease A, 13,7 kDa). 87

Abb. 3.11: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der FPLC-Gelfiltration. Drei gepoolte Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (3 ml) wurden zur Gelfiltration auf eine Superdex 200 10 Säule (GE Healthcare; Uppsala, Sweden) gegeben. Die Chromatographie wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. 0,5-ml-Fraktionen wurden aufgefangen, und Aliquots (10 µl) dieser Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. 89

Abb. 3.12. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz mit der Sojabohnen-LOX1 wurden 0,01 µg/ml gereinigte Sojabohnen-LOX1 eingesetzt. Für die Testung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.7.) verwendet. 93

Abb. 3.13.: Linolsäureoxygenierungsprodukte. Die Messung der Linolsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz der Sojabohnen-LOX1 wurde gereinigtes Enzym (0,01 µg/ml-Ansatz) eingesetzt. Für die Testung der Aktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.9.) verwendet. Die Bildung von 9-HODE durch die Sojabohnen-LOX1 ist auf die pH-Abhängigkeit des Enzyms zurückzuführen und wird unter 4.3.4. näher diskutiert. 94

Abb. 3.14. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierung unter hyperoxischen Bedingungen. Die Messung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Vor dem Start der Reaktion wurde der Reaktionspuffer (PBS) für 30 Minuten mit reinem Sauerstoff equilibriert. Für den Ansatz der Sojabohnen-LOX1 wurden 0,01 µg Protein/ml Aktivitätsassayansatz verwendet. Für die Testung der Aktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg Protein/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.7.) eingesetzt. 95

Abb. 3.15. Schematische Darstellung des pcDNA3.1(-)- Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text. 97

Abb. 3.16. Agarosegelelektrophorese nach analytischer Spaltung der rekombinanten eukaryontischen Expressionsplasmide. 200-300 ng DNA/µl der Minipreps wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III für 1,5 h inkubiert, und der Spaltansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2%-iges Agarosegel) analysiert. Das Spaltfragment mit einem Molekulargewicht von 1,7 kbp deutet auf das Vorhandensein des Mimivirus-LOX Inserts hin. 98

Abb. 3.17. DNA-Sequenzierung des N-terminalen (5'-Region) Anteils des rekombinanten Expressionsvektors der potentiellen Mimivirus-LOX. Rot: Startkodon des rekombinanten Proteins. Blau: Hexa-His-tag Sequenz. Grün: N-terminale Sequenz der nativen (Nichtfusionsprotein) potentiellen Mimivirus-LOX. Obere Zeilen: Experimentell ermittelte Sequenz des Expressionsplasmids. Mittlere Zeilen: Antisensesequenz des rekombinanten Expressionsplasmids. Untere Zeilen: Aus der Nukleotidsequenz abgeleitete N-terminale Aminosäuresequenz des rekombinanten Fusionsproteins. 100

Abb. 3.18. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz der humanen ALOX5 wurde rekombinant exprimiertes Enzym (20 µg Gesamtprotein eines bakteriellen Lysatüberstandes) eingesetzt. Für die Testung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurden 20 µg einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.7.) verwendet. 102

Abb 3.19. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen Elu1 und Elu2 der Ni-Agarose Affinitätschromatographie eines bakteriellen Lysatüberstandes. Die rot umrandeten Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und mittels in-vitro-Trypsinierung verdaut. Das entstandene Spaltpeptidmuster wurde anschließend über LC/MS quantifiziert und mit den theoretisch vorhergesagten Spaltpeptidmustern von *E.coli*-Proteinen verglichen. 103

Abb. 4.1. Mögliche biologische Funktionen bakterieller LOXn. Erläuterungen siehe Text. 107

Abb. 4.2.: Virion- und Genomgrößen repräsentativer Megaviren und Virophagen von Amöben. (Aherfi et al. 2016) 108

Abb. 4.3.: Intra-amöbialer Lebensstil als Quelle komplexer chimerer Genome. Farbige Vierecke, die ein „G“ enthalten stellen Gene verschiedenen Ursprungs dar (Bakterien, Viren, Eukaryonten) (Modifiziert nach Colson et al. 2010). 109

Abb. 4.4. Kristallstruktur der Decarboxylasedomäne des bifunktionalen Polymyxin Resistance Proteins ArnA aus *E. coli*. Quelle PDB-Eintrag 1Z74. 116

Abb. 4.5. Mechanismen des horizontalen Gentransfers. Erläuterungen siehe Text. Abb. modifiziert nach Hartmann 2004/2005. 120

Abb. 4.6. Schematische Darstellung der homologen Rekombination. A) Wegen der Anwesenheit von Bereichen mit ähnlicher Nukleotidsequenz kann genetisches Material zwischen einer Spender-DNA (oben) und einer Empfänger-DNA (Mitte) ausgetauscht werden. Als Resultat entsteht eine Mischform, die DNA-Anteile des Spender- und des Empfängerorganismus enthält. B) Wenn keine ähnlichen (homologen) Nukleotidsequenzen in der Spender- und der Empfänger-DNA vorhanden sind, kann keine

homologe Rekombination ablaufen. Die Spender-DNA wird nicht in das Genom der Wirtszelle integriert und abgebaut. 121

Abb. 4.7: Schritte, die für die stabile Aufnahme von DNA in Bakterien von Bedeutung sind.
Modifiziert nach Nielsen et al. 1998 122

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Die sieben NCLDV-Familien. Die Familien wurden aufgeschlüsselt nach Wirtsvorkommen, Genomgrößen sowie Orte ihrer Replikation (modifiziert nach Koonin 2010). | 42 |
| Tab. 3.1: Ergebnis der Verbalsuche. Trefferanzahl der PubMed-Datenbanksuche für Proteine und Lipoxygenase, reduziert auf die Spezies Viren | 69 |
| Tab. 3.2: Potentielle virale LOX-Sequenzen. Diese Sequenzen wurden bei der Datenbanksuche nach viralen LOX-Sequenzen im Molekulargewichtsbereich zwischen 60.00 und 100.000 Da erhalten. Die Sequenzen 1-9 sowie 10-11 sind jeweils strukuridentisch. | 71 |
| Tab. 3.3. Vergleich der Aminosäuresequenz der Mimivirus-LOX mit den entsprechenden Sequenzen humaner und muriner ALOX-Isoformen. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Pubmed Datenbank extrahiert und das Aminosäurealignment wurde mit dem Programm DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt. | 73 |
| Tab. 3.4: Fotometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in vier Plasmid-DNA-Proben nach MINI-Präparation. | 76 |
| Tab. 3.5. Abgeschätzte Molekulargewichte der verschiedenen Proteinpeaks der Gelfiltration. Die verschiedenen Proteinpeaks (I-IV) sind in Abb. 3.10. gekennzeichnet. | 88 |
| Tab. 3.6. Eisengehalt der potentiellen Mimivirus-LOX. Eine Fe-Konzentration von 65 µg/l wurde in einem 200-µl-Aliquot der Elutionsfraktion 12 der FPLC Gelchromatographie mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Die Proteinkonzentration in dieser Elutionsfraktion betrug 1,05 mg/ml. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur ca. 55-70 % des enthaltenen Proteins auf die potentielle Mimivirus-LOX zurückzuführen sind, ergab sich eine Mimivirus-LOX Konzentration von 0,58-0,74 mg/ml (580-740 mg/l). Anschließend wurden diese Werte in molare Konzentrationen umgerechnet und das molare Verhältnis gebildet. | 91 |
| Tab. 3.7. Fotometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in fünf Plasmid-DNA-Präparationen (Minipreps). Die Analyse des DNA-Gehaltes der verschiedenen Minipreps erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. | 99 |
| Tab. 3.8. Identifizierung des unbekanntes <i>E.Coli</i>-Proteins, dass bei der Affinitätschromatographie an Ni-Agarose mit der potentiellen rekombinanten Mimivirus-LOX kogereinigt wurde. Die Proteinbande 1 wurde aus dem SDS-Gel (Abb. 3.19) herausgeschnitten und einem in-vitro-Trypsinverdau unterworfen. Die proteolytischen Spaltprodukte wurden anschließend mittels LC/MS analysiert und mit theoretischen Spaltmustern verschiedener <i>E.coli</i> -Proteine verglichen | 104 |

Tab. 4.1. Abwesenheit von LOX-ähnlichen Sequenzen in den Genomen ausgewählter human-pathogener Viren. Erläuterungen siehe Text. 111

Tab. 4.2. Vergleich des experimentell ermittelten tryptischen Spaltmusters der putativen Mimivirus-LOX mit dem für dieses Protein vorhergesagte Spaltmuster. Die Schlussfolgerung, dass das Bande-2-Protein (Abb. 3.19.) die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX repräsentiert, konnte dadurch untermauert werden. Die meisten anderen Kandidatenproteine weisen deutlich niedrigere Ähnlichkeitswerte (MW, Scores) auf. 113

Zusammenfassung

Einleitung: Lipoxygenasen (LOXn) sind Lipid-peroxidierende Enzyme, die bisher in zwei (Bakterien, Eukaryonten) der drei Domänen des irdischen Lebens nachgewiesen wurden. Diese Enzyme kommen bei höheren Pflanzen und Säugetieren weit verbreitet vor und sind dort an der Regulation von Reifungs- und Differenzierungsprozessen sowie an der Biosynthese verschiedener Lipidmediatoren beteiligt. In niederen Organismen kommen LOXn weniger weit verbreitet vor, und in Bakterien gibt es nur vereinzelt funktionelle LOXn. Echte virale LOXn wurden in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Da Viren die am weitesten verbreitete biologische Erscheinungsform auf der Erde darstellen und da sie als Vektoren für den horizontalen Gentransfer bedeutsam sind, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob und in welcher Häufigkeit LOX-ähnliche Sequenzen in Viren vorkommen und ob virale LOX-ähnliche Sequenzen für funktionelle LOX-Isoformen kodieren.

Methoden: Um diese Fragen zu beantworten, durchsuchten wir mit einer mehrstufigen sequenzbasierten Screeningstrategie die NCBI Datenbank viraler Genomsequenzen auf das Vorkommen potentieller LOX-Gene. Dabei wurde eine potentielle LOX-Sequenz im Genom eines Mimivirus entdeckt, das die Amöbe *Acanthamoeba polyphaga* infiziert. Diese Sequenz zeigt zwar nur eine ca. 15 %-ige Aminosäureidentität mit verschiedenen pro- und eukaryontischen LOXn, enthält aber wie alle anderen bisher identifizierten LOXn zwei potentielle Eisenbindungskuster.

Ergebnisse: Diese potentielle virale LOX wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinant exprimiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Immunoblotanalysen und LC-MS-Daten der tryptischen Verdauungspeptide bestätigten die chemische Identität des rekombinanten Proteins, doch LOX-Aktivitätsassays mit verschiedenen Substratfettsäuren lieferten keinen Hinweis auf eine LOX-Aktivität. Weiterhin deuten die Ergebnisse der Metallanalyse (Eisen, Mangan) der gereinigten Enzympräparation darauf hin, dass es sich bei dem rekombinant exprimierten Protein nicht um eine katalytisch aktive LOX handelt. Bei der Affinitätschromatographischen Reinigung der potentiellen Mimivirus-LOX fiel auf, dass das rekombinante His-tag Fusionsprotein einen heterodimeren Komplex mit einem *E. coli*-Protein bildet, welches als das bifunktionelle Polymyxinresistenzprotein ArnA identifiziert werden konnte. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese des Lipids A, das ein wichtiger Strukturbestandteil des bakteriellen Lipopolysaccharids LPS ist.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse unserer Suchstrategie nach LOX-ähnlichen Sequenzen in den Genomen der bisher sequenzierten Viren deuten darauf hin, dass funktionelle LOX-Gene bei Viren nicht bzw. nur wenig verbreitet vorkommen. Die einzige virale LOX-ähnliche Sequenz, die mit Hilfe der von uns entwickelten Screeningstrategie identifiziert werden konnte, kodiert nicht für eine funktionelle LOX. Diese Daten unterstützen die früher gezogene Schlussfolgerung, dass funktionelle LOXn in humanpathogenen Viren nicht vorkommen, sodass kein Zusammenhang zwischen viralen LOXn und Virus-induzierten Infektionskrankheiten hergestellt werden kann.

Abstract

Introduction: Lipoxygenases (LOXs) are lipid peroxidizing enzymes, which have been detected in two (bacteria, eucarya) of the three domains of terrestrial life. They frequently occur in higher plants and mammals and have been implicated in cell differentiation and maturation but also in the biosynthesis of lipid mediators. In lower organisms they only occur at low frequency and in bacteria these enzymes rarely occur. Since viruses represent the most abundant type of biological entity on earth and since they frequently function as vectors for horizontal gene transfer we aimed at exploring whether LOX-like sequences occur in viral genomes and whether such sequences might encode for functional LOX enzymes.

Methods: To answer these questions, we used a multistep sequence-based screening strategy to screen the NCBI database of viral genome sequences for the presence of potential LOX genes. We identified a single potential LOX-like sequence in the genome of a mimivirus that frequently infects the amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. This sequence only shared a low (15 %) degree of amino acid conservation with different mammalian lipoxygenase isoforms. However, as eukaryotic LOXs this protein involved two putative metal ligand clusters in appropriate distance to each other.

Results: The potential LOX-like sequence of *Acanthamoeba polyphaga* was expressed as N-terminal hexa-his-tag fusion protein in *E. coli* and was purified from the bacterial lysate supernatant. The chemical identity of the recombinant protein was confirmed by immunoblotting using an anti-his-tag antibody and by LC-MS analysis of the tryptic digest fragments. Unfortunately, the recombinant protein did neither contain iron nor manganese, which are essential for the catalytic cycle of LOXs. Moreover, activity assays with different polyenoic fatty acids did not reveal any evidence for a fatty acid oxygenase activity. Interestingly, the recombinant protein formed a non-covalent dimer with the bifunctional polymyxin resistance protein ArnA, which was co-purified

with the his-tag fusion protein by affinity chromatography. This enzyme has previously been implicated in the biosynthesis of lipid A, which is a functionally relevant constituent of the bacterial lipopolysaccharide LPS.

Conclusions: Our data suggest that the LOX-like sequence present in the genome of the *Acantamoeba polyphaga* mimivirus does not encode for a functional LOX-isoform. Moreover, the negative outcome of our searching strategy for LOX-like sequences in viral genomes and the lack of such sequences in a large number of human pathogenic viruses strongly suggest that LOXs do not frequently occur in viruses and that LOX may not be related to viral pathogenicity.

Abkürzungsverzeichnis

- 1** 11-HETE (R/S) 11-hydroxy-5E,8Z,12Z,14Z-eicosatetraenoic acid
(R- und S-Enantiomer)
11-H(p)ETE 11-hydroperoxy-5Z,8Z,12E,14-eicosatetraenoic acid
12-HETE (R/S) 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
(R- und S-Enantiomer)
12-H(p)ETE 12-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
13S-H(p)ODE 13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid
15-H(p)ETE 15-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
- 5** 5-HETE (R/S) 5-Hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
(R- und S-Enantiomer)
5,6-DiHETE 5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid
- 8** 8-HETE (R/S) 8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
(R- und S-Enantiomer)
- 9** 9-HETE (R/S) 9-hydroxy-5Z,7E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid
(R- und S-Enantiomer)
9S-H(p)ODE 9S-hydroperoxy-10E,12Z-octadecadienoic acid
- A** AA Arachidonsäure
ALOX5 Arachidonsäure 5-Lipoxygenase
ALOX12 Arachidonsäure 12-Lipoxygenase
ALOX12B Arachidonsäure 12-Lipoxygenase B
ALOX15 Arachidonsäure 15-Lipoxygenase
ALOX15B Arachidonsäure 15-Lipoxygenase B
ALOXE3 Arachidonsäure Lipoxygenase epithelialer Typ 3
AS Aminosäure
AAS Atomabsorptionsspektroskopie
ATP Adenosintri-phosphat

- C** CD4 Cluster of differentiation protein 4; CD4-Rezeptor
COX Cyclooxygenase
cPLA2 Zytosolische Phospholipase A2
CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
- D** DNA Desoxyribonukleinsäure
- F** FS Fettsäure
- H** HGT Horizontaler Gentransfer
HIV Humanes Immundefizienz-Virus
HETE Hydroxyeicosatetraensäure
HpETE Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC High performance liquid chromatography; Hochauflösende
Flüssigkeitschromatografie
- I** IL-4 Interleukin 4
IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
- K** kbp Kilobasenpaare
- L** LA Linolsäure
LC Liquid chromatography; Flüssigkeitschromatographie
LB lysogeny broth
LDL Low density lipoprotein
LOX Lipoxygenase
LOX1 Lipoxygenase 1 (Lipoxygenase der Sojabohne)
LTA4 Leukotrien A4; 5-trans-5,6-epoxy-7E,9E,11Z,14-
Zeicosatetraensäure
LTB4 Leukotrien B4; 5,12-dihydroxy- 6Z,8E,10E,14-
Zeicosatetraensäure
LTC4 Leukotrien C4; 5-hydroxy-6-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-
eicosatetraensäure
LTD4 Leukotrien D4; 5-hydroxy-6-(S-cysteinylglycyl)-

- 7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
- LTE4 Leukotrien E4; 5-hydroxy-6R-(S-cysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
- LUCA Last universal common ancestor
- M** Mimivirus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus
- mRNA Messenger-RNA
- MS Massenspektroskopie
- MW Molekulargewicht
- P** PA *Pseudomonas aeruginosa*
- PA-LOX LOX-1 der *Pseudomonas aeruginosa*
- PBS Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
- Q** qRT-PCR quantitative real-time Polymerasekettenreaktion; Echtzeit-PCR
- R** RNA Ribonukleinsäure
- RP-HPLC Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography; Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
- rpm Rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
- S** SDS-PAGE Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Buchstabencodes der proteinogenen Aminosäuren

| Aminosäure | Dreibuchstabencode | Einbuchstabencode |
|---------------|--------------------|-------------------|
| Alanin | Ala | A |
| Arginin | Arg | R |
| Asparagin | Asn | N |
| Aspartat | Asp | D |
| Cystein | Cys | C |
| Glutamin | Gln | Q |
| Glutamat | Glu | E |
| Glycin | Gly | G |
| Histidin | His | H |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Lysin | Lys | K |
| Methionin | Met | M |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | Thr | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |
| Valin | Val | V |
| Selenocystein | Sec | U |
| Pyrrolysin | Pyl | O |

1. Einleitung

1.1. Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind Fettsäuredioxygenasen (EC 1.13.11), die pro Enzymmolekül am aktiven Zentrum ein Eisen- bzw. Manganion enthalten, welches nicht in einer Hämgruppe gebunden ist (Haeggström und Funk 2011; Banthiya et al. 2015). Sie katalysieren die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (FSn) (Taylor et Morris 1983) mit mindestens zwei isolierten cis-Doppelbindungen zum jeweils korrespondierenden Hydroperoxyderivat. LOXn sind primär zytosolische Enzyme, die aber nach Zellstimulierung an intrazelluläre Membranen binden. Diese Membranbindung ist kalziumabhängig, wobei der zugrunde liegende molekulare Mechanismus für die meisten LOXn noch nicht geklärt ist. Durch diese Membranbindung wird die Fettsäureoxygenierungsaktivität der Enzyme aktiviert, und einige LOX-Isoformen sind zur direkten Oxygenierung von Membranlipiden fähig (Kuhn et al. 1990; Armstrong et al. 2016). Das Ergebnis der primären LOX-Reaktion sind Isoform-spezifische Fettsäurehydroperoxide, die anschließend zu diversen bioaktiven Lipidmediatoren umgesetzt werden, zu denen u.a. Leukotriene (Savari et al. 2014), Lipoxine (Romano 2010), Hepoxiline (Pace-Asciak 2009), die Eoxine (Sachs-Olsen 2010), Resolvine (Yoo et al. 2010) und Protektine (Serhan und Petasis 2011) gehören.

1.1.1. Lipoxygenasereaktion

Die durch Lipoxygenasen katalysierte Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren verläuft stereospezifisch und besteht aus vier aufeinander folgenden Elementarreaktionen: 1. Wasserstoffabstraktion, 2. Radikalumlagerung, 3. Sauerstoffinsertion und 4. Reduktion des Peroxidradikals (Ivanov et al. 2010). Die initiale Wasserstoffabstraktion stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt dar (Glickman und Klinman 1995). Das Nichthämeisen wechselt im Verlaufe der Reaktion seinen Redoxzustand und pendelt zwischen seiner zweiwertigen und seiner dreiwertigen Form hin und her (Rickert und Klinman 1999; Kuhn et al. 1986).

Während der einleitenden Wasserstoffabstraktion (Haeggström und Funk 2011) wird ein Wasserstoffatom von einer doppelallylständigen Methylengruppe des 1,4-cis-Pentadiensystems stereospezifisch abstrahiert. Der Wasserstoff wird der Fettsäure formal gesehen in Form eines Protons und eines Elektrons entzogen. Das Elektron wird durch das Nichthämeisen der Lipoxygenase aufgenommen und reduziert das

dreiwertige Eisen zur zweiwertigen Form. Das abstrahierte Proton geht in den Protonenpool des Puffers ein. Durch die initiale Wasserstoffabstraktion wird die Substratfettsäure am aktiven Zentrum des Enzyms zu einem kohlenstoffzentrierten Fettsäureradikal umgewandelt. Dieses Fettsäureradikal ist jedoch fest am aktiven Zentrum gebunden und kann nur unter ganz bestimmten Bedingungen (Hypoxie, Fettsäureüberschuss) vom Enzym abdissoziieren.

Bei der darauf folgenden Radikalumlagerung (2. Elementarreaktion) wird das ungepaarte radikalische Elektron im Fettsäuremolekül so verlagert, dass die Elektronendichte an einem der endständigen Kohlenstoffatome des Pentadienylradikals erhöht wird. Diese Radikalumlagerung verläuft entweder in Richtung des Methylendes ([+2]-Umlagerung) der Fettsäurekette oder in Richtung des Carboxylendes ([-2]-Umlagerung) des Fettsäuremoleküls.

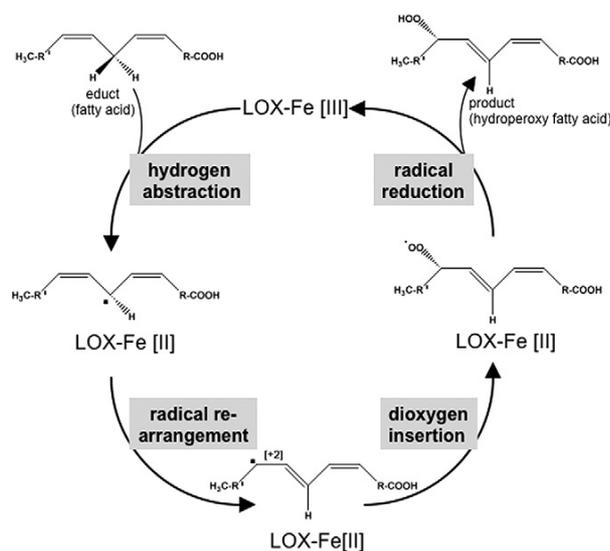


Abb. 1.1.: Lipoxygenasereaktion. Die vier Elementarreaktionen der durch Lipoxygenasen katalysierten Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren sind dargestellt. Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al., 2010.

Bei der Sauerstoffinsertion (3. Elementarreaktion) wird molekularer Sauerstoff positions- und stereospezifisch eingeführt, wodurch ein sauerstoffzentriertes Peroxyfettsäureradikal entsteht.

In der vierten und letzten Elementarreaktion des katalytischen Zyklus wird das Peroxyradikal zum entsprechenden Anion reduziert. Das dafür nötige Elektron liefert das zweiwertige Nicht-hämeisen, welches dabei in seine dreiwertige Form oxidiert wird.

Damit ist der katalytische Zyklus geschlossen und ein neues Substratmolekül kann am aktiven Zentrum binden (Abb. 1.1) (Ivanov et al. 2010).

1.1.2 Klassifizierung und Eigenschaften von Lipoxygenasen

1.1.2.1 Klassifizierungskonzepte für Lipoxygenasen (spezifitätsbasiertes Klassifizierungsschema, verwandtschaftsbasiertes Klassifizierungsschema)

Die Klassifizierung der LOXn basierte bei tierischen Enzymen lange Zeit auf ihrer Positionsspezifität der Oxygenierung von Arachidonsäure. Nach diesem Schema wurden LOXn danach benannt, an welchem Kohlenstoffatom der Arachidonsäurekette Sauerstoff eingeführt wird. Danach unterteilte man LOXn prinzipiell in 5-LOXn, 8-LOXn, 11-LOXn, 12-LOXn und 15-LOXn.

Allerdings weist dieses Klassifizierungsschema einige Nachteile auf, die zumindest potentiell zu Missverständnissen und Verwechslungen führen können (Ivanov et al. 2015): i) Das Klassifizierungskonzept ist selektiv auf die Arachidonsäureoxygenierung ausgerichtet und berücksichtigt nicht die Reaktionsspezifität der Enzyme mit anderen Polyenfettsäuren, wie Linolsäure, Linolensäure oder Dokosahexaensäure (Ivanov et al. 2010). ii) Evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse finden in diesem Klassifizierungsschema keine Berücksichtigung. Manche LOX-Isoformen weisen trotz eines engen Verwandtschaftsverhältnisses unterschiedliche Reaktionsspezifitäten auf. Umgekehrt zeigen andere LOX-Isoformen die gleiche Reaktionsspezifität, obwohl sie evolutionär kaum miteinander verwandt sind (Sloane et al. 1991; Sun und Funk 1996; Brash et al. 1997; Jisaka et al. 2000; Horn et al. 2015). Obwohl das spezifitätsbasierte Klassifizierungskonzept allgemein verständlich ist und vor allem von Wissenschaftlern anderer Fachrichtungen auch heute noch benutzt wird, ist es nicht eindeutig und birgt die Gefahr für Fehlinterpretationen.

Derzeit erfolgt die Klassifizierung der verschiedenen LOX-Isoformen zunehmend entsprechend ihrer evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen, die sich unter anderem in der Konserviertheit ihrer Aminosäuresequenzen ausdrücken (Ivanov et al. 2015). Zur Kennzeichnung einer bisher nicht näher charakterisierten LOX-Isoform wird dabei die Bezeichnung des jeweiligen humanen Gens herangezogen (Kuhn et al. 2015). Das humane Genom enthält sechs funktionelle LOX-Gene: ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3 und ALOX5, die für sechs verschiedene LOX-Isoformen kodieren

und die fast alle auf Chromosom 17 zu finden sind (Funk et al. 2002). Lediglich das ALOX5-Gen befindet sich auf Chromosom 10 (Kuhn et al. 2015). Das ALOX15-Gen kodiert für die ALOX15 (früher auch 12/15-LOX genannt), die beim Menschen hauptsächlich in eosinophilen Granulozyten (Sigall et al. 1988), in bronchoalveolären Epithelzellen (Sigal et al. 1992) und in mit Interleukin-4 behandelten Monozyten (Conrad et al. 1992) exprimiert wird. Das ALOX15B-Gen kodiert für die ALOX15B (früher 15-LOX2), die man hauptsächlich in verschiedenen Epithelzellen und in Haarwurzeln findet (Brash et al. 1997; Jisaka et al. 1997). Das ALOX12-Gen kodiert für die ALOX12 (früher Plättchentyp-12-LOX), die hauptsächlich in Blutplättchen exprimiert wird (Funk et al. 1990), aber auch in der Haut (Virmani et al. 2001) vorkommt. Das ALOX12B-Gen (Boeglin et al. 1998; Meruvu et al. 2005) kodiert für die ALOX12B (früher 12R-LOX), die einzige menschliche LOX-Isoform, die Polyenfettsäuren in Hydroperoxyderivate mit R-Konfiguration umwandelt. Neben der ALOX12B wird auch das ALOXE3-Gen in der Haut exprimiert (Kinzig et al. 1999; Yu 2006). Das ALOX5-Gen kodiert für die ALOX5 (früher 5-LOX), das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese (Haeggström und Funk 2011; Samuelsson et al. 1987). Eine eindeutige Zuordnung unbekannter LOX-Isoformen anderer Organismen (Bakterien, Algen, niedere und höher Pflanzen, Protozoa, Metazoa, niedere Wirbeltiere) zu den entsprechenden humanen Orthologen ist jedoch häufig nicht zweifelsfrei möglich, weil die Sequenzhomologien der zu klassifizierenden LOX zu mehreren humanen LOX-Isoformen ähnlich hoch sind. Daraus ergibt sich, dass das evolutionäre Klassifizierungsschema zwar für Säugetierlipoxygenasen angewendet werden kann, bei LOXn anderer Lebewesen aber häufig versagt. Damit muss geschlossen werden, dass es derzeit noch kein universelles Klassifizierungsschema für LOXn gibt (Ivanov et al. 2015).

1.1.2.2 Protein-chemische Eigenschaften von Lipoxygenasen

Säugetierlipoxygenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa. Pflanzliche LOXn sind in der Regel etwas größer (94-104 kDa), und bei niederen Organismen kommen LOXn auch als Fusionsproteine mit anderen Enzymen vor. Beispiele hierfür sind die LOXn aus *Plexaura homomalla* (Koljak et al. 1997) und *Gersemia fruticosa* (Löhelaid et al. 2008).

Röntgenkristallographische Daten zeigen, dass tierische und pflanzliche LOXn eine ähnliche Grundstruktur besitzen, wobei sich die zusätzlichen 20-30 kDa der Pflanzen-LOXn in Strukturbereichen befinden, die hoch konservierte Sequenzen

miteinander verbinden, selbst aber weniger hoch konserviert sind (Zheng et al. 2008). Bei den meisten hinsichtlich ihrer Raumstruktur bisher charakterisierten LOXn ist die Polypeptidkette in zwei abgrenzbare Domänen gefaltet. Die kleinere N-terminale Domäne besteht aus mehreren β -Faltblättern, die parallel bzw. anti-parallel zu einander verlaufen. Obwohl diese Domäne für die katalytische Aktivität verschiedener LOX-Isoformen nicht essenziell ist (Walther et al. 2002), scheint sie für die Regulation der katalytischen Aktivität und für die Membranbindung der Enzyme bedeutsam zu sein (Walther et al. 2011). Die größere C-terminale Domäne besteht aus mehreren alpha-Helices und enthält das katalytische Zentrum mit dem Nichthämeisen bzw. dem Manganion (Romanov et al. 2006) (Abb. 1.2). Ein Mol LOX enthält ein Mol Nichthämeisen bzw. Mangan (Ivanov et al. 2015).

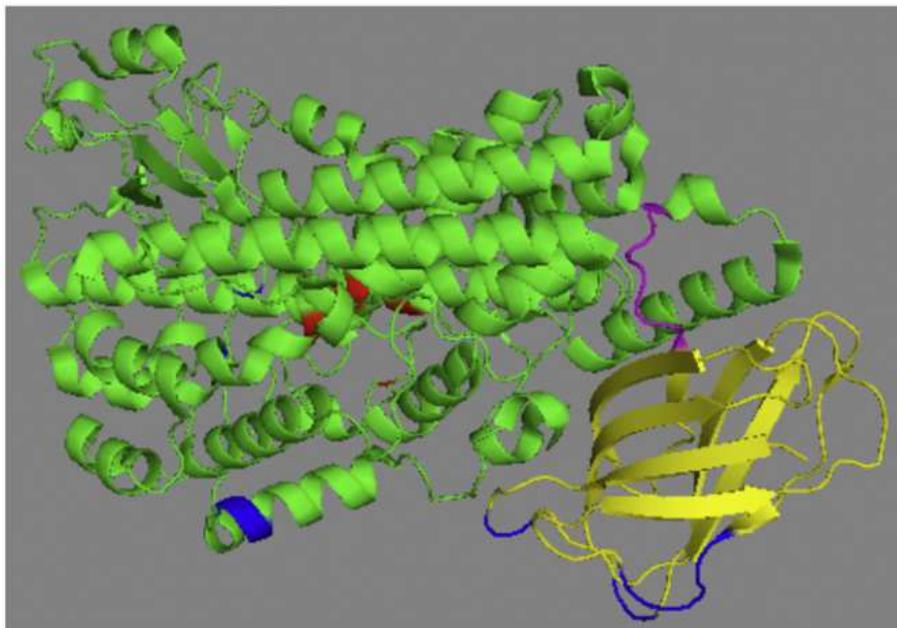


Abb 1.2.: Kristallstruktur der humanen ALOX5. Gelb: Parallel und anti-parallel zueinander verlaufende β -Faltblätter der N-terminalen Domäne. Grün: Helices der C-terminalen katalytischen Domäne. Rot: Eisen-ligandierende ASn. Magenta: Flexible Verbindung zwischen den Domänen. Blau: Modifikationen, die für die Kristallstrukturanalyse vorgenommen wurden. Die Abb. wurde modifiziert nach Kuhn et al. 2015

Dabei wird das Eisen- bzw. Manganion durch eine Gruppe hoch konservierter Aminosäuren komplexiert, bei denen es sich überwiegend um Histidin- und Asparaginseitenketten handelt. Als fünfter Eisenligand fungiert die freie Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure, bei der es sich häufig um ein Isoleucin (Haeggström und

Funk 2011) handelt. Die sechste Position der oktaedrischen Eisenligandensphere wird durch ein Wassermolekül oder ein Hydroxylion gebildet.

Für zwei menschliche LOX-Isoformen (ALOX5, ALOX15B) sind derzeit komplette Kristallstrukturen verfügbar (Gilbert et al. 2011; Kobe et al. 2014). Weiterhin gibt es komplette Datensätze für die Struktur der Kaninchen-ALOX15 (Gillmor et al. 1997; Choi et al. 2008) und einer N-terminalen Trunktionsmutante der Schweine-ALOX15 (Xu et al. 2012), die gute Modelle für die humanen ALOX15 darstellen. Da aber die Identitätsscores bei Aminosäurealignments für diese ALOX15-Orthologen zwischen 80-90 % variieren, können diese Modelle für mechanistische Detailuntersuchungen an der humanen ALOX15 nur bedingt verwendet werden. Für die restlichen drei humanen LOX-Isoformen (ALOX12, ALOX12B, ALOXE3) sind derzeit noch keine kompletten Röntgenkoordinatensätze verfügbar.

1.1.2.3 Enzymatische Eigenschaften von Lipoxygenasen

Grundsätzlich sind alle natürlich vorkommenden mehrfach ungesättigten FSn potentielle LOX-Substrate. Allerdings weisen verschiedene LOX-Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Linol- und Linolensäure dienen vor allem vielen pflanzlichen LOXn als Substrate (Lehnert und Solomon 2003), während viele tierische LOXn sowohl Linolsäure als auch Arachidonsäure umsetzen können (Kuhn et al. 2015).

Säugetier-LOXn bevorzugen freie Fettsäuren als Oxygenierungssubstrate. Jedoch ist die zelluläre Konzentration freier Fettsäuren in Säugetierzellen sehr niedrig (Kuhn et al. 2015). Daraus resultiert das Erfordernis der Freisetzung geeigneter Fettsäuren aus den Esterlipiden der zellulären Membranen. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung, katalysiert durch die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) (Mancini und Di Battista 2011). Um die bei der hydrolytischen Spaltung freigesetzten Polyenfettsäuren müssen die LOXn allerdings mit den Cyclooxygenasen (COXn) und Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen konkurrieren, durch welche die Fettsäuren alternativ zu Prostaglandinen bzw. Epoxidderivaten oxidiert werden können (Haeggström und Funk 2011) (Abb. 1.3; Pardutz und Schoenen 2010).

Neben der Oxidation freier FSn können manche LOX-Isoformen mehrfach ungesättigte FSn auch dann oxidieren, wenn sie Bestandteil von Phospholipiden (Schewe et al. 1975) oder von Cholesterolestern (Belkner et al. 1991) sind. Dies gilt

auch dann, wenn die Esterlipide Bestandteile von Lipid-Protein-Komplexen wie Biomembranen oder Lipoproteine sind (Kühn et al. 1993; Takahashi et al. 1993; Ivanov et al. 2015). Die ALOX15-abhängige Oxygenierung der Phospholipide der Mitochondrienmembranen ist wesentlicher Bestandteil des reifungsabhängigen Abbaus der Mitochondrien während der Retikulozytenentwicklung (Rapoport und Schewe 1986; van Leyen et al. 1998). Die katalytische Wirkung der ALOX15 auf das Lipidkompartiment von Lipoproteinen führt zur strukturellen Veränderung der Lipoproteine, so dass diese Lipid-Proteinkomplexe nicht mehr an den LDL-Rezeptor binden. Das oxidierte LDL kann jedoch von Scavengerrezeptoren gebunden werden, was zu einer unkontrollierten Lipidaufnahme durch Phagozyten und damit zur Schaumzellbildung führt. Da die Schaumzellbildung einen frühen Prozess der Atherogenese darstellt, wird die ALOX15 auch als pro-atherogenes Enzym angesehen (Cyrus et al. 1999; George et al. 2001; Zhao et al. 2005).

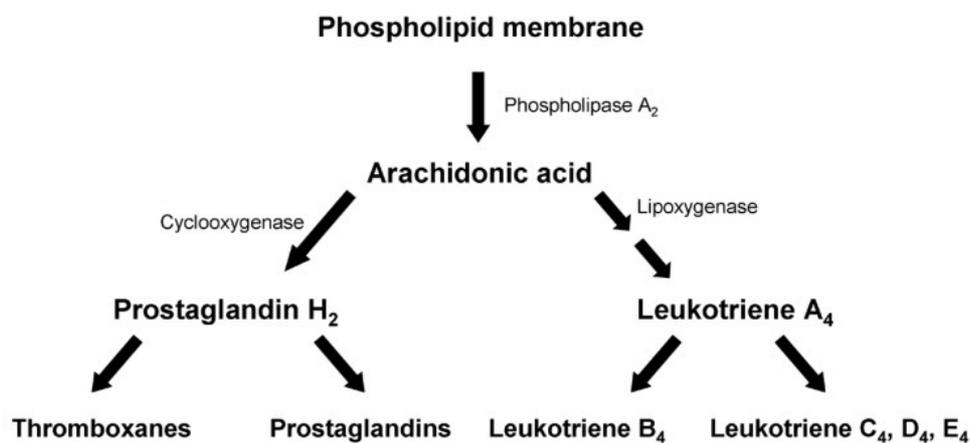


Abb. 1.3.: Arachidonsäurekaskade. Kaskade enzymatischer Reaktionen, die zur Bildung bioaktiver Oxygenierungsprodukte mehrfach ungesättigter Fettsäuren führt. Diese Reaktionsfolge wird initiiert durch die Aktivierung der zytosolischen Phospholipasen A2, die freie Fettsäuren aus den zellulären Phospholipiden freisetzt. Die Abb. wurde modifiziert nach Pardutz and Schoenen 2010. Der Reaktionsweg der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit der Darstellung nicht berücksichtigt.

Als kinetische Besonderheit zeigen LOXn auto-katalytische Eigenschaften, was als Ursache für die kinetische lag-Phase der Fettsäureaktivierung angesehen werden kann. Um die FS-Oxidation zu initiieren, müssen LOXn erst in ihre aktive dreiwertige Form oxidiert werden (Ivanov et al. 2015). Leider ist ein einzelner Aktivierungsschritt nicht ausreichend, um das Enzym unbegrenzt in seiner katalytisch aktiven Form zu halten, da während der Katalyse radikalische Intermediate vom aktiven Zentrum

abdissoziieren (Ludwig et al. 1987; Schilstra et al. 1994), wodurch das Enzym wieder in seine inaktive, zweiwertige Form reduziert wird. Um das Enzym wieder in seine aktive Form zu bringen, ist eine erneute Enzymaktivierung erforderlich, was durch die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren erreicht wird. Diese peroxidabhängige LOX-Aktivierung hängt zudem von der Anwesenheit molekularen Sauerstoffs ab (Ivanov et al. 2015; Zheng und Brash 2010), wobei der dieser Abhängigkeit zugrunde liegende molekulare Mechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

LOXn unterliegen bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten FSn einer Selbstinaktivierung (Hartel et al. 1982). Auch hier konnten die molekularen Grundlagen bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Abb. 1.4) (Ivanov et al. 2015).

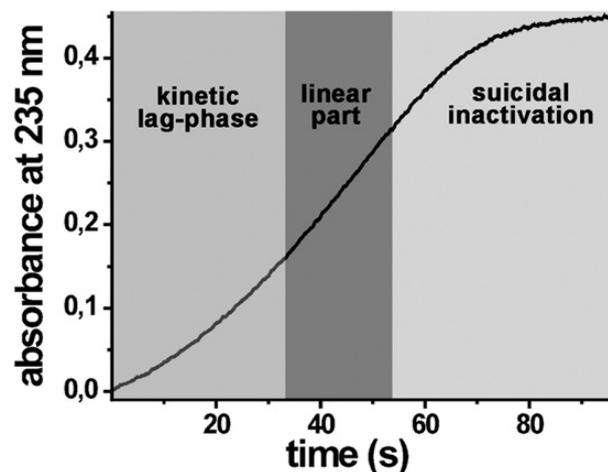


Abb. 1.4.: Darstellung der LOX-Kinetik. Die LOX-Reaktion beginnt mit der lag-Phase, in der die Reaktionsgeschwindigkeit der Fettsäureoxygenierung mit der Zeit ansteigt. Es folgt eine lineare Phase, in der die Reaktionsrate mehr oder weniger konstant bleibt. Als letztes schließt sich die Selbstinaktivierung (suicidal inactivation) an, in der die Reaktionsrate mit der Zeit wieder abfällt. Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al. 2015.

1.1.3 Vorkommen und biologische Rolle von Lipoxygenasen

1.1.3.1 Vorkommen von Lipoxygenasen in den drei Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten)

LOXn existieren in zwei der drei Domänen des irdischen Lebens, nämlich in Eukaryonten und in Bakterien (Hansen et al. 2013). Bei Eukaryonten kommen sie bei hochentwickelten Tieren (Ivanov et al. 2010) und Pflanzen (Andreou und Feussner 2009; Oliw 2002) vor. Sie konnten aber auch in weniger entwickelten Meeresorganismen (De Petrocellis und Di Marzo 1994; Hawkins und Brash 1987) nachgewiesen werden.

In Bakterien wurden LOX-Isoformen erst in jüngerer Zeit gefunden (Porta und Rocha-Sosa 2001; Vance et al. 2004; Koeduka et al. 2007) (Abb. 1.5). Zwar wurde früher bereits vereinzelt über LOXn in bestimmten Bakterien berichtet, doch erst mit der steigenden Verfügbarkeit vollständig sequenzierter bakterieller Genome und der damit verbundenen Möglichkeit einer systematischen Suche nach LOX-ähnlichen Gensequenzen, konnten in Bakterien eine Reihe solcher Sequenzen nachgewiesen werden (Horn et al. 2015). Darüber hinaus konnten in verschiedenen Bakterien katalytisch aktive LOX-Isoformen charakterisiert werden. Trotzdem bleibt festzustellen, dass LOXn nicht als typische bakterielle Proteine angesehen werden können. Aus den derzeit verfügbaren bakteriellen Genomen lässt sich abschätzen, dass weniger als 0,5 % aller Bakterienarten über LOX-ähnliche Sequenzen verfügen (Horn et al. 2015).

Außerdem zeigten multiple Sequenzvergleiche, dass bakterielle LOXn nicht das Resultat eines kontinuierlichen Entwicklungsprozesses sind, sondern dass die entsprechenden Genomsequenzen durch horizontalen Gentransfer aus höher entwickelten Lebewesen in bakterielle Genome eingeführt wurden (Hansen et al. 2013; Koeduka et al. 2007). Bei einigen Bakterienspezies, die durch diesen Gentransfer einen evolutionären Vorteil erlangt haben, wurden diese Sequenzen offenbar erhalten, bei anderen Bakterienspezies wurden sie jedoch wieder eliminiert.

Die biologische Rolle bakterieller LOXn ist derzeit noch weitgehend ungeklärt (Hansen et al. 2013; Koeduka et al. 2007). Kürzliche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die LOX-1 aus *Pseudomonas aeruginosa* (PA-LOX) als Teil eines bakteriellen Evasionsmechanismus angesehen werden kann, der darauf gerichtet ist, die Immunreaktion des Wirtsorganismus gegen den Krankheitserreger zu schwächen (Banthiya et al. 2016). Eine andere Hypothese zur biologischen Rolle bakterieller LOXn geht davon aus, dass diese Enzyme bei der Bildung von Biofilmen bedeutsam sein könnten (Deschamps et al. 2016). Zur Allgemeingültigkeit dieser Hypothese muss allerdings kritisch bemerkt werden, dass auch Bakterien ohne klassische LOX-Gene zur Biofilmbildung fähig sind. Eine dritte Hypothese zur möglichen biologischen Rolle bakterieller LOXn geht davon aus, dass diese Enzyme als Pathogenitätsfaktoren angesehen werden können. So ist z.B. die sezernierte PA-LOX in der Lage, durch Oxidation der Plasmamembranlipide menschlicher Erythrozyten eine Hämolyse hervorzurufen (Banthiya et al. 2016). Sollten sich diese Befunde *in vivo* bestätigen lassen, könnte eine Hemmung der LOX-1 bei einer PA-Infektion therapeutisch bedeutsam werden.

Für die dritte Domäne des irdischen Lebens, die Archaeen, bleibt das Vorkommen von LOXn unklar. Die Genome ausgewählter Archaeen (*Methanococcus voltae*, *Halorubrum kocurii*) enthalten zwar LOX-ähnliche Sequenzen, jedoch stimmen diese nur zu weniger als 25 % mit den Sequenzen gut charakterisierter pro- und eukaryontischer LOXn überein. Weiterhin fehlen funktionell wichtige Aminosäuren, so z.B. die bei allen LOXn hoch konservierten Metallliganden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass funktionelle LOXn bei Archaeen möglicherweise nicht vorkommen (Kuhn et al. 2015).

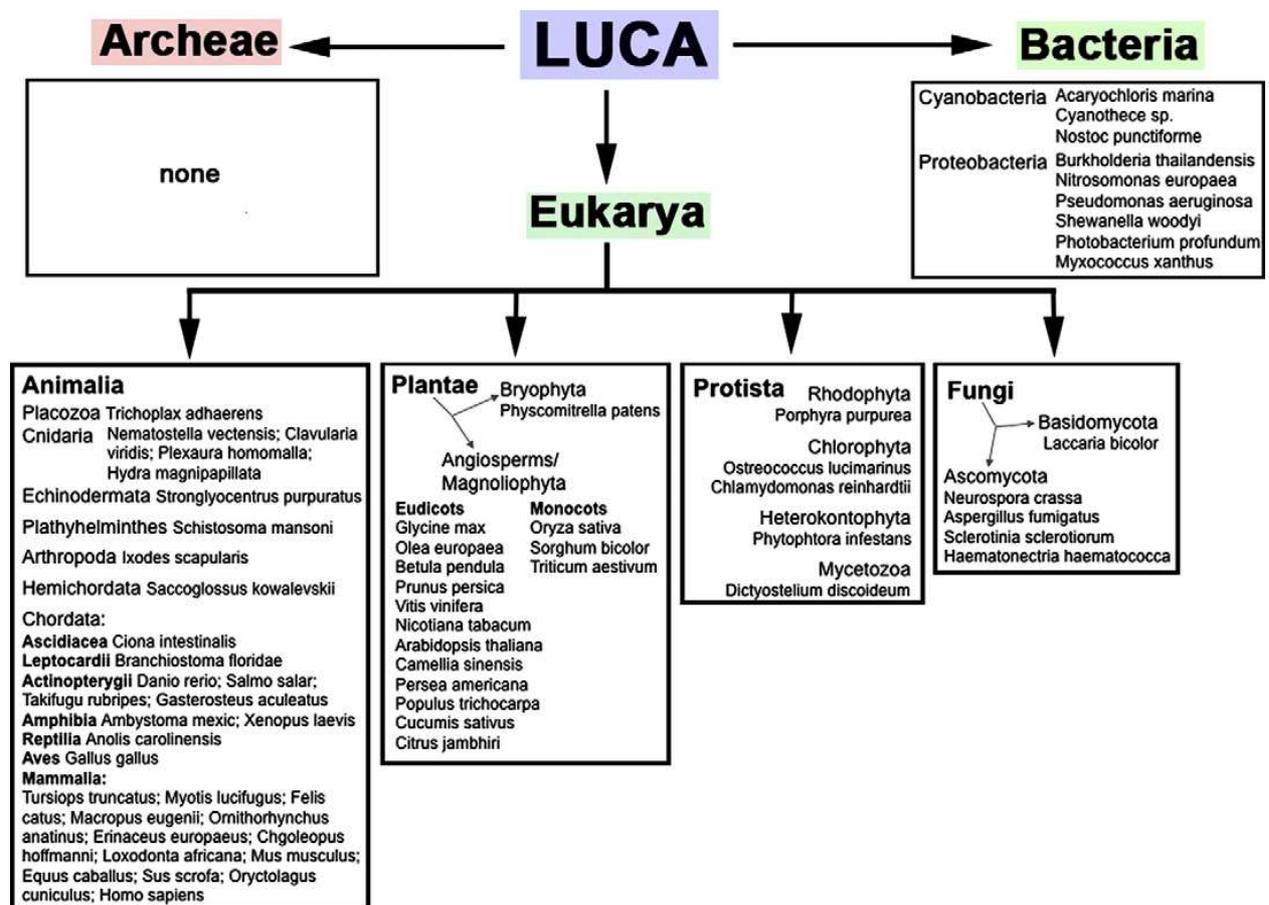


Abb. 1.5.: Domänen des irdischen Lebens und Verbreitung von LOX-Sequenzen in diesen Domänen. LUCA steht dabei für die hypothetische Lebensform last universal common ancestor (letzter universeller gemeinsamer Vorfahre, siehe auch Kapitel 1.2.3.1.) Die Abb. wurde modifiziert nach Ivanov et al. 2010.

1.1.3.2 Biologische Rolle von Lipoxygenasen bei Säugetieren

Säugetier-LOXn sind an physiologischen und pathologischen Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt (Gronert et al. 2005) (Abb. 1.6.). Sie nehmen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der zellulären Redox-Homöostase ein, die ein

wichtiges Element bei der Regulation der Genexpression darstellt. Der zelluläre Redox-Status wirkt sich auf das Genexpressionsmuster von Zellen aus (Kim et al. 2013) und bestimmt somit deren funktionellen Phänotyp. In jeder Zelle wird die Redox-Homöostase durch das balancierte Gleichgewicht aus pro- und anti-oxidativen Prozessen aufrechterhalten, und LOXn nehmen dabei als pro-oxidative Enzyme eine Schlüsselrolle ein (Kuhn et al. 2015).

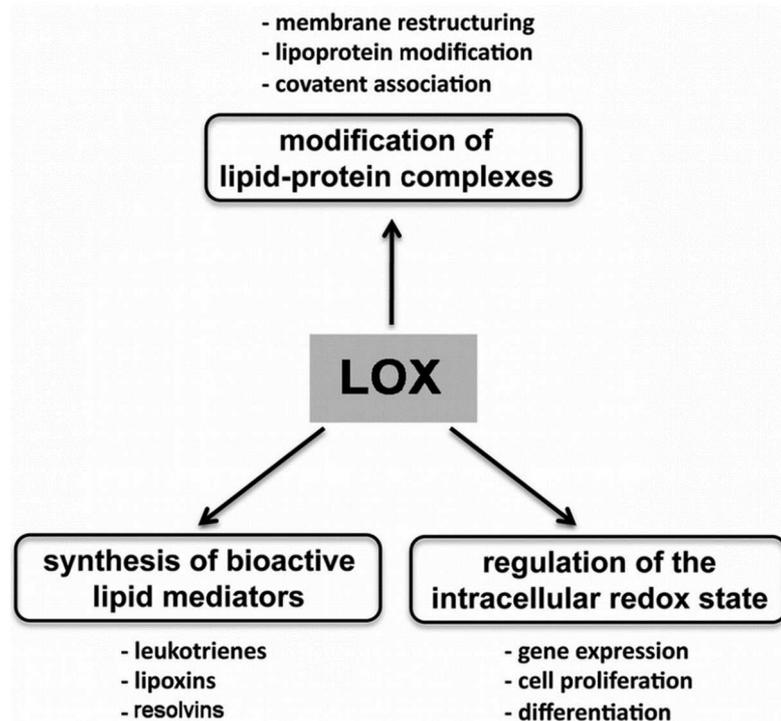


Abb. 1.6.: Biologische Rolle der LOXn. Erläuterungen siehe Text. Die Abb. wurde modifiziert nach Kuhn et al. 2015.

Die Fähigkeit einiger LOX-Isoformen Polyenfettsäuren zu oxidieren, wenn diese Bestandteil von Phospholipiden (Schewe et al. 1975) oder Cholesterolestern (Belkner et al. 1991) sind, deutet darauf hin, dass LOXn an der strukturellen Modifizierung komplexer Lipid-Protein-Partikel beteiligt sein können. Im Falle der Oxygenierung von Membranlipiden resultiert eine Modifizierung der Permeabilitätseigenschaften von Biomembranen. Dadurch wird die Barrierefunktion der Membranen beeinflusst, was zu zellulärer Dysfunktion führen kann (Kuhn et al. 2015).

LOXn sind an der Biosynthese zahlreicher bioaktiver Lipidmediatoren beteiligt (Pace-Asciak 2009), die eine große Anzahl physiologischer und patho-physiologischer Prozesse regulieren. Die Herstellung von knockout-Mäusen, bei denen die Expression

verschiedener LOX-Isoformen inaktiviert wurden, deutet darauf hin, dass die ALOX5 an der Biosynthese von Leukotrienen und damit an der Pathogenese allergischer Reaktionen beteiligt ist (Chen et al. 1994). Inaktivierung der Gene, die für die ALOX12b und die ALOXE3 kodieren, führt bei Mäusen zu epidermalen Phänotypen, die dem menschlichen Krankheitsbild der Ichtyosen ähneln (Krieg et al. 2013; Epp et al. 2007). Obwohl der molekulare Mechanismus der Wirkung von ALOX12b und ALOXE3 bei der epithelialen Differenzierung noch nicht vollständig geklärt werden konnte, geht man nach dem heutigem Verständnis davon aus, dass die ALOX12b die Oxidation hautspezifischer Ceramide zu entsprechenden Hydroperoxiden katalysiert (Krieg und Fürstenberger 2014; Zheng et al. 2011; Muñoz-Garcia et al. 2014). Diese Hydroperoxidlipide werden anschließend durch die Hydroperoxidisomeraseaktivität der ALOXE3 (Yu et al. 2003) modifiziert, was dazu führt, dass reaktive Lipidderivate kovalent mit Hautproteinen verlinkt werden. Dieser Prozess trägt zur Ausbildung der Hornschicht der Haut (*Stratum corneum*) bei (Kyriotou et al. 2012; Candi et al. 2005).

ALOX15 und ALOX12 knockout-Mäuse zeigen keinen signifikanten Phänotyp, solange sie nicht anderweitig stimuliert werden. Werden ALOX15-knockout-Mäuse jedoch mit apoE-defizienten Tieren gekreuzt und die Doppelknockouts anschließend über mehrere Wochen mit einer lipidreichen Diät gefüttert, ist der Grad der Lipidablagerungen in der Aorta deutlich geringer, wenn man diesen Readoutparameter mit dem von ALOX15 exprimierenden Kontrolltieren vergleicht (Cyrus et al. 2001). Ähnliche Effekte wurden beobachtet, wenn ALOX15-knockout-Mäuse mit LDL-rezeptordefizienten Tieren gekreuzt wurden (George et al. 2001). Diese Daten sprechen für eine pro-atherogene Wirkung der murinen ALOX15. ALOX12 knockout-Mäuse haben subtile Störungen der Blutgerinnung und zeigen ebenfalls Differenzierungsstörungen der Haut (Funk et al. 2002)

Während einer experimentellen Anämie wird die Expression der Kaninchen-ALOX15 in unreifen roten Blutzellen dramatisch hochreguliert (Rapoport und Schewe 1986). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Enzym bei der Retikulozyten-Erythrozyten-Transition bedeutsam sein könnte. In den Membranlipiden reifender roter Blutzellen wurden spezifische ALOX15-Produkte nachgewiesen (Kuhn et al. 1990), und eine Hemmung der ALOX15 führt zu einer Verzögerung der Retikulozytenreifung (van Leyen et al. 1998).

Auch an der embryonalen Hirnentwicklung scheinen 12-lipoxygenierende Isoformen beteiligt zu sein (Mikule et al. 2002; Nishiyama et al. 2003; de la Houssaye et

al. 1999). Sowohl 12-HETE als auch 12-HpETE fungieren als Signalmoleküle bei der Axonentwicklung. Als weitere Hinweise für die Rolle der ALOX15 bei der Hirnentwicklung kann interpretiert werden, dass das Enzym für die synaptische Signalübertragung bedeutsam zu sein scheint (Normandin et al. 1986; De Costanzo et al. 2010; Feinmark et al. 2003).

LOXn sind Schlüsselenzyme der Biosynthese aliphatischer Eicosanoide. Dabei handelt es sich um Lipidmediatoren, die sowohl an der Förderung inflammatorischer Prozesse als auch am Schutz gegen eine Entzündung beteiligt sein können (Kuhn et al. 2015). Zu den durch LOX-Katalyse entstehenden aliphatischen Eicosanoiden gehören die Leukotriene als klassisch pro-inflammatorische (Haeggström und Funk 2011; Rådmark und Samuelsson 2010) und die Lipoxine als klassisch anti-inflammatorische Mediatoren. Leukotriene werden von peripheren Leukozyten und anderen immunkompetenten Zellen aus Arachidonsäure über den ALOX5-Weg synthetisiert (Rådmark et al. 2007). Dabei wirkt die ALOX5 als Enzym mit dualer enzymatischer Aktivität. Sie katalysiert die Oxidation von Arachidonsäure zu 5(S)-HpETE und die sekundäre Umsetzung von 5(S)-HpETE zu Leukotrien A₄ (LTA₄). LTA₄ wird schließlich in peptidhaltige oder peptidfreie Leukotriene umgesetzt (Kuhn et al. 2015) (Abb. 1.7.).

Zu den peptidhaltigen Leukotrienen gehören LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Diese Leukotriene sind die wichtigsten Bestandteile der slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) und spielen eine Rolle bei der Pathogenese allergiebedingter Krankheiten wie Asthma bronchiale (Singh et al. 2013) und allergische Rhinitis (Çobanoğlu et al. 2013). Sie lösen in postkapillären Venolen eine Extravasation von Blutplasma aus und induzieren die Anheftung von Blutzellen ans Gefäßendothel. Dadurch entsteht ein Schleimhautödem (Dahlen et al. 1981). Zusätzlich induzieren die Peptidleukotriene die bronchiale Schleimsekretion (Kaliner et al. 1986; Peatfield et al. 1982) und erhöhen die Viskosität des Bronchialschleims.

Bei den Peptid-freien Leukotrienen ist vor allem das LTB₄ zu nennen. Es ist ein starker Stimulator von Zellen des angeborenen Immunsystems (Le Bel et al. 2014). LTB₄ wird u.a. in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, in Monozyten und in Makrophagen synthetisiert. Es induziert eine Zellaggregation und erhöht die vaskuläre Permeabilität (Smith 1981). Es stimuliert Chemotaxis von Entzündungszellen und aktiviert die Anheftung neutrophiler Granulozyten an die Gefäßwand (Palmland et al. 1981; Afonso et al. 2012). Weiterhin induziert LTB₄ über die Oberflächenrezeptoren

BLT1 und BLT2 intrazelluläre Signalkaskaden, die zur Aktivierung inflammatorischer Zellen führen (Yokomizo 2011; Hicks et al. 2007).

Lipoxine (Hu et al. 2012) und weitere anti-inflammatorische und/oder pro-resolutorische Mediatoren, wie Resolvine (Spite et al. 2014), Protektine (Kuda et al. 2016) und Maresine (Serhan et al. 2012), werden durch eine konzertierte Aktion verschiedener LOX-Isoformen (ALOX12, ALOX15, ALOX15B, ALOX5) synthetisiert. Die Synthese wird im Zuge der Beendigung einer Entzündungsreaktion in Gang gesetzt und führt durch Aktivierung bestimmter Rezeptoren (GPCR-32; ALX; BLT-1) auf der Oberfläche immunologisch aktiver Zellen zu einer aktiven Beendigung der Entzündungsreaktion (Kuhn et al. 2015). Zum Beispiel wird die Leukozytenmigration reduziert (Fierro et al. 2003) und die vaskuläre Permeabilität normalisiert sich (Ereso et al. 2009). Pro-inflammatorische neutrophile Granulozyten gehen in Apoptose (Kebir und Filep 2013), und transdifferenzierte M2-Makrophagen phagozytieren Bakterienreste sowie apoptotische pro-inflammatorische Entzündungszellen (Ohira et al. 2010).

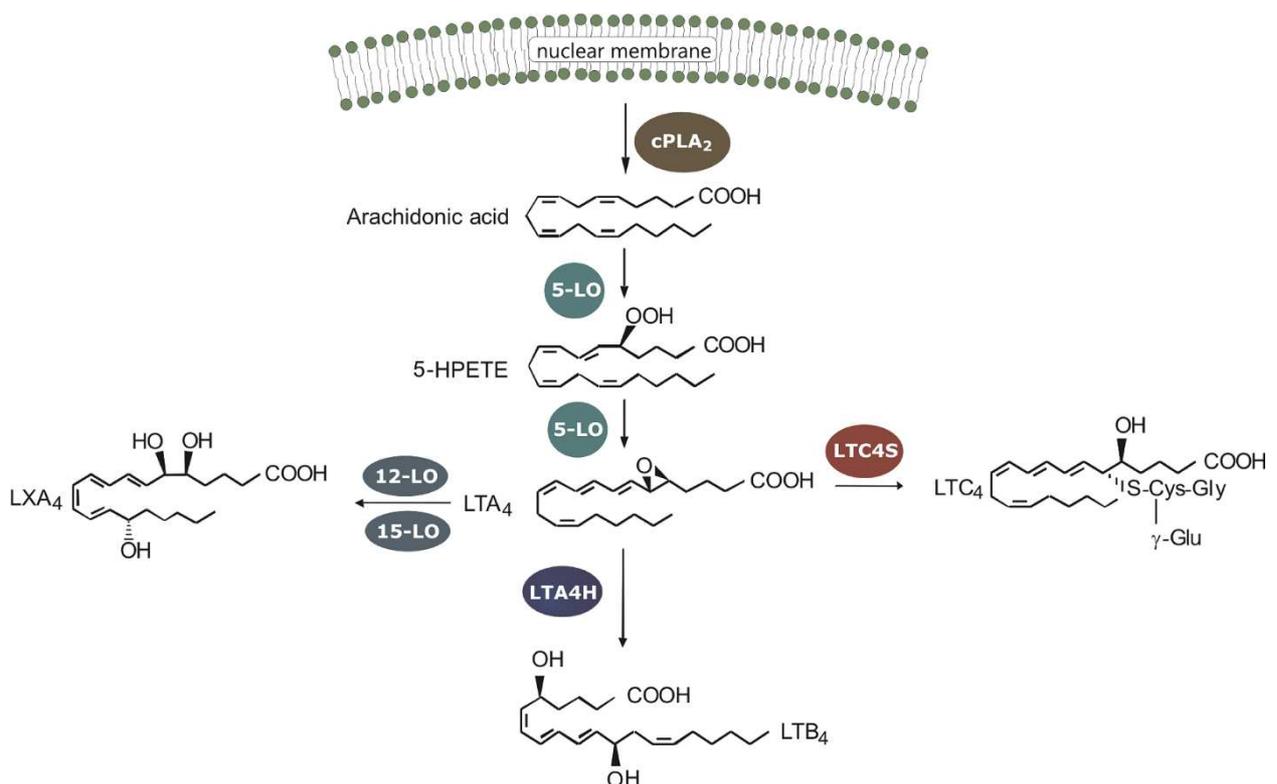


Abb. 1.7.: Eicosanoidbiosynthese. Erläuterungen siehe Text. Die Abb. wurde modifiziert nach Haeggström and Funk, 2011.

Vier der sechs humanen LOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX5) sind an der Regulation der zellulären Proliferation und damit auch an der Karzinogenese beteiligt. Grundsätzlich wurde diese Beteiligung bei unterschiedlichen Krebsarten gezeigt. Das Hauptaugenmerk der Forschung liegt allerdings auf dem kolorektalen Karzinom und dem Prostatakarzinom (Kuhn et al. 2015). Drei LOX-Isoformen (ALOX5, ALOX15, ALOX15B) sind vermutlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (Zhao und Funk 2014; Poeckel und Funk 2010; Wuest et al. 2014). ALOX5 und ALOX15B (Gertow et al. 2011) werden in hohem Ausmaß in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques exprimiert, während die ALOX15 nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Verschiedene LOX-Isoformen spielen wahrscheinlich auch bei der Pathogenese verschiedener ZNS-Erkrankungen, wie Schlaganfall, M. Parkinson und M. Alzheimer eine Rolle (Kuhn et al. 2015). Dabei ist jedoch heute noch nicht vollständig geklärt, ob die beobachteten Korrelationen auch kausal sind und wie genau die Enzyme den Krankheitsverlauf beeinflussen.

1.2 Viren

1.2.1 Definition und Klassifizierung der Viren

Viren sind die verbreitetsten biologischen Daseinsformen auf der Erde (Koonin et al. 2015). Viromuntersuchungen zeigen, dass die Anzahl an Viruspartikeln in unterschiedlichen Biotopen typischer Weise 10-100 mal größer ist, als die Anzahl lebender Zellen (Edwards und Rohwer 2005; Rohwer 2003; Suttle 2007).

Ursprünglich wurden Viren von lebenden Mikroorganismen dadurch abgegrenzt, dass sie Filter mit kleinen Porengrößen passieren können, durch die lebende Zellen nicht hindurch passen (Abb. 1.8.). Ihre Subklassifizierung beruhte in erster Linie auf ihren infektiösen (z.B. spezifischer Organtropismus hepatischer Viren) bzw. epidemiologischen Eigenschaften (z.B. Übertragung der Arboviren durch Arthropoden) (Chappell und Demody 2015).

Heute sind Viren definiert als obligat intrazelluläre Parasiten, die Organismen aller drei Domänen des irdischen Lebens und sogar andere Viren parasitieren und sich nicht unabhängig von ihren Wirtsorganismen replizieren können (Raoult und Forterre 2008). Sie nutzen den Replikationsapparat anderer Zellen, um sich selbst zu vervielfältigen (Lwoff 1957). Viren verpacken ihr Genom in ein virales Kapsid, das aus unterschiedlichen Proteinen besteht und u.a. für den Tropismus der Viren verantwortlich ist (Raoult und Forterre 2008). Über die Kapsidproteine können Viren an Wirtszellen

andocken und ihr Genom in die Wirtszelle injizieren. Einige Virenarten besitzen als äußere Begrenzung noch eine zusätzliche Lipidhülle, die sie empfindlich gegen Austrocknung macht. Viren ohne Lipidhülle kommen mit rauen Umweltbedingungen gut zurecht und verbreiten sich oft auf oral-fäkalem Weg (Chappell und Demody 2015). Viele Viren enthalten in ihrem Inneren zusätzlich zum Virusgenom noch einige Enzyme, die in der Wirtszelle die Initiierung der Replikation des viralen Genoms regulieren (Chappell und Demody 2015) (Abb. 1.9.).

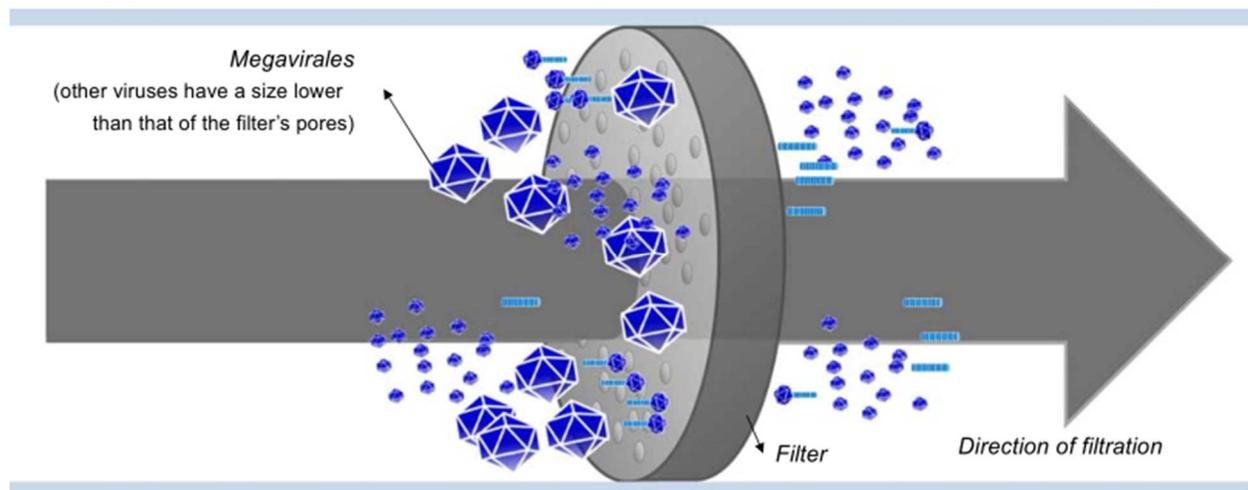


Abb. 1.8.: Schematische Darstellung der Aussonderung der Megaviren durch Filtration. Ursprünglich wurden Viren von lebenden Mikroorganismen dadurch abgegrenzt, dass sie Filter mit kleinen Porengrößen passieren können, durch die lebende Zellen nicht hindurch passen. Dadurch wurde zwangsläufig die Entdeckung von Viren verhindert, die größer sind als die Poren der verwendeten Filter (z.B. 0,2-0,45 µm). Die Abb. wurde modifiziert nach Colson et al. 2012

Die Klassifizierung von Viren basiert auf verschiedenen Kriterien: i) Typ und Struktur der viralen Nukleinsäure sowie die Strategie ihrer Replikation. ii) Typ und Symmetrie des Viruskapsids (helikal oder icosahedral) iii) Vorhandensein bzw. Abwesenheit einer Lipidhülle (Chappell und Demody 2015).

Hinsichtlich ihrer Nukleinsäurestruktur und ihrer Replikationsstrategie lassen sich Viren in sechs Klassen einteilen (Koonin und Starokadomskyy 2016): a) positive Einzelstrang-RNA-Viren (+ssRNA-Viren), b) negative Einzelstrang-RNA-Viren (-ssRNA-Viren), c) Doppelstrang-RNA-Viren (dsRNA-Viren), d) Einzelstrang-DNA-Viren (ssDNA-Viren), e) Doppelstrang-DNA-Viren (dsDNA-Viren) und f) Retroviren.

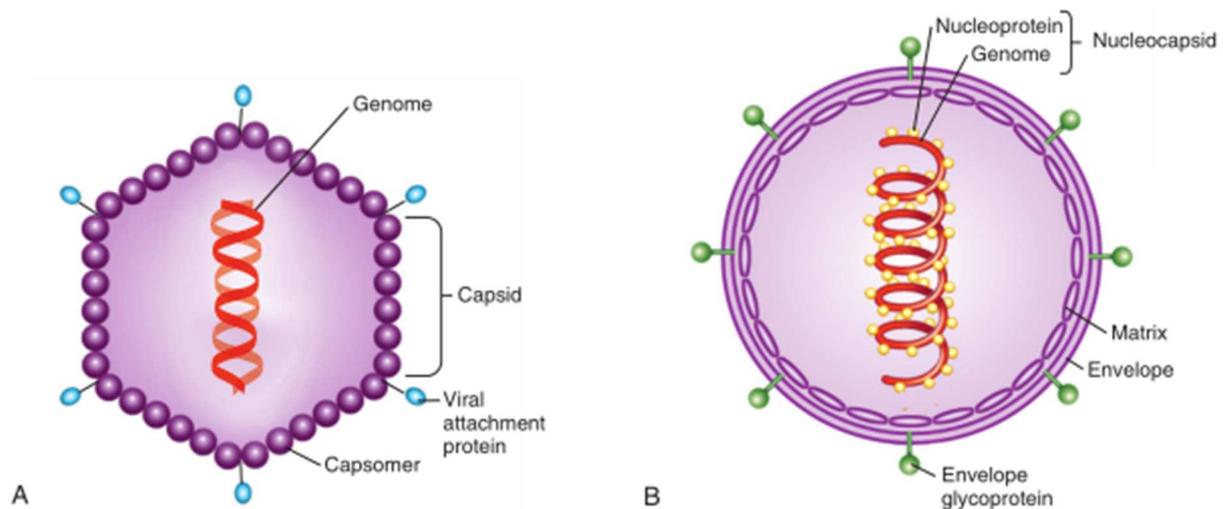


Abb. 1.9.: Schematische Darstellung der Struktur der Viren. A Icosahedrales Virus ohne Lipidhülle **B** Helikales Virus mit Lipidhülle. Die Abb. wurde modifiziert nach Chappell et Dermody 2015.

1.2.2 Struktur und Funktion der Viren

1.2.2.1 Viren als Triebkraft der Genomevolution lebender Systeme

Die Welt der Viren zeigt eine enorme strukturelle Vielfalt (Koonin et al. 2015). Wie oben erwähnt, bestehen virale Genome aus Einzelstrang [ss]- oder Doppelstrang [ds]-RNA oder -DNA. Ihre Genome erreichen eine Größe von bis zu 2 Megabasen. Ursprünglich wurden Viren ausschließlich als infektiöse Partikel betrachtet, die lebende Zellen infizieren und damit Krankheiten auslösen. Heute weiß man jedoch, dass Viren für die Evolution der Genome aller lebenden Organismen verantwortlich sind, da sie Genomelemente von einer Wirtszelle auf andere Wirtszellen übertragen (horizontaler Gentransfer, HGT). Damit tragen sie dazu bei, dass sich zelluläre Genome ständig verändern, so dass Lebewesen immer neue Überlebensstrategien ausprobieren können. Virale Genome entwickeln sich dabei typischerweise schneller als die meist größeren Genome zellulärer Organismen (Koonin et al. 2015). Das führt dazu, dass der größte Teil der genetischen Vielfalt mit großer Sicherheit auf die Viren konzentriert ist (Rohwer 2003; Koonin und Dolja 2013; Kristensen et al. 2013). Der virusabhängige Austausch genetischen Materials (HGT) kann in verschiedene Richtungen erfolgen.

Beim Wirt-Ursprung-Modell (host origin model) empfängt die Wirtszelle genetisches Material vom Virus. Beim Virus-Ursprung-Modell (Virus origin model) empfängt das Virus genetisches Material von der Wirtszelle und integriert es in das virale Genom. Beide Richtungen des HGTs können parallel existieren. Es ist dieser bidirektionale Fluss von funktionellen Genen, welcher die Koevolution von Viren und

ihren Wirten antreibt und die Angriffs- bzw. Abwehrstrategien beider Seiten weiterentwickelt (Chen et al. 2016). Die Gesamtzahl der Gene, die in viralen Genomen weltweit zu finden sind, übersteigt die Zahl der Gene aller zellulären Lebensformen erheblich (Koonin et al. 2015). Aus diesen Zahlen wird die besondere Bedeutung des horizontalen Gentransfers ersichtlich, der Spezies-übergreifend zum Austausch von genetischem Material führt. Unmittelbare Voraussetzung für einen viralen Gentransfer bleibt jedoch die Tatsache, dass Gendonator- und Genakzeptorzelle durch das entsprechende Virus infiziert werden können.

1.2.2.2 Viren als Krankheitserreger für Pro- und Eukaryonten

Seit langer Zeit sind Viren vor allem als Krankheitserreger von Menschen, Tieren und Pflanzen bekannt, und diese Tatsache spiegelt sich auch in der Bezeichnung dieser Partikel (Virus = Gift, griechisch) wieder (Lwoff 1957). Von besonderer gesundheitspolitischer Relevanz ist dabei, dass weit verbreitete humane Infektionserkrankungen (z.B. Grippe, Pocken, Masern, Mumps u.a.) durch Viren hervorgerufen werden.

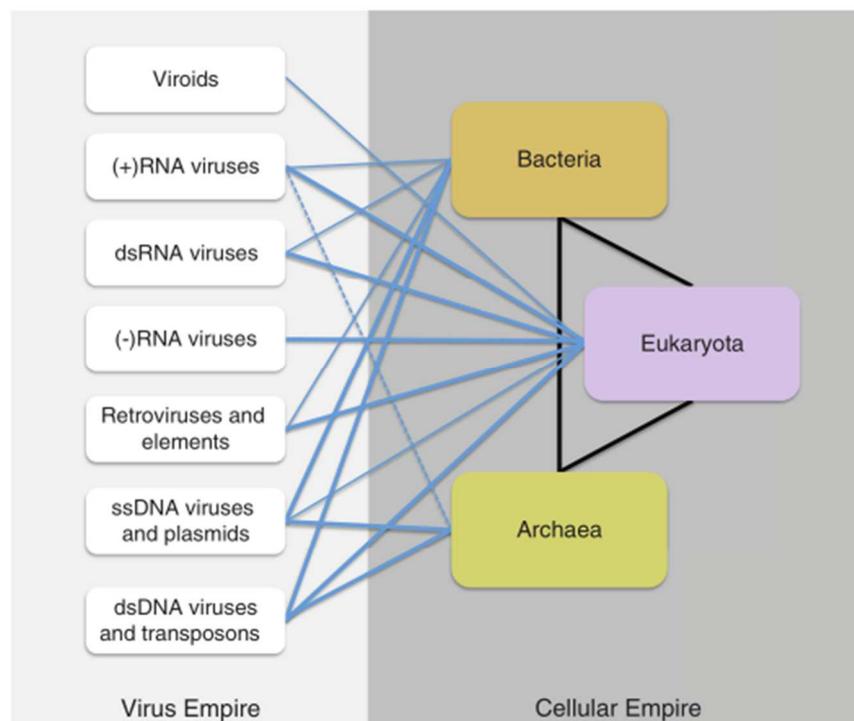


Abb. 1.10.: Virale und zelluläre Reiche der irdischen Biosphäre und assoziierte parasitäre Beziehungen. Die Dicke der Linien spiegelt grob die Prävalenz dieser Beziehungen und die Intensität der Flüsse wider. Die Abb. wurde modifiziert nach Koonin and Dolja 2013.

Generell können Viren alle zellulären Lebensformen infizieren oder mit ihnen symbiontische Beziehungen eingehen (Koonin und Dolja 2013). Zwischen den Viromen (Gesamtheit aller Viren und virusähnlichen Partikel), die Prokaryonten (Bakterien, Archaeen) befallen und denen, die Eukaryonten infizieren, gibt es jedoch erhebliche Unterschiede (Koonin und Dolja 2014). Viren, die Prokaryonten befallen sind nur sehr selten RNA-Viren. Sie enthalten meist entweder dsDNA-Genome (in der Größenordnung zwischen 10-100 kb) oder die kleineren ssDNA-Genome (Krupovic et al. 2011). Im Gegensatz dazu stellen die RNA-Viren die größte Gruppe unter den Viren dar, die Eukaryonten infizieren. Bei diesen Viren kommen zahlreiche Retroelemente vor (Goodier und Kazazian 2008). In Eukaryonten finden sich aber auch genomische Sequenzen von ssDNA-Viren und von dsDNA-Viren. Letztere unterteilt man in 18 verschiedene Familien (Koonin et al. 2015) (Abb. 1.10.). Unter den dsDNA-Viren, die eukaryontische Zellen infizieren, wurden Virusarten entdeckt, die sehr große Genome tragen. Die physikalischen Dimensionen und Genomgrößen dieser Viren übertreffen die entsprechenden Parameter vieler Bakterien und Archaeen (Raoult et al. 2004) und sogar die einiger parasitärer einzelliger Eukaryonten (Koonin und Yutin 2010; Philippe et al. 2013). Diese Viren wurden als Megaviren bezeichnet (Aherfi et al. 2016).

1.2.3 Megaviren als Übergangsformen zwischen belebten und unbelebten biologischen Strukturen

1.2.3.1 Klassifizierung der Megaviren und deren Aufbau

Megaviren bilden die größte und am weitesten verbreitete Klasse von DNA-Viren, die aus mindestens sieben Familien besteht (Koonin et al. 2015). Zwischen den unterschiedlichen Familien besteht ein deutlicher evolutionärer Zusammenhang. Zum einen enthalten viele Megaviren hoch konservierte Gene, die für Proteine kodieren, welche für bestimmte virale Schlüsselfunktionen verantwortlich sind (Koonin und Yutin 2010; Iyer et al. 2001; Iyer et al. 2006). So konnten häufig Gene nachgewiesen werden, die für die virale Replikation und die Verpackung nötig sind (Koonin und Yutin 2010). Zum anderen zeigen viele Megaviren eine ähnliche Virionarchitektur (Aherfi et al. 2016). Zu den Megaviren gehören u.a. die Pockenviren, die Asfarviren, die Iridoviren, die Ascoviren, die Phycodnaviren, die Mimiviren und die Marseilleviren (Colson et al. 2013). Diese Viren infizieren unterschiedliche Wirtszellen, wobei sowohl pro- als auch eukaryontische Zellen befallen werden können. Tabelle 1 zeigt die Wirtszellen, die

Genomgrößen sowie die Orte der viralen Replikation in den Wirtszellen für ausgewählte Megaviren (modifiziert nach Koonin und Yutin 2010).

Die Entdeckung der Megaviren machte eine Änderung der Virusdefinition nötig. Die bis dahin gültige Definition (Viren sind kleine „filtrierbare“ Infektionserreger) konnte nicht mehr angewendet werden, da Megaviren mit üblichen Virenfiltern nicht filtrierbar sind. Die bislang größten virale Genome enthalten die Pandoraviren (ca. 2,5 Megabasen).

Im Gegensatz zu kleineren Virusarten enthalten die Genome von Megaviren Gene, die für verschiedene Komponenten der eukaryontischen Replikations-, Transkriptions- und Translationsapparate kodieren. Damit sind Megaviren nicht vollständig auf die Bereitstellung der entsprechenden Komponenten durch die Wirtszelle angewiesen (Koonin et al. 2015). Das Vorkommen solcher universellen Gene in den Genomen der Megaviren ermöglichen die Einbeziehung der Megaviren in den Baum des Lebens, der die Basis für das Drei-Domänen-Modells des irdischen Lebens darstellt (Raoult et al. 2004).

| Virus-Familie | Wirte | Genomgröße | Replikationsort |
|-----------------|--|------------|-----------------------|
| Phycodnaviridae | Grün-Algen; Algen-Symbionten der Paramecia; Hydras | 150-400 | Kern und Zytoplasma |
| Poxviridae | Insekten; Reptilien; Vögel; Säugetiere | 130-380 | Zytoplasma |
| Asfarviridae | Säugetiere | 170 | Zytoplasma |
| Ascoviridae | Insekten, hauptsächlich Noctuids | 150-190 | Kern und Zytoplasma |
| Iridoviridae | Insekten; Kaltblütige Vertebraten | 100-220 | Kern und Zytoplasma |
| Mimiviridae | Acanthamoeba; Algen (wahrscheinlich); Korallen (möglich) | 1.180 | Zytoplasma |
| Marseillevirus | Acanthamoeba; Algen (wahrscheinlich) | 370 | Kern und Zytoplasma ? |

Tab. 1: Die sieben NCLDV-Familien. Die Familien wurden aufgeschlüsselt nach Wirtsvorkommen, Genomgrößen sowie nach den Orten ihrer Replikation (modifiziert nach Koonin und Yutin 2010).

Die geometrischen Dimensionen mancher Megaviren sind so gewaltig, dass bei den ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen eines Mimivirus in einer Wirtsamöbe

das Virus selbst als Zellkern der Wirtszelle angesehen wurde (Suzan-Monti et al. 2007). Die Frage, ob es sich bei Megaviren wirklich um lebende Organismen handelt, ist bisher umstritten und wird auch zukünftig noch weiterhin kontrovers diskutiert werden. Bemerkenswert bleibt in jedem Fall die Fähigkeit mancher Megaviren, sich zu replizieren, ohne dabei auf den Zellkern der Wirtszelle zurückgreifen zu müssen (Mutsafi et al. 2014).

Neben der Größe ist auch der nicht-autonome intrazelluläre Lebensstil der Viren kein adäquates Kriterium zur Unterscheidung zwischen Viren und zellulären Lebensformen mehr. Es gibt nämlich auch intrazellulär lebende Bakterien (z.B. *Rickettsia spp.*, *Candidatus carsonella spp.*), die sich extrazellulär nicht vermehren können. Die Ursache dafür ist, dass diese Bakterien im Laufe der Evolution viele Gene verloren haben, die für diverse Stoffwechsellzyme kodieren. Diese Enzyme werden bei der intrazellulären Lebensweise dieser Bakterien von den Wirtszellen zur Verfügung gestellt. Bei diesen Bakterien handelt es sich streng genommen auch nicht mehr um autonome Lebensformen (Audic 2007). Allerdings muss auch hier hinterfragt werden, ob ein eigener autonomer Energiestoffwechsel den Unterschied zwischen lebend und nicht-lebend ausmacht (Koonin und Starokadomskyy 2016; Moran 2002; Tamas et al. 2001). Das bisher stärkste Argument, selbst Megaviren nicht als selbständige Lebewesen anzusehen, ist die Abwesenheit ribosomaler RNA. Ribosomen fungieren in Zellen als Proteinsyntheseorganellen und stellen ein gemeinsames Merkmal aller lebenden Systeme dar (Sharma et al. 2015; Raoult und Forterre 2008). Zwar gibt es auch bei eukaryontischen Lebensformen Zellen, die keine Ribosomen mehr aufweisen und damit nicht zur Proteinsynthese fähig sind (z.B. Erythrozyten); diese Zellen stellen aber Differenzierungsstufen ribosomenhaltiger Vorläuferzellen (erythroide Progenitorzellen) dar, welche die Ribosomen im Rahmen eines gezielten Differenzierungsprogrammes verloren haben. Einige Virusarten (z.B. Arenaviren) enthalten ribosomale Proteine in ihren Kapsiden. Sie verfügen aber nicht über die zur Synthese dieser Proteine nötigen Gene, sondern beziehen diese von ihren Wirtszellen (Raoult und Forterre 2008).

Alle zellulären Lebensformen verfügen über einen gemeinsamen Satz von Genen, die für ribosomale RNAs kodieren. Diese Gene waren bereits beim letzten universellen gemeinsamen Vorfahren aller irdischen Lebensformen, dem hypothetischen LUCA (last universal common ancestor) vorhanden und haben sich seitdem kaum verändert (Koonin 2003). Die Gesamtheit aller Viren hat keinen solchen gemeinsamen Vorfahr.

Dementsprechend gibt es kein einziges Gen, das allen Viren gemeinsam wäre (Iyer et al. 2001). Raoult et al. schlagen daher vor, dem Drei-Domänen-Modell des irdischen Lebens ein Zwei-Bereich-Modell vorzuschalten, welches aus Ribosomen kodierenden Lebensformen, REOs (ribosome encoding organisms) und aus für Kapside kodierende Viren, CEOs (capsid encoding organisms) besteht (Abb. 1.11.) (Raoult und Forterre 2008). Dieses Modell würde Viren als essentielle Bestandteile des irdischen Lebens mit einschließen, auch wenn dadurch die Frage nicht beantwortet wäre, ob Viren nun Lebewesen sind oder nicht. Da Megaviren auf Grund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften nur schwer in die derzeitigen Klassifizierungskonzepte einzugruppieren sind (Sharma et al. 2016), werden sie in der neuesten Literatur auch als TRUC (things resisting completed classification) bezeichnet. Dadurch wird ihre Stellung als Übergangsform zwischen belebter und unbelebter Natur gekennzeichnet (Sharma et al. 2016).

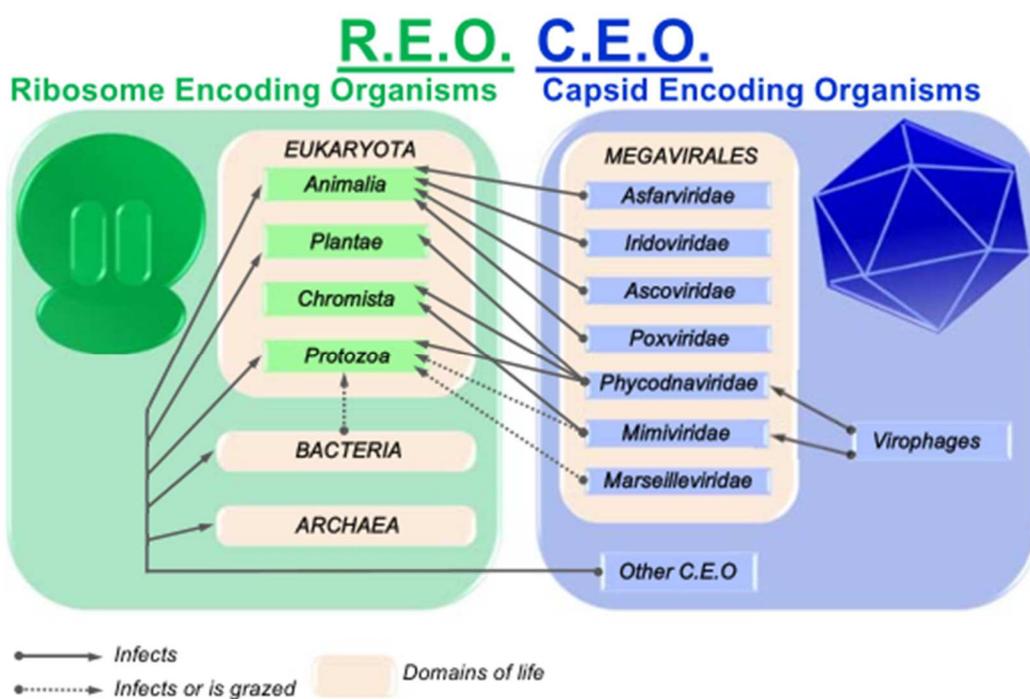


Abb. 1.11.: Zwei-Bereich-Modell des irdischen Lebens. Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen REOs (ribosome encoding organisms) und CEOs (capsid encoding organisms). Die Abb. wurde modifiziert nach Colson et al. 2012

1.2.3.2 Mimiviren als Subfamilie der Megaviren (Vorkommen und Bedeutung)

Ein Amöben-infizierendes Mimivirus wurde 1992 im Wasser von Kühltürmen in Bradford (UK) entdeckt (La Scola et al. 2003) und verdankt seinen Namen der Eigenschaft, einen Mikroorganismus nachzuahmen (Tsai 2011). Es gehört zu den größten bisher bekannten Viren (Partikelgröße von rund 750 nm) und ist damit größer als viele Bakterien. Es besitzt ein Doppelstrang-DNA-Genom, das aus 1,2 Millionen Basenpaaren besteht und ca. 1.000 verschiedene Gene enthält (Mutsafi et al. 2014). Das Mimivirus besteht aus einem Genom-enthaltenden Kern, der von einer Lipiddoppelschicht umgeben ist. Die Lipiddoppelschicht bildet die Grundlage des icosahedralen Kapsids (Xiao et al. 2005; Xiao et al. 2009). Strukturell einzigartig sind das Fasergitter, welches das Kapsid umhüllt, und die spezielle sternenförmige Struktur am Scheitel (Zauberman et al. 2008; Mutsafi et al. 2014).

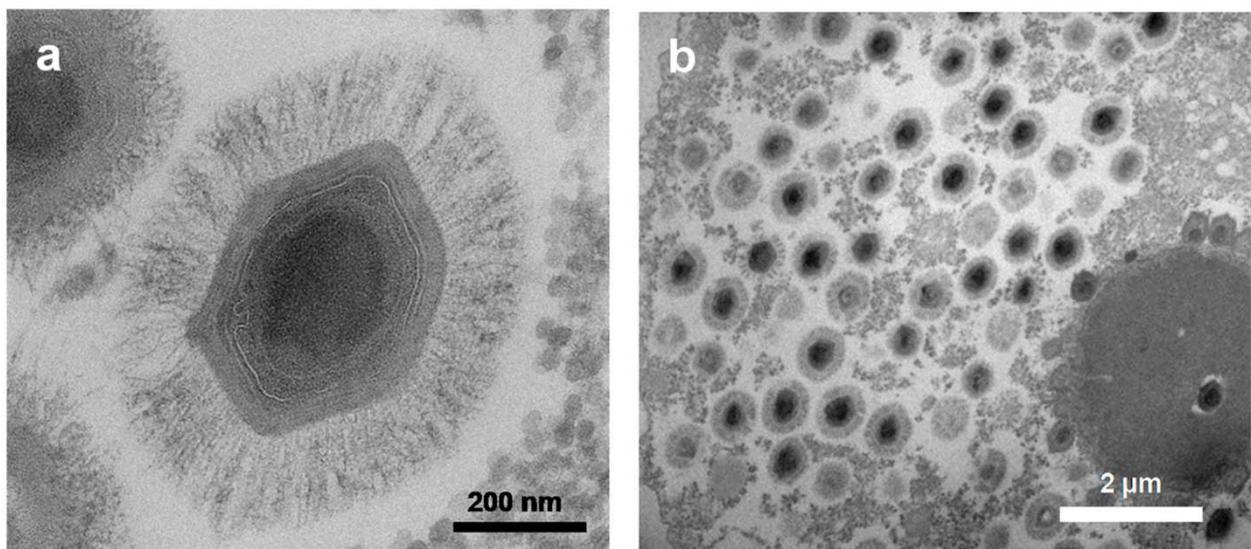


Abb. 1.12.: Elektronenmikroskopaufnahmen des Megavirus *Acanthamoeba Polyphaga Mimivirus*. a) Einzelnes Mimiviruspartikel, b) Mimiviren im Zytoplasma von *Acanthamoeba Polyphaga* (Aherfi 2016)

Eine weitere Besonderheit des Mimivirus ist, dass es Proteine enthält, die bis zur Entdeckung des Mimivirus noch nie in anderen Viren gefunden wurden. Zu diesen gehören u.a. Komponenten, die für die Translation benötigt werden (Mutsafi et al. 2014). Es enthält zwar wie alle Viren keine Gene, die für Ribosomenbestandteile kodieren. Es finden sich aber im Mimivirusgenom Gene, die für vier unterschiedliche Aminoacyl-tRNA-Synthetasen kodieren (Tsai 2011). Darüber hinaus ergab die Sequenzierung des Mimivirusgenoms die Existenz von Genen, die für verschiedene

Transkriptionsfaktoren (u.a. eRF1, eF-Tu, SUI1, 4E) und sechs verschiedene tRNAs kodieren (Sharma et al. 2016). Das Mimivirus besitzt auch Gene, die für DNA-Reparaturenzyme (Topoisomerasen), Chaperone (Proteinfaltungskatalysatoren) und verschiedene Stoffwechsellzyme kodieren (Raoult et al. 2004). Dadurch werden die bisherigen Abgrenzungskriterien zwischen Viren und Zellen aufgeweicht (Mutsafi et al. 2014).

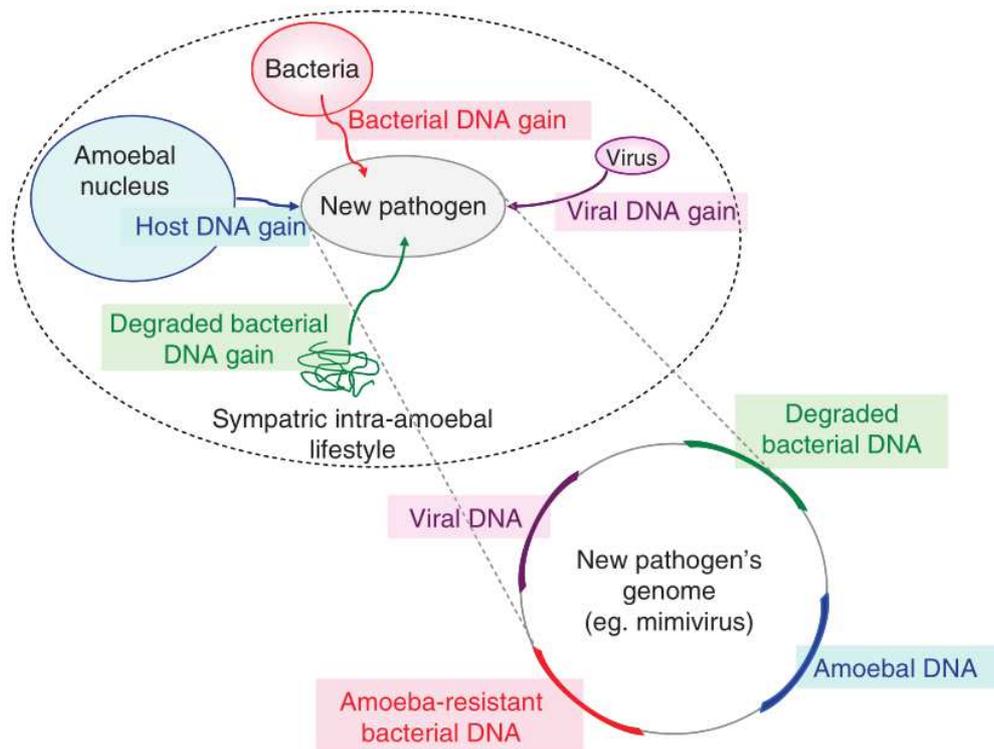


Abb. 1.13.: Darstellung des Genoms der Mimiviren als Sammlung von Genen verschiedener Mikroorganismen. Der Genpool des Mimivirus entstand durch Genaquisition und Genkonservierung. Die Abb. wurde modifiziert nach Moliner et al. 2010.

Das Mimivirus gehört zur Familie der Mimiviridae (Yoshida et al. 2011) und ist Mitglied der nukleozytoplasmatischen großen DNA-Viren (NCLDV) (Mutsafi et al. 2014). NCLDVs vermehren sich entweder ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle oder starten ihren Lebenszyklus im Kern, vervollständigen ihn aber im Zytoplasma (Iyer et al. 2006) (Abb. 12.). Die Infektion von Amöben ermöglicht dem Mimivirus den horizontalen Gentransfer. Entscheidend ist dabei, dass das Mimivirus einen sympatrischen Lebensstil pflegt und verschiedene Amöbenstämme befallen kann (Chien et al. 2004; Cazalet et al. 2004; Glöckner et al. 2008; La Scola et al. 2004; Ogata et al. 2006). Das gemeinschaftliche Leben intraamöbialer Mikroorganismen begünstigt den horizontalen

Genaustausch zwischen verschiedenen Spezies. Das auffallend große Genom der Mimiviren stellt eine Sammlung von Genen verschiedener Mikroorganismen dar, die durch Genaquisition und Genkonservierung zustande kam (Moliner et al. 2010) (Abb. 1.13.).

Phagozytierende Amöben beherbergen verschiedene Bakterien, Pilze und Megaviren in ein und derselben Zelle (sympatrischer Lebensstil) und stellen damit ein geeignetes System für den horizontalen Gentransfer (HTG) dar. Besonders intensiv scheint dabei der HGT zwischen Bakterien und Viren zu sein, da die meisten der in das Mimivirus importierten Gene anscheinend bakterieller Herkunft sind (Raoult und Boyer 2010). Analysen des Mimivirusgenoms identifizierten eine große Anzahl an Genen, die eine hohe Sequenzhomologie zu bakteriellen Genen aufweisen. Diese Gene wurden scheinbar durch horizontalen Gentransfer aquiriert (Moliner et al. 2010; Moreira und Brochier-Armanet 2008) und im Genom des Mimivirus konserviert. Das durch das Mimivirus von der Amöbe selbst aquirierte genetische Material beträgt dabei nur ca. 10 % des mimiviralen Genoms (Moliner et al. 2010; Filée et al. 2008; Moreira und Brochier-Armanet 2008).

Neben den genomischen Gemeinsamkeiten der in der Amöbe lebenden Mikroorganismen, finden sich auch weitere Anhaltspunkte für den HGT, welche die Theorie des Genaustausches zwischen intraamöbialen Mikroorganismen stützen. Dazu gehört eine große Anzahl an Mobilomen, die sich in diesen Mikroorganismen finden lassen (Juhas et al. 2008). Einen weiteren Marker stellen die Ankyrin-Repeats dar, die bei vielen dieser Mikroorganismen vorkommen (Seshadri et al. 2003; Beare et al. 2009; McGraw et al. 2004; Ogata et al. 2005; Cazalet et al. 2004; Moliner et al. 2010).

1.3 Lipoxygenasen bei Viren

Vor Beginn dieser Arbeiten gab es keine Hinweise auf das Vorkommen von LOXn in Viren. Lediglich wenige LOXn-ähnliche Sequenzen konnten in viralen Genomen identifiziert werden, und diese kodierten in den meisten Fällen für Proteine, die deutlich kleiner waren als echte LOXn. Das verursachte berechtigte Zweifel daran, ob diese Sequenzen tatsächlich für katalytisch aktive LOXn kodieren. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener eu- bzw. prokaryontischer Lipoxygenasen (humane ALOX15 [NP_001131], humane ALOX5 [NP_000689], Zebrafisch-LOX [NP_955912.1], 8R-LOX der Koralle *Plexaura homomalla* [AAC47283.1], LOX des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* [AAL85880.2]) mit dem Genom des

Acanthamoeba Polyphaga Mimiviruse (YP_003986553.1) konnte im Genom des Mimivirus eine Nukleotidsequenz identifiziert werden, die für eine katalytisch aktive LOX kodieren könnte (Horn et al. 2015). Bei dieser Sequenz handelte es sich um ein Polynukleotid, welches für ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67.000 Da kodiert. Ein ähnliches Molekulargewicht zeigen fast alle Säugetier-LOXn. Obwohl die Aminosäurehomologie mit der humanen ALOX15 nur ca. 15 % beträgt, waren vier der fünf Eisenliganden konserviert (His361, His540, His544, Ile663; Numerierung bezogen auf die humane ALOX15). Das His366, das bei der humanen ALOX15 als fünfter Eisenligand fungiert, wird im Mimivirusprotein durch ein Leu ersetzt, welches auf Grund der Struktur seiner Seitenkette nicht als Eisenligand fungieren kann.

Allerdings folgt dieses Leu direkt einem Threonin, welches wegen seiner freien OH-Gruppe als Eisenligand fungieren könnte. Außerdem enthält die potentielle Mimivirus-LOX ein weiteres Histidin in der räumlichen Nachbarschaft des oben beschriebenen Leu, welches die Funktion des Eisenliganden übernehmen könnte. Aus dieser formalen Sequenzanalyse geht hervor, dass es sich bei dieser viralen Nukleotidsequenz tatsächlich um ein Gen handeln könnte, das für eine katalytisch aktive Lipoxygenase kodiert. Für diese Vermutung fehlten jedoch bisher jegliche funktionelle Daten (Horn et al. 2015).

1.4 Fragestellung

LOXn sind Enzyme des oxidativen Lipidstoffwechsels und könnten damit in biologischen Systemen, die über einen aktiven Lipidstoffwechsel verfügen, weit verbreitet vorkommen. Außerdem könnten LOXn für den Prozess der Zellinfektion eine wichtige Rolle spielen. In diesem Fall würden die zu oxygenierenden Substrate von den zu infizierenden Wirtszellen geliefert. So wäre es z.B. vorstellbar, dass virale LOXn dafür genutzt werden könnten, die Membranlipide eukaryontischer Wirtszellen zu oxidieren, um damit die Barrierefunktion der Plasmamembran zu beeinträchtigen. Ein solches Szenario würde den Infektionsprozess effektivieren, womit LOX-exprimierende Viren über einen Evolutionsvorteil verfügen würden. Da LOXn sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten nachgewiesen werden konnten, war es bedeutsam zu erforschen, ob diese Enzyme auch bei Viren vorkommen.

Auf der Suche nach einer Antwort auf diese Frage, wurden zunächst die genomischen Sequenzdaten der wichtigsten öffentlich zugänglichen Datenbanken nach potentiellen viralen LOX-Sequenzen durchsucht. Dies geschah zunächst indem die viralen Genomdatenbanken mit dem Suchwort „Lipoxygenase“ gescreent wurden (Sequenzähnlichkeitssuche). Die dabei erzielten Treffer wurden anschließend mit Hilfe einer mehrfachen Filterstrategie bearbeitet, wobei das Molekulargewicht als primäres Filterkriterium verwendet wurde. Proteine mit einem Molekulargewicht < 60 kDa wurden als falsch positive Treffer eliminiert. Als sekundäres Filterkriterium wurde das Vorhandensein von zwei räumlich getrennten Metallligandenclustern verwendet. Proteine mit keinem bzw. nur einem Metallligandencluster wurden ebenfalls als falsch positive Treffer eliminiert. Als tertiäres Filterkriterium wurde der räumliche Abstand der beiden potentiellen Ligandencluster betrachtet. Proteine, bei denen die beiden Ligandencluster weniger als 150 oder mehr als 200 Aminosäuren auseinander lagen, wurden ebenfalls als falsch positive Treffer eliminiert. Durch Anwendung dieser Suchstrategie wurde eine potentielle LOX-Sequenz im Genom des *Acanthamoeba polyphaga Mimivirus* identifiziert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob die rekombinante Expression dieser potentiellen LOX-Sequenz zur Synthese einer katalytisch aktiven LOX führt. Sollte sich dies bewahrheiten, ginge es im weiteren Verlauf der Untersuchungen darum, das Enzym hinsichtlich seiner protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften zu charakterisieren und mit bekannten pro- und eukaryontischen LOXn zu vergleichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Für die Untersuchungen wurden die im Folgenden aufgelisteten Geräte und Hilfsmittel verwendet, die von den angegebenen Firmen geliefert wurden.

| Utensil / Gerät | Bezug / Hersteller |
|--|---|
| AAAnalyst800 Instrument | Perkin Elmer (Waltham, USA) |
| ÄKTA-FPLC-System | GE Healthcare (Uppsala, Sweden) |
| Agarosegelelektrophorese-System | Hoefer Inc. (Holliston, USA) |
| Automatik-Pipette (IBS Integra biosciences Pipetboy acu) | INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland) |
| Blot-Imager | behr Labor-Technik GmbH (Düsseldorf, Deutschland) |
| Blot-Membran (Nitrozellulose; 0,45 µm) | GE Healthcare Life science (Berlin, Deutschland) |
| Blot-Papier (218 B) | Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) |
| Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Entsalzungssäule (Encono-Pac® 10DG Column von Bio-Rad) | Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| Erlenmeyerkolben (500 ml bis 2 l) | DURAN Group GmbH (Wertheim/Main, Deutschland) |
| Falcon-Tubes (15 ml; 50 ml) | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) |
| Filter-Pipettenspitzen | Sarstedt AG & Co (Nürnberg, Deutschland) |
| FPLC-Säule (Superdex 200 10/300GL; GE Healthcare; contains 20 % ethanol as preservative; Label No: 71-5018-77-EG; 17-5175-01; lot 10015894; est exp 2012-09; store at 4-30 °C) | GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) |
| Gel Drying Frames | Sigma-Aldric Corporation (St. Louis, Missouri, USA) |
| Hamilton-Spritze, stumpf | Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, Deutschland) |
| Halbmikro-Küvetten | Sarstedt AG & Co (Nürnberg, Deutschland) |
| Handzentrifuge (3 rcf) | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Holzzahnstocher | Fackelmann GmbH + Co. KG (Hersbruck, Deutschland) |
| HPLC Auto-Sampler SIL-20A | Shimadzu Deutschland GmbH |

| | |
|---|--|
| | (Duisburg, Deutschland) |
| HPLC Column Oven CTO-20AC | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| HPLC-C18-Säule für Umkehrphasen-HPLC | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| HPLC Solvent Delivery Units LC-20AD | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| HPLC System Controller CBM-20A | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| Inkubator (37 °C, 5 % CO ₂ , 20 % O ₂) | Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland) |
| Inkubationsschüttler | Gallenkamp & Co (London, Großbritannien) |
| Inkubationsschüttler | Infors AG (Bottmingen, Schweiz) |
| Konische Glasphiolen (1 ml) + Dichtung u. Deckel für Glasphiolen (8 mm) | Novodirect GmbH (Kehl/Rhein, Deutschland) |
| Konzentrator-Säule (Concentrator; 30k MWCO; Spin-X UF 6; 6 ml; nicht steril; Qty: 25; Lot-No. 27514008; Exp. Date: 09-2016) | Sigma-Aldric Corporation (St. Louis, Missouri, USA) |
| Küvetten | Sarstedt AG & Co (Nürnberg, Deutschland) |
| Laminar-Flow-Bank | Antares (Köln, Deutschland) |
| Lichtmikroskop | Olympus Europa Holding GmbH (Hamburg, Deutschland) |
| Mikropipetten (0,1 µl - 1.000 µl) | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Neubauer Zählkammer | Carl-Zeiss (Jena, Deutschland) |
| Petrischalen (35 x 10 mm Style) | Sarstedt AG & Co (Nürnberg, Deutschland) |
| Bio Photometer plus | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| Realtime-PCR | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| Reversephasen-HPLC | Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) |
| Rotationsmischer (ELMI Rotamix RM1) | ELMI Ltd. (Riga, Lettland) |
| Rundboden-Röhrchen mit loser Kappe (14 ml) | Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland) |
| Mini-Vertikal-Gelelektrophorese-Einheit für Proteine und Nukleinsäuren | Hofer, Inc. (Holliston, USA) |
| Semi-dry-Blot-System | Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) |
| Serologische Pipetten-Spitzen (5 ml; 10 ml; 25 ml) | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |

| | |
|--|--|
| Standard Power Pack P25 (Stromerzeuger) | Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland) |
| Thermocycler T3000 | Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland) |
| Transwellplatten (12-Well- Polycarbonatplatten mit 3 µm Porengroße) | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) |
| Trigalski-Spatel | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ultraschallsonde (Branson Digitl Sonifier W-250D) | G. Heinemann Ultraschall-Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland) |
| Yield-Kolben (500 ml; 2,5 l) | Infors AG (Bottmingen, Schweiz) |
| Zentrifugen-Röhrchen (50 ml), (29 x 108 mm Nalgene Oak-Ridge Zentrifugenröhrchen für High-Speed- Anwendung) | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) |
| Wasserbad | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) |
| Zellkulturflaschen (75 cm ² ; 250 ml) | Sarstedt AG & Co (Nürnberg, Deutschland) |
| Zentrifuge | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |

2.1.2 Chemikalien

Für die Untersuchungen wurden die folgend aufgelisteten Chemikalien verwendet, die von den angegebenen Firmen bezogen wurden.

| Chemikalie | Bezug / Hersteller |
|--|---|
| Antibiotika (Ampicillin; Chloramphenicol; Kanamycin) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| AntiFoam | Sigma (Taufkirche, Deutschland) |
| Arachidonsäure (AA) 33-mM-Stock | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Acrylamid | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ammoniumpersulfat | Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland) |
| Bradford-Reagenz | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Chromatographie-Säulen (Poly-Prep Chromatography Columns von Bio-Rad; Cat. # 731-1550; empty polypropylene columns with end cap and tip closures) | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Coomassie blue | Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) |

| | |
|--|---|
| ε-Aminocapronsäure | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| EDTA | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Essigsäure | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ethanol | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ethidiumbromid (EtBr) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| 1,5 % Gel von Bio Line (2 Tabletten + 67 ml 1fach TAE-Puffer) | Bio Line (Luckenwalde, Deutschland) |
| Glucose | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Glycerin (50%iges) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| HPLC-Lösungsmittel | Baker (Deventer, Niederlande) |
| HPLC-Standards 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15- HETE (R/S) | Cayman Chem., Ann Arbor, USA, per Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland) |
| Imidazol | Serva (Heidelberg, Deutschland) |
| IPTG (1M) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Isopropanol | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Kaliumchlorid | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Linosäure (LA) 33-mM-Stock | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Mercapto-Ethanol | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Methanol (MeOH) | VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland) |
| Milchpulver "Blotting-Grade-Blocker" | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumbohrhydrid | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Natronlauge | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ni-NTA (in 20 % Ethanol gelagert) | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Ponceau S | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Protein Loading Buffer 4-fach | Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) |

| | |
|----------------------------------|--|
| Reagenz A | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Reducin Agent (DTT) | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| SDS | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| Tcep 0,5 mM | Sigma (Taufkirchen, Deutschland) |
| TEMED | Serva (Heidelberg, Deutschland) |
| TransIT-LT1 Transfektionsreagenz | Mirus (Madison, USA) |
| Tris (Pulver) | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Tris 20 mM pH 8.0 | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Trypanblau | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Trypsin | PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| Tween 20 | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |

2.1.3 Nährmedien, Puffer und sonstige Lösungen

Für die Untersuchungen wurden die folgend aufgelisteten Lösungen verwendet, die von den angegebenen Firmen bezogen wurden.

| Lösung | Bezug / Hersteller |
|---|---|
| 1-kb-DNA-Ladder für Agarosegelelektrophorese (5-fach) | Bio Line (Luckenwalde, Deutschland) |
| DPBS | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| EMEM-Nährmedium (mit NEAA u. Natriumpyruvat ohne L-Glutamin) | PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| FD-Puffer green (10-fach) für DNA- Spaltung | Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder für SDS-PAGE | Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) |
| LB-Agar | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| LB-Medium | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| PBS | Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) |
| TransIT-LT1 Transfection Reagent | Mirus (Madison, USA) |

Für die Untersuchungen wurden die folgend aufgelisteten Puffer und Lösungen gemischt und verwendet.

| Puffer/Lösung für SDS-PAGE | Zusammensetzung |
|--|--|
| Beladungspuffer | 85,1 % Protein Loading Buffer (4-fach); 14,89 % DTT (20-fach) |
| Lämmli Laufpuffer | 7,2 % Glycin; 1,51 % Tris (pH 6,8); 0,5 % SDS; destilliertes Wasser |
| SDS-PAGE-Sammelgelpuffer (4-fach) | 0,5 M Tris (pH 6,8); 0,4 % SDS |
| SDS-PAGE-Trenngelpuffer (4-fach) | 1,5 M Tris (pH 8,8); 0,4 % SDS |
| SDS-PAGE-Sammelgel (4%ig) | 13 % Acrylamid; 25 % Sammelgelpuffer; 1 % Ammoniumpersulfatlösung (10%ig); 0,1 % TEMED; 61 % destilliertes Wasser |
| SDS-PAGE-Trenngel (10%ig) | 33 % Acrylamid; 25 % Trenngelpuffer; 1 % Ammoniumpersulfatlösung (10%ig); 0,1 % TEMED; 41 % destilliertes Wasser |
| Puffer für Westernblot | Zusammensetzung |
| Anodenpuffer 1 (A1) | 18,171 g Tris (0,3 M; pH 10,4); 100 ml Methanol; destilliertes Wasser für Endvolumen von 500 ml |
| Anodenpuffer 2 (A2) | 1,514 g Tris (0,025 M; pH 10,4); 100 ml Methanol; destilliertes Wasser für Endvolumen von 500 ml |
| Kathodenpuffer (K) | 1,514 g Tris (0,025 M; pH 9,4), 2,634 g ϵ -Aminocaprinsäure (0,04 M); 100 ml Methanol; destilliertes Wasser für Endvolumen von 500 ml |
| Puffer/Lösung für Agarose-Gelelektrophorese | Zusammensetzung |
| TAE-Puffer (pH 8,5) | 40 mM Tris (pH 8); 2 mM EDTA; 5,7 % Essigsäure; destilliertes Wasser |
| Elektrophoresegel (1,5%ig) | Agarose Tablets (0,5 g); TAE-Puffer für Agarose-Gelelektrophoresegele |
| Puffer/Lösung für Protein-Präparation nach Expression | Zusammensetzung |
| Puffer A für Imidazol-Wasch-Puffer | 50 ml Tris pH 8; 8,8 g NaCl; Milli-Q- Wasser (Reinstwasser Typ 1 = hochgradig deionisiertes Wasser, hier nicht autoklaviert) für Endvolumen von 500 ml |
| Puffer B für Imidazol-Wasch-Puffer | 50 ml Tris pH 8; 8,8 g NaCl; 6,8 g Imidazol; Milli-Q-Wasser für Endvolumen von 500 ml |

| | |
|-----------------------------------|---|
| 10mM-Imidazol-Wasch-Puffer | Puffer B und Puffer A im Verhältnis 1:20 |
| 25mM-Imidazol-Wasch-Puffer | Puffer B und Puffer A im Verhältnis 1:8 |
| Puffer/Lösung für HPLC | Zusammensetzung |
| Laufmittel für Reversephasen-HPLC | Methanol (90%), Wasser (10%), Essigsäure (0,1%) |
| Lösung für Bakterienkultur | Zusammensetzung |
| LB-Agar | Bacto-Agar (1,5 %), Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5%), Natronlauge (1 mM) |
| LB-Medium | Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5 %), Natronlauge (1 mM) |
| SOC-Medium | 0,5 % Hefe-Extrakt; 2 % Trypton, 10 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid; 10 mM Magnesiumsulfat; 4 % Glucose; destilliertes Wasser |

2.1.4 Proteine und Kits

| Protein / Kit | Bezug / Hersteller |
|--|--|
| Antikörper gegen His-Teg (Anti-His-Peroxidase, Anti-His-POD, Anti His HRP) | Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) |
| EnPresso Expressionssystem | BioSilta (Berlin, Deutschland) |
| "Gel and PCR Clean-up" Kit | Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) |
| MIDI-Kit "NucleoBond Xtra MIDI plus" | Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) |
| KIT „NucleoSpin RNA“ / „NucleoSpin RNA II“ | Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) |
| Premium Reverse Transkriptase | Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| "Rapid DNA Ligation" Kit | Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland) |
| Restriktionsenzyme (Sal I; Hind III; Xba I; Not I) | Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) |

2.1.5 Plasmide und Oligonukleotide

| Plasmid / Oligonukleotid | Bezug / Hersteller |
|---------------------------------|--|
| pcDNA | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| pET28 | Novagen der EMD Biosciences (Darmstadt, Deutschland) |
| pQE-9 | Qiagen (Hilden, Deutschland) |

Die anfallenden Sequenzierungen der spezifizierten rekombinanten Plasmide erfolgten durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

2.1.6 Nukleotid- und Proteinsequenzen

Die folgende Aminosäuresequenz des *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus wurde aus der Datenbank Pubmed extrahiert:

```

1  mlkkigndls fftgyltfrt ydsiwrkatl pmysklkenl rkptktclpq ndldyrlrht
61  lirqnarhyq sikntfinip tfelntflkk efhsniilas ptlsfsildy lndgriinsd
121 kdirxivkkf rlidsmtrlt dynayqlnpa idilkilddn trnkllglfd daifysldie
181 sfvtfnfsdkk yyfqdceain kqfnvdvnyl yvpyddngkk rlqietiilv drtdntkty
241 vfqsnfsqwe iirnnyniwt rtmssvyehq lgsnvycqnt lyhmrktlak thpitvlnkp
301 fmegvyftnk vftsfgisia dtenevvnry mdrvelfdls nqtmigaley ihktdgykll
361 dykkvyheng vddiyfeqq lledlyqivf dlvtvfyey yqstddyvkd nelrdfylsi
421 kndltfvedl qqkdnaikff sniiflssir hsknhinyay lnsfydyalr ktnfdllldk
481 ldngipfdek dclstvgdfy skyssgiyps vpinlfgtgy knlfadnevq kfftdvtnkl
541 nqlkkntrn nyteflfrlq nsnti

```

2.1.7 Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Bezug / Herkunft |
|---------------------------|----------------------------|
| BL21(DE3) u. BL21(DE3)Lys | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| M15-Bakterien | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| XL1-Blue | Stratagene (La Jolla, USA) |

2.1.8 Eukaryontische Zellstämme

| Zellstamm | Bezug / Herkunft |
|-----------|------------------------------------|
| HEK-293 | LGC Standards (Wesel, Deutschland) |

2.2. Methoden

2.2.1. Datenbankrecherchen

Initial wurden die Einträge für virale Proteine aus der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach Lipoxygenase-ähnlichen Sequenzen durchsucht. Dies geschah zunächst dadurch, dass die virale Proteindatenbank mit dem Schlüsselwort „Lipoxygenase“ durchsucht wurde. Dabei wurden alle Proteine als Treffer angezeigt, deren Aminosäuresequenz einen Ähnlichkeitsscore > 10 % mit bekannten

bakteriellen und eukaryotischen LOXn aufwies. Die dabei erzielten Treffer wurden anschließend mit Hilfe einer dreifachen Filterstrategie bearbeitet, wobei das Molekulargewicht als primäres Filterkriterium verwendet wurde. Proteine mit einem Molekulargewicht < 60 kDa und > 100 kDa wurden als falsch positive Treffer eliminiert. Als sekundäres Filterkriterium wurde das Vorhandensein von zwei Metallligandenklustern verwendet. Als tertiäres Filterkriterium haben wir den räumlichen Abstand der beiden Metallligandenklustern in der Primärstruktur herangezogen. Proteine, bei denen dieser Abstand < 150 Aminosäuren betrug wurden ebenso eliminiert wie Proteine, bei denen dieser Abstand > 200 Aminosäuren betrug.

2.2.2. Klonierung der mutmaßlichen Mimivirus-LOX

Für die Konstruktion eines geeigneten bakteriellen Expressionsplasmids für die potentielle Mimivirus-LOX ließen wir durch die Firma Biomatik Corporation (Ontario, Kanada) nach Vorgabe des publizierten Datenbankeintrages ein cDNA-Fragment synthetisieren, das wir als LOX-Insert verwendeten. Dieses Fragment wurde im Klonierungsvektor pBME als Lyophilisat geliefert. Zur Erleichterung der Klonierungsstrategie wurde eine vorhandene interne Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Hind III durch Mutation eines Guanins zu einem Adenin unter Erhalt der durch das Basentriplett kodierten Aminosäure eliminiert. In dieser Form wurde die cDNA von der Firma chemisch synthetisiert.

Beim pBME-Vektor handelt es sich um einen Transport- u. Klonierungsvektor, der nicht für Expressionsuntersuchungen verwendet werden kann. Daher wurde die LOX-Sequenz aus dem pBME-Vektor in den bakteriellen Expressionsvektor pET28 umklont. Beim pET28-Vektor handelt es sich um einen prokaryontischen low-copy-Expressionsvektor, der ein Antibiotikaresistenzgen für Kanamycin trägt und der den Bakteriophagenpromotor T7 enthält. Der pET28-Vektor besitzt außerdem eine N-terminale Hexa-His-tag-Sequenz, die dem Insert vorgeschaltet ist und mit diesem als Fusionsprotein exprimiert wird. Diese Hexa-His-tag-Sequenz kann zur Detektion des exprimierten Proteins im Western-Blot genutzt werden.

Zur Vermehrung des gelieferten Ausgangsmaterials wurde das Lyophilisat ($4 \mu\text{g}$) zunächst in $20 \mu\text{l}$ Milli-Q-Wasser (Reinstwasser Typ 1 = hochgradig deionisiertes Wasser, hier nicht autoklaviert) gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Dazu wurden $3 \mu\text{l}$ des gelösten Lyophilisats eingesetzt und das BioPhotometer plus der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) verwendet. Anschließend wurde die

Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen des Stammes XL-1 Blue transformiert. Hierfür wurden 1 µl einer 1:10-Verdünnung des gelösten Lyophilisats zu 100 µl Zellsuspension von kompetenten Bakterienzellen zugesetzt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Es folgten ein 45-sekündiger Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Nach Zufügen von 500 µl SOC-Medium und einstündiger Inkubation bei 37 °C und 180 rpm Schüttelung, wurden die Proben per Zentrifugation (5 Minuten; 3 rpm) und Abnahme von 300 µl Überstand auf 200 µl angereichert. Danach wurden 200 µl dieser Bakteriensuspension auf Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden vier Bakterienklone (Bakterien-Populationen) mit einem Holzzahnstocher aufgenommen und die Zahnstocher in jeweils 2,5 ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1.000) überführt. Die Flüssigkulturen (Minipreps) wurden für ca. 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm Schüttelung inkubiert, bevor dann die Bakterien isoliert und die Plasmid-DNA präpariert wurden. Für Isolation und Präparation der Plasmid-DNA wurde das „NucleoSpin Plasmid EasyPure“-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die DNA wurde jeweils in 35 µl Milli-Q-Wasser von der Extraktionssäule eluiert. Die DNA-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers plus der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bestimmt. Um zu überprüfen, ob die präparierte Plasmid-DNA das Insert der potentiellen Mimivirus-LOX enthält, wurde eine Probespaltung der Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III durchgeführt. Dafür wurden jeweils 200-300 ng Plasmid-DNA mit 0,5 µl Sal I, 0,5 µl Hind III, 1 µl 10fach FD-Puffer green von Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) versetzt und mit Milli-Q-Wasser auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Diese Ansätze wurden im Thermocycler für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Bestimmung der Länge der Restriktionsfragmente einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Hierfür wurden ein 1,5%iges Agarosegel und 1kb-DNA-Marker verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde dem Agarosegel 1%iges Ethidiumbromid zugesetzt.

Für die Umklonierung des Inserts wurden der Insert-enthaltende pBME-Vektor und der pET28-Vektor an den Schnittstellen Sal I und Hind III mittels Restriktionsendonukleasen präparativ gespalten. Dafür wurden zwei Spaltansätze durchgeführt, die ca. 2 µg DNA (pBME-Vektor mit LOX-Insert) bzw. ca. 5 µg Vektor-DNA (pET28-Vektor) und jeweils 1 µl Sal I, 1 µl Hind III, 2 µl 10fach FD-Puffer green

von Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) enthielten. Die Spaltansätze wurden jeweils mit Milli-Q-Wasser auf 20 µl aufgefüllt und im Thermocycler für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Restriktionsfragment der mutmaßlichen LOX (Insert) mit ~ 1,7 kb und das Fragment des pET28-Vektors mit ~ 5,4 kb durch Agarosegelelektrophorese präpariert. Dazu wurden 1,5%iges Agarosegel und 1kb-DNA-Marker verwendet und zum Nachweis der DNA 1%iges Ethidiumbromid dem Agarosegel zugesetzt. Anschließend wurden das Insert- und das Vektor-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert. Dazu wurde das „Geland-PCR-Clean-up“-Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet und nach Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Eluiert wurde die gereinigte DNA in 35 µl Milli-Q-Wasser. Im Anschluss erfolgte die Ligation des LOX-Inserts in den linearisierten pET28-Vektor, wobei Insert:Vektor-Verhältnisse von 1:2; 1:3 und 1:4 eingestellt wurden. Außerdem enthielten die Ansätze 4 µl 5fach-Puffer und 1 µl T4-Ligase aus dem „Rapid DNA Ligation“-Kit von Thermo Fisher Scientific-Fermentas (Schwerte, Deutschland) und wurden mit Milli-Q-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde und zusätzlich in einem 1:4-Ansatz bei 4 °C über Nacht. Die Ansätze wurden dann direkt für die in Absatz 2.2.3. beschriebene Transformation weiterverwendet.

Des Weiteren erfolgten Klonierungen in andere Expressionsvektoren (pcDNA, pQE9), um alternative Klonierungsstrategien auszuprobieren. Beim pcDNA-Vektor handelt es sich um einen eukaryontischen high-copy-Expressionsvektor, der ein Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin trägt und den Bakteriophagenpromotor T7 enthält. Dieser rekombinante Expressionsvektor wurde verwendet, um die potentielle LOX in eukaryontischen Zellen zu exprimieren, falls eine bakterielle Expression nicht möglich sein sollte. Beim pQE9-Vektor handelt es sich um einen anderen bakteriellen Expressions-Vektor, bei dem die Expression des rekombinanten Proteins unter der Kontrolle eines starken T7-Promotors steht. Die Klonierung mit diesen Vektoren erfolgte jeweils nach dem gleichen Schema, wie bei Verwendung des pET28-Vektors. Der pcDNA-Vektor wurde an den Schnittstellen Xba I und Not I gespalten und zwar, wie bei dem pET28-Vektor, unter Erhalt der His-tag-Sequenz.

2.2.3. Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem rekombinanten Expressionsplasmid und Plasmidamplifizierung

Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurden die konstruierten Expressionsplasmide in *E. coli*-Zellen des Stammes XL-1 Blue transformiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA kompetenten Bakterienzellen zugesetzt (jeweils gesamter Ligations-Ansatz auf 100 µl Zellsuspension) und dann eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock, für 45 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C, wurden die Proben erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden jeweils 500 µl SOC-Medium zugefügt und eine einstündige Inkubation bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180 rpm durchgeführt. Anschließend wurden die Proben per Zentrifugation (5 Minuten; 3 rcf) und Abnahme von 300 µl Überstand auf 200 µl angereichert und die transformierten Bakterien auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Je nach Antibiotikumresistenzgen des jeweiligen Vektors wurden Agarplatten mit 1 µl des entsprechenden Antibiotikums (100 mg/ml) auf 1 ml Agar (1:1.000) verwendet. Als nächstes wurden einzelne Klone (Bakterienpopulationen) zur Vermehrung ausgewählt und jeweils als Flüssigkultur angezüchtet. Dazu wurden die Klone mit einem sterilen Holzzahnstochern aufgenommen und die Zahnstocher jeweils in LB-Medium mit Resistenzantibiotikum (1:1.000) überführt. Es wurden 2,5 ml LB-Medium für Ansätze mit high-copy-Vektoren (pQE-9-Vektor; pcDNA-Vektor) und 5 ml LB-Medium für Ansätze mit dem low-copy-Vektor pET28 verwendet. Die Flüssigkulturen wurden für ca. 24 Stunden bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180 rpm inkubiert. Aus den Flüssigkulturen wurden dann die Bakterien isoliert und die Plasmid-DNA präpariert (Minipreps). Dazu wurde der „NucleoSpin Plasmid EasyPure“-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die DNA wurde jeweils in 35 µl Milli-Q-Wasser eluiert und ihre jeweilige Konzentration photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers plus der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.2.4. Sequenzierung des Expressionsplasmids

Zur Überprüfung des Ergebnisses von Umklonierung, Transformation und Vermehrung erfolgte bei allen Minipräparationen eine Probespaltung des Expressionsplasmids mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III bzw. Xba I und Not I. Dabei wurde wie bei der präparativen Spaltung der Umklonierung

vorgegangen. Es wurden jedoch nur 200-300 ng Plasmid-DNA eingesetzt und nur die Hälfte der Menge an Puffer und Restriktionsendonukleasen verwendet. Das Endvolumen der Ansätze betrug 10 µl. Anschließend wurden die Längen der Restriktionsfragmente in einer Agarosegelelektrophorese bestimmt, die genauso durchgeführt wurde, wie bei der oben beschriebenen Umklonierung. Nach positivem Vorhandensein der Insertbande von ca. 2 kbp wurden Proben des Expressionsplasmids (1.500 ng DNA in Milli-Q-Wasser auf 15 µl Endvolumen) zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) versandt.

2.2.5. Prokaryontische Expression der mutmaßlichen Mimivirus-LOX in *E. coli*

Zur Expression der potentiellen Mimivirus-LOX wurde das pET28-Expressionsplasmid in kompetente Zellen transformiert (wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben). Als Expressionsorganismus dienten *E. coli*-Zellen der Stämme BL21DEpLysS und RosettaDEpLysS, die eine Chloramphenicolresistenz besitzen. Für die Transformation wurden beide *E. coli*-Stämme simultan eingesetzt, um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. *E. coli*-Rosetta-Stämme sind BL21-Derivate, die auch Codons erkennen können, die von anderen *E. coli*-Stämmen üblicher Weise nicht erkannt werden. Es kamen ca. 200 ng Plasmid-DNA pro Ansatz zum Einsatz. Die Zellen wurden an Tag eins der Expression auf Kanamycin/Chloramphenicol-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. An Tag zwei wurden drei Klone ausgewählt und in 20 ml LB-Medium (mit 20 µl Kanamycin und 20 µl Chloramphenicol als Selektionsantibiotika) überführt. Die Vorkultur wurde sechs Stunden bei 37 °C und 200 rpm Schüttelfrequenz inkubiert. Die optische Dichte der Vorkultur wurde photometrisch bestimmt, und bei Erreichen einer optischen Dichte zwischen 0,1 und 0,15 wurden der Vorkultur 20 ml entnommen und als 500ml-Hauptkulturen angesetzt. Dazu wurde das Expressionssystem "EnPresso B" der Firma BioSilta (Berlin, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die Induktion der Synthese des rekombinanten Proteins erfolgte an Tag drei bei Erreichen einer optischen Dichte von ≥ 5 durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration im Expressionsansatz). Die Inkubation während der Expression erfolgte bei 24 °C und einer Schüttelfrequenz von 250 rpm. Nach 20-stündiger Expressionsperiode und Erreichen einer optischen Dichte zwischen 10 und 20 wurden die Zellen bei 4.000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Das Zellpellett wurde in 30 ml kalter PBS-Lösung resuspendiert, auf Eis gestellt und durch Ultraschall aufgeschlossen. Dann wurden die

Zelltrümmer bei 6 °C und 14.000 rpm über 30 min abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des exprimierten Proteins mittels Affinitätschromatographie wie unter 2.2.9.1 beschrieben.

Das pQE9-Expressions-Plasmid wurde ebenfalls in kompetente Zellen transformiert. Als Expressionsorganismus dienten hier *E. coli* des Stammes M15, die eine Kanamycin-Resistenz besitzen und für die rekombinante Expression von Proteinen mit Hilfe von pQE9-Expressionsvektoren empfohlen werden. Die Transformation und die Vorkultur wurden wie für die pET28-Expressionsplasmide beschrieben durchgeführt. Es kamen ca. 100 ng Plasmid-DNA zum Einsatz. Anschließend wurde IPTG (1 mM Endkonzentration) zugefügt, 2 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und für 10 Minuten bei 4 °C und 2.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Der Lysatüberstand wurde anschließend für einen Aktivitätsassay verwendet.

2.2.6. Eukaryontische Expression der mutmaßlichen Mimivirus-LOX in HEK293-Zellen

Zur Expression wurde das rekombinante pcDNA-basierte Expressionsplasmid in HEK293-Zellen transfiziert. Diese Zellen eignen sich besonders für die Expression rekombinanter Proteine, da die rekombinanten Expressionsplasmide von diesen Zellen leicht aufgenommen werden und als Episomen im Zytosol längere Zeit verweilen. Dafür wurden die HEK293-Zellen einen Tag vor der Transfektion in eine 6-Wellplatte mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well in 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) eingesät und bei 37 °C in 5 % CO₂ in der Atmosphäre kultiviert. Zur Transfektion wurden in jedes Well 200 µl einer Lösung gegeben, die aus folgenden Komponenten bestand: a) 2 µg Plasmid-DNA und b) 6 µl LT1 Transfektionsreagenz der Firma Mirus Bio (Madison, USA). Nach zwei Tagen wurden die Zellen jedes Wells in jeweils 500 µl DPBS überführt und für drei Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in je 100 µl DPBS resuspendiert, auf Eis gestellt und mit Ultraschall aufgeschlossen. Dann wurden die Zelltrümmer bei 4 °C und 16.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Nachfolgend wurden eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) und Aktivitätsmessungen durchgeführt.

2.2.7. Quantifizierung von pro- und eukaryontischer Expression

Mit den bei der Expression gewonnenen Proteinextrakten wurden zur Quantifizierung des Expressionsniveaus eine SDS-PAGE und ein Westernblot durchgeführt. Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet (für Molekulargewichte von 30-100 kDa). Als Marker wurde die „Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder“ Mischung der Firma Fermentas eingesetzt. Aliquots der Analyselösungen (10 oder 20 µl) wurden jeweils mit 3-5 µl Beladungspuffer versetzt und 3-5 Minuten bei 95 °C inkubiert, bevor sie für die jeweilige SDS-PAGE verwendet wurden. Die Elektrophoresegele wurden nach der Proteintrennung entweder für eine Coomassie-Färbung oder für einen Immunoblot weiterverwendet.

Mittels Coomassie-Färbung wurden die in den SDS-PAGEs getrennten Proteine unspezifisch sichtbar gemacht. Dafür wurden die Gele drei mal fünf Minuten in Milli-Q-Wasser geschwenkt. Nach Entfernung des Milli-Q-Wassers wurde Coomassieblau zugefügt, ein Triphenylmethanfarbstoff, mit dem man Proteine unspezifisch anfärben kann. Die Gele wurden dann jeweils für eine weitere halbe Stunde geschwenkt, kurz mit destilliertem Wasser gespült und über Nacht stehen gelassen. Am Folgetag wurden die Gele getrocknet.

Für die Erstellung eines Immunoblots wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurden acht Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Zwei Filterpapiere wurden in Anodenlösung 1 getränkt und aufeinander gelagert. Darauf wurden zwei in Anodenlösung 2 getränkte Filterpapiere plziert. Es folgten die in Anodenlösung 2 getränkte Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und vier in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere. Der Blot wurde im Semi-dry-Verfahren durchgeführt (10 V; 1 h). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran kurz in Ponceau S geschwenkt, ein Azofarbstoff, mit dem man Proteine auf Nitrozellulosemembran reversibel anfärben kann. Anschließend wurde die Membran fünfmal mit destilliertem Wasser gespült und für 30 Minuten mit Trockenmilch der Marke „Blotting-Grade-Blocker“ der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) in PBS (5 %) zur Blockade geschwenkt. Nach Entfernung der Trockenmilch, wurden erneut 10 ml Trockenmilch zugefügt sowie einen His-tag-spezifischer Antikörper (Antihisperoxidase; 1:10.000), mit dem die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Nach dreimaligem kurzen Spülen und zweimaligem Schwenken für je fünf Minuten der Membran mit PBS (0,3 % Tween 20),

wurde die Membran mit Milli-Q-Wasser gespült und für eine Minute mit 4 ml "Western Lightning Plus-ECL" der Firma Perkin Elmer (Boston, USA) behandelt. Der entstandene Farbstoff wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Imagers sichtbar gemacht.

2.2.8. Enzymatische Charakterisierung der Mimivirus-LOX

2.2.8.1 LOX-Aktivitätsassay unter normoxischen Bedingungen

Um zu testen, ob es sich beim rekombinant exprimierten Protein um eine LOX handelt, wurden die aufgereinigten Proteinfractionen in einem HPLC-basierten LOX-Aktivitätsassay getestet. Dazu wurden zunächst 1 µl und 5 µl des bakteriellen Lysatüberstandes (pET28 Expressionssystem) in 500 µl luftgesättigter PBS (Sauerstoffkonzentration ca. 170 µM) mit 5 µl einer 33 mM Arachidonsäure als Substrat (0,33 mM Arachidonsäureendkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Hydroperoxyverbindungen wurden anschließend durch Zugabe von Natriumborhydrid zu Hydroxyfettsäuren reduziert. Der Ansatz wurde daraufhin mit 30 µl konzentrierter Essigsäure auf pH 3 angesäuert und die enthaltenen Proteine mit 500 µl Methanol ausgefällt. Die Proben wurden geschüttelt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde für die HPLC-Analytik verwendet.

Ein ähnlicher Aktivitätsassay wurde mit dem rekombinanten Protein durchgeführt, welches mit Hilfe des pQE-9-Vektors exprimiert wurde. Es wurden verschiedene Mengen Lysatüberstand zu 500 µl luftgesättigter PBS zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion mit 2,5 µl einer 33 mM AA (160 µM Endkonzentration) als Substrat gestartet und bei 37° C für 15 Minuten inkubiert. Die entstandenen Hydroperoxyfettsäuren wurden durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert, der Ansatz mit 45 µl Essigsäure angesäuert, und die Proteine wurden mit 450 µl Methanol ausgefällt. Aliquots des proteinfreien Lysatüberstandes wurden anschließend zur HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte eingesetzt.

Auch mit dem rekombinanten Protein, welches mit Hilfe des pcDNA-Vektors exprimiert wurde, erfolgte ein Aktivitätsassay ähnlicher Art. Dabei wurden verschiedene Mengen des Lysatüberstandes in 500 µl Messpuffer (PBS mit 250 µM Arachidonsäure) inkubiert, indem dem Lysatüberstand zusammen mit 500 µl luftgesättigter PBS 3,8 µl einer 22 µM AA-Lösung (250 µM Endkonzentration) als Substrat zugesetzt wurde. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C, wurden die entstandenen Hydroperoxyderivate mit Natriumborhydrid reduziert und nach fünfminütiger Inkubation auf Eis mit 10 µl

Essigsäure angesäuert. Dann wurden 500 µl Methanol zugegeben und die Probe nach kurzem Vortexen für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 rpm und 8 °C und dann die Weiterverwendung des Überstandes zur HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte.

2.2.8.2. LOX Aktivitätstmessungen unter hyperoxischen Bedingungen

Die meisten LOX-Isoformen, die bisher charakterisiert worden sind, besitzen eine hohe Sauerstoffaffinität mit Km-Werten für Sauerstoff im ein- bis zweistelligen µM-Bereich (Juránek et al., 1999). Andere LOXn, wie z.B. die humane ALOXE3 (Zheng and Brash, 2010) und LOX-1 von *Pseudomonas aeruginosa* (Banthiya et al., 2017) weisen eine deutlich geringere Sauerstoffaffinität auf. Für die humane ALOXE3 konnte auf Grund der geringen Sauerstoffaffinität bei normoxischen Bedingungen fast keine LOX-Aktivität nachgewiesen werden. Unter hyperoxischen Bedingungen (100%ige Sauerstoffsättigung) wurde hingegen die Bildung von LOX-Produkten beobachtet (Zheng and Brash, 2010). Sollte es sich bei der potentiellen LOX des Mimivirus um ein ähnliches Enzym handeln, könnten Messungen unter normoxischen Bedingungen die Frage nicht beantworten, ob das Mimivirusprotein tatsächlich LOX-Aktivität aufweist. Aus diesem Grunde wurden die LOX-Aktivitätsmessungen auch unter hyperoxischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionspuffer mit reinem Sauerstoff für 30 min bei Raumtemperatur gespült und dann zur Aktivitätsmessung (siehe 2.2.8.1.) eingesetzt. Produktaufarbeitung und HPLC-Analyse der möglichen Reaktionsprodukte erfolgte wie beschrieben.

2.2.8.3. HPLC-Analytik

Zur Analytik der LOX-Produkte wurde eine Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionsprodukte an einer C18-Säule (Nucleodur C18 Gravity Säule, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) unter Verwendung eines Laufmittels, das aus Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis von 85:15:0,1 bestand, aufgetrennt. Es wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet. Das chromatographische System wurde durch die Verwendung von authentischen Standards (15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) geeicht, so dass die Retentionszeiten der zu erwartenden LOX-Produkte festgelegt werden konnten. Zur Detektion der gebildeten LOX-Produkte wurden die Lichtabsorption des Säuleneffluenten bei 235 nm (typische

Lichtabsorption durch die konjugierten Diene von Hydroxyfettsäuren) kontinuierlich über die Zeit gemessen.

2.2.9 Enzymreinigung

2.2.9.1. Affinitätschromatographie

Nach der prokaryontischen Expression der mutmaßlichen Mimivirus-LOX in pET28-Vektor (2.2.5.) wurde der Überstand des Bakterienlysats zur Reinigung des darin gelösten rekombinanten Proteins zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Dazu wurde der Lysatüberstand (30 ml) zunächst für eine Stunde mit Nickel-Agarose (2 ml Nickel-Agarosesuspension auf 6 ml kaltes Lysat) im Überkopfschüttler bei 4 °C und 12 rpm inkubiert. Danach wurde die Suspension in zwei Leersäulen überführt. Nachdem sich die Ni-Agarose abgesetzt hatte und die überstehende Flüssigkeit durch das Gel durchgelaufen war, wurden die Säulen jeweils zweimal mit 2 ml 10 mM Imidazolwaschpuffer gespült. Danach wurde das Gel zweimal mit 2 ml 25-mM-Imidazol-Waschpuffer gespült. Durch diese beiden Waschschrte wurden lose gebundene Fremdproteine, die kein His-tag enthalten, ausgewaschen. Anschließend wurden die Säulen jeweils sechsmal mit 1 ml Elutionspuffer (200 mM Imidazol) eluiert und das Eluat aufgefangen, sodass zweimal sechs Elutionsfraktionen zu jeweils 1.000 µl aufgefangen wurden. Die gewonnenen Fraktionen wurden jeweils mit 200 µl 50%igem Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2. Gelfiltration (Fast liquid Chromatographie, FPLC)

Für die weitere Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus der pET28-Expression wurde zuerst eine Proteinentsalzung durchgeführt, um das in den Elutionsfraktionen enthaltene Imidazol zu entfernen. Dazu wurden drei Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie, die rekombinantes Protein enthielten (Westernblotanalysen), gepoolt und auf eine Entsalzungssäule gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden die Proteine mit Hilfe von 4 ml FPLC-Puffer (Tris: 20 mM, pH 8,0) von der Entsalzungssäule eluiert und auf Eis gelagert. Zur Konzentrierung der im Säuleneluat enthaltenen Proteine wurde eine Ultrafiltration durchgeführt. Dazu wurde das Säuleneluat (4 ml) in einen Proteinkonzentrator (Spin-X UF 6, 30 kDa MW cutoff, Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) überführt und mit 4.000 rpm bei 4 °C solange zentrifugiert, bis eine Reduktion des Eluatvolumens auf 500 µl erreicht war. Als letzten Schritt der Reinigungsstrategie wurde eine FPLC-

Gelfiltration (size-exclusion chromatography) durchgeführt. Dazu wurde die konzentrierte Proteinpräparation auf eine FPLC-Säule (Superdex 200 10/300GL, GE Healthcare, GE Healthcare; Uppsala, Sweden) gegeben und mit dem ÄKTA-FPLC-System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) aufgereinigt. Dabei wurden die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen durch Messung der Absorption bei 280 nm quantifiziert. Entsprechend des Proteinelutionsprofils wurden die Proteinkonzentrationen zweier Elutionsfraktionen mit der Bradford-Methode bestimmt und anschließend zur protein-chemischen Charakterisierung der potentiellen Mimivirus-LOX verwendet. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte eingefroren in flüssigem Stickstoff.

2.2.10. Protein-chemische Charakterisierung der potentiellen Mimivirus-LOX

2.2.10.1. Bestimmung des Eisengehaltes

Da alle bisher charakterisierten LOXn entweder Eisen oder Mangan als katalytisch aktives Metall enthalten, haben wir den Eisen- und Mangangehalt der FPLC-gereinigten potentiellen Mimivirus-LOX bestimmt. Dafür wurden 200 µl einer FPLC-Fraktion (2.2.9.2.) eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) an einen AA Analyst 800 Instrument der Firma Perkin Elmer (Waltham, USA). Der Eisengehalt der Präparation wurde auf deren Proteingehalt bezogen. Die Analysen wurden im Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin durchgeführt.

2.2.10.2. Massenspektroskopie der tryptischen Spaltpeptide

Bei der Reinigungsprozedur des rekombinanten Mimivirusproteins (Affinitätschromatographie, FPLC) fiel auf, dass ein unbekanntes bakterielles Protein mit einem unterschiedlichen Molekulargewicht mit der potentiellen Mimivirus-LOX kogereinigt wurde. Da die Trennprinzipien der Affinitätschromatographie (His-tag) und der FPLC (Molekulargewicht) unterschiedlich sind, deutet diese Koreinigung darauf hin, dass beide Proteine spezifisch miteinander wechselwirken und in beiden Reinigungsverfahren der gemeinsame Proteinkomplex gereinigt wurde. Zur proteinchemischen Charakterisierung der beiden kogereinigten Proteine wurden diese mittels SDS-PAGE von einander getrennt, mit Coomassieblau angefärbt und aus dem Elektrophoresegel separat voneinander ausgeschnitten. Anschließend wurden beide Proteine einem tryptischen Verdau unterzogen, und die Spaltpeptide wurden mittels Massenspektroskopie analysiert. Die Analysen und deren quantitativen Auswertungen

wurden im proteinchemischen Labor des Instituts für Biochemie der Charité durchgeführt.

2.2.11. Sequenzalignments

Um Aussagen zur Identität der potentiellen Mimivirus-LOX machen zu können, wurde die Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins mit den Sequenzen aller humanen LOX-Isoformen (ALOXE3 [Q9BYJ]; ALOX5 [AAA36183]; ALOX12B [O75342]; ALOX12 [P18054]; ALOX15 [P16050]; ALOX15B [O15296]) verglichen. Dazu wurde das Programm DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Datenbanksuche nach Lipoxygenase-ähnlichen Sequenzen in viralen Genomen

Um herauszufinden, ob in den bisher sequenzierten viralen Genomen „lipoxygenase-ähnliche Sequenzen“ vorkommen, wurden die Datenbankeinträge viraler Genome, die in der Pubmed Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) hinterlegt sind, mit einer dreistufigen Suchstrategie durchforstet. Diese Suche wurde erstmalig im Herbst 2015 durchgeführt und im Frühjahr 2016 wiederholt. Der letzte Suchlauf erfolgte im Sommer 2017.

3.1.1. Dreistufige Suchstrategie

3.1.1.1. Lipoxygenase-ähnliche Sequenzen (Verbalsuche)

Zunächst wurde in der Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) die Kategorie "Proteine" geöffnet und als Suchbegriff "Lipoxygenase" eingegeben, wobei sich 14.068 Treffer ergaben.

| Viren-Stamm | | Anzahl Treffer |
|----------------|-------------|----------------|
| Pocken-Viren | Ortho-Viren | 110 |
| | Centa-Viren | 2 |
| Caudo-Viren | Myo-Viren | 1 |
| | Podo-Viren | 2 |
| Mimi-Viren | Mimi-Virus | 7 |
| | Andere | 2 |
| Phycodna-Viren | | 2 |

Tab. 3.1: Ergebnis der Verbalsuche. Trefferanzahl der PubMed-Datenbanksuche für Proteine und Lipoxygenase, reduziert auf die Spezies Viren

Anschließend wurden die Suchergebnisse auf die Kategorie "Viren" reduziert. Dabei ergaben sich 126 Suchtreffer für potentielle virale LOXn (Tab. 3.1.), wobei die Gesamtzahl der viralen Genome in der Datenbank zum Suchzeitpunkt 7.366 betrug. Da die durchgeführte Verbalsuche auf dem Vergleich der Nukleotidsequenzen der potentiellen viralen LOX-Gene mit den cDNA-Sequenzen bekannter pro- und eukaryontischer LOX-Isoformen beruht, kann dieser Suchschritt als sequenzbasierte Suchstrategie bezeichnet werden.

3.1.1.2. Filterkriterien zur Reduktion falsch positiver Suchergebnisse (Molekulargewicht, Eisencluster)

Als primäres Filterkriterium zur Reduktion der positiven Ergebnisse der Verbalsuche wurde das Molekulargewicht verwendet. Dabei wurden aus den Treffern der Verbalsuche zunächst alle Sequenzen aussortiert, die ein kleineres Molekulargewicht als 60 kDa oder ein größeres Molekulargewicht als 100 kDa aufwiesen. Nach dem heutigen Stand des Wissens weisen die meisten katalytisch aktiven eukaryontischen LOXn Molekulargewichte zwischen 70 und 100 kDa auf. Das schließt allerdings LOX-Fusionsproteine (Koljak et al. 1997; Löhelaid et al. 2008), die außer einer LOX-Aktivität noch andere katalytische Eigenschaften besitzen, nicht mit ein. Da bis heute jedoch noch keine virale LOX identifiziert worden ist, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass bei Viren kleinere katalytisch aktive LOXn vorkommen. Sollte dies der Fall sein, würden diese Treffer als Konsequenz unserer Filterstrategie als falsch negative Ergebnisse eliminiert werden.

Durch diese primäre Filterstrategie wurden die 126 Treffer der Verbalsuche auf 11 Treffer (Tabelle 3.2.) reduziert. Unter den aussortierten Suchergebnissen befand sich kein Treffer mit einem Molekulargewicht über 100 kDa; 4 Treffer wiesen ein Molekulargewicht von 40 bis 59 kDa auf und betrafen ausschließlich Pockenviren. 111 falsch positive Treffer wiesen ein Molekulargewicht von unter 40 kDa auf. Auch dabei handelte es sich zum Großteil um Pockenvirusproteine (108 Treffer) und zu einem kleinen Anteil um Caudovirusproteine (3 Treffer). Unter den verbliebenen 11 Treffern befand sich eine Sequenz, die aus 565 Aminosäuren bestand. Diese Sequenz wurde in unterschiedlichen Viren gefunden und ist bei allen diesen Viren identisch. Da diese Sequenz in mehreren Mimivirusarten vorkommt, wird sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Mimivirus-LOX bezeichnet. Neben dieser Sequenz wurde ein zweiter

Sequenztyp im Rahmen unserer Suchstrategie identifiziert. Dieses Protein besteht aus 737 Aminosäuren und kommt im *Ectocarpus siliculosus virus 1* vor.

| Nummer | Virus | Aminosäuren | Code-Nr. |
|--------|------------------------------------|-------------|---------------|
| 1 | Acanthamoeba castellanii mimivirus | 565 | GI:1073515578 |
| 2 | Acanthamoeba castellanii mimivirus | 565 | GI:1073514589 |
| 3 | Mimivirus Bombay | 565 | GI:1020266019 |
| 4 | Samba virus | 565 | GI:998642360 |
| 5 | Niemeyer virus | 565 | GI:960350128 |
| 6 | Hirudovirus strain Sangsue | 565 | GI:557952020 |
| 7 | Acanthamoeba polyphaga mimivirus | 565 | GI:823719114 |
| 8 | Acanthamoeba polyphaga mimivirus | 565 | GI:311977434 |
| 9 | Acanthamoeba polyphaga mimivirus | 565 | GI:308204514 |
| 10 | Ectocarpus siliculosus virus 1 | 737 | GI:13242618 |
| 11 | Ectocarpus siliculosus virus 1 | 737 | GI:13177418 |

Tab. 3.2: Potentielle virale LOX-Sequenzen. Diese Sequenzen wurden bei der Datenbanksuche nach viralen LOX-Sequenzen im Molekulargewichtsbereich zwischen 60.000 und 100.000 Da erhalten. Die Sequenzen 1-9 sowie 10-11 sind jeweils strukuridentisch.

In der zweiten Filtrerrunde wurden die in Tabelle 3.2. angegebenen Aminosäuresequenzen aus der Datenbank extrahiert und auf das Vorhandensein von Aminosäuren untersucht, welche für die beiden Metalligandierungskuster kodieren könnten. LOXn sind Nichthämeisen oder Mangan enthaltene Fettsäuredioxygenasen, wobei das Übergangsmetall durch zwei in der Primärstruktur abgrenzbare Metalligandenkuster gebunden wird. Bei diesen Klustern handelt es sich um zwei konservierte Aminosäuresequenzen, die über zwei in den Aminosäureseitenketten sitzenden Sauerstoff- bzw. Stickstoffatome Übergangsmetalle komplexieren können.

Der erste Eisenkuster wird durch ein Hexapeptid mit der Sequenz His-As1-As2-As3-As4-His gebildet. Der zweite Eisenkuster ist ein Pentapeptid mit der Sequenz His-As5-As6-As7-His (Asn, Ser), wobei As für beliebige Aminosäuren steht. Die beiden nach der ersten Filtrerrunde (Molekulargewichtsfiler) noch verbliebenen potentiellen viralen LOX-Sequenzen (Tabelle 3.2.), enthielten Sequenzen, die der Struktur der beiden Eisenkuster ähneln. Allerdings konnten die Sequenzen der beiden Eisenkuster bei der *Ectocarpus siliculosus-virus-1-LOX* nur in stark veränderter Form nachgewiesen werden. Bei der Mimivirus-LOX war der zweite Eisenkuster hoch konserviert (His-As1-As2-As3-His), während es für den ersten Eisenkuster mehrere mögliche Sequenzen gab (Abb. 3.1.). Weiterhin lagen die beiden potentiellen Eisenkuster bei der

Ectocarpus-siliculosus-virus-1-LOX sehr weit auseinander. Details zu den beiden potentiellen Metallligandenklustern werden unter 3.1.1.3. näher beschrieben. Der Abstand der beiden potentiellen Metallligandenklustern beträgt bei der potentiellen Mimivirus-LOX ca. 170 Aminosäuren (Abb. 3.1.). Ähnliche Klusterabstände wurden für die meisten eukaryontischen LOXn bereits beschrieben.

```

1      mlkkigndls  fftgyltfrt  ydsiwrkatl  pmysklkenl  rkptktclpq
51     ndldyrlrht  lirqnarhyq  sikntfinip  tfelntflkk  efhsniilas
101    ptlsfsildy  lndgriinsd  kdirkivkkf  rlidsmtrlt  dynayqlnpa
151    idilkilddn  trnkllglfd  daifysldie  sfvtnfsdkk  yyfqdceain
201    kqfnvydvygl  yvpyddngkk  rlqietiilv  drrtdntkty  vfqsnfsqwe
251    iirnnyniwt  rtmssvyehq  lgsnvycqnt  lyhmrktlak  thpitvlmkp
301    fmegvyftnk  vftsfgisia  dtenevnry  mdrvelfdls  nqtmigaley
351    ihktdgykll  dykkvyheng  vddiyfeqkq  lledlyqivf  dlvtvfyey
401    yqstddyvkd  nelrdfylsi  kndltfvedl  qqkdnaikff  sniiflssir
451    hsknhinyay  lnsfydyalr  ktnfdllldk  ldngipfdek  dclstvgdfy
501    skyssgiyps  vpinlfgtgy  knlfadnevq  kfftdvtnkl  nqlkknatern
551    nyteflftrlq  nsnti

```

Abb. 3.1: Aminosäuresequenz der potentiellen LOX des Mimivirus aus *Acanthamoeba polyphaga*. Die potentiellen Eisenliganden sind grün (N-terminaler Eisencluster) bzw. gelb (C-terminaler Eisencluster) hinterlegt. Der erste potentielle Eisencluster wird gebildet durch die Aminosäuren **His-Met-Arg-Lys-Thr** oder durch **Thr-Leu-Ala-Lys-Thr-His**. Alternativ wäre auch die Sequenz **His-Met-Arg-Lys-Thr** ein Kandidat für den ersten Eisencluster. Alle drei Sequenzbereiche könnten über die Aminosäuren Asn, His und Thr prinzipiell zur Eisenligandierung beitragen. Der zweite potentielle Eisencluster wird gebildet durch die Aminosäuren **His-Ser-Lys-Asn-His**. Der ungefähre Abstand der beiden potentiellen Eisenligandenklustern beträgt 160-170 Aminosäuren. Als fünfter potentieller Eisenligand könnte wie bei vielen anderen LOXn das C-terminale Ile (blau hinterlegt) fungieren.

Um weitergehende Aussagen darüber zu erhalten, ob es sich bei den beiden extrahierten Sequenzen um funktionelle LOXn handelt, wurden die Aminosäuresequenzen beider potentiellen viralen LOXn mit denen der humanen LOX-Isoformen verglichen. Dabei ergaben sich für die potentiellen Mimivirus-LOX Sequenzidentitätsscores von 13-16 % (Tabelle 3.3.). Bei der potentiellen *Ectocarpus-siliculosus-virus-1-LOX* waren diese Werte deutlich niedriger (3-6 %). Lediglich für die humane ALOX15B konnte ein Identitätsscore von 13,1 % im Vergleich zur potentiellen *Ectocarpus-siliculosus-virus-1-LOX* ermittelt werden.

| ALOX-Isoformen | Aminosäureidentität (%) | |
|----------------|-------------------------|------|
| | Mensch | Maus |
| ALOX15 | 14,0 | 15,8 |
| ALOX15B | 13,8 | 12,9 |
| ALOX12 | 13,0 | 13,5 |
| ALOX12B | 15,4 | 13,4 |
| ALOX5 | 14,4 | 13,3 |
| ALOXE3 | 15,7 | 13,9 |
| ALOXE12 | Pseudogen | 14,3 |

Tab. 3.3. Vergleich der Aminosäuresequenz der potentiellen Mimivirus-LOX mit den entsprechenden Sequenzen humaner und muriner ALOX-Isoformen. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Pubmed Datenbank extrahiert und das Aminosäurealignment wurde mit dem Programm DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt.

Zusammenfassung: Mit Hilfe einer 3-stufigen Suchstrategie konnten im Rahmen einer Datenbanksuche zwei potentielle virale LOX-Sequenzen ermittelt werden. Eine dieser Sequenzen (potentielle Mimivirus-LOX) enthielt zwei für LOXn typische Metallligandenkluster, die in einem ähnlichen räumlichen Abstand voneinander angeordnet sind, wie das für eukaryontische LOXn der Fall ist.

3.1.1.3. Aminosäuresequenzalignments der potentiellen Mimivirus-LOX mit humanen ALOX-Isoformen

Nach der oben beschriebenen Filterstrategie blieb von den 126 möglichen viralen LOX-Sequenzen der Verbalsuche lediglich eine Sequenz als potentielle virale LOX-Sequenz übrig: *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus (ADO18315.1; Genbank HQ336222.2; 565 Aminosäuren). Die komplette Aminosäuresequenz des Proteins ist in Abb. 3.1. dargestellt, wobei der Einbuchstabencode der Aminosäuren verwendet wurde. Potentiell metalligandierende Aminosäuren sind farbig hinterlegt. Für die Spezifizierung des mehr N-terminal gelegenen Ligandenklusters (grün hinterlegt) gibt es auf der Basis der Sequenzdaten mehrere Möglichkeiten. So könnte die Sequenz **NTLYH** mit den Aminosäuren N (Asn) und H (His) als potentielle Metallliganden fungieren. Alternativ dazu wären auch die Sequenzen **HMRKT** (His und Thr als direkte Metallliganden) und **TLAKT(H)** (Thr und Thr oder Thr und His als direkte Metallliganden) zur Metalligandierung fähig. Aminosäurealignments (s. u.) mit bisher bekannten ALOX-Isoformen konnten dabei behilflich sein, die funktionell wahrscheinlichste Sequenz des Klusters zu identifizieren.

Der potentielle C-terminale Eisenkuster (gelb hinterlegt) ist hinsichtlich der Sequenzdaten besser definiert als der N-terminale Kuster. Hier gibt es zur markierten HSKNH-Sequenz keine wirkliche Alternative. Ob in dieser Sequenz jedoch das C-terminale His oder das davor liegende Asn als direkter Eisenligand fungiert, kann auf der Basis der verfügbaren Sequenzdaten nicht genau spezifiziert werden.



Abb. 3.2: Aminosäurealignment der humanen ALOX15 mit der potentiellen LOX des Mimivirus aus *Acanthamoeba polyphaga*. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der Pubmed Datenbank extrahiert und das Aminosäurealignment wurde mit dem Programm DNASTar Lasergene 7 (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) durchgeführt. Die potentiellen Eisenliganden der Mimivirus-LOX, die mit den Eisenliganden der humALOX15 alignen, sind blau hinterlegt. Dies betrifft auch die N-terminale Aminosäure der beiden Proteine (Ile in beiden Fällen). Für die humane ALOX15 konnte dieses Ile als fünfter direkter Eisenligand identifiziert werden.

Wie einleitend erwähnt, verfügt das humane Genom über sechs funktionelle LOX-Gene, während das Genom der Maus sieben solcher Gene aufweist. Um den Ähnlichkeitsgrad der potentiellen Mimivirus-LOX mit den humanen und murinen ALOX15-Isoformen zu quantifizieren, wurden die Aminosäuresequenzen jeder der sechs humanen und sieben murinen ALOX-Isoformen separat mit der Sequenz der potentiellen Mimivirus-LOX verglichen.

In Abb. 3.2 ist das Aminosäurealignment der humanen ALOX15 mit der potentiellen Mimivirus-LOX dargestellt. Die humALOX15 ist um ca. 100 Aminosäuren größer als das Mimivirusprotein und auf Aminosäureebene ergab sich zwischen den beiden Proteinen eine Sequenzidentität von 14 %. Ähnliche Aminosäureidentitätswerte wurden für die anderen humanen und murinen ALOX-Isoformen ermittelt (Tabelle 3.3). Da das humane ALOXE12-Gen ein funktionsloses Pseudogen ist, kann ein entsprechender Vergleich für dieses Enzym nicht durchgeführt werden.

Die Aminosäureidentitätswerte belegen, dass die Sequenzen der humanen und murinen ALOX-Isoformen nur einen geringen Verwandtschaftsgrad mit der potentiellen Mimivirus-LOX aufweisen. Auf der Basis dieser relativ geringen Aminosäureidentitätswerte kann jedoch nicht geschlossen werden, dass es sich bei der potentiellen Mimivirus-LOX-Sequenz nicht um eine funktionsfähige LOX handelt. Ein ähnliches Sequenzalignment der humanen ALOX15 mit der LOX1 aus Soyabohnen ergab ebenfalls einen relativ niedrigen Aminosäureidentitätsscore von 23,1 %. Trotzdem handelt es sich bei diesen beiden Enzymen um voll funktionsfähige LOXn, deren enzymatische Eigenschaften sich in vielen Aspekten durchaus ähneln.

Zusammenfassung: Die potentielle Mimivirus-LOX lässt sich sinnvoll mit den sechs humanen LOX-Isoformen vergleichen und weist Sequenzidentitätsscores von 13-16 % mit diesen Proteinen auf.

3.2. Rekombinante Expression der putativen Mimivirus-LOX in *E. coli*

3.2.1. Synthese und Amplifizierung der Mimivirus-LOX-cDNA

Da die cDNA der potentiellen Mimivirus-LOX nicht kommerziell verfügbar war, wurde diese von der Firma Biomatik Corporation (Ontario, Kanada) anhand der Sequenzdaten durch chemische Totalsynthese hergestellt.

| Proben-Nummer | DNA-Konzentration (ng/μl) |
|---------------|---------------------------|
| 1 | 430 |
| 2 | 442 |
| 3 | 499 |
| 4 | 479 |

Tab. 3.4: Fotometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in vier Plasmid-DNA-Proben nach MINI-Präparation.

Die cDNA-Sequenz wurde in einem Synthesvektor (pBME) eingebettet geliefert. Zunächst wurde die angelieferte Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Danach wurden vier 2,5-ml-Flüssigkulturen (Minipreps) der transformierten Bakterien gezüchtet und Plasmid-DNA präpariert (siehe Material und Methoden). Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 35 μl Milli-Q-Wasser aufgenommen und die erhaltene DNA-Menge wurde fotometrisch bestimmt (Tabelle 3.4.).

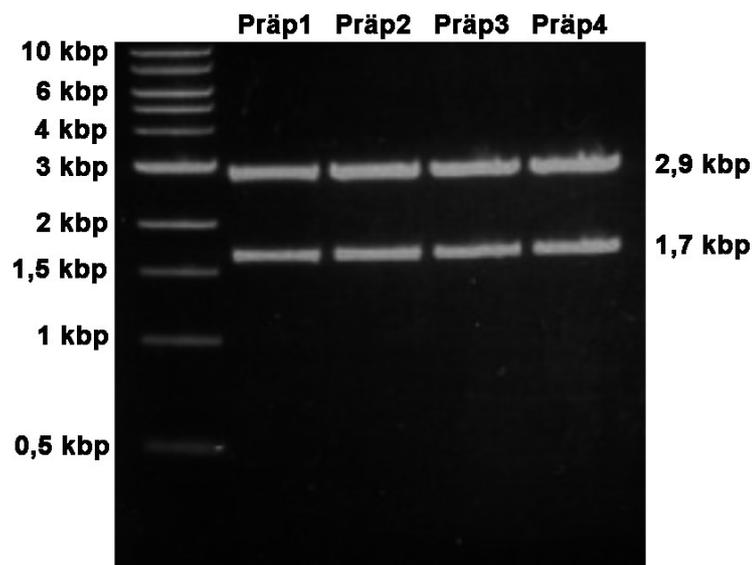


Abb. 3.3: Analytische Agarosegelelektrophorese des rekombinanten Synthesplasmids verschiedener Präparationsansätze. Nachweis des putativen LOX-Inserts (1,7 kb; untere Bande) und des linearisierten pBME-Vektors (2,96 kb; obere Bande) nach Präparation und Probespaltung der synthetisierten DNA-Sequenz aus vier unterschiedlichen Bakterienklonen (Minipräparationen). Der Ablauf der Minipräparationen, der Restriktionsspaltung und der Agaroseelektrophorese wurde wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die präparierten Plasmide das Mimivirus-LOX-Insert enthielten, wurde mit Aliquots der vier Präparationen eine Restriktionsspaltung durchgeführt. Dazu wurde aus allen vier Präparationen jeweils ein Aliquot (0,5 μl ≈ 200 ng cDNA) entnommen und eine Probespaltung mit den Restriktionsendonukleasen

Sal I und Hind III durchgeführt. Diese Enzyme spalten das rekombinante Plasmid an zwei verschiedenen Stellen, so dass ein großes (2,96 kbp, entspricht dem linearisierten Synthesevektor) und ein kleines (1,7 kbp, entspricht dem Mimivirus-LOX-Insert) Restriktionsfragment zu erwarten waren. Nach Beendigung der Restriktionsspaltung wurden Aliquots des Spaltansatzes in der Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 3.3.)

3.2.2. Konstruktion, Klonierung und Analyse der rekombinanten prokaryontischen Expressionsplasmide

Für die Konstruktion und Klonierung des prokaryontischen Expressionsplasmids wurden zwei unterschiedliche Expressionsvektoren ausgewählt:

i) pQE9 (Abb. 3.4.): Dieses prokaryontische Expressionsplasmid besteht aus 3,4 kbp und enthält einen ColE1-Replikationsort sowie ein Ampicillinresistenzgen. Die Expression rekombinanter Proteine wird durch einen T5-Promoter gesteuert, der sich upstream des Lac-operator-elements befindet. Der kodierende Bereich der cDNA des zu exprimierenden Proteins kann in die Multikloning-Kassette (MCS; Multiple cloning site) einkloniert werden, die sich unmittelbar downstream der Hexa-His-tag-Sequenz befindet. Die ATG-Sequenz des Expressionsvektors markiert den Start der Translation des rekombinanten Proteins, welches eine N-terminale Hexa-His-tag-Sequenz enthält.

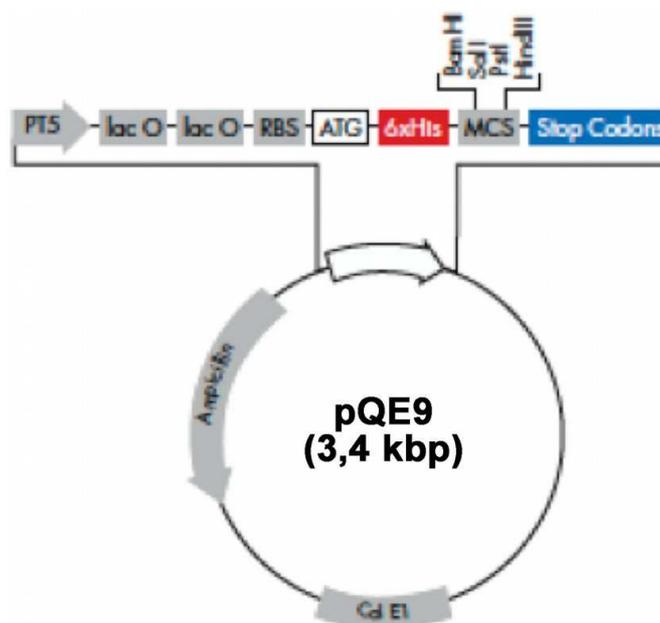


Abb. 3.4. Schematische Darstellung des pQE9-Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text.

Bei der Einklonierung der kodierenden cDNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins musste beachtet werden, dass der Leserahmen der cDNA erhalten bleibt. Für die Einklonierung des kodierenden Teils der Mimivirus-LOX-cDNA wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III genutzt, die im Insert nicht vorkommen. Aus technischen Gründen mussten zwischen der N-terminalen His-tag-Sequenz und dem Start der kodierenden Region der Mimivirus-LOX zusätzliche Aminosäuren eingefügt werden, so dass sich die N-terminale Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins wie folgt veränderte: Met-Arg-Gly-Ser-*His-His-His-His-His*-Gly-Ser-Val-Asp-**Met-Leu-Lys-Lys**. Dabei markieren die fettgedruckten Reste die N-terminalen Aminosäuren der potentiellen Mimivirus-LOX.

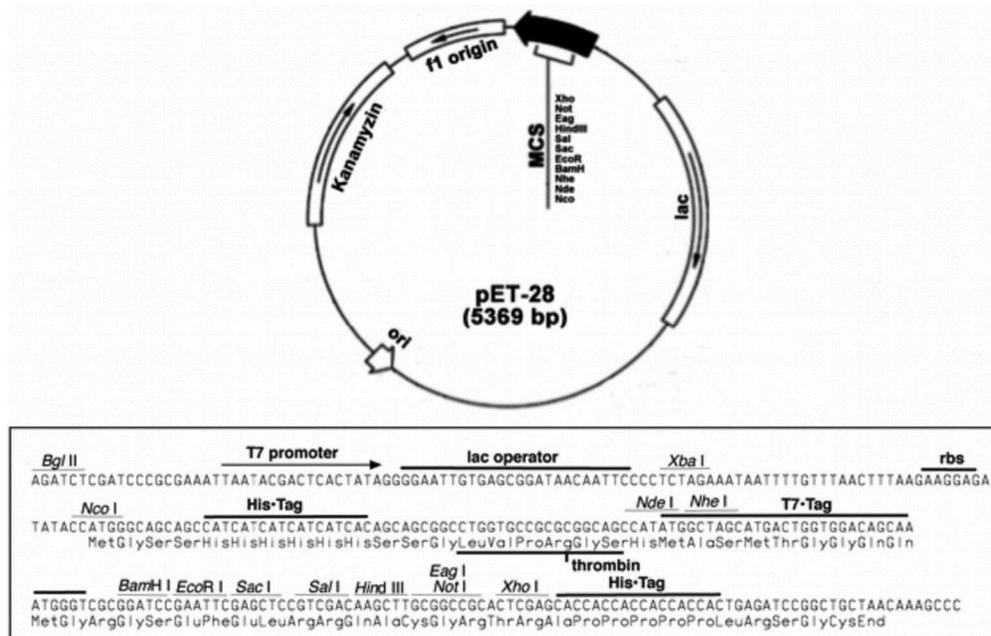


Abb. 3.5. Schematische Darstellung des pET28 Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text.

ii) pET28 (Abb. 3.5): Dieses prokaryontische Expressionsplasmid besteht aus ca. 5,4 kbp und enthält einen F1-Replikationsort sowie ein Kanamycinresistenzgen. Die Expression rekombinanter Proteine wird durch einen T7-Promoter gesteuert. Der kodierende Bereich der cDNA des zu exprimierenden Proteins kann in die Multikloning-Kassette (MCS; Multiple cloning site) einkloniert werden, in der sowohl eine N-terminale als auch eine C-terminale Hexa-His-tag-Sequenz vorhanden ist. Auch hier musste bei der Einklonierung der kodierenden cDNA-Sequenz beachtet werden, dass der Leserahmen der cDNA erhalten bleibt. Für die Einklonierung der Mimivirus-LOX-cDNA

wurden wie für die pQE9-Klonierung die Restriktionsstellen Sal I (5'Ende) und Hind III (3'Ende) genutzt. Aus technischen Gründen wurden auch bei dieser Klonierungsstrategie zwischen dem Startkodon des Vektors (ATG der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Nco I) und dem Startkodon der potentiellen Mimivirus-LOX zusätzliche Aminosäuren eingefügt, so dass sich die N-terminale Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins wie folgt veränderte: Met-Gly-Ser-Ser-*His-His-His-His-His-His*-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly-Arg-Asp-Pro-Asn-Ser-Ser-Ser-Val-Asp-**Met-Leu-Lys-Lys**. Dabei markieren die fettgedruckten Reste die N-terminalen Aminosäuren der potentiellen Mimivirus-LOX. Die einklonierte cDNA-Sequenz enthielt das endogene Stop-Codon der Mimivirus-LOX, so dass die C-terminale Hexa-His-tag-Sequenz nicht translatiert wurde.

Um die rekombinanten Expressionsplasmide zu präparieren, wurde das Mimivirus-LOX-Insert aus dem rekombinanten Synthesvektor mit einer Kombination aus Sal I und Hind III herausgeschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt.

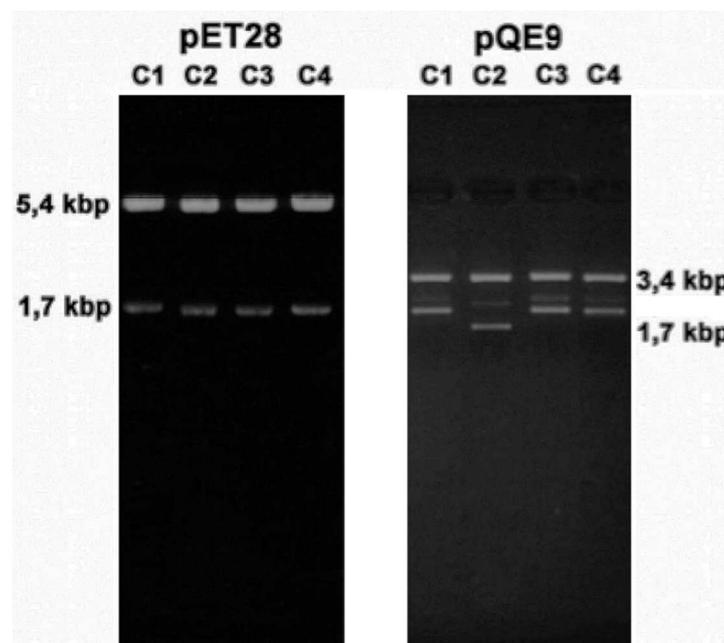


Abb. 3.6. Restriktionsspaltung ausgewählter rekombinanter Expressionsplasmide mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III. Das Restriktionsfragment mit dem Molekulargewicht von 1,7 kbp entspricht dem Mimivirus-LOX Insert. Die Fragmente mit 3,4 kbp bzw. 5,4 kbp repräsentieren die Insert-freien linearisierten Vektoren.

Gleichzeitig wurden die Expressionsvektoren pQE9 und pET28 mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt. Die dadurch linearisierten Expressionsvektoren wurden ebenfalls mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese gereinigt. Danach wurden jeweils die beiden Restriktionsfragmente (Insert und linearisierter Vektor) ligiert, wobei die zirkulären rekombinanten Expressionsplasmide entstanden. Diese wurden anschließend genutzt, um kompetente *E. coli*-Bakterien zu transformieren. Nach der Bakterienvereinzelung und Übernachtkultur wurden jeweils mindestens vier verschiedene Bakterienklone isoliert und Plasmid-DNA präpariert (Minipreps).

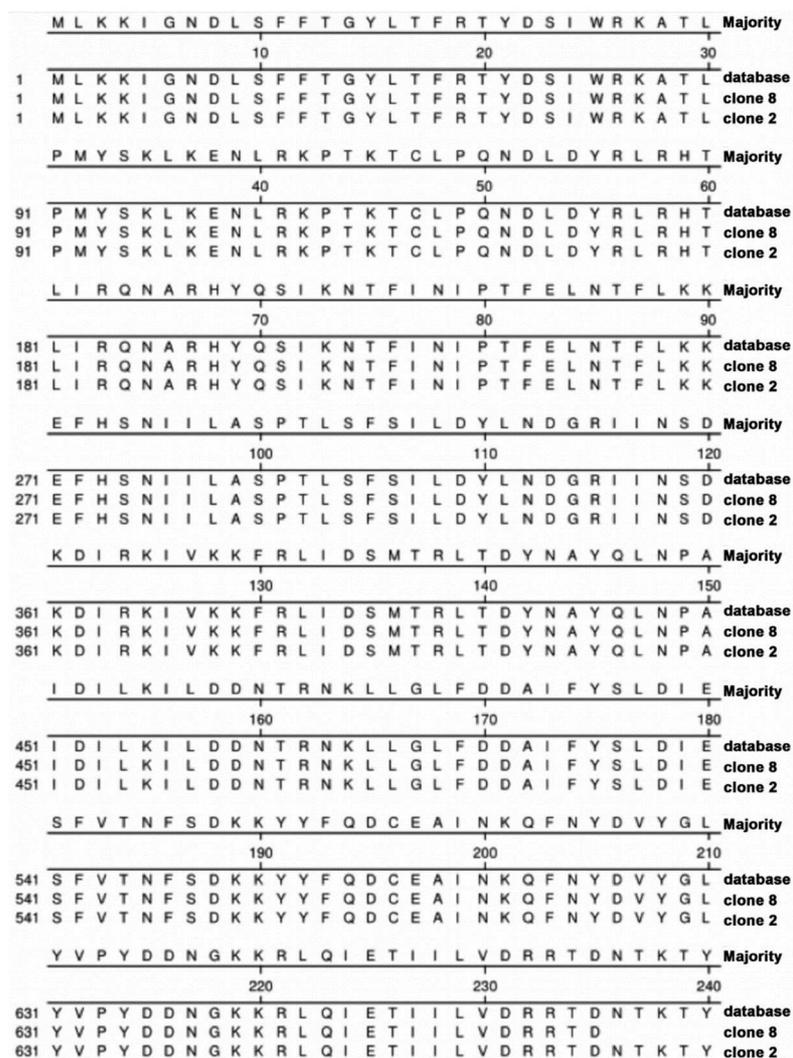


Abb. 3.7. Aminosäurealignment des Mimivirus-LOX Inserts der Bakterienklone 2 und 8 auf der Basis der erhaltenen Nukleinsäuresequenzen. Das Alignment beschränkt sich auf die 240 N-terminalen ASn der potentiellen Mimivirus-LOX. Die restlichen ASn, einschließlich der C-terminalen Sequenz der potentiellen Mimivirus-LOX sowie die N-terminalen Sequenzen, die während der Klonierungsstrategie vor das Startmethionin der potentiellen Mimivirus-LOX vorgeschaltet wurden (inklusive der N-terminalen Hexa-His-tag Sequenz), sind bei diesem Alignment nicht berücksichtigt.

Aliquots der Plasmid-DNA-Präparationen wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III behandelt (Herausspaltung des Inserts), und der Restriktionsansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei allen pET28-Plasmidpräparationen und bei einem Klon (C2) der pQE9-Plasmidpräparationen das Mimivirus-LOX-Insert in der zu erwartenden Größe (1,7 kbp) herausgespalten werden konnte. Bei den Klonen C1, C3 und C4 der pQE-Expressionsstrategie wurden längere Inserts identifiziert, so dass diese Klone nicht weiter verwendet werden konnten. Zusammengefasst belegen diese Analysen, dass fünf der getesteten acht verschiedenen Bakterienklone das zu erwartende rekombinante Expressionsplasmid enthielten (Abb 3.6).

Um auszuschließen, dass sich während der chemischen Plasmidsynthese bzw. während des Klonierungsprozesses der rekombinanten Expressionsplasmide Mutationen in die kodierende Region der potentiellen Mimivirus-LOX eingeschlichen haben, wurde die Plasmid-DNA von einem pQE9-Klon und zwei pET28-Klonen zur DNA-Sequenzierung geschickt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden am Computer in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und mit den erhaltenen Daten ein dreifaches Aminosäurealignment durchgeführt. Auf Grund der Größe des Mimivirus-LOX-Inserts waren für jeden Klon mindestens drei überlappende DNA-Sequenzierungsansätze nötig, um die gesamte Aminosäuresequenz der potentiellen Mimivirus-LOX zu identifizieren. Ein Beispiel für einen Sequenzierungsansatz der beiden pET28-Klone 2 und 8, bei dem das N-terminale Drittel der kompletten Aminosäuresequenzen ermittelt wurde, ist in Abb. 3.7. dargestellt. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass der Bakterienklon der pQE9-Klonierungsstrategie und ein Bakterienklon der pET28-Klonierungsstrategie frei von unerwünschten Mutationen war. Von diesen beiden Bakterienklonen wurde jeweils eine Midi-Plasmidpräparation durchgeführt, die für die Transformation von *E. coli*-Zellen bei den anstehenden Expressionsuntersuchungen verwendet werden konnte.

Zusammenfassung: Es wurden zwei verschiedene rekombinante Expressionsplasmide (pQE9- und pET28-basiert) für die prokaryontische Expression der potentiellen Mimivirus-LOX hergestellt. Zur Qualitätskontrolle wurden die Inserts der beiden rekombinanten Plasmide einschließlich der 5'- und 3'-flankierenden Bereiche sequenziert.

3.2.3. Expression des rekombinanten Proteins und dessen Affinitätsreinigung

3.2.3.1. Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe des pQE9-Vektors

Zur Expression der in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE9 eingebrachten putativen Mimivirus-LOX wurde das pQE9-Expressionsplasmid in kompetenten Bakterienzellen des Stammes M15 transformiert. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Nach der Expressionsperiode wurden die Bakterien abzentrifugiert, die Pellets in 500 µl PBS aufgenommen und die Zellen mit Ultraschall zerstört. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die stromafreien Lysatüberstände (zwei Fraktionen) wurden zur Analyse der rekombinanten Expression verwendet. Immunoblotanalysen des Lysatüberstandes (Daten nicht gezeigt) unter Verwendung eines Anti-Hexa-His-tag Antikörpers belegten, dass das rekombinante Hexa-His-tag-Fusionsprotein Protein in diesem Expressionssystem nicht bzw. nur in geringer Menge exprimiert wurde. Die Ursachen für die unzureichende Expression wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Zusammenfassung: Unter Verwendung des rekombinanten pQE9-basierenden Expressionsplasmids war die potentielle Mimivirus-LOX nicht exprimierbar. Im Western-Blot waren keine immunoreaktiven Proteinbanden in den bakteriellen Lysaten nachweisbar, wenn ein Anti-His-tag-Antikörper verwendet wurde.

3.2.3.2. Expression des rekombinanten Proteins mit Hilfe des pET28-Vektors

Zur Expression der in den prokaryontischen Expressionsvektor pET28 einklonierten putativen Mimivirus-LOX wurde das pET28-Expressionsplasmid in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DE3 transformiert und das rekombinante Protein wie im Methodenteil beschrieben exprimiert.

Für die Expressionsanalyse wurden die Bakterien eines 50 ml-Expressionsansatzes nach der Expressionsperiode abzentrifugiert, in 10 ml PBS resuspendiert und mittels Ultraschall zerstört. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und das rekombinante Hexa-His-tag-Fusionsprotein aus dem Lysatüberstand mittels Affinitätschromatographie (Ni-Agarose) gereinigt. Ein Aliquot (10 µl) der Elutionsfraktion 1 wurde zur Westernblot-Analyse (Abb. 3.8.) eingesetzt. Dabei ergab sich eine einzelne immunoreaktive Proteinbande, die in der SDS-PAGE im Molekulargewichtsbereich von 60-70 kDa wanderte. Dieser Molekulargewichtsbereich

entspricht dem theoretisch berechneten Molekulargewicht der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX, und die Immunoreaktivität belegt, dass es sich bei diesem Protein um ein His-tag-Fusionsprotein handelt. Eine semi-quantitative densitometrische Auswertung des Immunoblots ergab ein ungefähres Expressionsniveau der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX von ca. 5 mg rekombinanten Protein pro Liter bakterieller Flüssigkeitskultur. Für diese Quantifizierung wurde die Identitätsskala des Immunoblots mit einer bekannten Menge gereinigter humaner ALOX15 geeicht, die als Hexa-His-tag Fusionsprotein im gleichen Expressionssystem hergestellt wurde.

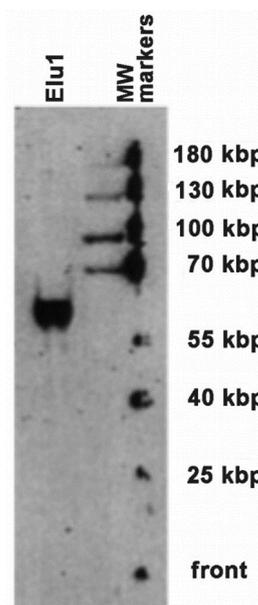


Abb. 3.8: Immunoblotanalyse der Elutionsfraktion Elu 1 der Ni-Agarose Affinitätschromatographie. Die potentielle Mimivirus-LOX wurde in *E. coli* (Stamm DE3) unter Verwendung des rekombinanten pET-28b-Expressionsplasmids exprimiert (siehe Material und Methoden). Der Lysatüberstand wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt, und ein Aliquot der Elutionsfraktion Elu 1 wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers gefärbt. Dabei ergab sich eine immunoreaktive Bande im theoretisch vorhergesagten Molekulargewichtsbereich von 67 kDa.

Zusammenfassung: Unter Verwendung des rekombinanten pET28-basierenden Expressionsplasmids konnte die potentielle Mimivirus-LOX als N-terminales Hexa-His-tag-Fusionsprotein exprimiert werden. Im Western-Blot war bei Verwendung eines Anti-His-tag-Antikörpers eine immunoreaktive Proteinbande im zu erwartenden Molekulargewichtsbereich nachweisbar. Aus der Bandenintensität konnte eine Expressionshöhe des rekombinanten Proteins von ca. 5 mg Protein pro Liter Flüssigkultur abgeschätzt werden.

3.2.3.3. Protein-chemische Charakterisierung der gereinigten rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX

Molekulargewicht: Die oben beschriebenen Expressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass die potentielle Mimivirus-LOX unter Verwendung des pET28-Expressionsvektors in *E. coli* exprimiert werden kann (Abb. 3.8.). Deshalb wurde anschließend ein präparativer Expressionsansatz (500 ml) angesetzt, mit dem größere Mengen des rekombinanten Proteins gewonnen werden sollten. Nach der Expressionsprozedur wurden die Bakterien pelletiert, das Pellet in 30 ml PBS aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall zerstört. Der Lysatüberstand wurde zur Affinitätschromatographie auf eine Ni-Agarosesäule (0,5 ml gepackte Ni-Agarose) gegeben. Das rekombinante His-tag-Fusionsprotein wurde mit einem Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei sechs 1-ml-Fractionen aufgefangen wurden. Aliquots der Fractionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 3.9.).

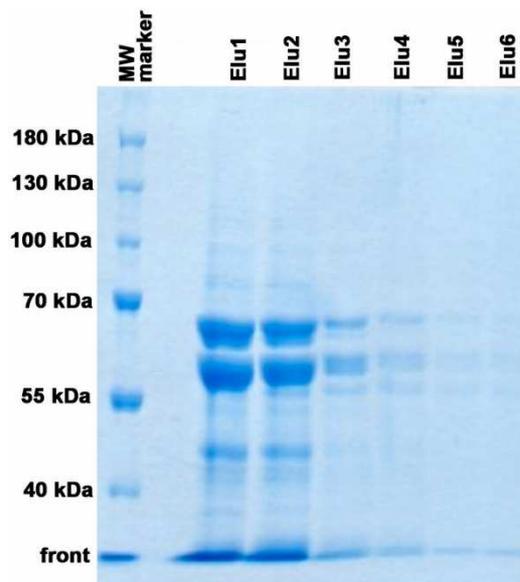


Abb. 3.9: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Ni-Agarose Affinitätschromatographie. Die potentielle Mimivirus-LOX wurde in *E. coli* (Stamm DE3) unter Verwendung des rekombinanten pET28-Expressionsplasmids exprimiert (siehe Material und Methoden). Der Lysatüberstand wurde anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt, und Aliquots der verschiedenen Elutionsfraktionen (Elu 1-6) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei ergaben sich zwei Hauptproteinbanden mit geschätzten Molekulargewichten von 67 kDa (obere Bande) und 60 kDa (untere Bande).

Dabei ergab sich überraschender Weise, dass zwei unterschiedliche Proteine von der Affinitätsmatrix koeluiert wurden. Aus der Färbeintensität der beiden koeluierten Proteinbanden konnte ein molares Verhältnis der beiden Proteine von 1:1 abgeschätzt

werden. Die Auswertung der Migrationsstrecken der beiden Proteine deutet darauf hin, dass beide Proteine ein ungefähres Molekulargewicht von 60-70 kDa aufweisen, in der SDS-PAGE aber sicher voneinander getrennt werden können. Auf Grund der Aminosäuresequenz konnte für die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX ein theoretisches Molekulargewicht von 67.169 Da vorhergesagt werden. Dieser Wert passt eher zum Molekulargewichtsbereich des in der SDS-PAGE weniger weit gewanderten Proteins. Diese Schlussfolgerung ist jedoch nicht zwingend, da neben dem Molekulargewicht auch andere Faktoren die elektrophoretische Mobilität von Proteinen in der SDS-PAGE beeinflussen können.

Um sicher festzustellen, ob es sich bei der oberen oder der unteren SDS-PAGE Bande um die potentielle Mimivirus-LOX handelt, wurde ein zusätzlicher Immunoblot mit einem Anti-His-tag-Antikörper durchgeführt. Dabei konnte selektiv die untere Bande spezifisch angefärbt werden. Aus diesen Daten kann man schlussfolgern, dass die untere koeluierte Bande die potentielle Mimivirus-LOX repräsentiert. Zusammengenommen deuten diese analytischen Daten darauf hin, dass die rekombinante Mimivirus-LOX mit einem endogenen *E. coli*-Protein spezifisch interagiert, so dass dieses endogene *E. coli*-Protein durch den Hexa-His-tag der potentiellen Mimivirus-LOX bei der Affinitätschromatographie an die Ni-Agarose gebunden wird. Der heterodimere nicht-kovalente Proteinkomplex von unbekanntem *E. coli*-Protein und potentieller Mimivirus-LOX scheint sehr stabil zu sein, da er unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen (hohe Imidazolkonzentrationen) nicht in seine Bestandteile zerfällt. Eine solche spezifische Komplexierung eines endogenen bakteriellen Proteins wurde bisher für keine in *E. coli* exprimierte LOX-Isoform beschrieben.

Zusammenfassung: Die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX konnte mittels Affinitätschromatographie an Ni-Agarose aus dem bakteriellen Lysatüberstand angereichert werden. Dabei kam es zu einer Koelution mit einem unbekanntem *E. coli*-Protein. In der SDS-Elektrophorese wandert die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX mit einem Molekulargewichtsbereich von ca. 60 kDa. Dieser Wert liegt etwas unter dem aus der Aminosäuresequenz berechnetem Molekulargewicht.

Immunoreaktivität: Die Hexa-His-tag-Sequenz des Expressionskonstruktes sollte der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX eine Immunoreaktivität mit einem Anti-His-tag Antikörper verleihen. Dies ist jedoch nicht zwangsläufig der Fall, da die His-tags

post-translational in den zellulären Expressionssystemen proteolytisch entfernt werden können und damit in den finalen Expressionskonstrukten nicht mehr nachweisbar sind. Um zu überprüfen, ob die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX den ursprünglich eingeführten Hexa-His-tag noch enthält, wurde ein Immunoblot mit einem Anti-His-tag-Antikörper durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die SDS-PAGE-Analyse mit einem Aliquot der Elutionsfraktion 1 wiederholt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und der Blot mit einem Anti-His-tag-Antikörper entwickelt. Dabei stellte sich heraus, dass die untere Proteinbande des Proteindupletts mit dem Antikörper angefärbt werden konnte, während die obere Bande ungefärbt blieb (Abb. 3.8). Diese Daten deuten darauf hin, dass die obere Proteinbande durch ein endogenes *E. coli*-Protein verursacht wird, das keine His-tag-Markierung trägt.

Zusammenfassung: Das rekombinante N-terminale His-tag-Fusionsprotein der potentiellen Mimivirus-LOX ist im Immunoblot mit einem kommerziellen Anti-His-tag-Antikörper nachweisbar.

Expressionshöhe und Reinheitsgrad: Um den Reinheitsgrad der Proteinpräparation zu quantifizieren (Fraktionen Elu1 und Elu2) wurde das Coomassie-gefärbte Elektropherogramm (Abb. 3.9.) densitometrisch ausgewertet. Dabei ergab sich, dass die untere Proteinbande (potentielle Mimivirus-LOX) ca. 55 % des Proteindupletts, die obere 40 % des Proteindupletts ausmachte. Die restlichen 5 % verteilten sich auf die anderen Proteinbanden, die in Abb. 3.9. durch weniger intensiv gefärbte Banden repräsentiert werden.

Zur Abschätzung des Expressionsniveaus der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX im hier beschriebenen prokaryontischen Expressionssystem wurde ein zweiter 50-ml-Expressionsansatz durchgeführt und das rekombinante Protein wie oben beschrieben präpariert. Aus der densitometrischen Auswertung des Elektropherogramms nach Coomassie-Färbung ergab sich eine Expressionsrate der potentiellen Mimivirus-LOX von ca. 9 mg gereinigten Mimivirus-LOX-Proteins pro 1 l Flüssigkultur. Auch bei diesem Expressionsansatz waren zwei Hauptproteinbanden (potentielle Mimivirus-LOX und unbekanntes *E. coli*-Protein) zu erkennen, wobei in diesem Ansatz die potentielle Mimivirus-LOX mehr als 70 % zum gereinigten Gesamtprotein beitrug. Die durch semi-quantitative Auswertung der SDS-PAGE

abgeschätzte Expressionshöhe von 9 mg rekombinantes Protein pro Liter Flüssigkulturen entspricht in etwa dem Wert (5 mg rekombinantes Protein pro Liter Flüssigkultur) der bei der Quantifizierung des Immunoblots (Abb. 3.8.) erhalten wurde.

Zusammenfassung: Das Expressionsniveau der rekombinanten Mimivirus-LOX lag bei 9 mg gereinigtes rekombinantes Protein pro 1 l bakterieller Flüssigkultur. Durch Affinitätschromatographie wurde ein heterodimerer Proteinkomplex (bestehend aus potentieller Mimivirus-LOX und einem unbekanntem *E. coli*-Protein) zu einem Reinheitsgrad von > 95 % angereichert. Zu diesem Komplex trägt die potentielle Mimivirus-LOX ca. 55-70 % bei.

Chromatographisches Verhalten (Gelfiltration): Um ergänzende Aussagen zum Molekulargewicht der potentiellen Mimivirus-LOX zu erhalten und um zu überprüfen, ob der Proteinkomplex auch unter anderen experimentellen Bedingungen stabil ist, wurden drei gepoolte Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration analysiert. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt, und Elutionsfraktionen von 0,5 ml wurden aufgefangen. Das entsprechende Elutionsprofil ist in Abb. 3.10. dargestellt.

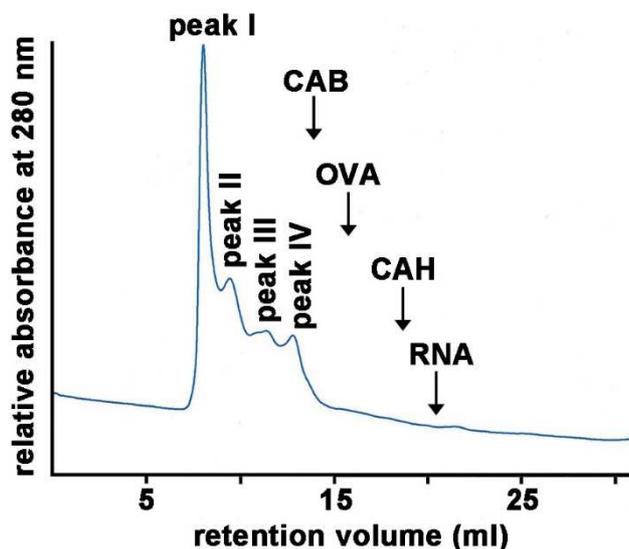


Abb. 3.10. Size-Exclusion-Chromatographie der potentiellen rekombinanten Mimivirus-LOX. Drei gepoolte Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (3 ml) wurden zur Gelfiltration auf eine Superdex 200 10 Säule (GE Healthcare; Uppsala, Sweden) gegeben. Die Chromatographie wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Das Elutionsprofil der aufgetragenen Proteine wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 280 nm im Eluat der Säule verfolgt. 0,5 ml-Fractionen wurden aufgefangen. Die Pfeile über der Kurve kennzeichnen die Elution der Molekulargewichtsstandards. CAB (Conalbumin, 75 kDa), OVA (Ovalbumin, 44 kDa), CAH (Karboanhydrase, 29 kDa), RNA (Ribonuklease A, 13,7 kDa)

Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass ein Hauptproteinpeak (Peak I) mit einem Retentionsvolumen von 7,8 ml detektierbar war. Dieser Hauptpeak weist mehrere Talschultern (Peaks II-IV) auf, die mit höheren Retentionsvolumina eluiert wurden.

| Peak | V _{Ret} (ml) | MW (kDa) |
|------|-----------------------|----------|
| I | 7,96 | 398 |
| II | 9,42 | 265 |
| III | 11,38 | 153 |
| IV | 12,80 | 103 |

Tab. 3.5. Abgeschätzte Molekulargewichte der verschiedenen Proteinpeaks der Gelfiltration. Die verschiedenen Proteinpeaks (I-IV) sind in Abb. 3.10. gekennzeichnet

Um die Molekulargewichte der verschiedenen Peaks zu ermitteln, wurde das chromatographische System mit fünf verschiedenen Molekulargewichtsstandards kalibriert. Diese Standardmischung umfasste folgende Proteine: Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Karboanhydrase (29 kDa), Ribonuklease A (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa). Diese Molekulargewichtsmarker umspannen den Molekulargewichtsbereich der zu erwartenden Proteinmonomere (60-70 kDa). Ein dimerer Proteinkomplex, der aus einem Monomer potentieller Mimivirus-LOX und einem Monomer des unbekanntes *E. coli*-Proteins zusammengesetzt ist, liegt allerdings außerhalb des kalibrierten Molekulargewichtsbereiches. Ähnliches gilt auch für hochmolekulare Proteinpolymere. Damit ist eine exakte Zuordnung von Molekulargewichten zu Proteinpeaks in diesem Molekulargewichtsbereich nicht möglich. Trotzdem lassen sich aus der Extrapolation der Kalibrierungskurven ungefähre Molekulargewichte für die verschiedenen chromatographischen Peaks I-IV abschätzen (Tabelle 3.5.). Diese liegen alle deutlich über den Molekulargewichten der Proteinmonomere für die potentielle Mimivirus-LOX und das unbekanntes *E. coli*-Protein (60-70 kDa). Aus den Ergebnissen der Gelfiltration können zusammenfassend zwei wesentliche Schlussfolgerungen gezogen werden:

i) Im Molekulargewichtsbereich von 60-70 kDa, in dem sowohl die potentielle Mimivirus-LOX (theoretisches Molekulargewicht von ca. 67 kDa) als auch das unbekanntes *E. coli*-Protein, welches mit der potentiellen Mimivirus-LOX einen nicht-kovalenten Komplex bildet, migrieren sollten, konnte kein signifikanter Proteinpeak eluiert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass unter den gegebenen

chromatographischen Bedingungen, der nicht-kovalente Proteinkomplex von potentieller Mimivirus-LOX und unbekanntem *E. coli*-Protein stabil zu sein scheint. Entfernung des Überschusses an Imidazol scheint die Stabilität des Proteinkomplexes nicht zu beeinflussen.

ii) Der Hauptpeak eluierte mit einem geschätzten Molekulargewicht von fast 400 kDa. Ein Proteindimer, welches aus einem Monomer potentieller Mimivirus-LOX und einem Monomer des unbekanntes *E. coli*-Proteins besteht, weist jedoch nur ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 130 kDa auf. Daraus kann geschlossen werden, dass der Hauptpeak der Gelfiltration nicht durch ein einfaches Proteindimer, sondern durch ein größeres Proteinoligomer hervorgerufen wird.

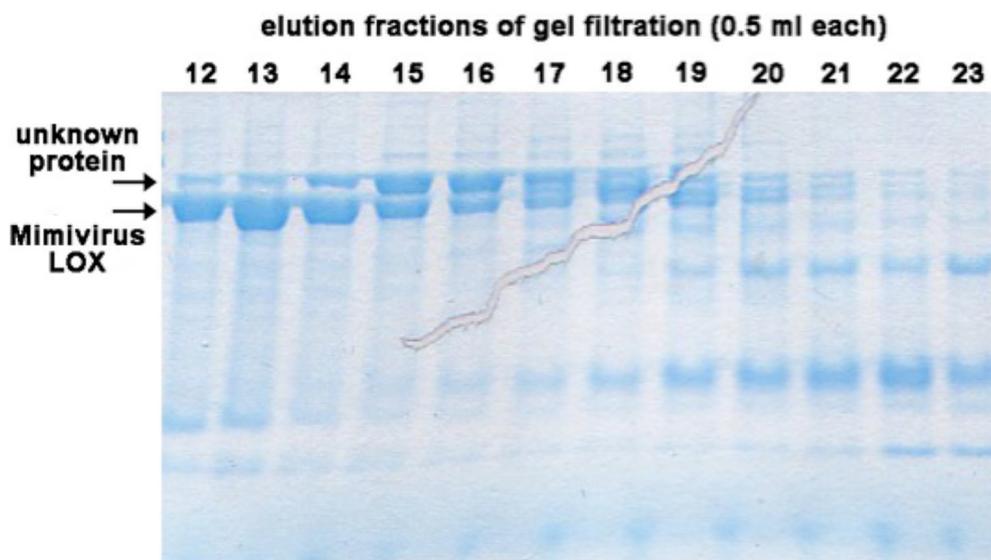


Abb. 3.11: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der FPLC-Gelfiltration. Drei gepoolte Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (3 ml) wurden zur Gelfiltration auf eine Superdex 200 10 Säule (GE Healthcare; Uppsala, Sweden) gegeben. Die Chromatographie wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. 0,5-ml-Fraktionen wurden aufgefangen, und Aliquots (10 µl) dieser Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Um zu überprüfen, ob die beiden Hauptkomponenten des oligomeren Proteinkomplexes, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes voneinander unterscheiden, mittels Gelfiltration zumindest teilweise getrennt werden können, wurde von den eluierten Fraktionen der Gelfiltration eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.11.). Diese Analysen zeigen, dass in den früh eluierten Fraktionen (Fr. 12, 13, 14) vor allem die putative Mimivirus-LOX eluiert wurde. In den später eluierten Fraktionen (Fr. 15, 16, 17) folgte dann das unbekanntes *E. coli*-Protein. In den Fraktionen

19-23 wurden noch andere Proteine mit kleineren Molekulargewichten detektiert, die in bisherigen Analysen nicht aufgefallen waren.

Zusammenfassend kann aus der Gelfiltration geschlussfolgert werden, dass die beiden Hauptproteine des in der Affinitätschromatographie eluierten hochmolekularen Proteinkomplexes mit Hilfe der Gelfiltration partiell von einander getrennt werden konnten. In den früh eluierten Fraktionen (Fr. 12, 13, 14) überwog die potentielle Mimivirus-LOX, während in später eluierten Fraktionen (Fr. 15, 16, 17) das unbekannte *E. coli*-Protein dominierte.

Zusammenfassung: In der Gelfiltration (size exclusion chromatography) wandert der Proteinkomplex aus rekombinanter potentieller Mimivirus-LOX und unbekanntem *E. coli*-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich unter nativen Bedingungen mehrere Mimivirus-LOX-Monomere und mehrere Monomere des unbekanntes *E. coli*-Proteins zu einem hochmolekularen Komplex zusammenlagern.

Oligomerstabilität: In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Proteinoligomere, die in der Affinitätschromatographie beobachtet wurden, stabil sind oder ob sie durch Reduktion stabilisierender Disulfidbrücken in ihre monomeren Komponenten zerfallen. Zu diesem Zweck wurden die Fraktionen des Peaks I mit 1 mM Dithiothreitol (DTT, starkes Reduktionsmittel) inkubiert und anschließend erneut mittels Gelfiltration analysiert. Der Hauptpeak dieser Rechromatographie eluierte mit einem Retentionsvolumen von 7,5 ml, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die DTT-Behandlung das Retentionsvolumen des Proteinoligomers nicht beeinflusst hat (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnten bei den Retentionsvolumina der zu erwartenden Proteinmonomere keine Proteine nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Proteinoligomeren um stabile Oligomere handelt, die unter reduzierenden Bedingungen (DTT) nicht aufgespalten werden konnten.

Zusammenfassung: Der hochmolekulare Proteinkomplex ist stabil und kann auch durch Reduktion von Disulfidbrücken nicht aufgespalten werden. Unter denaturierenden Bedingungen zerfällt er allerdings in seine beiden monomeren Komponenten (potentielle Mimivirus-LOX, unbekanntes 60-70-kDa-Protein).

Metallgehalt: Alle bisher identifizierten funktionellen LOXn enthalten als katalytisch aktive Komponente ein Übergangsmetall, wobei bisher entweder Eisen (Fe) oder Mangan (Mn) in einem molaren Verhältnis von 1:1 zum jeweiligen Protein als prosthetische Gruppe identifiziert worden sind. Um zu überprüfen, ob die FPLC-gereinigte potentielle Mimivirus-LOX Fe oder Mn enthält, wurde der Metallgehalt einer Peakfraktion der FPLC mittels Atomabsorptionsspektrometrie quantifiziert. Dabei konnte in einem 200- μ l-Aliquot der Elutionsfraktion 12 der FPLC ein Fe-Gehalt von 65,0 μ g/l ermittelt werden. Bei einem Molekulargewicht von 55,9 g/mol entspricht dieser Wert einer molaren Fe-Konzentration in der Enzympräparation von 1,2 μ M. Die Proteinkonzentration der Mimivirus-LOX-Präparation (Fraktion 12 der FPLC-Reinigung), die mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt worden war, betrug 1,05 mg/ml. Geht man nun davon aus, dass ca. 55-70 % des in dieser Elutionsfraktion enthaltenen Proteins auf die Mimivirus-LOX zurückzuführen sind, ergibt sich eine Mimivirus-LOX-Konzentration von 0,58-0,74 mg/ml. Bei einem theoretischen Molekulargewicht der potentiellen Mimivirus-LOX von 67.169 g/mol entspricht dieser Wert einer molaren Proteinkonzentration von 8,6-11,0 μ M Mimivirus-LOX. Vergleicht man jetzt die molaren Konzentrationen von Fe (1,2 μ M) und potentieller Mimivirus-LOX (8,6-11,0 μ M), errechnet sich ein molares Verhältnis (LOX:Fe) von ca. 10:1).

| Parameter | Konzentration | | Fe/LOX (mol/mol) |
|-----------|---------------|----------|---------------------|
| | mg/l | μ M | |
| Eisen | 0,065 | 1,16 | 0,1:1 |
| LOX | 580-740 | 8,6-11,0 | |

Tab. 3.6. Eisengehalt der potentiellen Mimivirus-LOX. Eine Fe-Konzentration von 65 μ g/l wurde in einem 200- μ l-Aliquot der Elutionsfraktion 12 der FPLC-Gelchromatographie mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Die Proteinkonzentration in dieser Elutionsfraktion betrug 1,05 mg/ml. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ca. 55-70 % des enthaltenen Proteins auf die potentielle Mimivirus-LOX zurückzuführen sind, ergab sich eine Mimivirus-LOX Konzentration von 0,58-0,74 mg/ml (580-740 mg/l). Anschließend wurden diese Werte in molare Konzentrationen umgerechnet und das molare Verhältnis gebildet.

Mangan konnte in der Enzympräparation nur in Spuren nachgewiesen werden, wobei die detektierte Mn-Konzentration unter der entsprechender Kontrollmessungen (Elutionspuffer) lag. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur jedes zehnte potentielle Mimivirus-LOX-Molekül ein Eisenion enthält (Tabelle 3.6.). Bei Mn waren diese Werte noch geringer. Damit dürfte weder Fe noch Mn essentieller Bestandteil der potentiellen Mimivirus-LOX sein. Da bisher alle charakterisierten LOXn eines dieser

beiden Übergangsmetalle enthalten, könnte man aus diesen Daten schlussfolgern, dass es sich bei der potentiellen Mimivirus-LOX nicht um eine katalytisch aktive LOX handeln sollte.

Zusammenfassung: Im Unterschied zu allen bisher charakterisierten pro- und eukaryontischen LOXn, trägt die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX weder Eisen noch Mangan als katalytisch aktives Übergangsmetall. Diese Daten deuten darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX keine katalytisch aktive LOX zu sein scheint.

3.2.3.4. Enzymatische Charakterisierung des gereinigten rekombinanten Proteins (HPLC basierter Aktivitätsassay)

Katalytische Aktivität mit Arachidonsäure: Um zu untersuchen, ob die potentielle Mimivirus-LOX als Fettsäureoxygenase fungiert, wurden LOX-Aktivitätsassays durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der Proteinpräparationen mit zwei unterschiedlichen LOX-Substraten (Arachidonsäure, Linolsäure) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mittels Umkehrphasen-HPLC die Menge und die Zusammensetzung der Produktmischungen quantifiziert. Als Positivkontrolle wurde eine entsprechende Inkubation mit der Sojabohnen-LOX1 unter identischen experimentellen Bedingungen mitgeführt.

In Abb. 3.12. sind Beispielchromatogramme für das Experiment der Arachidonsäureoxygenierung zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass während der Inkubation der Sojabohnen-LOX1 mit Arachidonsäure große Mengen an 15-H(p)ETE gebildet wurden (Chromatogramm C). Das Chromatogramm zeigt aber auch, dass neben dem 15-H(p)ETE ein zweites konjugiertes Dien gebildet wird, dessen Retentionszeit geringfügig länger ist, als die von 15-HETE. In der RP-HPLC ko-chromatographiert dieses Reaktionsprodukt mit 11-HETE, und UV-spektroskopische Daten unterstützen diese analytische Schlussfolgerung. Die Beobachtung, dass Arachidonsäure durch die Sojabohnen-LOX1 auch zu 11-HETE umgewandelt werden kann, war zunächst überraschend. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in der pH-Abhängigkeit der Sojabohnen-LOX1 liegen und wird unter 4.3.4. ausführlicher diskutiert. In der entsprechenden Nichtenzymkontrolle (Inkubation in Abwesenheit von Enzym) waren hingegen nur geringe Mengen oxygenierter Fettsäuren nachweisbar (Chromatogramm B). Nach der Inkubation der potentiellen Mimivirus-LOX mit Arachidonsäure waren ebenfalls nur geringe Mengen an oxygenierten Fettsäuren

nachweisbar (Chromatogramm A). Diese Daten deuten darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX mit Arachidonsäure als Substrat keine Oxygenaseaktivität aufweist.

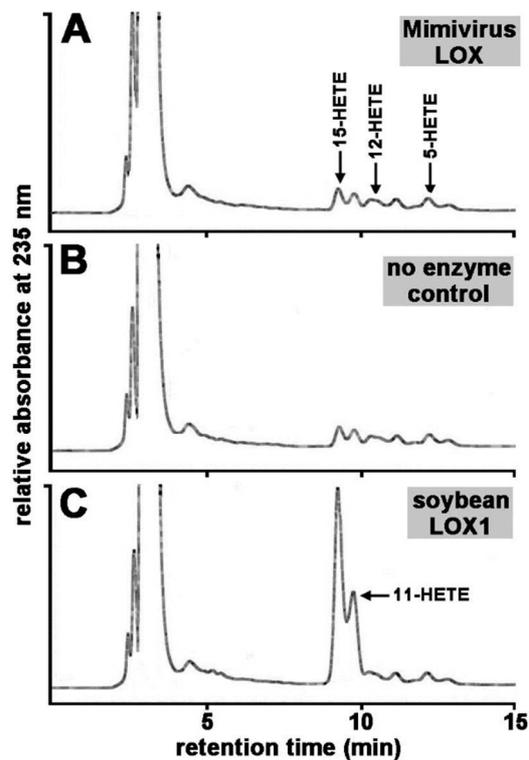


Abb. 3.12. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz mit der Sojabohnen-LOX1 wurden 0,01 µg/ml gereinigte Sojabohnen-LOX1 eingesetzt. Für die Testung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.9.) verwendet.

Katalytische Aktivität mit Linolsäure: Mehrere pflanzliche LOXn unterscheiden sich von den Säugetierenzymen u.a. dadurch, dass sie Arachidonsäure kaum als Oxygenierungssubstrat akzeptieren (Lehnert und Solomon 2003). Stattdessen oxygenieren diese LOXn Linolsäure mit hoher katalytischer Aktivität. Sollte dies auch für die potentielle Mimivirus-LOX zutreffen, wäre die fehlende Produktbildung mit Arachidonsäure als Substrat mit der Substratspezifität des Enzyms zu erklären. Deshalb testeten wir die Linolsäureoxygenaseaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX. Dazu wurde ein ähnlicher experimenteller Ansatz gewählt, wie für die Testung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität. In Abb. 3.13. sind Beispielchromatogramme für das Linolsäureoxygenierungsexperiment zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass während der Inkubation der Sojabohnen-LOX1 mit Linolsäure große Mengen an 13-H(p)ODE gebildet wurden (Chromatogramm C). In der entsprechenden

Nichtenzymkontrolle (Inkubation in Abwesenheit von Enzym, Chromatogramm B) waren hingegen nur geringe Mengen oxygenierter Fettsäuren nachweisbar. Nach der Inkubation der potentiellen Mimivirus-LOX mit Linolsäure waren ebenfalls nur geringe Mengen an oxygenierten Fettsäuren nachweisbar (Chromatogramm A). Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Nichtenzymkontrolle. Diese Daten deuten darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX auch mit Linolsäure keine Oxygenaseaktivität aufweist.

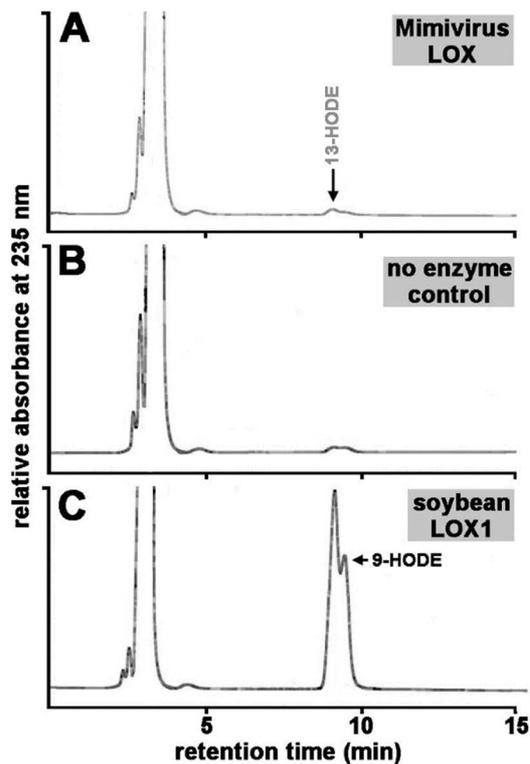


Abb. 3.13.: Linolsäureoxygenierungsprodukte. Die Messung der Linolsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz der Sojabohnen-LOX1 wurde gereinigtes Enzym (0,01 µg/ml-Ansatz) eingesetzt. Für die Testung der Aktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.9.) verwendet. Die Bildung von 9-HODE durch die Sojabohnen-LOX1 ist auf die pH-Abhängigkeit des Enzyms zurückzuführen und wird unter 4.3.4. näher diskutiert.

Katalytische Aktivität mit Arachidonsäure und Linolsäure unter hyperoxischen Bedingungen: Die humane ALOXE3 weist unter normoxischen Bedingungen (Luftsättigung des Reaktionspuffers, O₂-Konzentration von ca. 170 µM) keine messbare Arachidonsäureoxygenaseaktivität auf. Wenn der Reaktionspuffer jedoch mit Sauerstoff gesättigt wurde, war eine deutliche katalytische Aktivität nachweisbar (Zhen und Brash 2010).

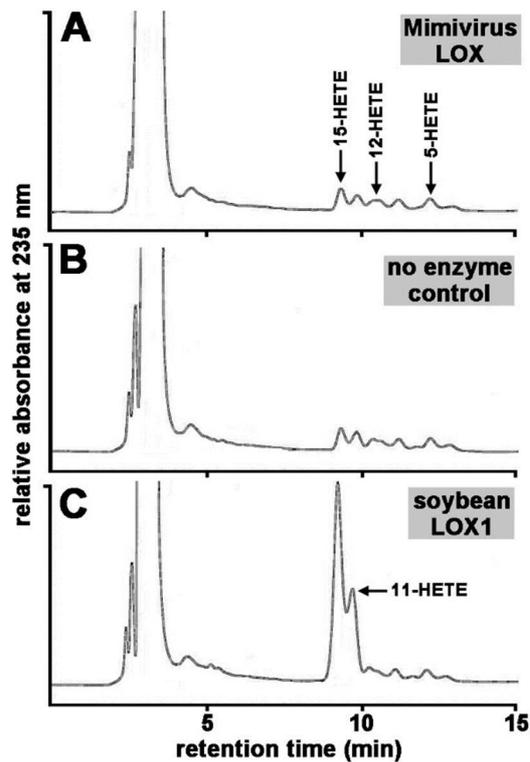


Abb. 3.14. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierung unter hyperoxischen Bedingungen. Die Messung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Vor dem Start der Reaktion wurde der Reaktionspuffer (PBS) für 30 Minuten mit reinem Sauerstoff equilibriert. Für den Ansatz der Sojabohnen-LOX1 wurden 0,01 µg Protein/ml Aktivitätsassayansatz verwendet. Für die Testung der Aktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurde ein 60 µg Protein/ml-Ansatz einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.9.) eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob die potentielle Mimivirus-LOX unter hyperoxischen Bedingungen in der Lage ist, Arachidonsäure zu oxygenieren wurden entsprechende Experimente durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionspuffer für ca. 30 Minuten mit reinem Sauerstoff gespült und anschließend eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde dabei wieder die gereinigte LOX-1 aus Sojabohnen verwendet. In Abb. 3.14. sind Beispielchromatogramme für dieses Experiment zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass während der Inkubation der Sojabohnen-LOX1 mit Arachidonsäure unter hyperoxischen Bedingungen große Mengen an 15-HETE gebildet wurden (Chromatogramm C). In der entsprechenden Nichtenzymkontrolle (Inkubation in Abwesenheit von Enzym, Chromatogramm B) waren hingegen nur geringe Mengen oxygenierter Fettsäuren nachweisbar. Nach der Inkubation der potentiellen Mimivirus-LOX mit Arachidonsäure unter hyperoxischen Bedingungen waren ebenfalls nur geringe Mengen von oxygenierten Fettsäuren nachweisbar (Chromatogramm A). Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrollinkubation (Nichtenzymkontrolle). Ähnliche

Ergebnisse wurden erhalten, wenn als Oxygenierungssubstrat nicht Arachidonsäure sondern Linolsäure verwendet wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX mit Arachidonsäure und mit Linolsäure auch unter hyperoxischen Bedingungen keine katalytische Aktivität aufweist.

Zusammenfassung: Die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX weist weder mit Arachidonsäure noch mit Linolsäure als Substrat eine signifikante Fettsäureoxygenaseaktivität auf. Entsprechende Ergebnisse wurden sowohl unter normoxischen als auch unter hyperoxischen Bedingungen erhalten.

3.3. Rekombinante Expression der putativen Lipoxygenasesequenz in eukaryontischen Zellen

3.3.1. Konstruktion und Klonierung des eukaryontischen Expressionsplasmids

Unsere bisherigen Aktivitätsmessungen deuten darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX keine Fettsäureoxygenaseaktivität aufweist. Diese Daten beweisen jedoch nicht, dass die virale Gensequenz nicht für eine katalytisch aktive LOX kodiert. So wäre es z.B. denkbar, dass für die reguläre Faltung der Polypeptidkette im Rahmen der Proteinbiosynthese Faltungskatalysatoren benötigt werden, die in prokaryontischen Expressionssystemen nicht vorhanden sind. Weiterhin wäre es denkbar, dass der Eiseneinbauapparat von *E. coli* mit der rekombinanten Synthese der Mimivirus-LOX überfordert ist, was sowohl den geringen Eisengehalt der Enzympräparation als auch dessen katalytische Inaktivität erklären könnte. Diese Argumentationen würden allerdings nicht erklären, warum entsprechende Expressionsexperimente mit der humanen ALOX15 und anderen rekombinanten humanen LOX-Isoformen unter identischen Bedingungen zu aktiven Enzympräparaten geführt haben.

Um einen möglichen Einfluss des Expressionssystems zu untersuchen, sollte als nächstes überprüft werden, ob die rekombinante Expression der potentiellen Mimivirus-LOX in einem eukaryontischen Expressionssystem zu einer katalytisch aktiven LOX führt. Für die Konstruktion und Klonierung des eukaryontischen Expressionsplasmids wurde der pcDNA3.1(-)-Expressionsvektor verwendet (Abb. 3.15.). Dieser eukaryontische Expressionsvektor ist so konstruiert, dass er in Bakterien vermehrt werden kann. Er induziert aber auch die transiente Expression rekombinanter Proteine, wenn er als rekombinantes Plasmid in eukaryontische Zellen transfiziert wird und dort als Episom im Zytoplasma vorliegt. Er enthält ein Ampicillin- und ein

Neomycinresistenzgen, was den transfizierten Zellen die Eigenschaft verleiht, auf Ampicillin- und Neomycin-Nährmedien zu überleben. Dies gilt sowohl für mit dem Expressionsplasmid transformierte Bakterien als auch für eukarontische Zellen, die mit dem rekombinanten Plasmid transfizierte worden sind.

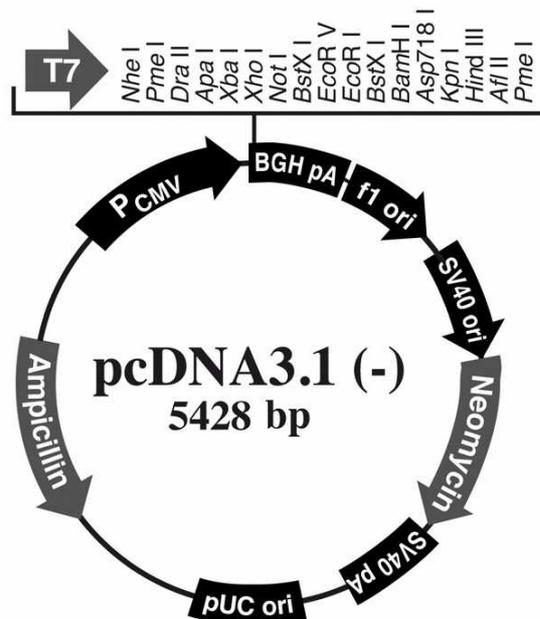


Abb. 3.15. Schematische Darstellung des pcDNA3.1(-)-Expressionsplasmids. Erläuterungen siehe Text.

Für die Umklonierung wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen Xba I und Not I das komplette Mimivirus-LOX-Konstrukt einschließlich des Startkodons, der Hexa-His-tag-Sequenz, der kodierenden cDNA-Region und des endogenen Stopkodons aus dem konstruierten pET28-Expressionsvektor herausgeschnitten und mittels Agaroseelektrophorese gereinigt. Der Expressionsvektor wurde ebenfalls mit beiden Restriktionsenzymen behandelt, und der linearisierte Vektor wurde mittels Agaroseelektrophorese gereinigt. Die beiden gereinigten Restriktionsfragmente wurden anschließend ligiert, und kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf einer Nähragarplatte (Ampicillin als Selektionsmarker) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wuchsen zahlreiche Bakterienklone, die auf Grund ihrer Ampicillinresistenz das rekombinante Plasmid aufgenommen haben sollten. Von diesen wurden acht isoliert wachsende Bakterienklone isoliert und Plasmid-DNA präpariert (Minipreps).

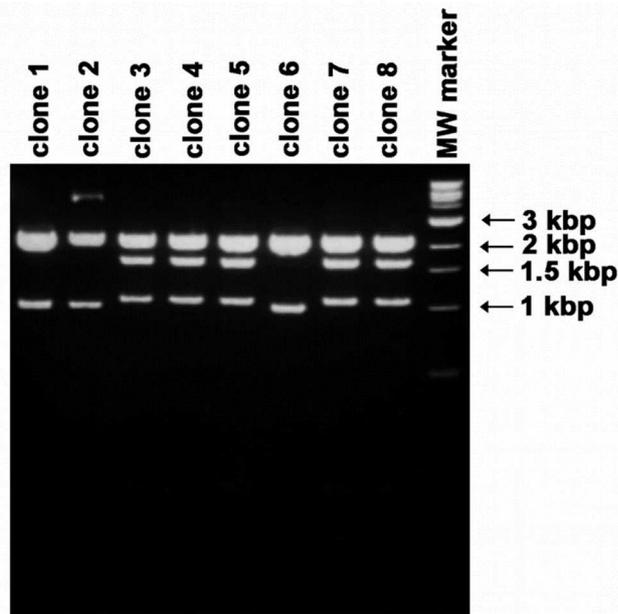


Abb. 3.16. Agarosegelelektrophorese nach analytischer Spaltung der rekombinanten eukaryontischen Expressionsplasmide. 200-300 ng DNA/ μ l der Minipreps wurden mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III für 1,5 h inkubiert, und der Spaltansatz wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2%-iges Agarosegel) analysiert. Das Spaltfragment mit einem Molekulargewicht von 1,7 kbp deutet auf das Vorhandensein des Mimivirus-LOX-Inserts hin.

Anschließend erfolgte eine Kontrollspaltung mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III, um das 1,7 kbp große Insert wieder herauszuspalten. In der Elektrophorese sollte damit durch die Spaltung ein 1,7 kbp großes Restriktionsfragment entstehen, welches das Mimivirus-LOX-Insert repräsentiert. Da der Vektor zusätzlich zu der für die Einklonierung des Inserts verwendeten Sal I-Stelle noch weitere Sal I-Erkennungssequenzen in der Vektorsequenz enthält, sollten bei der Spaltung des rekombinanten Plasmids theoretisch zwei Fragmente mit einer Größe von ca. 2,1 kbp, ein Fragment mit einer Größe von ca. 1,2 kbp und das 1,7 kbp große Insertfragment nachweisbar sein. Insgesamt entspricht die Summe der Restriktionsfragmente 7,1 kbp. Ein solcher Wert kann auf Grund der Größe des Vektors (5,4 kbp und des Inserts (1,7 kbp) vorhergesagt werden. Ein passendes Spaltmuster wurde für die Klone 3, 4, 5, 7 und 8 erhalten (Abb. 3.16.).

Nach der analytischen Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Konzentrationen in den Minipreps der positiven Klone bestimmt. Die entsprechenden analytischen Werte sind in Tabelle 3.7. zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass die DNA Konzentrationen in den verschiedenen Präparationen zwischen 530 und 660 ng/ μ l variierten.

| Proben-Nummer | DNA-Konzentration (ng/μl) |
|---------------|---------------------------|
| Klon 3 | 533 |
| Klon 4 | 630 |
| Klon 5 | 573 |
| Klon 7 | 638 |
| Klon 8 | 659 |

Tab. 3.7. Fotometrische Bestimmung des DNA-Gehalts in fünf Plasmid-DNA-Präparationen (Minipreps). Die Analyse des DNA-Gehaltes der verschiedenen Minipreps erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Zur weiteren Analytik und zur eukaryontischen Expression der potentiellen Mimivirus-LOX wurde der Klon 8 verwendet. Um direkte Sequenzinformationen zum Expressionsplasmid zu erhalten, wurde die N-terminale Sequenz des rekombinanten Expressionsplasmids unter Verwendung des kommerziellen T7-Sequenzierungsprimers sequenziert (Abb. 3.17.). Die experimentell ermittelte DNA-Sequenz wurde am Computer in die entsprechende Aminosäuresequenz umgeschrieben und anschließend mit der aus der Datenbank extrahierten Aminosäuresequenz der potentiellen Mimivirus-LOX verglichen. Dabei konnte eine 100%-Identität der experimentellen Daten mit der theoretischen Aminosäuresequenz festgestellt werden, die aus der Nukleotidsequenz des entsprechenden Expressionsplasmids ermittelt wurde. Aus diesen Daten ließ sich demzufolge ableiten, dass sich während des Klonierungsprozesses keine Mutation eingeschlichen hatte, so dass eine eventuelle katalytische Inaktivität des rekombinanten Enzyms nicht auf Klonierungsartefakte zurückzuführen sein kann. Einschränkend muss dabei jedoch erwähnt werden, dass nur die N-terminalen 260 Aminosäuren durch experimentelle Daten gesichert wurden. Für die C-terminalen Anteile der Aminosäurezusammensetzung wurde aus Kostengründen auf eine direkte Sequenzierung des rekombinanten Expressionsplasmids verzichtet. Dieser Verzicht birgt allerdings die Gefahr, dass unentdeckte Mutationen in diesem Bereich des Expressionsplasmids dazu führen könnten, dass die Expression des rekombinanten Proteins kompromittiert wird. Alternativ könnte das rekombinante Protein auch mutationsbedingt seine katalytische Aktivität verlieren, was die Expression einer inaktiven LOX zur Folge hätte.

Zusammenfassung: Die cDNA des N-terminalen His-tag-Fusionsproteins der potentiellen Mimivirus-LOX wurde erfolgreich aus dem bakteriellen Expressionsvektor pET28 in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 umklontiert.

```

GGAGCCGCTACGTATACGACTCACTATAGGGGAGACCCAGCTGGCTAGCGTTTAAAACGGCCCTCTAGA
+++++
CCTCGGCAGATGCATATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTTGACCGATCGCAAATTTGCCCGGAGATCT

AATAATTTTGTTRACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAACAGCAG
+++++
TTATAAAAACAAATTGAAATTTCTCTCTATATGGTACCCGTCGTCGGTAGTAGTAGTAGTAGTGTCTGTC
      M G S S H H H H H S S

CGGCCTGGTGGCGCGGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCGART
+++++
GCCGGACCCAGCGCGCGCTGGTATACCGATCGTACTGACCCCTGTCGTTTACCAGCCCTAGGCTTA
      G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R D P N

TCGAGCTCCGTCGCACATGTTAAAAAATAGGTAATGATTTATCTTTTTTTACGGGGTATTTAACATTTA
+++++
AGCTCGAGGCAGCTGTACAATTTTTTTATCCATTACTAATAGAAAAAATGCCCATAAATGTAAAT
      S S S V D M L K K I G N D L S F F T G Y L T F

GARCATATGATAGTATTTGGAGAAAAGCTACACTTCCAATGTACTCTAACTAAAAGAAAATTTAAGGAA
+++++
CTTGATATCTATCAAAACCTCTTTTCGATGTGAAGGTACATGAGATTTGATTTCTTTAAATTCCTT
      R T Y D S I W R K A T L P M Y S K L K E N L R K

ACCCACAAAACTTGTTCACCTCAAAATGATTTAGATTATCGTTTGAGACACACATTAATAAGACAAAAT
+++++
TGGGTGTTTTTGAACAAATGGAGTTTACTAATCTAATAGCAAACCTCTGTGTGTAATTATTCGTTTTA
      P T K T C L P O N D L D Y R L R H T L I R Q N

GCCAGACACTATCAATCAATCAAAATCTTTTATAATATAACCAACATTCGAACTAAATACATTTCTAA
+++++
CGGTCTGGGATAGTTAGTTAGTTTATGAAATATTTATATGGTGTAACTGATTTTATGTAAGAT
      A R H Y O S I K N T F I N I P T F E L N T F L

AAAAAGAAATTCATTCCAATATTTATTTAGCATCACCCACATATCTTTTCTATTTTAGATTATCTAAA
+++++
TTTTCTTAAAGTAAAGTTATAAATAAATCGTAGTGGGTGTAATAGAAAAAGATAAAATCTAATAGATT
      K K E F H S N I I L A S P T L S F S I L D Y L N

TGACGGACGAATCATTAACTCCGACAAAGATATACGCAAAATCGTAAAAAATTCAGATTAAATGATTCT
+++++
ACTGCCTGTTAGTAAATGAGGCTGTTCTATATGCGTTTAGCATTTTTTAAAGTCTAATTAACAAAGA
      D G R I I N S D K D I R K I V K K F R L I D S

ATGACAAGATTAAGTATACAAACGATATCAACTCAATCCTGCTATAGATATACTTAAATATTAGATG
+++++
TACTGTTCTAATGACTAATGTTGCGTATAGTTGAGTTAGGACGATATCTATATGAATTTATAATCTAC
      M T R L T D Y N A Y O L N P A I D I L K I L D

ATAATACAAGAAACAAATATTGGGATTAATTTGATGACGCTATTTTCTATTCAATAGATATTGAGAGCTT
+++++
TATTATGTTCTTTGTTTAAACCCATTAACACTACTGCGATAAAAGATAAGTAACTATAACTCTCGAA
      D N T R N K L L G L F D D A I F Y S L D I E S F

CGTGACTAATTTTAGTGACAAAATATTTTTCAGATTGTGAGGCAATCAACAAACATTTAATTTAT
+++++
GCACCTGATTAATCACTGTTTTTTTAAATAAAGTTCTAACACTCCGTTAGTTGTTTGTAAATTAATA
      V T N F S D K K Y Y F Q D C E A I N K O F N Y

GATGTATACGGATTGTATGTTCCGTATGATGATAATGGTAAAAACGCTACAAATGAAACTATTTATAT
+++++
CTACATATGCTTAAACATAAAGGCATACTACTATTCCATTTTTTGCAGATGTTAACTTTGATATATA
      D V Y G L Y V P Y D D N G K K R L Q I E T I I

TAGTTGATCGTCTACTGATAATACAAAACCTTATGTTTTTCAATCTAATTTTTCTCARTGGGAARTCAT
+++++
ATCAACTAGCAGCATGACTATTATGTTTTGARTACAAAAGTTAGATTAAAAGAGTTACCCCTTAGTA
      L V D R R T D N T K T Y V F O S N F S O W E I I

```

Abb. 3.17. DNA-Sequenzierung des N-terminalen (5'-Region) Anteils des rekombinanten Expressionsvektors der potentiellen Mimivirus-LOX. Rot: Startkodon des rekombinanten Proteins. Blau: Hexa-His-tag-Sequenz. Grün: N-terminale Sequenz der nativen (Nichtfusionsprotein) potentiellen Mimivirus-LOX. Obere Zeilen: Experimentell ermittelte Sequenz des Expressionsplasmids. Mittlere Zeilen: Antisensesequenz des rekombinanten Expressionsplasmids. Untere Zeilen: Aus der Nukleotidsequenz abgeleitete N-terminale Aminosäuresequenz des rekombinanten Fusionsproteins.

3.3.2. Eukaryontische Expression des rekombinanten Proteins

Zur eukaryontischen Expression wurde das Expressionsplasmid in HEK293-Zellen transfiziert und das rekombinante Protein wie im Methodenteil beschrieben exprimiert. Nach der Expressionsperiode wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschallbehandlung lysiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Lysatüberstand für weitere Analysen (Immunoblot mit einem anti-His-tag-Antikörper, Aktivitätsassay mit Arachidonsäure als Substrat) verwendet.

3.3.2.1. Testung der Expression des rekombinanten Proteins durch Immunoblotting

Verschiedene Aliquots des Lysatüberstandes von transfizierten HEK-Zellen wurden zur SDS-PAGE aufgetragen. Nach der Proteintrennung wurden die getrennten Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, und der Blot wurde mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers gefärbt. Dabei ließen sich keine immunoreaktiven Banden nachweisen. Diese Daten deuten darauf hin, dass das rekombinante His-tag-Fusionsprotein nicht bzw. nicht in ausreichender Menge in transfizierten HEK-Zellen exprimiert wurde.

3.3.2.2. Testung der rekombinanten Expression mittels Aktivitätsassay

Obwohl sich im Immunoblot keine immunoreaktive Bande nachweisen ließ, wurde mit einem Teil des HEK-Zellysates ein Aktivitätsassay mit Arachidonsäure als Oxygenierungssubstrat durchgeführt. Dazu wurde der Lysatüberstand mit Arachidonsäure (250 μ M finale Arachidonsäurekonzentration im Assay) in PBS für 15 Minuten inkubiert und die dabei entstandenen Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC analysiert. Als Positivkontrolle wurde die rekombinant exprimierte humane ALOX5 verwendet. In Abb. 3.18. sind Beispielchromatogramme für das Experiment der Arachidonsäureoxygenierung zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass während der Inkubation von Arachidonsäure mit dem Lysatüberstand, der nach Transfektion von HEK-Zellen mit der humanen ALOX5 gewonnen wurde, große Mengen an 5-HETE gebildet wurden (unteres Chromatogramm). In der entsprechenden Nichtenzymkontrolle (kein Lysatüberstand in der Inkubation) waren hingegen nur geringe Mengen oxygenierter Fettsäuren nachweisbar (oberes Chromatogramm). Nach der Inkubation des Lysatüberstandes, der nach Transfektion von HEK-Zellen mit der potentiellen Mimivirus-LOX erhalten wurde, waren ebenfalls nur geringe Mengen an oxygenierten

Fettsäuren nachweisbar (mittleres Chromatogramm). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zur Nichtenzymkontrolle nachgewiesen werden.

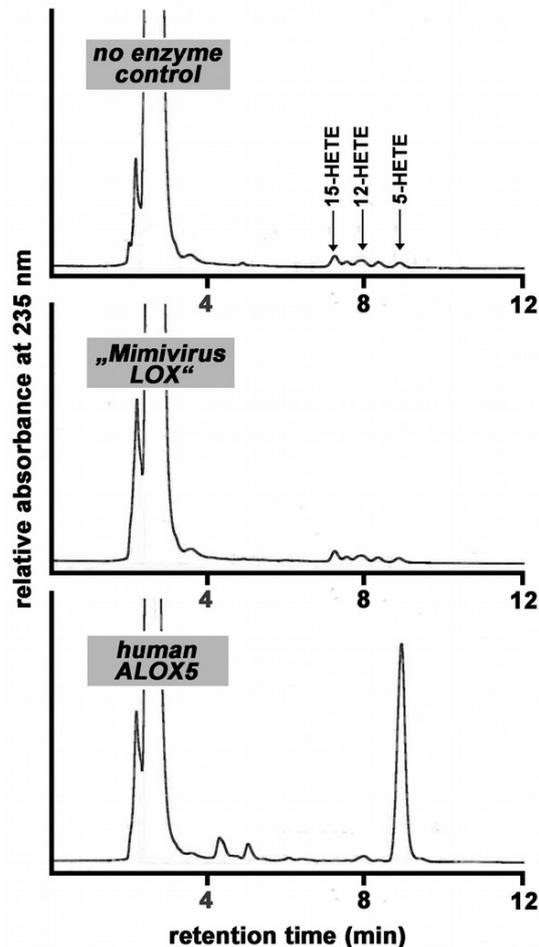


Abb. 3.18. RP-HPLC-Analysen der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der verschiedenen LOX-Isoformen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Für den Ansatz der humanen ALOX5 wurde rekombinant exprimiertes Enzym (20 µg Gesamtprotein eines bakteriellen Lysatüberstandes) eingesetzt. Für die Testung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX wurden 20 µg einer affinitätsgereinigten Enzympräparation (Abb. 3.9.) verwendet.

Gemeinsam mit den Daten des Immunoblots deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die potentielle Mimivirus-LOX in diesem eukaryontischen Expressionssystem nicht exprimiert wurde.

Zusammenfassung: Die potentielle Mimivirus-LOX konnte, im Unterschied zur humanen ALOX5 in HEK-Zellen nicht exprimiert werden. Im Immunoblot konnte kein His-tag-Fusionsprotein nachgewiesen werden, und Aktivitätsassays ergaben keine Hinweise auf eine Arachidonsäureoxygenaseaktivität in transfizierten Zellen.

3.4. Charakterisierung des ko-gereinigten unbekanntes bakteriellen Proteins

3.4.1. Elektrophoretische Trennung der rekombinant exprimierten potentiellen Mimivirus-LOX vom ko-gereinigten bakteriellen Protein

Bei der affinitätschromatographischen Reinigung der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX aus dem Bakterienlysatüberstand (Abb. 3.9.) wurde festgestellt, dass das rekombinante virale Protein mit einem unbekanntes bakteriellen Protein koeluiert wurde. Um zusätzliche Daten zu den beiden kogereinigten Proteinen zu erhalten und insbesondere die chemische Identität des unbekanntes bakteriellen Proteins zu identifizieren, wurden die beiden Proteine mittels SDS-PAGE voneinander getrennt und die gefärbten Proteinbanden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten (Abb. 3.19). Nach einem in-vitro-Trypsinverdau beider Proteine wurden die proteolytischen Spaltprodukte mittels LC/MS analysiert und theoretischen Spaltmustern verschiedener *E. coli*-Proteine zugeordnet.

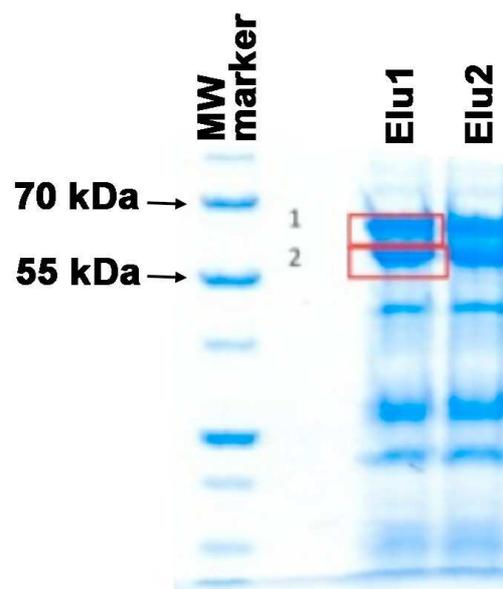


Abb 3.19. SDS-PAGE der Elutionsfraktionen Elu1 und Elu2 der Ni-Agarose Affinitätschromatographie eines bakteriellen Lysatüberstandes. Die rot umrandeten Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und mittels in-vitro-Trypsinierung verdaut. Das entstandene Spaltpeptidmuster wurde anschließend über LC/MS quantifiziert und mit den theoretisch vorhergesagten Spaltpeptidmustern von *E. coli*-Proteinen verglichen.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 3.8. zusammengefasst. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei dem ko-gereinigten *E. coli*-Protein um das früher bereits beschriebene bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA handelt. Dieses *E. coli*-Protein wird durch den höchsten Ähnlichkeitsscore (3675), eine 33%-ige

Sequenzidentität und ein Sequenzcoverage von 65 % ausgezeichnet. Außerdem passt das Molekulargewicht von > 74 kDa zur experimentellen Beobachtung, dass dieses *E. coli*-Protein in der SDS-PAGE weniger weit wanderte als die potentielle Mimivirus-LOX mit ihrem theoretischen Molekulargewicht von ca. 67 kDa.

| Sample | Significance | Accession Number | Protein Name | Score | MW | Sequence Identity (%) | Coverage (%) |
|---------|--------------|------------------|--|-------|-------|-----------------------|--------------|
| Bande 1 | significant | ARNA_ECOLI | C4ZU97 Bifunctional polymyxin resistance protein ARNA | 3675 | 74242 | 33 | 65 |
| Bande 1 | significant | GLMS_ECOLI | P17169 Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase | 2320 | 66853 | 24 | 67 |
| Bande 1 | significant | YL064_MIMIV | QSUPE1 Uncharacterized protein L64 | 659 | 67130 | 18 | 50 |
| Bande 1 | significant | CH60_ECOLI | A7ZV12 60 kDa chaperonin | 303 | 57293 | 12 | 35 |
| Bande 1 | significant | ALBU_BOVIN | P02769 | 272 | 69248 | 1 | 2 |
| Bande 1 | significant | SDHA_ECOLI | P0AC41 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit | 230 | 64381 | 5 | 21 |
| Bande 1 | significant | DANK_ECOLI | A7ZVV7 Chaperone protein DnaK | 203 | 69088 | 5 | 14 |
| Bande 1 | significant | RS1_ECOLI | P0AG69 30S ribosomal protein S1 | 171 | 61121 | 6 | 22 |
| Bande 1 | significant | PPID_ECOLI | P0ADY1 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D | 164 | 68108 | 4 | 9 |
| Bande 1 | significant | FTSH_ECOLI | P0AA13 ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH | 160 | 70663 | 4 | 15 |
| Bande 1 | significant | K2C1_HUMAN | P04264 Keratin, type II cytoskeletal 1 | 141 | 65999 | 5 | 11 |
| Bande 1 | significant | HTPG_ECOLI | A7ZXD1 Chaperone protein HtpG | 107 | 71378 | 3 | 7 |

Tab. 3.8. Identifizierung des unbekanntes *E. coli*-Proteins, dass bei der Affinitätschromatographie an Ni-Agarose mit der potentiellen rekombinanten Mimivirus-LOX kogereinigt wurde. Die Proteinbande 1 wurde aus dem SDS-Gel (Abb. 3.19) herausgeschnitten und einem in-vitro-Trypsinverdau unterworfen. Die proteolytischen Spaltprodukte wurden anschließend mittels LC/MS analysiert und mit theoretischen Spaltmustern verschiedener *E. coli*-Proteine verglichen.

Die Schlussfolgerung, dass das Bande 2-Protein (Abb. 3.19.) die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX repräsentiert, konnte durch den Vergleich des experimentell ermittelten tryptischen Spaltmusters mit dem für dieses Protein vorhergesagte Spaltmuster untermauert werden (siehe Tab. 4.2.) Die meisten anderen Kandidatenproteine weisen deutlich niedrigere Ähnlichkeitswerte (MW, Scores) auf.

Damit kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass das ko-gereinigte *E. coli*-Protein, welches einen Komplex mit der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX bildet, das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA ist. Es bleibt jedoch unklar, warum dieses bakterielle Protein relativ spezifisch an die rekombinant potentielle LOX bindet.

Zusammenfassung: Beim kogereinigten *E. coli*-Protein, welches mit der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX einen hochmolekularen Proteinkomplex bildet, handelt es sich um das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA.

4. Diskussion

4.1. Vorkommen und biologische Rolle von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind wesentliche Funktionsträger im oxidativen Fettsäuremetabolismus, da sie durch Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (FSn) zur Synthese bioaktiver Lipidmediatoren beitragen (Taylor und Morris 1983). Diese Lipidmediatoren können sowohl pro- (z.B. Leukotriene) als auch anti-inflammatorische (z.B. Lipoxine, Resolvine) Eigenschaften aufweisen (Abb. 1.6.). Damit sind LOXn an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt und stellen wichtige Komponenten des adaptiven bzw. nicht-adaptiven Immunsystems dar. In höher entwickelten Pflanzen und Tieren kommen LOXn weit verbreitet vor. In niederen eukaryontischen Organismen (Algen, Pilze, Moose, Protisten, Wirbellose) wurden LOXn ebenfalls beschrieben (Horn et al. 2015); sie kommen aber mit deutlich geringerer Frequenz vor. Auch in Bakterien konnten LOXn vereinzelt nachgewiesen werden (Hansen et al. 2013). Obwohl die Anzahl charakterisierter bakterieller LOX-Isoformen in den letzten Jahren auf Grund der steigenden Verfügbarkeit komplett sequenzierter bakterieller Genome deutlich zugenommen hat (Porta und Rocha-Sosa 2001; Vance et al. 2004; Koeduka et al. 2007), deutet eine systematische Suche nach LOX-ähnlichen Sequenzen in den bisher sequenzierten Bakteriengenomen darauf hin, dass solche Sequenzen nur in weniger als 0,5 % aller Bakterien vorhanden sind. Aus den verfügbaren Sequenzdaten konnte geschlussfolgert werden, dass bakterielle LOXn nicht durch einen kontinuierlichen Entwicklungsprozess gebildet wurden, sondern durch horizontalen Gentransfer aus höher entwickelten Organismen in bakterielle Genome eingeführt wurden (Hansen et al. 2013; Koeduka et al. 2007).

Unklar blieb dabei die biologische Rolle bakterieller LOXn (Hansen et al. 2013; Koeduka et al. 2007). Allerdings wurden in den letzten Jahren aus neueren experimentellen Daten verschiedene Hypothesen zur biologischen Rolle von bakteriellen LOXn abgeleitet, die derzeit experimentell überprüft werden (Banthiya et al. 2016) (Abb. 4.1.):

i) Beteiligung an der Bildung von Biofilmen (Deschamps et al. 2016). Dabei konnte festgestellt werden, dass die LOX von *P. aeruginosa* auf einem höheren Niveau exprimiert wird, wenn sich das Bakterium im Wachstumsmodus für die Ausbildung von Biofilmen befindet. Es bleibt aber unklar, in welcher Art und Weise sich das Enzym an der Biofilmbildung beteiligt.

ii) LOX als Teil des Sauerstoffsensors: Die meisten LOXn von Säugetieren besitzen eine hohe Affinität für Sauerstoff, was durch Km-Werte für Sauerstoff im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich belegt wird (Juránek et al. 1999). Für die LOX von *P. aeruginosa* wurde jedoch ein Km-Wert bestimmt, der mehr als eine Größenordnung höher ist (Kalms et al. 2017). Bei den aktuellen Sauerstoffkonzentrationen in biologischen Systemen (Luftsättigung) bedeutet ein solch hoher Km-Wert, dass das Enzym *in vivo* nicht unter Sättigungsbedingungen aktiv ist. Solche kinetischen Parameter sind typisch für Sensorproteine, da die Reaktionsgeschwindigkeit der Lipoxygenierung von den aktuellen Sauerstoffkonzentrationen abhängt. Damit würde die Bildung von Lipidperoxiden von der aktuellen Sauerstoffkonzentration abhängen. Es bleibt jedoch weitgehend unklar, wie die zellulären Konzentrationen von Lipidhydroperoxiden gemessen werden und über welchen Mechanismus dieses Signal die Anpassung des Stoffwechsels an die aktuellen Sauerstoffkonzentrationen bewirkt.

iii) Bildung anti-inflammatorischer Lipoxine zur Herunterregulation der Immunantwort des Wirtsorganismus (Banthiya et al. 2016). *In vitro* ist die LOX von *P. aeruginosa* in der Lage, verschiedene Substrate (15-HETE, 5,6-DiHETE) zu anti-inflammatorischen Lipoxinen umzuwandeln. Pro-inflammatorische Leukotriene werden hingegen von diesem Enzym nicht gebildet (Banthiya et al. 2016). Sollten sich diese Ergebnisse auf die *in-vivo* Situation übertragen lassen, würde das bedeuten, dass die *P. aeruginosa*-LOX die Immunreaktion der Wirtsorganismus auf das Pathogen durch die Bildung immunsuppressiver Mediatoren herunterregulieren könnte. Diese Reaktion könnte Teil eines evolutionären Evasionsmechanismus sein, der dem Pathogen das Überleben innerhalb des Wirtsorganismus erleichtert.

iv) Erhöhung der Invasivität und Pathogenität bakterieller Krankheitserreger durch Peroxidation von Membranlipiden der Wirtszellen (Banthiya et al. 2016). Um dem humoralen Immunsystem von Wirtsorganismen zu entgehen, haben verschiedene Pathogene die Fähigkeit entwickelt, in Wirtszellen einzudringen und sich dort zu vermehren. Als Teil dieser Evasionsstrategie ist es aber nötig, die Plasmamembran der Wirtszellen zu überwinden (intrazelluläre Pathogene). Eine Möglichkeit diese Aufgabe zu lösen, besteht darin, die Plasmamembran zeitlich begrenzt permeabel zu machen. Dies könnte dadurch geschehen, dass die Membranphospholipide oxidiert werden, wodurch die Struktur der Lipiddoppelschicht der Membran gestört würde. Durch Clusterung der oxidativ modifizierten Membranlipide käme es zur Bildung „hydrophiler

Poren“ in der Membran, durch die Pathogene eindringen können. Die hydrophilen Peroxylipide können anschließend durch zelluläre Reparaturprozesse wieder aus den Membranen entfernt werden, so dass eine osmotische Zytolyse verhindert wird. Bei Zellen, die nur über beschränkte Reparaturkapazitäten verfügen (z.B. Erythrozyten), könnte diese Oxidation der Membranlipide jedoch zum Zelltod führen (Banthiya et al. 2015).

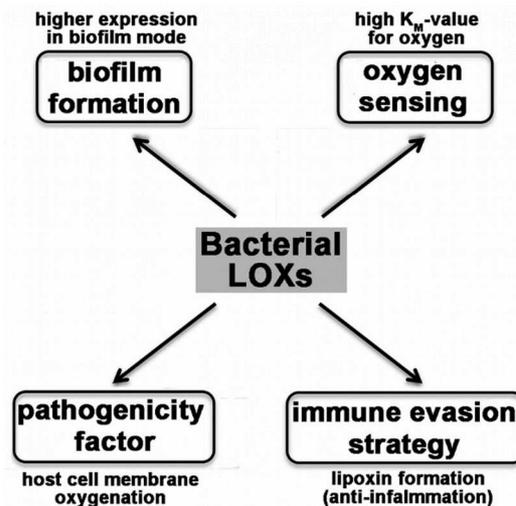


Abb. 4.1. Mögliche biologische Funktionen bakterieller LOXn. Erläuterungen siehe Text.

Obwohl diese Konzepte durch eine Reihe von *in vitro*-Daten unterstützt werden, liegen derzeit noch keine überzeugenden Beweise für die *in vivo*-Gültigkeit einer dieser Hypothesen vor. Damit muss die Frage nach der biologischen Rolle bakterieller LOXn als unbeantwortet angesehen werden.

In den Genomen von Archaeen und von Viren konnten bisher noch keine funktionellen LOX-Isoformen nachgewiesen werden. Diese Daten beweisen jedoch nicht, dass LOXn in diesen biologischen Systemen nicht vorkommen. Es scheint durchaus möglich, dass solche Enzyme vereinzelt vorkommen. Ihre Verbreitungssequenz ist aber verglichen mit der Vorkommensrate bei Säugetieren eher gering.

4.2. Vorkommen von LOXn bei Viren

4.2.1. LOX-ähnliche Sequenzen bei Viren

Wenn man untersuchen möchte, ob auch Viren über LOXn verfügen, so bieten sich Megaviren als aussichtsreiche Untersuchungsobjekte an. Megaviren stellen

Übergangsformen zwischen Viren und einzelligen Lebewesen dar und verfügen über relativ große und sehr variable Genome (Abb. 4.2.).

In der Literatur ist gut belegt, dass die in Amöben vorkommenden Megaviren ihr Genom durch horizontalen Gentransfer erweitern und damit Gene auch auf andere Lebewesen übertragen können. Dabei ist von wesentlicher Bedeutung, dass viele Megaviren einen sympatrischen Lebensstil pflegen und verschiedene Amöbenstämme befallen können (Chien et al. 2004; Cazalet et al. 2004; Glöckner et al. 2008; La Scola et al. 2004; Ogata et al. 2006).

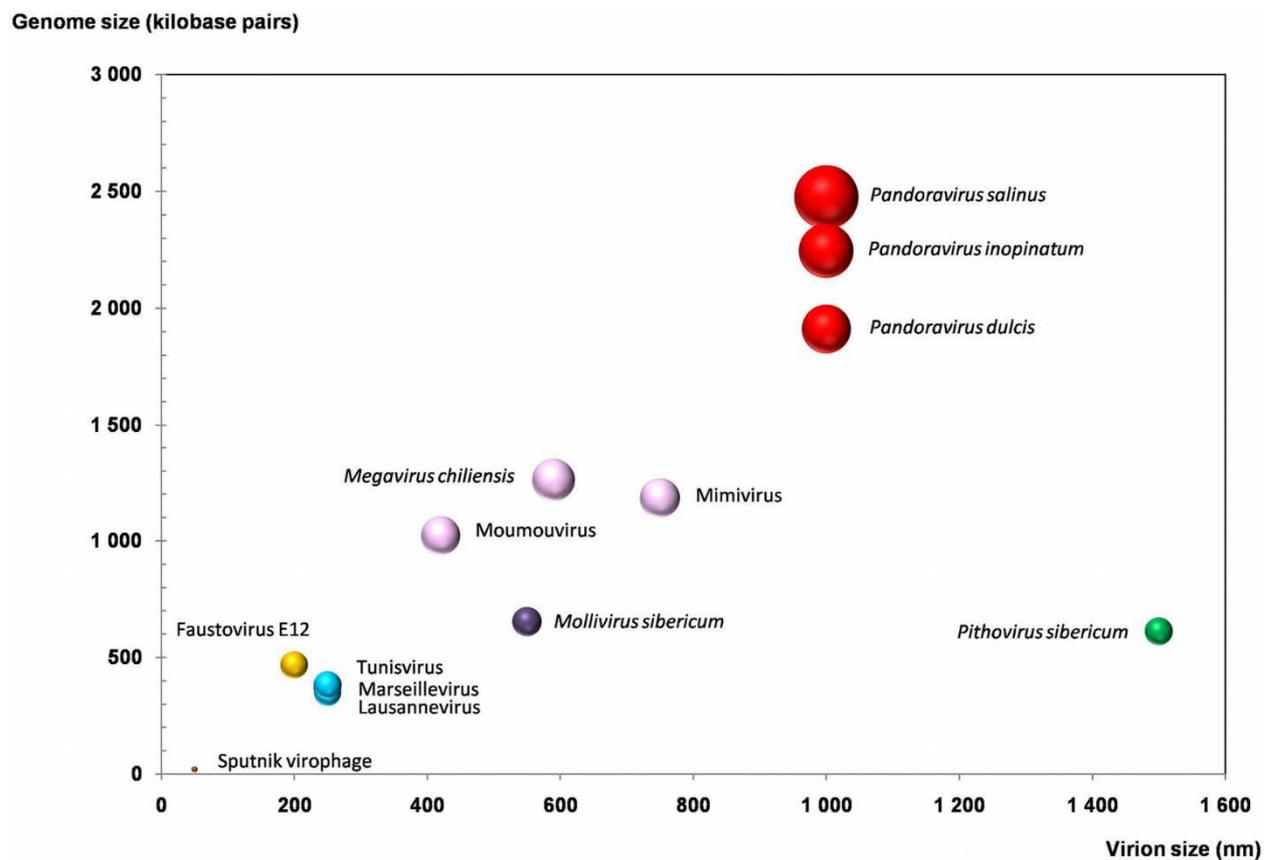


Abb. 4.2.: Virion- und Genomgrößen repräsentativer Megaviren und Virophagen von Amöben.
(Aherfi et al. 2016)

Diese Eigenschaften begünstigen den horizontalen Genaustausch zwischen verschiedenen Spezies durch Megaviren. Besonders das große Genom der Mimiviren stellt ein Reservoir an Genen verschiedener Mikroorganismen dar, das evolutionär durch Genakquisition und Genkonservierung zustande gekommen ist (Moliner et al. 2010). In ihrem Existenzumfeld innerhalb der Amöben treffen Mimiviren auf

verschiedene andere intrazellulär lebende Bakterien, Pilze bzw. andere Viren (sympatrischer Lebensstil), so dass ein Genaustausch leicht möglich wird (Abb. 4.3.).

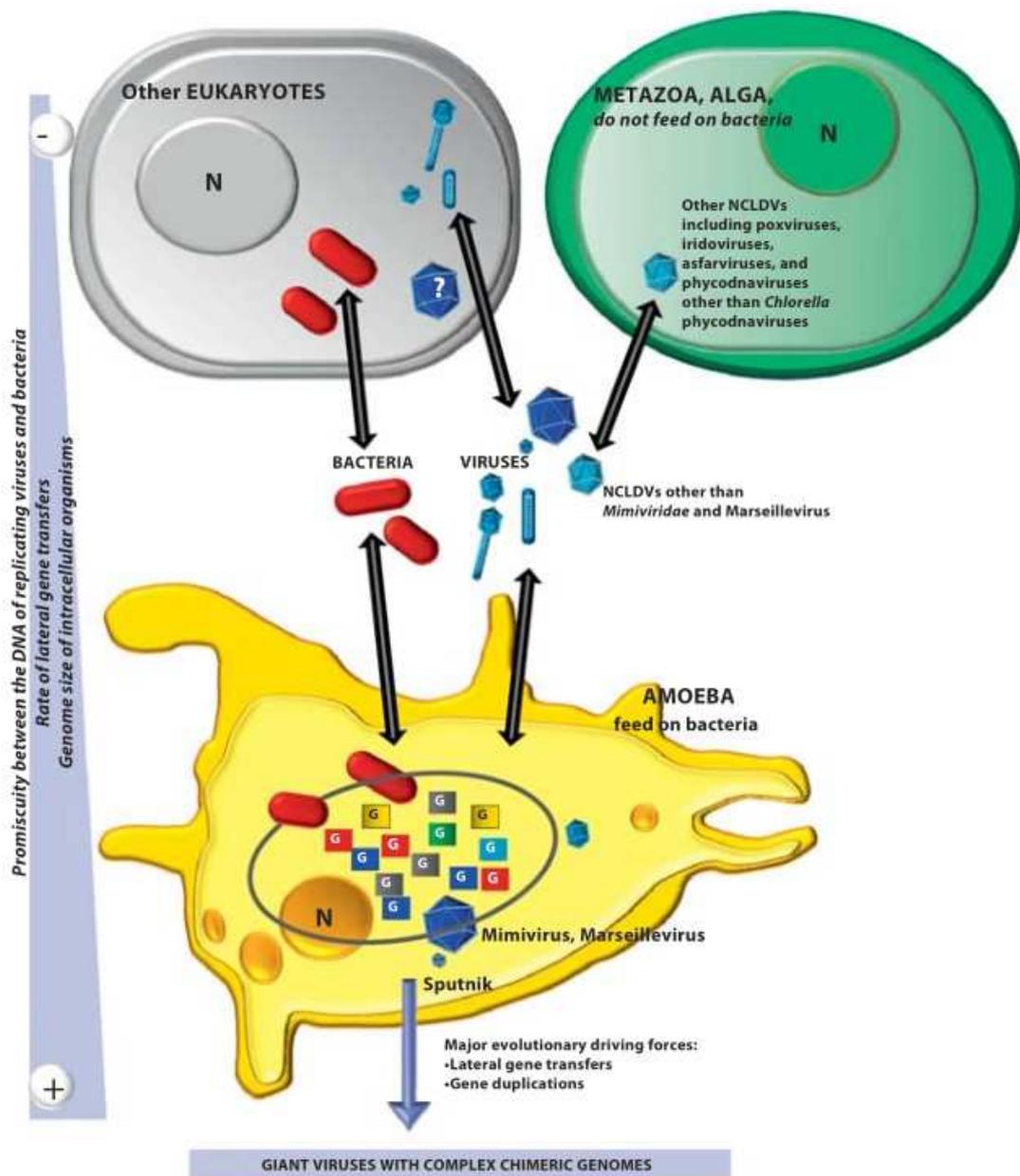


Abb. 4.3.: Intra-amöbialer Lebensstil als Quelle komplexer chimerer Genome. Farbige Vierecke, die ein „G“ enthalten stellen Gene verschiedenen Ursprungs dar (Bakterien, Viren, Eukaryonten) (Modifiziert nach Colson and Raoult 2010)

Die meisten der in Mimiviren importierten Gene sind dabei bakterieller Herkunft (Raoult und Boyer 2010), was sich aus der hohen Sequenzhomologie von mimiviralen und bakteriellen Genen schlussfolgern lässt (Moliner et al. 2010; Moreira und Brochier-Armanet 2008). Nur etwa 10 % der akquirierten mimiviralen Gene stammen nicht von

intrazellularen Bakterien, sondern vom Wirtsorganismus Amöbe (Moliner et al.2010; Filée et al. 2008; Moreira und Brochier-Armanet 2008).

Eine systematische Analyse von viralen Genomen hinsichtlich des Vorhandenseins LOX-ähnlicher Sequenzen ist bisher in der Literatur nicht dokumentiert, und katalytisch aktive virale LOXn wurden bislang nicht beschrieben. In vorbereitenden Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener pro- und eukaryontischer Lipoxygenasen (humane ALOX15 [NP_001131], humane ALOX5 [NP_000689], Zebrafisch-LOX [NP_955912.1], 8R-LOX der Koralle *Plexaura homomalla* [AAC47283.1], LOX des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* [AAL85880.2]) mit dem Genom eines Mimivirus aus *Acanthamoeba Polyphaga* eine Proteinsequenz identifiziert, die eine katalytisch aktive LOX darstellen könnte (Horn et al. 2015). Diese Sequenz repräsentiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67.000 Da. Dieser Wert ist zwar etwas kleiner als die entsprechenden Parameter der meisten Säugetier-LOXn (74.000 Da). Trotzdem spricht das etwas kleinere Molekulargewicht nicht prinzipiell gegen eine mögliche LOX-Natur dieses unbekanntes viralen Proteins. So zeigt die LOX von *P. aeruginosa* z.B. ein Molekulargewicht von 70.000 Da und bewegt sich damit in einer ähnlichen Molekulargewichtsregion wie das Mimivirusprotein. Obwohl der Grad der Aminosäureidentität verschiedener humaner und muriner ALOX-Isoformen nur zwischen 13 und 16 % variiert, konnten in der Primärstruktur zwei potentielle Metallligandenkluster in einem Abstand von ca. 170 Aminosäuren detektiert werden. Diese strukturelle Eigenschaft des bisher nicht näher charakterisierten Mimivirusproteins kann als ein Hinweis auf dessen mögliche LOX-Aktivität gewertet werden.

4.2.2. Humanpathogene Viren besitzen keine LOX Gene

Nach der Verbalsuche viraler Genome mit dem Schlüsselwort „Lipoxygenase“ haben wir die kompletten Genome einiger bedeutsamer humanpathogener Viren aus der Datenbank extrahiert und mit den Sequenzen der humanen LOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOX5, ALOXE3) verglichen (BLAST search). Diese Strategie hat eine höhere Treffsicherheit als die Verbalsuche, da hierbei Nukleotidsequenzen direkt miteinander verglichen werden. Leider konnten auch mit dieser Suchstrategie keine sinnvollen Alignments mit viralen Proteinen erstellt werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass in humanpathogenen Viren keine echten

LOXn vorkommen (Tab. 4.1.). Damit sollten virale LOXn für die Pathomechanismen, der durch diese Viren ausgelösten Erkrankungen, keine Rolle spielen.

Diese Ergebnisse bedeuten aber nicht, dass LOXn der Wirtszellen bei diesen Virusinfektionen nicht bedeutsam sein könnten. Obwohl zu diesem Thema noch keine direkten experimentellen Daten vorliegen, ist es möglich, dass die Expression humaner LOXn durch humanpathogene Viren hoch- bzw. herunterreguliert wird. Diese Vermutung basiert vor allen auf den Befunden, dass es bei allen Virusinfektionen zu einer Aktivierung von Immunzellen kommt. Bei diesen Aktivierungsprozessen werden u.a. pro-inflammatorische Botenstoffe (z.B. Leukotriene) von den Immunzellen freigesetzt, die über den LOX-Weg der Arachidonsäurekaskade gebildet werden. Damit könnte es zur Hochregulation von Wirtszell-LOXn durch humanpathogene Viren kommen.

| Virus | Erkrankung | LOX |
|-------------------------------|--|------|
| SARS virus | Schweres akutes Atemwegssyndrom | nein |
| Human immune deficiency virus | Humane Immundefizienz (AIDS) | nein |
| Human hepatitis B virus | Hepatitis B | nein |
| Human hepatitis C virus | Hepatitis C | nein |
| Herpes simplex virus type 1 | Herpes simplex | nein |
| Small pox virus | Pocken | nein |
| Poliomyelitis virus | Kinderlähmung | nein |
| Dengue virus | Dengue-Fieber (hämorrhagisches Fieber) | nein |
| Measles virus | Masern | nein |
| Ebola virus | Ebola (hämorrhagisches Fieber) | nein |

Tab. 4.1. Abwesenheit von LOX-ähnlichen Sequenzen in den Genomen ausgewählter humanpathogener Viren. Erläuterungen siehe Text.

Die Expression der humanen ALOX15 wird durch Interleukin-4 (IL4) in Monozyten/Makrophagen drastisch hochreguliert (Conrad et al. 1992). Verschiedene qRT-PCR-Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei die Expression von CD4 und CXCR4 herunterreguliert wird (Chaitidis und Kuhn 2005). Beide Zelloberflächenproteine fungieren als Korezeptoren für das humane Immundefizienzvirus (HIV), den AIDS-Erreger. Eine ähnliche Herunterregulation der beiden HIV-Korezeptoren wurde beobachtet, wenn humane U937-Zellen mit der cDNA der humanen ALOX15 transfiziert wurden und das funktionelle Enzym in relativ hohen Konzentrationen exprimierten. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Expression der ALOX15 humane Monozyten

gegen eine Infektion durch HIV schützen sollte (Chaitidis und Kuhn 2005). Leider wurde die Gültigkeit dieser Vorhersage bisher nicht in einem funktionellen AIDS-Infektionsmodell überprüft. Diese Modelle erfordern methodische Erfahrungen und spezielle sicherheitstechnische Voraussetzungen, die in unserem Laborbereich nicht vorhanden sind. Denzufolge konnten entsprechenden Experimente in unserem Labor nicht durchgeführt werden.

4.3. Das putative Mimivirus-LOX-Gen kodiert nicht für eine aktive LOX

4.3.1. Die in *E. coli* exprimierte potentielle Mimivirus-LOX bildet einen hochmolekularen Komplex mit einem unbekanntem *E. coli*-Protein

Die vorliegende Dissertation widmete sich nun der Fragestellung, ob die potentielle Mimivirus-LOX-Gensequenz tatsächlich für eine funktionelle virale LOX kodiert. Um diese Frage zu beantworten, wurde das entsprechende Protein als rekombinantes N-terminales His-tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und hinsichtlich seiner protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei wurde zuerst das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins mit Hilfe der SDS-PAGE bestimmt, wobei sich ein Wert von etwas weniger als 61 kDa ergab. Entsprechend der Nukleotidsequenz des rekombinanten Expressionsplasmids wurde ein theoretisches Molekulargewicht von 67.169 Da bestimmt. Um weitere Eigenschaften des rekombinanten Proteins bestimmen zu können, wurde zunächst die Expressionsstrategie optimiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz in zwei verschiedene prokaryontische Expressionsplasmide (pET28, pQE9) einkloniert und dann vergleichende Expressionsuntersuchungen durchgeführt. Für die Transformation von M15-Zellen wurde das pQE-9-Expressionsplasmid verwendet, während DE- bzw. DE3-*E. coli*-Zellen mit dem pET28-Plasmid transformiert wurden. Leider konnte mittels Immunoblot kein rekombinantes Protein nach der Transformation von M15-Zellen mit dem pQE9-Expressionsplasmid nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Mimivirusprotein in diesem prokaryontischen in-vitro-Expressionssystem nicht exprimiert werden konnte. Diese Schlussfolgerung wurde auch dadurch bestätigt, dass keine LOX-Aktivität im Lysatüberstand dieser Zellen nachgewiesen werden konnte. Hingegen wurde im Lysatüberstand von mit pET28 transformierten DE3-Bakterien eine immunoreaktive Bande im Molekulargewichtsbereich von 60 kDa gefunden (Abb. 3.8.). Diese Daten bewiesen, dass die potentielle Mimivirus-LOX prinzipiell als rekombinantes N-terminales His-tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimierbar ist.

Zur näheren Charakterisierung des rekombinanten Proteins wurde ein präparativer Expressionsansatz (500 ml) angesetzt und das Protein aus dem Überstand des Bakterienlysats durch Affinitätschromatographie an Ni-Agarose gereinigt. Anschließende SDS-PAGE-Analysen zeigten überraschender Weise, dass durch diesen Reinigungsschritt zwei unterschiedliche Proteine aus dem bakteriellen Lysatüberstand ko-gereinigt wurden (Abb. 3.9.). Nur die in der SDS-PAGE weiter wandernde Proteinbande war immunreaktiv und repräsentiert damit das rekombinante His-tag-Fusionsprotein (potentielle Mimivirus-LOX). Diese Schlussfolgerung wurde durch Analyse des Musters der tryptischen Spaltfragmente mittels LC/MS bestätigt (Tab. 4.2.). Die obere Proteinbande repräsentiert ein endogenes *E. coli*-Protein, welches mit der potentiellen Mimivirus-LOX einen hochmolekularen nicht-kovalenten Proteinkomplex bildet, der in der Affinitätschromatographie über den His-tag der potentiellen Mimivirus-LOX an die Affinitätsmatrix bindet und so von anderen *E. coli*-Proteinen abgetrennt werden konnte.

In der Gelfiltration wanderte der Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von > 300.000 Da, und diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei diesem Komplex um ein Proteinpolymer handelt. Ein Heterodimer, das aus einem Monomer potentieller Mimivirus-LOX und einem Monomer unbekanntem *E. coli*-Protein besteht, würde ein ungefähres Molekulargewicht von 140-150 kDa aufweisen. Deshalb sollte der Proteinkomplex ein Heterotetramer oder ein Heterohexamer sein, wobei die SDS-PAGE-Analysen (Abb. 3.9.) eine ungefähre 1:1-Verteilung von potentieller Mimivirus-LOX und unbekanntem *E. coli*-Protein innerhalb des Proteinkomplexes belegen.

| Sample | Significance | Accession Number | Protein Name | Score | MW | Sequence Identity (%) | Coverage (%) |
|--------|--------------|------------------|---|-------|-------|-----------------------|--------------|
| Bande2 | significant | CH60_ECOLI | A7ZV12 60 kDa chaperonin | 4916 | 57293 | 29 | 83 |
| Bande2 | Significant | YL064_MIMIV | Q5UPE1 Uncharacterized protein L64 | 4895 | 67130 | 31 | 71 |
| Bande2 | Significant | ARNA_ECOLI | C4ZU97 Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA | 1166 | 74242 | 14 | 41 |
| Bande2 | Significant | GLMS_ECOLI | P17169 Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] | 898 | 66853 | 10 | 36 |
| Bande2 | Significant | DLD_ECOLI | P06149 D-lactate dehydrogenase | 216 | 64572 | 8 | 25 |
| Bande2 | Significant | KPYK2_ECOLI | P21599 Pyruvate kinase II | 192 | 51325 | 5 | 20 |
| Bande2 | Significant | SDHA_ECOLI | P0AC41 Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit | 125 | 64381 | 3 | 10 |
| Bande2 | Significant | PUR9_ECOLI | A7ZUM3 Bifunctional purine biosynthesis protein PurH | 116 | 57366 | 5 | 12 |

Tab. 4.2. Vergleich des experimentell ermittelten tryptischen Spaltmusters der putativen Mimivirus-LOX mit dem für dieses Protein vorhergesagte Spaltmuster. Die Schlussfolgerung, dass das Bande 2-Protein (Abb. 3.19.) die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX repräsentiert, konnte dadurch untermauert werden. Die meisten anderen Kandidatenproteine weisen deutlich niedrigere Ähnlichkeitswerte (MW, Scores) auf.

Die chemische Identität der potentiellen Mimivirus-LOX, die in bakteriellen Expressionssystem exprimiert wurde, konnte durch zwei unabhängige Verfahren identifiziert werden. i) Immunoblotuntersuchungen ergaben, dass sich das rekombinante Protein mit einem Anti-His-tag-Antikörper anfärben lässt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich auf ein His-tag-tragendes rekombinantes Protein handelt. ii) Die Resultate der LC-MS-Untersuchungen des Musters der tryptischen Spaltpeptide des immunoreaktiven rekombinanten Proteins (Tabelle 4.2.) lassen sich am besten damit erklären, dass es sich bei diesem Protein um das bisher uncharakterisierte Mimivirusprotein YL064 (potentielle Mimivirus-LOX) handelt. Der experimentell bestimmte Ähnlichkeitsparameter (31 %), das Molekulargewicht (67 kDa) und der coverage score (71 %) belegen diese Schlussfolgerung eindrucksvoll. Außerdem handelt es sich bei diesem mimiviralen Protein um das einzige Nicht-*E. coli*-Protein, das in dieser Proteinbande identifiziert werden konnte. Alle anderen Kandidatenproteine (Tabelle 4.2.) stellen *E. coli*-Proteine dar, die in dieser Region der SDS-PAGE gewandert sind.

4.3.2. Das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA bildet mit der potentiellen Mimivirus-LOX einen nicht-kovalenten Komplex

Unsere affinitätschromatographischen Analysen, die Gelfiltration und die SDS-PAGE-Analysen haben gezeigt, dass die potentielle Mimivirus-LOX mit einem unbekanntem *E. coli*-Protein einen nicht-kovalenten Komplex bildet. Unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) wird dieser Komplex in seine beiden Bestandteile zerlegt, die entsprechend ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in der SDS-PAGE unterschiedlich weit migrieren (Abb. 3.9). Um nähere Aussagen zur chemischen Identität des unbekanntem *E. coli*-Proteins zu erhalten, wurde das Protein mittels SDS-PAGE präpariert und ein tryptischer *in-vitro*-Verdau durchgeführt. Die dabei entstehenden Spaltpeptide wurden mittels LC/MS identifiziert. Die analytischen Daten wurden *in silico* mit den theoretischen Spaltmustern (abgeleitet aus der Aminosäuresequenz) aller *E. coli*-Proteine verglichen. Aus den Ähnlichkeitsparametern (Tabelle 3.8.) konnten zwei mögliche Kandidatenproteine in die engere Wahl einbezogen werden: Das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA zeigte einen Ähnlichkeitsscore von 3.675 und lag damit hinsichtlich dieses Parameters deutlich vor der Glutamin-fructose-6-phosphat-aminotransferase. Ähnliche Schlussfolgerungen können aus dem Vergleich der Parameter „Molekulargewicht“ und „Sequenzidentität“

gezogen werden. Die aus den tryptischen Spaltmustern errechneten Molekulargewichte der beiden Kandidatenproteine (74 kDa für das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA, 66 kDa für die Glutamin-fruktose-6-phosphat-aminotranferase) deuten aber eher darauf hin, dass es sich bei dem unbekanntem *E. coli*-Protein um das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA handelt. Das 66-kDa-Protein Glutamin-fruktose-6-phosphat-aminotranferase sollte in der SDS-PAGE gemeinsam mit der potentiellen Mimivirus-LOX wandern (theoretisches Molekulargewicht von 67 kDa) und nicht so deutlich von diesem Protein abgetrennt werden können (Abb. 3.9.). Beim Vergleich des Parameters „Sequenzidentität“ (Tabelle 3.8.) wurde für das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA eine 33%-ige Sequenzidentität mit dem unbekanntem *E. coli*-Protein festgestellt werden. Dieser Wert liegt deutlich über dem entsprechenden Parameter, der für Glutamin-fruktose-6-phosphat-aminotranferase (22%-iger Sequenzidentitätsscore) ermittelt wurde. Beim „Coverage Score“, der angibt, wie viel % der Primärstruktur in den analytischen Daten abgebildet wird, unterscheiden sich beide Kandidatenproteine nur unwesentlich voneinander.

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der Identitätsparameter geschlussfolgert werden, dass es sich bei dem unbekanntem *E. coli*-Protein, welches mit der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX einen nicht-kovalenten Proteinkomplex bildet, um das bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA handelt. Die molekulare Basis, die dieser selektiven Komplexbildung zugrunde liegt, sowie die Struktur des hochmolekularen Proteinkomplexes konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden.

4.3.3. Biologische Bedeutung des bifunktionale Polymyxin Resistance Protein ArnA

Als bifunktionelles Enzym katalysiert das Polymyxin Resistance Protein ArnA zwei unterschiedliche Reaktionen: i) Oxidative Dekarboxylierung von UDP-Glucuronsäure zu 4-Ketoarabinose und ii) Addition einer Formylgruppe an UDP-4-Amino-4-deoxyarabinose, was zur Bildung von UDP-4-Formamido-4-deoxyarabinose führt. Die so modifizierte Arabinose wird an das Lipid A angehängt. Lipid A ist ein Strukturbaustein des bakteriellen Membranbestandteils LPS (Lipopolysaccharide), der als Ligand für den Toll-like Rezeptor 4 fungiert und damit für die Initiierung der Immunantwort auf gramnegative Bakterien bedeutsam ist (Yan et al. 2007). Außerdem ist ArnA mitverantwortlich für die Resistenz mancher gramnegativer Bakterien

gegenüber Polymyxin und anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden (Breazeale et al. 2002; Breazeale et al. 2005). Die Decarboxylasedomäne dieses bifunktionalen Enzyms wurde kristallisiert, die Kristallstruktur mit einer molekularen Auflösung von 2,5 Å gelöst (PDB-ID: 1Z74; Abb. 4.4.) und die Km-Werte für NAD und für UDP-Glukoronsäure wurden bestimmt (Gatzeva-Topalova et al. 2004). Warum dieses bakterielle Enzym so selektiv mit der rekombinanten potentiellen Mimivirus-LOX einen hochmolekularen Proteinkomplex bildet, könnte in weiterführenden mechanistischen Untersuchungen aufgeklärt werden.

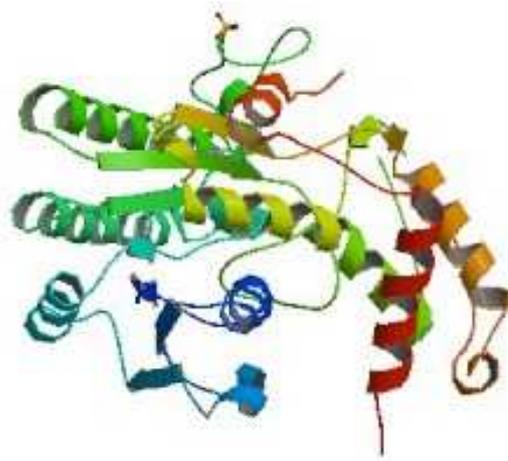


Abb. 4.4. Kristallstruktur der Decarboxylasedomäne des bifunktionalen Polymyxin Resistance Proteins ArnA aus *E. coli*. Quelle PDB-Eintrag 1Z74.

4.3.4. Die potentielle Mimivirus-LOX zeigt keine Fettsäureoxygenaseaktivität unter normoxischen Bedingungen

Für unsere Untersuchungen war es besonders wichtig herauszufinden, ob das rekombinante His-tag-Fusionsprotein katalytische LOX-Aktivität aufweist. Um diese Frage zu beantworten, wurden zwei unabhängige analytische Verfahren angewendet:

i) Eisenbestimmung: Katalytisch aktive LOXn tragen am aktiven Zentrum pro Enzymmolekül ein Ion Eisen oder Mangan. Wir untersuchten den Eisen- und Mangangehalt unserer gereinigten Proteinpräparation und mussten feststellen, dass nur etwa jedes zehnte Proteinmolekül ein Eisenion enthielt. Bei Mangan war das Protein:Metall-Verhältnis noch geringer. Diese Daten sprechen nicht dafür, dass es sich bei der potentiellen Mimivirus-LOX um eine katalytisch aktive LOX handelt. Unter vergleichbaren Bedingungen konnte für die rekombinante *P. aeruginosa*-LOX ein Eisengehalt von mehr als 95 % ermittelt werden (Banthiya et al. 2016).

ii) LOX-Aktivitätsassays: 1 bzw. 5 μ l der Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie wurden mit Arachidonsäure bzw. Linolsäure in PBS für 15 Minuten inkubiert. Die während dieser Inkubation entstandenen Oxygenierungsprodukte der Substratfettsäuren wurden mittels HPLC analysiert und als Maß der LOX-Aktivität des rekombinanten Proteins quantifiziert. Parallel zu den Inkubationsansätzen, in denen sich die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX befand, wurden eine Nichtenzymkontrolle (keine Enzymzugabe) und eine Positivkontrolle (Zugabe von gereinigter kommerzieller Sojabohnen-LOX1) mitgeführt. Während sich im Ansatz der Positivkontrolle sowohl mit Arachidonsäure als auch mit Linolsäure große Mengen an oxygenierten Fettsäuren nachweisen ließen, war das bei der Nichtenzymkontrolle und der potentiellen Mimivirus-LOX nicht der Fall. Aus diesen Ergebnissen muss geschlussfolgert werden, dass die rekombinante potentielle Mimivirus-LOX keine messbare LOX-Aktivität aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den negativen Ergebnissen der Metallanalytik (s.o.).

Die Sojabohnen-LOX1, die für unsere Aktivitätsassays als Positivkontrolle verwendet wurde, oxygeniert Linolsäure am pH-Optimum des Enzyms (pH = 9,5) selektiv zu 13S-H(p)ODE. Bei niedrigeren pH-Werten verändert sich die Reaktionsspezifität des Enzyms dahingehend, dass zusätzlich zum 13S-H(p)ODE auch noch 9S-H(p)ODE gebildet wird (Gardner 1989). Da unsere Aktivitätsassays bei pH 7,4 durchgeführt wurden, konnte erwartet werden, dass neben dem Hauptprodukt 13-H(p)ODE in der Positivkontrolle auch geringere Mengen an 9-H(p)ODE als Nebenprodukt nachgewiesen werden sollten. Dieser Nachweis gelang durch die analytischen RP-HPLC, bei der unter unseren chromatographischen Bedingungen 13-HODE und 9-HODE partiell voneinander getrennt werden konnten (Abb. 3.12.). Ein Vergleich der UV-Spektren, die während der chromatographischen Analyse aufgezeichnet wurde ergab, dass das Absorptionsmaximum des später eluierten 9-HODE ($\lambda_{\text{max}} = 233 \text{ nm}$) verglichen mit dem früher eluierten 13-HODE ($\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$) geringfügig in den kurzwelligen Bereich verschoben wurde. Diese Daten erklären den zweigipfligen Verlauf des Chromatogramms der Reaktionsprodukte (Abb. 3.12.). Ein ähnliches doppelgipfliges Chromatogramm wurde für die Oxidation von Arachidonsäure durch die Sojabohnen-LOX1 erhalten (Abb. 3.13.). Hier wurde wie erwartet 15-H(p)ETE als dominantes Oxygenierungsprodukt gebildet. Als Nebenprodukt konnte 11-HETE in signifikanten Mengen nachgewiesen werden. Ein nahezu identisches Produktmuster der Sojabohnen-LOX1 (dominante Bildung von 15-H(p)ETE

und geringere Mengen an 11-H(p)ETE als Nebenprodukt) wurde auch unter hyperoxischen Bedingungen identifiziert.

4.3.5. Die potentielle Mimivirus-LOX zeigt keine Fettsäureoxygenaseaktivität unter hyperoxischen Bedingungen

Die humane ALOXE3 fungiert ähnlich wie die potentielle Mimivirus-LOX unter normoxischen Bedingungen nicht als Fettsäureoxygenase. Für dieses Enzym finden man eine kinetischen lag-Phase, die sich über Stunden erstrecken kann (Brash et al. 1997). Kinetische lag-Phasen sind auch für andere LOXn beschrieben (Ludwig et al. 1987), dauern aber meist nur wenige Sekunden bis Minuten. Diese kinetische lag-Phase, deren molekulare Ursache noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, kann im Fall der humanen ALOXE3 durch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration (Hyperoxie) deutlich verkürzt werden, so dass Aktivitätsmessungen mit kurzen Inkubationszeiten (2-20 Minuten) möglich werden (Zheng und Brash 2010). Um auszuschließen, dass die offensichtliche katalytische Inaktivität der potentiellen Mimivirus-LOX auf einem ähnlichen kinetischen Effekt beruht, haben wir Aktivitätsmessungen unter hyperoxischen Bedingungen durchgeführt. Leider konnte auch unter hyperoxischen Bedingungen keine Arachidonsäureoxygenaseaktivität und keine Linolsäureaktivität festgestellt werden.

4.3.6. Die potentielle Mimivirus-LOX konnte in HEK-Zellen nicht exprimiert werden

Das von uns untersuchte Mimivirus infiziert vor allem eukaryontische Zellen (z.B. Amöben). Damit besteht die Möglichkeit, dass die potentielle Mimivirus-LOX enzymatisch inaktiv ist, wenn sie in Prokaryonten exprimiert wird. Dies wäre u. a. der Fall, wenn der Eiseneinbauapparat der Prokaryonten das Übergangsmetall nicht mit der nötigen Effizienz in das translatierte Protein einbaut. Sollte dies der Fall sein, wäre die von uns beobachtete katalytische Inaktivität des rekombinanten Enzyms ein Expressionsartefakt. Um diese Hypothese zu testen, haben wir versucht, die potentielle Mimivirus-LOX in einem eukaryontischen System zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen mit einem eukaryontischen Expressionsplasmid transfiziert, welches die kodierende Sequenz der potentiellen Mimivirus-LOX cDNA enthält. Als Positivkontrolle wurde die humane ALOX5 mitgeführt. Leider mussten wir feststellen, dass die potentielle Mimivirus-LOX in diesem System nicht exprimiert wurde. Im Immunoblot konnte keine immunoreaktive Bande mit einem entsprechenden

Molekulargewicht nachgewiesen werden und die entsprechenden Aktivitätsassays waren ebenfalls negativ. Im Gegensatz dazu konnte bei den Aktivitätsassays der humanen ALOX5 (Positivkontrolle) große Mengen des Oxygenierungsproduktes 5-H(p)ETE in der HPLC detektiert werden.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleibt ungeklärt, warum das mimivirale Protein trotz mehrmaliger Versuche in HEK-Zellen nicht exprimiert werden konnte. Obwohl die zugehörige mRNA (RT-PCR) nachgewiesen werden konnte, ergaben sich keine Hinweise auf die Expression des zugehörigen rekombinanten Proteins. Die Ursachen dafür wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Eine mögliche Erklärung für die unterdrückte Translation der potentiellen Mimivirus-LOX-mRNA wäre, dass das rekombinante Protein eine toxische Wirkung auf HEK293-Zellen ausübt. Sollte dies der Fall sein, würden die Zellen von der Unterdrückung der Translation der vorhandenen mRNA profitieren. Derzeit gibt es aber keine experimentellen Belege für eine toxische Wirkung des rekombinanten Proteins.

4.4. Virus-abhängiger horizontaler Gentransfer und dessen Rolle bei der Verbreitung von LOXn in irdischen Lebensformen

4.4.1. Biologische Rolle des horizontalen Gentransfers

Als horizontaler Gentransfer wird die Weitergabe genetischen Materials von einer biologischen Lebensform an eine andere bezeichnet (Syvanen 1994, Syvanen 1982, Syvanen 2012). Im Unterschied zum vertikalen Gentransfer, bei dem genetisches Material innerhalb einer Spezies von Eltern auf die Nachkommen, übertragen wird, handelt es sich beim horizontalen Gentransfer um eine Weitergabe von genetischen Informationen zwischen verschiedenen Spezies (Nielsen et al. 1998; Sprague 1991). Prinzipiell stellt der horizontale Gentransfer selbst in langen evolutionären Zeiträumen ein sehr seltenes Ereignis dar (Hartmann 2004/2005; Nielsen et al. 1998; Clerc und Simonet 1998; Dröge et al. 1998). Er ist jedoch möglich, und sein Vorkommen kann durch verschiedene Bedingungen positiv bzw. negativ beeinflusst werden. Positiv beeinflussende Faktoren sind, neben der räumlichen Nähe von DNA-Donator und DNA-Akzeptor, eine effiziente DNA-Aufnahme durch den Empfängerorganismus, die Möglichkeit zur somatischen Rekombination der aufgenommenen Nukleinsäure in homologen internen Gensequenzen (s.u.), der Dosisseffekt sowie ein Selektionsdruck auf die Weitergabe des aufgenommenen genetischen Materials an zukünftige Generationen (van Elsas et al. 2003; Bertolla und Simonet 1999). Obwohl ein

horizontalen Gentransfer auch negative Folgen für einzelne Individuen oder für ganze Ökosysteme haben kann (z.B. Übertragung von Pestizidresistenzgenen von Pflanzen auf Krankheitserreger) (Dröge et al. 1998; Nielsen et al. 1998; Bertolla und Simonet 1999), sollte er primär als wesentliche Triebkraft der Evolution lebender Systeme betrachtet werden, die über diesen Mechanismus Erbinformationen austauschen können und damit wesentlich dazu beitragen, dass evolutionär vorteilhafte Merkmale auch an nicht verwandte Organismen weitergegeben werden können. In diesem Sinne stellt der horizontale Gentransfer einen biologischen Prozess dar, der die Evolution der Arten vorantreibt (Syvanen 1998).

4.4.2. Mechanismen des horizontalen Gentransfers

Prinzipiell ist horizontaler Gentransfer zwischen allen irdischen Lebensformen möglich (Bertolla und Simonet 1999). Besonders ausgeprägt ist er jedoch unter niederen Organismen, vor allem unter Einzellern. Mechanistisch kann man drei Arten des horizontalen Gentransfers unterscheiden (van Elsas et al. 2003; Nielsen et al. 1998; Bertolla und Simonet 1999) (Abb. 4.5.).

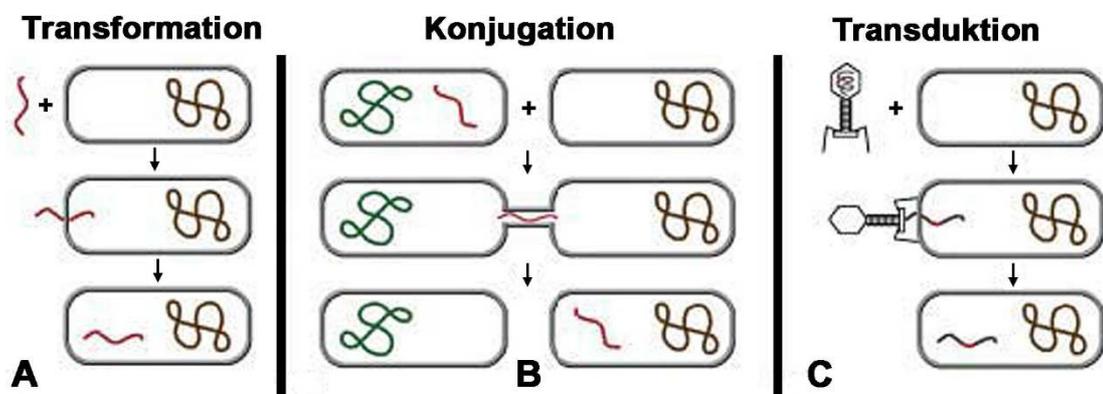


Abb. 4.5. Mechanismen des horizontalen Gentransfers. Erläuterungen siehe Text. Abb. modifiziert nach Hartmann 2004/2005

Transformation: Bei der Transformation nimmt eine Zelle genetisches Material (meist DNA, seltener RNA, da RNA sehr instabil ist und schnell abgebaut wird) aus seiner unmittelbaren Umgebung auf. Diese Umgebung ist in vielen Fällen der Extrazellularraum (Lorenz und Wackernagel 1994; Bertolla und Simonet 1999). Wenn jedoch mehrere parasitäre Mikroorganismen gemeinsam in einer Wirtszelle leben, kann diese Umgebung auch das Zytosol der Wirtszelle sein. Bei der Transformation stellt die

Plasmamembran der zu transformierenden Zelle eine erhebliche Penetrationsbarriere dar, da Oligo- bzw. Polynukleotide normalerweise Zellmembranen nicht durchdringen können. Im Labor können die bakteriellen Plasmamembranen durch die Behandlung der Zellen mit bestimmten Chemikalien bzw. Enzymen zeitlich begrenzt permeabel gemacht werden, so dass diese Zellen für einen gewissen Zeitraum chemisch kompetent sind und extrazelluläre Oligonukleotide aufnehmen können (Lorenz und Wackernagel 1994). Bestimmte Bakterienarten (z.B. *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) verfügen jedoch auch ohne chemische Behandlung über die Eigenschaft extrazelluläre Polynukleotide aufzunehmen (natürlich kompetente Bakterien) (de Vries et al. 2003; Nielsen et al. 1998; Dröge et al. 1998). Diese Mikroorganismen sind für einen horizontalen Gentransfer durch Transformation besonders geeignet.

Konjugation: Bei der Konjugation kommt es zu einer zeitlich begrenzten Verbindung von zwei Mikroorganismen, so dass genetisches Material zwischen den beiden Organismen ausgetauscht werden kann. Bei dieser Art des horizontalen Gentransfers spielt die Penetrationsbarriere der Plasmamembranen keine Rolle. Neben dem Austausch von genetischem Material werden mittels Konjugation auch andere Bestandteile des Zytosols zwischen den Partnerzellen ausgetauscht.

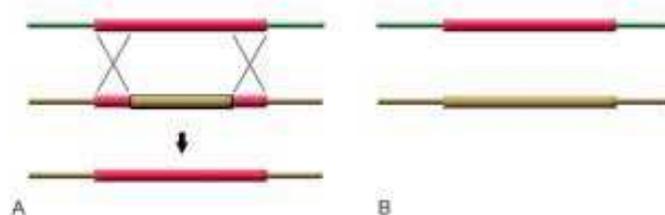


Abb. 4.6. Schematische Darstellung der homologen Rekombination. A) Wegen der Anwesenheit von Bereichen mit ähnlicher Nukleotidsequenz kann genetisches Material zwischen einer Spender-DNA (oben) und einer Empfänger-DNA (Mitte) ausgetauscht werden. Als Resultat entsteht eine Mischform, die DNA-Anteile des Spender- und des Empfängerorganismus enthält. B) Wenn keine ähnlichen (homologen) Nukleotidsequenzen in der Spender- und der Empfänger-DNA vorhanden sind, kann keine homologe Rekombination ablaufen. Die Spender-DNA wird nicht in das Genom der Wirtszelle integriert und abgebaut.

Transduktion: Während Transformation und Konjugation vor allem bei Mikroorganismen vorkommen, kann genetisches Material durch Transduktion auch auf höher entwickelte Lebensformen übertragen werden. Für diese Art des Gentransfers ist ein Vehikel nötig, welches das genetische Material von einer auf eine andere Zelle überträgt (Clerc und Simonet 1998). Dafür eignen sich Viren am besten. So kann ein

weitergegeben werden, so dass es zu einem unproduktiven Gentransfer kommt (Abb. 4.7).

4.4.3. Mögliche Verbreitung von LOX-Genen durch horizontalen Gentransfer

Bakterielle LOXn sind nicht das Ergebnis einer systematischen Enzymevolution, die in LUCA (Abb. 1.5) ihren Ursprung hatte, sondern wurden mit großer Wahrscheinlichkeit durch horizontalen Gentransfer von höher entwickelten Tieren und Pflanzen in die primitivere Lebensform der Bakterien eingeführt (Hansen et al. 2013; Koeduka et al. 2007). Ein HGT kommt besonders häufig in komplexen, häufig wechselnden Umwelten vor (Hartmann 2004/2005), bei denen zusätzlich zum Kontakt des Gendonors mit dem jeweiligen Wirt auch Kontakte zu einer großen Anzahl anderer, ebenfalls symmetrisch lebender Organismen stattfinden. Da LOXn in zwei der drei Domänen des irdischen Lebens verbreitet sind, ist davon auszugehen, dass unter sympatrischen Organismen auch LOX-haltige Vertreter zu finden sein müssen oder dass die Wirtsorganismen zu dieser Gruppe von Lebewesen gehören. Auch wenn Viren LOX-ähnliche Sequenzen oder andere durch HGT erworbene Sequenzteile nicht exprimieren, wäre es eine sinnvolle Strategie der Viren, ein Reservoir an Genteilen der durch sie parasitierten Organismen zu besitzen. In diesem Fall könnten sich die Viren an den Stoffwechsel der Wirte besser anpassen, so dass sie eine größere Unabhängigkeit von Veränderungen im Stoffwechsel der Wirtszellen erlangen würden. Dies würde den Viren einen erheblichen Evolutionsvorteil verschaffen. Unter diesen Umständen ist es eher überraschend, dass bislang noch keine Viren identifiziert werden konnten, die echte LOX-Gene in ihren Genomen tragen. Unsere Suchstrategie hat ergeben, dass in den bisher sequenzierten viralen Genomsequenzen kein funktionelles LOX-Gen nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Viren LOX-Gene zwar durch horizontalen Gentransfer aufnehmen und an Empfängerorganismen weitergeben können, dass diese Gene jedoch sehr schnell wieder inaktiviert und abgebaut werden, da sie den Überträgern keinen evolutionären Vorteil verschaffen. Diese Interpretation würde auch mit unserer Beobachtung in Einklang stehen, dass bei der Suche nach viralen LOX-Genen mehr als 120 potentielle LOX-Teilsequenzen identifiziert wurden. Diese Teilsequenzen stellen möglicherweise als Ab- bzw. Umbauprodukte ursprünglich funktioneller viraler LOX-Gene dar.

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den Genomen der derzeit auf der Erde existierenden Viren keine funktionellen LOX-Sequenzen vorhanden sind. Diese Schlussfolgerung ist insofern überraschend, da bakterielle LOXn mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen horizontalen Gentransfer aus höher entwickelten Organismen zurückzuführen sind. Obwohl prinzipiell auch Virus-unabhängige Mechanismen des HGT möglich sind, sollten Viren bei der Genübertragung von hochentwickelten Pflanzen und Tieren auf primitivere Lebensformen eine besondere Rolle spielen. Sollten diese Prämissen zutreffen, muß es im Laufe der Evolution des irdischen Lebens Viren gegeben haben, die funktionelle LOX-Gene besessen haben. Deren evolutionäre Lebensdauer könnte jedoch relativ kurz gewesen sein, so dass sie heute nicht mehr nachweisbar sind. Da jedoch immer wieder neue Viren entstehen und immer mehr virale Genome vollständig sequenziert werden, sollte in der Zukunft die von uns entwickelte *in silico*-Suchstrategie auf neue virale Genome ausgedehnt werden. Sollten in Folge dieser Untersuchungen potentielle virale LOX-Gene identifiziert werden, könnten diese entsprechend des hier beschriebenen Schemas rekombinant exprimiert und funktionell charakterisiert werden.

Im Rahmen unserer Expressionsstudien wurde beobachtet, dass die potentielle Mimivirus-LOX mit dem bakteriellen bifunktionalen Polymyxin Resistenzprotein ArnA einen polymeren Proteinkomplex bildet. Leider konnte aus Zeitgründen nicht untersucht werden, ob diese Komplexbildung biologisch bedeutsam ist und welchen Effekt diese Komplexierung auf die katalytische Aktivität von ArnA hat. Es wäre z.B. vorstellbar, dass die potentielle Mimivirus-LOX die katalytische Aktivität von ArnA durch die Bildung dieses polymeren Proteinkomplexes hemmt bzw. gegebenenfalls auch aktiviert. Eine solche Hemmung hätte zur Konsequenz, dass die mit der potentiellen Mimivirus-LOX transformierten Bakterien weniger Lipid A bilden sollten und damit ihre LPS-Synthese eingeschränkt wäre. Da LPS ein wesentlicher Ligand für den Toll-like Rezeptor 4 ist, über den die initiale Reaktion menschlicher Immunzellen auf gramnegative Bakterien initiiert wird, könnte die Komplexierung von ArnA durch die potentielle Mimivirus-LOX zu einer Suppression der Immunreaktion gegen diese Bakterien führen. Um diese Fragen zu untersuchen, sollte zunächst getestet werden, ob die Komplexierung von ArnA dessen katalytische Aktivität beeinflusst und ob dadurch die Antigeneigenschaften der transformierten Bakterien modifiziert werden.

Obwohl es möglich war, die potentielle Mimivirus-LOX in *E. coli* zu exprimieren, gelang eine Expression des rekombinanten Proteins in eukaryontischen HEK-Zellen trotz mehrfacher Versuche nicht. Die Ursachen dafür konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden. Zwar konnten wir durch den Nachweis der entsprechenden mRNA zeigen, dass die Transkription des episomalen Expressionsplasmids in den transfizierten Zellen ablief. Trotzdem konnte kein rekombinantes Protein nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass entweder die Translation der mimiviralen mRNA in transfizierten HEK-Zellen blockiert ist oder dass das finale Translationsprodukt schnell proteolytisch abgebaut wird. Direkte *in vitro*-Translationsassays könnten die Beantwortung dieser Frage weiter voranbringen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, Losert W, Cicerone MT, Parent CA. LTB 4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Developmental Cell*. 2012;22:1079-1091.
- (2) Aherfi S, Colson P, La Scola B, Raoult D. Giant Viruses of Amoebas: An Update. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(349):1-14.
- (3) Andreou A, Feussner I. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*. 2009;70:1504-1510.
- (4) Armstrong M, van Hoorebeke C, Horn T, Deschamps J, Freedman JC, Kalyanaraman C, Jacobson MP, Holman T. Human 15-LOX-1 active site mutations alter inhibitor binding and decrease potency. *Bioorg Med Chem*. (2016);24(21):5380-5387.
- (5) Audic S. Genome Analysis of *Minibacterium massiliensis* highlights the convergent evolution of water-living bacteria. *PLoS Genet*. 2007;3:e138.
- (6) Banthiya S, Pekárová M, Kuhn H, Heydeck D. Secreted lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* exhibits biomembrane oxygenase activity and induces hemolysis in human red blood cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015;584:116-124.
- (7) Banthiya S, Kalms J, Galemou Yoga E, Ivanov I, Carpena X, Hamberg M, Kuhn H, Scheerer P. Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2016;1861(11):1681-1692.
- (8) Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, Williams KP, BW Sobral, Kupko JJ, Porcella SF, Samuel JE, Heinzen RA. Comparative Genomics Reveal Extensive Transposon-Mediated Genomic Plasticity and Diversity among Potential Effector Proteins within the Genus *Coxiella*. *Infection And Immunity*. 2009;77(2):642-656.

- (9) Belkner J, Wiesner R, Kuhn H, Lankin VZ. The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett.* 1991;279:110-114.
- (10) Bertolla F, Simonet P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* 1999;150:375-384.
- (11) Boeglin WE, Kim RB, Brash AR. A 12R-lipoxygenase in human skin: Mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:6744-6749.
- (12) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72: 248-254.
- (13) Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 Jun;94:6148-6152.
- (14) Breazeale SD, Ribeiro AA, Raetz CRH. Oxidative Decarboxylation of UDPGlucuronic Acid in Extracts of Polymyxin-resistant *Escherichia coli*. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. *The journal of biological chemistry.* 2002;277(4):2886-2896.
- (15) Breazeale SD, Ribeiro AA, McClerren AL, Raetz CRH. A Formyltransferase Required for Polymyxin Resistance in *Escherichia coli* and the Modification of Lipid A with 4-Amino-4-deoxy- L -arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *The journal of biological chemistry.* 2005;280(14): 14154-14167.
- (16) Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2005;6:328-340.
- (17) Cazalet C, Rusniok C, Bruggemann H , Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C.

Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics*. 2004;36(11):1165-1173.

(18) Chaitidis P, Kuhn H. Induction of 15-lipoxygenase-1 impairs expression of HIV-1 receptors CD4 and CXCR4 in monocytic cells. *FEBS Lett*. 2005;579(17):3691-4.

(19) Chappell J, Demody T. Biology of viruses and viral diseases. In: John E. Bennett, Raphael Dolin and Martin J. Blaser. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. eds. 2015;1681-1693, Elsevier Inc. Verlag, ISBN:978-1-4557-4801-3

(20) Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*. 1994;372(6502):179-82.

(21) Chen DS, Wu YQ, Zhang W, Jiang SJ, Chen SZ. Horizontal gene transfer events reshape the global landscape of arm race between viruses and homo sapiens. *Nature Sci Reports* 2016;6:26934.

(22) Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou I-C, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ. The Genomic Sequence of the Accidental Pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*. 2004;305(5692):1966-1968.

(23) Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W. Conformational flexibility in mammalian 15-lipoxygenase: reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* 2008;70:1023-1032.

(24) Clerc S, Simonet P. A review of available systems to investigate transfer of DNA to indigenous soil bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998;73:15-23.

- (25) Çobanoğlu B, Toskala E, Ural A, Cingi C. Role of Leukotriene Antagonists and Antihistamines in the Treatment of Allergic Rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13:203-208.
- (26) Colson P, Raoult D. Gene Repertoire of Amoeba-Associated Giant Viruses. *Intervirology.* 2010;53:330-343.
- (27) Colson P, de Lamballerie X, Fournous G, Raoult D. Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales. *Intervirology.* 2012;55:321-332.
- (28) Colson P, De Lamballerie X; Yutin N, Asgari S, Bigot Y, Bideshi DK, Cheng XW, Federici BA, Van Etten JL, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch Virol.* 2013;158:2517-2521.
- (29) Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:217-221.
- (30) Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 1999;103:1597-1604.
- (31) Cyrus T, Praticò D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD. Absence of 12/15-Lipoxygenase Expression Decreases Lipid Peroxidation and Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation.* 2001;103:2277-2282.
- (32) Dahlen S-E, Bjork J, Hedqvist P, Arfor K-E, Hammarstrom S, Lindgren J-A, Samuelsson B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 1981;78:3887-3891.

- (33) De Costanzo AJ, Voloshyna I, Rosen ZB, Feinmark SJ, Siegelbaum SA. 12-Lipoxygenase Regulates Hippocampal Long-Term Potentiation by Modulating L-Type Ca^{2+} Channels. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(5):1822-1831.
- (34) De la Houssaye BA, Mikule K, Nikolic D, Pfenninger KH. Thrombin-Induced Growth Cone Collapse: Involvement of Phospholipase A 2 and Eicosanoid Generation. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(24):10843-10855.
- (35) De Petrocellis L, Di Marzo V. Aquatic invertebrates open up new perspectives in eicosanoid research: biosynthesis and bioactivity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994;51(4):215-29.
- (36) Deschamps JD, Ogunsola AF, Jameson JB, II, Yasgar A, Flitter BA, Freedman CJ, Melvin JA, Nguyen JVMH, Maloney DJ, Jadhav A, Simeonov A, Bomberger JM, Holman TR. Biochemical and Cellular Characterization and Inhibitor Discovery of *Pseudomonas aeruginosa* 15-Lipoxygenase. *Biochemistry*. 2016;55:3329-3340.
- (37) Dröge M, Pühler A, Selbitschka W. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology*. 1998;64:75-90.
- (38) Edwards RA, Rohwer F. Viral metagenomics. *Nat. Rev. Microbiol*. 2005;3:504-510.
- (39) Epp N, Fürstenberger G, Müller K, de Juanes S, Leitges M, Hausser I, Thieme F, Liebisch G, Schmitz G, Krieg P. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *The Journal of Cell Biology*. 2007;177:173-182.
- (40) Ereso AQ, Cureton EL, Cripps MW, Sadjadi J, Dua MM, Curran B, Victorino GP. Lipoxin A4 Attenuates Microvascular Fluid Leak During Inflammation. *Journal of Surgical Research*. 2009;156:183-188.
- (41) Feinmark SJ, Begum R, Tsvetkov E, Goussakov I, Funk CD, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. 12-Lipoxygenase Metabolites of Arachidonic Acid Mediate Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression at Hippocampal CA3–CA1 Synapses. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(36):11427-11435.

- (42) Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, Serhan CN. Lipoxin A4 and Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxin A 4 Inhibit Human Neutrophil Migration: Comparisons Between Synthetic 15 Epimers in Chemotaxis and Transmigration with Microvessel Endothelial Cells and Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*. 2003;170:2688-2694.
- (43) Filée J, Pouget N, Chandler M. Phylogenetic evidence for extensive lateral acquisition of cellular genes by Nucleocytoplasmic large DNA viruses. *BMC Evolutionary Biology*. 2008;8:320.
- (44) Funk CD, Furci L, Fitzgerald GA. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:5638-5642.
- (45) Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2002;68-69:303-312.
- (46) Gardner HW. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1001(3):274-81.
- (47) Gatzeva-Topalova PZ, May AP, Sousa MC. Crystal Structure of Escherichia coli ArnA (Pmrl) Decarboxylase Domain. A Key Enzyme for Lipid A Modification with 4-Amino-4-deoxy- L -arabinose and Polymyxin Resistance. *Biochemistry*. 2004; 43(42):13370-13379.
- (48) George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 2001;104:1646-1650.
- (49) Gertow K, Nobili E, Folkersen L, Newman JW, Pedersen TL, Ekstrand J, Swedenborg J, Kühn H, Wheelock CE, Hansson GK, Hedin U, Haeggström JZ, Gabrielsen A. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: Associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis*. 2011;215:411-416.

- (50) Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME. The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science* 2011;331:217-219.
- (51) Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* 1997;4:1003-1009.
- (52) Glickman MH, Klinman JP. Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction. *Biochemistry.* 1995;34(43):14077-92.
- (53) Glöckner G, Albert-Weissenberger C, Weinmann E, Jacobi S, Schunder E, Steinert M, Hacker J, Heuner K. Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *International Journal of Medical Microbiology.* 2008;298:411-428.
- (54) Goodier JL, Kazazian HH Jr. Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites. *Cell.* 2008;135:23-35.
- (55) Gronert K, Maheshwari N, Khan N, Hassan IR, Dunn M, Schwartzman ML. A Role for the Mouse 12/15-Lipoxygenase Pathway in Promoting Epithelial Wound Healing and Host Defense. *The Journal Of Biological Chemistry.* 2005;280(15):15267-15278.
- (56) Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chem. Rev.* 2011;111:5866-5898.
- (57) Hansen J, Garreta A, Benincasa M, Fusté MC, Busquets M, Manresa A. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:4737-4747.
- (58) Hartel B, Ludwig P, Schewe T, Rapoport SM. Self-Inactivation by 13-Hydroperoxylinoleic Acid and Lipohydroperoxidase Activity of the Reticulocyte Lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.* 1982;126:353-357.

- (59) Hartmann A. Horizontaler Gentransfer - ein natürlicher Prozess. mensch+umwelt spezial. 2004/2005;17:59-64. https://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/GSF/pdf/publikationen/mensch_und_umwelt_spezial/Heft17/59_64_Hartmann.pdf.
- (60) Hawkins JD, Brash AR. Eggs of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, Contain a Prominent (11R) and (12R) Lipoxygenase Activity. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1987;262:7629-7634.
- (61) Hicks A, Monkarsh SP, Hoffman AF, Goodnow R Jr. Leukotriene B₄ receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2007;16(12):1909-1920.
- (62) Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Progress in Lipid Research*. 2015;57:13-39.
- (63) Hu S, Mao-Ying QL, Wang J, Wang ZF, Mi WL, Wang XW, Jiang JW, Huang YL, Wu GC, Wang YQ. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9:278.
- (64) Iyer LM, Aravind L, Koonin EV. Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses. *Journal Of Virology*. 2001;75:11720-11734.
- (65) Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res*. 2006;117:156-184.
- (66) Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*. 2015;573:1-32.
- (67) Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010;503:161-174.

- (68) Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Brash AR. Identification of Amino Acid Determinants of the Positional Specificity of Mouse 8S-Lipoxygenase and Human 15SLipoxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 2000;275:1287-1293.
- (69) Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Nanney LB, Brash AR. Molecular Cloning and Functional Expression of a Phorbol Ester-inducible 8S-Lipoxygenase from Mouse Skin. *The Journal Of Biological Chemistry.* 1997;272:24410-24416.
- (70) Juhas M, Crook DW, Hood DW. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology.* 2008;10(12):2377-2386.
- (71) Juránek I, Suzuki H, Yamamoto S. Affinities of various mammalian arachidonate lipoxygenases and cyclooxygenases for molecular oxygen as substrate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1436:509-518.
- (72) Kaliner M, Shelhamer JH, Borson B, Nadel J, Patow C, Marom Z. Human Respiratory Mucus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986;134:612-621.
- (73) Kalms J, Banthiya S, Galemou Yoga E, Hamberg M, Holzhutter HG, Kuhn H, Scheerer P. The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase Ala420Gly mutant explains the improved oxygen affinity and the altered reaction specificity. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1862(5):463-473.
- (74) Kebir DE, Filep JG. Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through β 2 integrins. *Frontiers in Immunology.* 2013;4(60):1-15.
- (75) Kim GH, Ryan JJ, Archer SL. The Role of Redox Signaling in Epigenetics and Cardiovascular Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013;18(15):1920-1936.
- (76) Kinzig A, Heidt M, Fürstenberger G, Marks F, Krieg P. cDNA Cloning, Genomic Structure, and Chromosomal Localization of a Novel Murine Epidermis-type Lipoxygenase. *Genomics.* 1999;58:158-164.

- (77) Kobe MJ, Neau DB, Mitchell CE, Bartlett SG, Newcomer ME. The Structure of Human 15-Lipoxygenase-2 with a Substrate Mimic. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:8562-8569.
- (78) Koeduka T, Kajiwara T, Matsui K. Cloning of Lipoxygenase Genes from a Cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and Its Expression in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 2007;54:315-319.
- (79) Koljak R, Boutaud O, Shieh BH, Samel N., Brash AR. Identification of a Naturally Occurring Peroxidase-Lipoxygenase Fusion Protein. *Science*. 1997;277:1994-1996.
- (80) Koonin EV. Comparative genomics, minimal genesets and the last universal common ancestor. *Nature Rev Microbiol*. 2003;1:127-136.
- (81) Koonin EV, Yutin N. Origin and Evolution of Eukaryotic Large Nucleo-Cytoplasmic DNA Viruses. *Intervirology*. 2010;53:284-292.
- (82) Koonin EV, Dolja VV. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr. Opin. Virol*. 2013;3:546-557.
- (83) Koonin EV, Dolja VV. Virus World as an Evolutionary Network of Viruses and Capsidless Selfish Elements. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014;78:278-303.
- (84) Koonin EV, Starokadomskyy P. Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.shpsc.2016.02.016>.
- (85) Koonin EV, Krupovic M, Natalya Yutin N. Evolution of double-stranded DNA viruses of eukaryotes: from bacteriophages to transposons to giant viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2015;1341:10-24.

- (86) Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1841:390-400.
- (87) Krieg P, Rosenberger S, de Juanes S, Latzko S, Hou J, Dick A, Kloz U, van der Hoeven F, Hausser I, Esposito I, Rauh M, Schneider H. Aloxe3 Knockout Mice Reveal a Function of Epidermal Lipoxygenase-3 as Hepoxilin Synthase and Its Pivotal Role in Barrier Formation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133:172-180.
- (88) Kristensen DM, Waller AS, Yamada T, Bork P, Mushegian AR, Koonin EV. Orthologous Gene Clusters and Taxon Signature Genes for Viruses of Prokaryotes. *Journal of Bacteriology*. 2013;195:941-950.
- (89) Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW, Bamford D. Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2011;75(4):610-635.
- (90) Kuda O, Brezinova M, Rombaldova M, Slavikova B, Posta M, Beier P, Janovska P, Veleba J, Kopecky J Jr, Kudova E, Pelikanova T, Kopecky J. Docosahexaenoic acid-derived fatty acid esters of hydroxy fatty acids (FAHFAs) with anti-inflammatory properties (Novel members of FAHFA lipid class derived from DHA). *Diabetes Publish Ahead of Print*, published online June 16, 2016:1-39.
- (91) Kühn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, Bursztyjn-Pettegrew H, Chan H, Sigal E. Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1993;1169: 80-89.
- (92) Kuhn H, Schewe T, Rapoport SM. The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1986;58:273-311.
- (93) Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015;1851:308-330.

- (94) Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 1990;265:18351-18361.
- (95) Kypriotou M, Huber M, Hohl D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Experimental Dermatology.* 2012;21:643-649.
- (96) Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- (97) La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, De Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie J-M, Raoult D. A Giant Virus in Amoebae. *Science.* 2003;299:2033.
- (98) La Scola B, Birtles RJ, Greub G, Harrison TJ, Ratcliff RM, Raoult D. *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2004;54:699-703.
- (99) Le Bel M, Brunet A, Gosselin J. Leukotriene B4, an Endogenous Stimulator of the Innate Immune Response against Pathogens. *J Innate Immun.* 2014;6:159-168.
- (100) Lehnert N, Solomon EI. Density-functional investigation on the mechanism of H atom abstraction by lipoxygenase. *J Biol Inorg Chem* (2003);8: 294-305.
- (101) Löhelaid H, Järving R, Valmsen K, Varvas K, Kreen M, Järving I, Samel N. Identification of a functional allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein in the soft coral *Gersemia fruticosa* suggests the generality of this pathway in octocorals. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008;780:315-321.
- (102) Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *Microbiological Reviews.* 1994;58(3):563-602.
- (103) Ludwig P, Holzhutter HG, Colosimo A, Silvestrini MC, Schewe T, Rapoport SM. A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* 1987;168:325-337.

- (104) Lwoff A. The concept of virus. *J Gen Microbiol.* 1957;17: 239-253.
- (105) Mancini AD, Di Battista JA. The cardinal role of the phospholipase A2/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E2 (PCPP) axis in inflammotasis. *Inflamm. Res.* (2011);60:1083-1092.
- (106) McGraw EA, L O'Neill S. *Wolbachia pipientis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology.* 2004;7:67-70.
- (107) Meruvu S, Walther M, Ivanov I, Hammarström S, Fürstenberger G, Krieg P, Reddanna P, Kuhn H. Sequence Determinants for the Reaction Specificity of Murine (12R)-Lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *The Journal Of Biological Chemistry.* 2005;280:36633-36641.
- (108) Mikule K, Gatlin JC, de la Houssaye BA, Pfenninger KH. Growth Cone Collapse Induced by Semaphorin 3A Requires 12/15-Lipoxygenase. *The Journal of Neuroscience.* 2002;22(12):4932-4941.
- (109) Moliner C, Fournier PE, Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *Microbiology Reviews.* 2010 Feb;34:281-294.
- (110) Moreira D, Brochier-Armanet C. Giant viruses, giant chimeras: The multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. *BMC Evolutionary Biology.* 2008;8:12.
- (111) Moran NA. Microbial Minimalism: Genome Reduction in Bacterial Pathogens. *Cell.* 2002;108:583-586.
- (112) Muñoz-Garcia A, Thomas CP, Keeney DS, Zheng Y, Brash AR. The importance of the lipoxygenase-hepoxilin pathway in the mammalian epidermal barrier. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014;1841:401-408.

- (113) Mutsafi Y, Fridmann-Sirkis Y, Milrot E., Hevroni L, Minsky A. Infection cycles of large DNA viruses: Emerging themes and underlying questions. *Virology*. 2014;466-467:3-14.
- (114) Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, van Elsas JD. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria — a rare event? *FEMS Microbiology Reviews*. 1998;22:79-103.
- (115) Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Muming P, Hong K. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature* 2003;423:990-995.
- (116) Normandin M, Gagné J, Bernard J, Élie R, Miceli D, Baudry M, Massicotte G. Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Research*. 1996;730:40-46.
- (117) Ogata H, Robert C, Audic S, Robineau S, Blanc G, Fournier PE, Renesto P, Claverie JM, Raoult D. *Rickettsia felis*, from Culture to Genome Sequencing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;1063:26-34.
- (118) Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS Genetics*. 2006;2:e76.
- (119) Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN. Resolvin E1 Receptor Activation Signals Phosphorylation and Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 2010;285(5):3451-3461.
- (120) Oliw EH. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2002;68-69:313-323.

- (121) Pace-Asciak CR. The hepoxilins and some analogues: a review of their biology. *Br. J. Pharmacol.* 2009;158:972-981.
- (122) Palmblad BJ, Malmsten CL, Udén AM, Rådmark O, Engstedt L, Samuelsson B. Leukotriene B4 is a Potent and Stereospecific Stimulator of Neutrophil Chemotaxis and Adherence. *Blood.* 1981;58(3):658-661.
- (123) Pardutz A, Schoenen J. NSAIDs in the Acute Treatment of Migraine: A Review of Clinical and Experimental Data. *Pharmaceuticals* (2010);3:1966-1987.
- (124) Peatfield AC, Piper PJ, RICHARDSON PS. The effect of leukotriene c4 on mucin release into the cat trachea in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1982;77:391-393.
- (125) Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes Up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes. *Science.* 2013;341:281-286.
- (126) Poeckel D, Funk CD. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovascular Research.* 2010;86:243-253.
- (127) Porta H, Rocha-Sosa M. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology.* 2001;147:3199-3200.
- (128) Rådmark O, Samuelsson B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010;396:105-110.
- (129) Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 2007;32(7):332-341.
- (130) Raoult D, Forterre P. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature Reviews Microbiology.* 2008;6:315-319.

- (131) Raoult D, Boyer M. Amoebae as Genitors and Reservoirs of Giant Viruses. *Intervirology*. 2010 Jun;53:321-329.
- (132) Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H, La Scola B, Suzan M, Claverie J-M. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*. 2004 Nov;306:1344-1350.
- (133) Rapoport SM, Schewe T. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986;864:471-495.
- (134) Rickert KW, Klinman JP. Nature of Hydrogen Transfer in Soybean Lipoxygenase 1: Separation of Primary and Secondary Isotope Effects. *Biochemistry* 1999;38:12218-12228.
- (135) Rohwer F. Global phage diversity. *Cell*. 2003;113:141.
- (136) Romano M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *Sci. World J*. 2010;10:1048-1064.
- (137) Romanov S, Wiesner R, Myagkova G, Kuhn H, Ivanov I. Affinity Labeling of the Rabbit 12/15-Lipoxygenase Using Azido Derivatives of Arachidonic Acid. *Biochemistry* 2006;45:3554-3562.
- (138) Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lodrup Carlsen KC, Carlsen KH, Szczeklik A. Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010;126:859-867.
- (139) Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis, and Biological Effects. *Science*. 1987;237:1171-1176.
- (140) Savari S, Vinnakota K, Zhang Y, Sjolander A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol*. 2014;20:968-977.

- (141) Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett.* 1975;60:149-152.
- (142) Schilstra MJ, Veldink GA, Vliegthart JF. The dioxygenation rate in lipoxygenase catalysis is determined by the amount of iron (III) lipoxygenase in solution. *Biochemistry.* 1994;33(13):3974-9.
- (143) Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem. Rev.* 111 (2011) 5922-5943.
- (144) Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *The FASEB Journal.* 2012;26:1755-1765.
- (145) Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson EC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *PNAS.* 2003;100(9):5455-5460.
- (146) Sharma V, Colson P, Pontarotti P, Raoult D. Mimivirus inaugurated in the 21st century the beginning of a reclassification of viruses. *Current Opinion in Microbiology.* 2016;31:16-24.
- (147) Sharma V, Colson P, Chabrol O, Scheid P, Pontarotti P, Raoult D. Welcome to pandoraviruses at the 'Fourth TRUC' club. *Frontiers in Microbiology.* 2015;6(423):1-11.
- (148) Sigal E, Dicharry S, Highland E, Finkbeiner WE. Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. *Am. J. Physiol* 1992;262:L392-L398.
- (149) Sigall E, Grunbergerl D, Cashman JR, Craik CS, Caughey GH, Nadell JA. Arachidonate 15-Lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial

purification and properties. *Biochemical and biophysical research communications*. 1988;150:376-383.

(150) Singh RK, Tandon R, Dastidar SG, Ray A. A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma. *Journal of Asthma*. 2013;50(9):922-931.

(151) Sloane DL, Dixon RA, Craik CS, Sigal E. Expression of cloned human 15-lipoxygenase in eukaryotic and prokaryotic systems. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res*. 1991;21A:25-28.

(152) Smith MJH. Biological activities of leukotriene B₄. *Agents and Actions*. 1981;11(6/7):571-572.

(153) Spite M, Clària J, Serhan CN. Resolvins, Specialized Proresolving Lipid Mediators, and Their Potential Roles in Metabolic Diseases. *Cell Metabolism*. 2014;19:21-36.

(154) Sprague GF Jr. Genetic exchange between kingdoms. *Current Opinion in Genetics and Development* 1991;1:530-533.

(155) Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-Lipoxygenase Expression in Peritoneal Macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem*. 1996 Sep;271:24055-24062.

(156) Suttle CA. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol*. 2007;5:801-812.

(157) Suzan-Monti M, Scola BL, Barrassi L, Espinosa L, Raoult D. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus-factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PLoS ONE*. 2007;2:e328.

(158) Syvanen M. Horizontal Gene transfer: Evidence and Possible Consequences. *AmJ. Rev. Genet*. 1994;28:237-261

- (159) Syvanen M. Evolutionary Implications of Horizontal Gene Transfer. *Annu. Rev. Genet.* 2012;46:341-58.
- (160) Takahashi Y, Glasgow WC, Suzuki H, Taketani Y, Yamamoto S, Anton M, Kuhn H, Brash AR. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. *Eur. J. Biochem.* 1993;218:165-171.
- (161) Tamas I, Klasson LM, Sandström JP, Andersson SGE. Mutualists and parasites: how to paint yourself into a (metabolic) corner. *FEBS Letters.* 2001;498:135-139.
- (162) Taylor GW, Morris HR. Lipoxygenase Pathways. *British Medical Bulletin* 1983;39:219-222
- (163) Tsai IJ. Honey, I shrunk the mimiviral genome. *Nature Reviews Microbiology.* 2011;9:563.
- (164) Vance RE, Hong S, Gronert K, Serhan CN, Mekalanos JJ. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 2004;101:2135-2139.
- (165) van Elsas JD, Turner S, Bailey MJ. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist.* 2003;157:525-537.
- (166) Van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 1998;395:392-395.
- (167) Virmani J, Johnson EN, Klein-Szanto AJP, Funk CD. Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer Letters.* 2001;162:161-165.
- (168) Walther M, Anton M, Wiedmann M, Fletterick R, Kuhn H. The N-terminal Domain of the Reticulocyte-type 15-Lipoxygenase Is Not Essential for Enzymatic Activity but Contains Determinants for Membrane Binding. *Journal of biological chemistry* 2002;277:27360-27366.

- (169) Walther M, Hofheinz K, Vogel R, Roffeis J, Kühn H. The N-terminal b-barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;516:1-9.
- (170) Wuest SJA, Horn T, Marti-Jaun J, Kühn H, Hersberger M. Association of polymorphisms in the ALOX15B gene with coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*. 2014;47:349-355.
- (171) Xiao C, Chipman PR, Battisti AJ, Bowman VD, Renesto P, Raoult D, Rossmann MG. Cryo-electron Microscopy of the Giant Mimivirus. *J. Mol. Biol.* 2005;353:493-496.
- (172) Xiao C, Kuznetsov YG, Sun S, Hafenstein SL, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Suzan-Monti M, Raoult D, Mc Pherson A, Rossmann MG. Structural Studies of the Giant Mimivirus. *PLoS Biology*. 2009;7:958-966.
- (173) Xu S, Mueser TC, Marnett LJ, Funk MO Jr. Crystal Structure of 12-Lipoxygenase Catalytic-Domain-Inhibitor Complex Identifies a Substrate-Binding Channel for Catalysis. *Structure* (2012);20:1490-1497.
- (174) Yan A, Guan Z, Raetz CRH. An Undecaprenyl Phosphate-Aminoarabinose Flippase Required for Polymyxin Resistance in *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*. 207;282(49):36077-36089.
- (175) Yokomizo T. Leukotriene B 4 receptors: Novel roles in immunological regulations. *Advances in Enzyme Regulation*. 2011;51:59-64.
- (176) Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Resolvins: endogenously-generated potent painkilling substances and their therapeutic perspectives. *Curr. Neuropharmacol.* 2013;11:664-676.
- (177) Yoshida T, Claverie JM, Ogata H. Mimivirus reveals Mre11/Rad50 fusion proteins with a sporadic distribution in eukaryotes, bacteria, viruses and plasmids. *Virology Journal*. 2011;8:427.

- (178) Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Human and mouse eLOX3 have distinct substrate specificities: Implications for their linkage with lipoxygenases in skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006;455:188-196.
- (179) Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Marnett LJ, Brash AR. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(16):9162-9167.
- (180) Zauberman N, Mutsafi Y, Halevy Db, Shimoni E, Klein E, Xiao C, Sun S, Minsky A. Distinct DNA Exit and Packaging Portals in the Virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biology*. 2008;6:1104-1114.
- (181) Zhao L, Funk CD. Lipoxygenase Pathways in Atherogenesis. *TCM*. 2004;14(5):191-195.
- (182) Zhao L, Pratico D, Rader DJ, Funk CD. 12/15-Lipoxygenase gene disruption and vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005;78:185-193.
- (183) Zheng Y, Brash AR. On the Role of Molecular Oxygen in Lipoxygenase Activation: comparison and contrast of epidermal Lipoxygenase-3 with soybean lipoxygenase-1. *The journal of biological chemistry* 2010;285:39876-39887.
- (184) Zheng Y, Boeglin WE, Schneider C, Brash AR. A 49-kDa Mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 Retains Catalytically Complete Functionality. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2008;283(8):5138-5147.
- (185) Zheng Y, Yin H, Boeglin WE, Elias PM, Crumrine D, Beier DR, Brash AR. Lipoxygenases Mediate the Effect of Essential Fatty Acid in Skin Barrier Formation. A proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *The Journal of Biological chemistry*. 2011;286(27):24046-24056.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Tatjana Gehring, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rekombinante Expression und proteinchemische Charakterisierung einer potentiellen viralen (Mimivirus Acanthamoeba polyphaga) Lipoxygenase“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht.

Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum,

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Tatjana Gehring hatte folgenden Anteil an folgenden Publikationen:

Kuhn H, Gehring T, Schröter A, Heydeck D. Cytokine-Dependent Expression Regulation of ALOX15. J Cytokine Biol. 2016;1:106. doi:10.4172/jcb.1000106

Beitrag im Einzelnen: Aus den Ergebnissen meiner Arbeit sind die Abb. 1 und eine Textpassage im Abschnitt "Diversity of LOX family and occurrence of LOX sequences in the domains of terrestrial life" entstanden.

Gehring T, Heydeck D, Niewianda A, Janek K, Kuhn H. Do lipoxygenases occur in viruses? Expression and characterization of a viral lipoxygenase-like genomic sequence did not provide evidence for the existence of viral lipoxygenases. Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids. 2018;138:14-23.

Beitrag im Einzelnen: Dieses Publikationsmanuskript basiert auf den wesentlichen experimentellen Daten, die in der vorliegenden Dissertationsschrift enthalten sind. Die entsprechenden Experimente sind überwiegend von mir geplant und durchgeführt worden. Weiterhin habe ich an der Erstellung des Manuskriptes mitgearbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

1. H. Kuhn, **T. Gehring**, A. Schröter, D. Heydeck (2016) Cytokine-Dependent Expression Regulation of ALOX15. *J Cytokine Biol.* 1:106. doi:10.4172/jcb.1000106
2. S. Kroschwald, C. Y. Chiu, D. Heydeck, N. Rohwer, **T. Gehring**, U Seifert, A. Lux, M. Rothe, K. H. Weylandt, H. Kuhn (2018) Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. *Biochim. Biophys. Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids.* doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.04.019
3. **T. Gehring**, D. Heydeck, A. Niewienda, K. Janek, H. Kuhn (2018) Do lipoxygenases occur in viruses? Expression and characterization of a viral lipoxygenase-like genomic sequence did not provide evidence for the existence of viral lipoxygenases. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids.* 2018;138:14-23

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hartmut Kühn für die freundliche Überlassung des spannenden Promotionsthemas und die Einarbeitung in die Methodik der HPLC mit seinem sehr schönen Erklärungsstil.

Außerdem danke ich ihm dafür, dass er immer Zeit für Fragen, Vorschläge und Diskussionen fand und für seine konstruktive Kritik sowie für die Fähigkeit, sich auch als langjähriger Profi immer noch in Studenten eindenken zu können.

Ich danke ebenfalls meiner Betreuerin Dr. Dagmar Heydeck für ihre freundliche Begleitung der einzelnen Schritte meiner praktischen Tätigkeit im Labor hinsichtlich der Koordination des Ablaufs und für ihre jederzeitige Ansprechbarkeit bei Problemen.

Weiterhin danke ich Sabine Stehling für die Vermittlung der Methoden, die bereitwillige Weitergabe ihres praktischen Erfahrungsschatzes und ihr immer offenes Ohr für studentische Probleme jeglicher Art.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Christoph Ufer für die Einführung in die Handhabung der FPLC und die vielen praktischen Kniffe bei der Umsetzung der Methodenvorschriften.

Auch bei Astrid Borchert möchte ich mich für ihre Unterstützung bedanken, die sehr gut und strukturiert erklären kann.

Tausend Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mir immer und vor allem während schwieriger Phasen Kraft gaben als Fels in der Brandung und Insel der Erholung.