

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Reaktionsspezifität ausgewählter pro- und eukaryotischer  
Lipoxygenasen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kateryna Goloshchapova  
aus Wowtschansk

Datum der Promotion: 4. März 2022

## **Vorwort**

Auszüge dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

- 1) Kutzner, L., **Goloshchapova, K.**, Heydeck, D., Stehling, S., Kuhn, H., & Schebb, N. H. (2017). Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(7), 666-675.
- 2) **Goloshchapova, K.**, Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., & Kuhn, H. (2018). Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. *MicrobiologyOpen*, e775.
- 3) Kutzner, L., **Goloshchapova, K.**, Rund, K. M., Jübermann, M., Blum, M., Rothe, M., Kirsch, S. F., Schunck, W. H., Kühn, H., & Schebb, N. H. (2020). Human lipoxygenase isoforms form complex patterns of double and triple oxygenated compounds from eicosapentaenoic acid. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1865(12), 158806.

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	2
Abbildungsverzeichnis .....	6
Tabellenverzeichnis .....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
Zusammenfassung .....	10
Abstract .....	11
1. Einleitung .....	13
1.1. Entdeckung der Lipoxygenasen und Interesse an ihrer Untersuchung .....	13
1.2. Struktur von Lipoxygenasen .....	14
1.3. Nomenklatur und Klassifikation der Lipoxygenasen .....	16
1.4. Lipoxygenasereaktion .....	17
1.4.1. Mechanismus der Fettsäuredioxygenierung .....	17
1.4.2. Determinanten der Positionsspezifität (Triadenkonzept) und der Enantioselektivität (Coffa-Determinante) .....	19
1.5. Lipoxygenasen im Tierreich .....	21
1.5.1. Verschiedene metabolische Wege der Wirkungsentfaltung .....	21
1.5.2. Säugetier-Lipoxygenasen und ihre enzymatischen Eigenschaften .....	25
1.5.3. Beteiligung der Lipoxygenasen an physiologischen und pathologischen Prozessen .....	27
1.6. Pflanzliche Lipoxygenasen: Vorkommen und biologische Funktionen .....	34
1.7. Bakterielle Lipoxygenasen: Einige Vertreter und mögliche Bedeutung .....	35
1.8. Ziele der Arbeit .....	36
2. Materialien .....	38
2.1. Chemikalien und Standards .....	38
2.2. Puffer, Lösungen und Nährmedien .....	39
2.3. Enzyme und Kits .....	40
2.4. Klonierungs- und Expressionsvektoren .....	40
2.5. <i>E. coli</i> Stämme .....	40
2.6. Primer .....	40
3. Methoden .....	41
3.1. Datenbankrecherchen und Sequenzalignments für <i>Myxococcus fulvus</i> Lipoxygenase .....	41
3.2. Klonierung der Lipoxygenase-cDNA in verschiedene Expressionsvektoren .....	42
3.3. Ortsgerichtete Mutagenese .....	43
3.4. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen .....	43
3.4.1. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen in <i>E. coli</i> .....	44
3.4.2. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen im Insektenzellsystem .....	45

3.4.3.	Expression der MF-LOX1 in HEK293-Zellen.....	45
3.5.	Reinigung, Entsalzung und Aufkonzentrierung von Proteinpräparationen.....	46
3.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	47
3.7.	Aktivitätsassays für rekombinante Lipoxygenasen .....	47
3.7.1.	PUFA-Oxygenierungsassays mit ALOX15-Orthologen.....	47
3.7.2.	EPA- und 18-HEPE-Oxygenierungsassays mit humanen Lipoxygenasen .....	48
3.8.	Enzymatische und proteinchemische Charakterisierung der MF-LOX1 .....	49
3.8.1.	Zeitabhängigkeit.....	49
3.8.2.	Temperatur- und pH-Abhängigkeit.....	49
3.8.3.	Substratspezifität und Produktstruktur .....	50
3.8.4.	Km-Wert.....	50
3.8.5.	Bestimmung des Eisengehaltes der MF-LOX1 .....	50
3.8.6.	Aktivitätsassays unter hyperoxischen Bedingungen .....	50
3.8.7.	Isoelektrische Fokussierung .....	51
3.8.8.	Membranoxygenierung .....	51
3.9.	Analytische Methoden.....	52
3.9.1.	Reverse- und Normal-Phasen-HPLC .....	52
3.9.2.	Chiral LC-MS/MS für die 18-HEPE-Analytik.....	53
3.10.	Computergestützte Analyse .....	53
4.	Ergebnisse .....	54
4.1.	Proteinchemische und enzymatische Charakterisierung von MF-LOX1 .....	54
4.1.1	Identifizierung potenzieller Lipoxygenasegene im Genom von <i>Myxococcus fulvus</i> ...	54
4.1.2.	Rekombinante Expression der MF-LOX1 .....	57
4.1.3.	Proteinchemische Charakterisierung der MF-LOX1 .....	60
4.1.4.	Enzymatische Charakterisierung der MF-LOX1 .....	63
4.1.5.	Mutanten der MF-LOX1 und ihre Eigenschaften .....	69
4.1.6.	Membranoxygenierungsaktivität der MF-LOX1 .....	71
4.2.	Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologe von Säugetieren mit verschiedenen PUFAs	72
4.2.1.	Reaktionsspezifität der humALOX15 mit ausgewählten $\omega$ -3- und $\omega$ -6-PUFAs .....	72
4.2.2.	Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs .	73
4.2.3.	Substratpräferenz von Säugetier-ALOX15-Orthologen.....	78
4.2.4.	Reaktionsspezifität der gibALOX15 .....	82
4.3.	Untersuchung der sekundären und tertiären Oxygenierungsprodukte der humanen Lipoxygenasen .....	84
4.3.1.	HEPEs als primäre Reaktionsprodukte der EPA-Oxygenierung durch humane ALOX-Paraloge.....	84
4.3.2.	Bildung von 18-HEPE als Präkursor für E-Serien-Resolvine durch die humALOX15 .....	87

5.	Diskussion.....	90
5.1.	Biologische Bedeutung der Lipoxygenase aus <i>Myxococcus fulvus</i> und ihr Vergleich mit bekannten bakteriellen Lipoxygenasen .....	90
5.1.1.	Das Vorkommen von Lipoxygenasegenen in der Bakteriengattung <i>Myxococcus</i> ..	90
5.1.2.	Geringer Eisengehalt und niedrige katalytische Aktivität der MF-LOX1 .....	93
5.1.3.	Mögliche biologische Bedeutung der Lipoxygenase für <i>Myxococcus fulvus</i> .....	94
5.1.4.	Substratpräferenz der MF-LOX1 und zelluläre Fettsäurekomposition von <i>Myxococcus fulvus</i> .....	97
5.2.	Produktmuster der ALOX-Isoformen von Säugetieren mit verschiedenen Substraten .	98
5.2.1.	Biologische Bedeutung der Positionsspezifität von Lipoxygenasen .....	98
5.2.2.	Biologische Bedeutung der Substratpräferenz von Lipoxygenasen für zellulären Stoffwechsel.....	101
5.2.3.	Produktmuster von ALOX15-Isoformen der höheren Primaten mit DHA.....	103
5.2.4.	Einfluss mehrerer PUFAs auf die Stereoselektivität der Lipoxygenasen .....	105
5.3.	Quantitative Untersuchungen der Produktmuster humaner Lipoxygenasen .....	107
5.3.1.	Produktmuster der humanen Lipoxygenasen mit EPA.....	107
5.3.2.	Bildung von 18-HEPE durch die humALOX15 .....	108
6.	Literaturverzeichnis .....	110
7.	Eidesstaatliche Erklärung.....	124
8.	Anteilsklärung.....	125
9.	Lebenslauf.....	127
10.	Publikationsliste .....	128
11.	Danksagung.....	129

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Aufbau der Lipoxygenasen am Beispiel der rabALOX15 .....	15
Abb. 2. Mechanismus einer Dioxygenase-Reaktion der LOXn.....	18
Abb. 3. Bildung von Eicosanoiden durch humane Lipoxygenasen .....	23
Abb. 4. Übersicht über die Stoffwechselwege der Säugetier-Lipoxygenasen .....	24
Abb. 5. Duales Aminosäurealignment der MF-LOX1 (WP_046712474.1) mit der MX-LOX2 (WP_011551854.1) .....	56
Abb. 6. Bakterielle Expression und Proteinreinigung der MF-LOX1 .....	58
Abb. 7. Eukaryotische Expression der rekombinanten MF-LOX1 in Sf9-Zellen.....	60
Abb. 8. Bestimmung des Molekulargewichtes der rekombinanten MF-LOX1 .....	61
Abb. 9. Isoelektrische Fokussierung des MF-LOX1-Fusionsproteins.....	62
Abb. 10. Substratspezifität der MF-LOX1 .....	64
Abb. 11. Hauptprodukte der durch MF-LOX1 katalysierten PUFA-Oxygenierung.....	65
Abb. 12. Enantioselektivität der durch MF-LOX1 gebildeten Produkte .....	66
Abb. 13. Bestimmung der Reaktionskinetik der MF-LOX1 mit EPA als Modelsubstrat.....	66
Abb. 14. Untersuchung der Sauerstoffaffinität der MF-LOX1 .....	67
Abb. 15. Bestimmung des pH-Optimums der durch MF-LOX1 katalysierten EPA-Oxygenierungsreaktion .....	68
Abb. 16. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit einer durch MF-LOX1 katalysierten EPA-Oxygenierung .....	69
Abb. 17. Reaktionsspezifität der humALOX15 mit C20- und C22-PUFAs (NP-HPLC).....	74
Abb. 18. Reaktionsspezifität einzelner LOX-Isoformen mit Octadeca-9Z,12Z-diensäure (LA) und Octadeca-6Z,9Z,12Z-triensäure (GLA) .....	75
Abb. 19. Die Substratpräferenz von ALOX15-Isoformen für C20- und C22-PUFAs.....	80
Abb. 20. Die Substratpräferenz der ALOX15-Isoformen für C18-PUFAs.....	82
Abb. 21. Die Produktbildung und der Substratverbrauch der durch die humanen ALOX-Isoformen katalysierten EPA-Oxygenierung.....	86
Abb. 22. Bildung von 18-HEPE durch humane ALOX-Isoformen .....	88
Abb. 23. Bildung von 18-HEPE bei der Inkubation humaner ALOX-Isoformen mit EPA.....	89
Abb. 24. Mögliche biologische Rollen der Lipoxygenase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	95
Abb. 25. Zwei mögliche Wege der Biosynthese von Resolvin D2.....	106

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Aminosäureidentitätsgrade der ALOX-Isoformen aus <i>Myxococcus fulvus</i> und <i>Myxococcus xanthus</i> in Prozent (%).....	57
Tab. 2. Eisengehalt der gereinigten rekombinanten MF-LOX1 und ihrer Sloane-Mutante .....	63
Tab. 3. Untersuchungen zur Membranoxygenierungsaktivität der MF-LOX1 .....	72
Tab. 4. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraensäure (AA) als Substrat .....	76
Tab. 5. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaensäure (EPA) als Substrat .....	77
Tab. 6. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaensäure (DHA) als Substrat .....	77
Tab. 7. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Octadeca-6Z,9Z,12Z-triensäure (GLA) als Substrat .....	78
Tab. 8. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit einzelnen Substraten sowie mit einer äquimolaren PUFA-Mischung .....	81
Tab. 9. Reaktionsspezifität der gibALOX15 mit verschiedenen PUFAs .....	83

## Abkürzungsverzeichnis

5-H(p)EPE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaensäure
5-H(p)ETE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-H(p)ETE	8-Hydro(pero)xy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
9-H(p)ODE	9-Hydro(pero)xy-10E,12Z-octadecadiensäure
11-H(p)ETE	11-hydro(pero)xy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraensäure
12-H(p)EPE	12-Hydro(pero)xy-5Z,7E,11Z,14Z,17Z-eicosapentaensäure
12-H(p)ETE	12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
13-H(p)ODE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadiensäure
13-H(p)OTrE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E,15Z-octadecatriensäure
14-H(p)DHA	14-Hydro(pero)xy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-docosahexaensäure
15-H(p)EPE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-eicosapentaensäure
15-H(p)ETE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
17-H(p)DHA	17-Hydro(pero)xy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaensäure
18-H(p)EPE	18-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaensäure
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ALA	Alpha-Linolensäure
ALOX5	Arachidonsäure 5-Lipoxygenase
ALOX 12	Arachidonsäure 12-Lipoxygenase
ALOX 12B	Arachidonsäure 12R-Lipoxygenase
ALOX15	Arachidonsäure 15-Lipoxygenase
ALOX15B	Arachidonsäure 15-Lipoxygenase-2
ALOXE3	Arachidonsäure Lipoxygenase 3
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
CA	Chloramphenicol
cDNA	Komplementäre DNA
chiALOX15	15-Lipoxygenase der Schimpanse
COX	Cyclooxygenase
CP-HPLC	Chiralphase-HPLC
Da	Dalton
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Eicosapentaensäure
Fe	Eisen
FLAP	5-Lipoxygenasen-Aktivierungsprotein
FS	Fettsäure
GLA	Gamma-Linolensäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSH	Glutathion
Hepoxilin A3	11R,12S-Epoxy-8-hydroxy-5Z,9E,14Z-octadecatriensäure
Hepoxilin B3	11R,12S-Epoxy-10-hydroxy-5Z,8Z,14Z-octadecatriensäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
humALOX15	5-Lipoxygenase des Menschen
humALOX12	12-Lipoxygenase des Menschen

humALOX12B	12R-Lipoxygenase des Menschen
humALOX15	15-Lipoxygenase des Menschen
humALOX15B	15-Lipoxygenase-2 des Menschen
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LA	Linolsäure
LB	lysogeny broth Medium
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie
LDL	„low density lipoprotein“ – Lipoprotein niederer Dichte
Lipoxin A4	5S,6R,15S-tri-Hydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraensäure
LTA4	5S-trans-5,6-oxido-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTB4	5S,12R-di-Hydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraenoic acid
LTC4	5S-Hydroxy-6R-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTD4	5S-Hydroxy-6R-(S-Zysteinylglyciny)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTE4	5S-Hydroxy-6R-(S-Zysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LOX(n)	Lipoxygenase(n)
M	Molar
macALOX15	15-Lipoxygenase des <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)
MeOH	Methanol
MF	Myxococcus fulvus
mouALOX15	15-Lipoxygenase der Maus
MX	Myxococcus xanthus
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NF- $\kappa$ B	nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells
OD	optische Dichte
opt	Optimum
PA	Pseudomonas aeruginosa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“phosphat buffered saline” – phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	“polymerase chain reaction” – Polymerasekettenreaktion
pigALOX15	15-Lipoxygenase des Schweins
ponALOX15	15-Lipoxygenase des Organs-Utans
PPAR $\gamma$	Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PUFA	“polyunsaturated fatty acids” – mehrfach ungesättigte Fettsäuren
rabALOX15	15-Lipoxygenase des Kaninchens
ratALOX15	15-Lipoxygenase der Ratte
Resolvin D2	7S,16R,17S-tri-Hydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaensäure
Resolvin D5	7S,17S-di-Hydroxy-4Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-docosahexaensäure
RP-HPLC	“reversed phase HPLC” – Umkehrphasen-HPLC
rpm	“revolutions per minute” – Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	“super optimal broth with catabolite repression”
SP-HPLC	“straight-phase HPLC” – Normalphasen-HPLC
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
Zsfg.	Zusammenfassung

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Lipoxygenasen (ALOXn) bilden eine Klasse Nichthämeisen-haltiger lipidperoxidierender Enzyme. Im Gegensatz zu bakteriellen ALOXn, deren biologische Bedeutung noch weitgehend unklar ist, wurde die funktionelle Relevanz der Säugetierenzyme für die Zellreifungs- und Differenzierungsprozesse sowie für die Entzündungsreaktion eingehend untersucht. Die Reaktionsspezifität dieser Enzyme ist für die biologische Bedeutung der Lipoxygenasen relevant. Die vorliegende Dissertation setzt sich mit den strukturellen Grundlagen der Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen auseinander. Sie besteht aus drei Teilprojekten, die thematisch miteinander verknüpft sind: 1. Suche nach neuen bakteriellen ALOX-Isoformen und deren funktionelle Charakterisierung. 2. Untersuchung der Reaktionsspezifität ausgewählter Säugetier-ALOX-Isoformen mit verschiedenen Polyenfettsäuren. 3. Untersuchungen zu der Fähigkeit der humALOX15, 18-HEPE aus EPA zu bilden.

**Methodik:** Die ausgewählten ALOX-Isoformen wurden als N-terminale His-Tag Fusionsproteine rekombinant in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert und wenn erforderlich mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die katalytische Funktion der so hergestellten Enzympräparate wurde anschließend in Aktivitätsassays quantifiziert. Das Muster der Oxygenierungsprodukte (Einfach- und Mehrfachoxygenierung) verschiedener Polyenfettsäuren konnte mithilfe der Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert werden.

**Ergebnisse:** Mit einer mehrstufigen Suchstrategie wurden die öffentlichen Proteindatenbanken nach potenziellen bakteriellen Lipoxygenase-Sequenzen durchsucht. Dabei konnte im Genom des *Myxococcus fulvus* eine bisher nicht beschriebene ALOX-Isoform identifiziert werden. Dieses Enzym wurde anschließend in *E. coli* exprimiert und hinsichtlich seiner proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei wurde die *M. fulvus* Lipoxygenase als Arachidonsäure 12-lipoxygenierendes Enzym identifiziert. Bei der Analyse der Reaktionsprodukte der humanen Lipoxygenasen mit unterschiedlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren ergaben sich bemerkenswerte Unterschiede in der Reaktionsspezifität dieser Enzyme mit verschiedenen Polyenfettsäuren, die eine Neuinterpretation bisheriger Literaturdaten erforderlich machen. Die humane ALOX15 kann Eicosapentaensäure in geringem Ausmaß (1 %) zu 18-HEPE umwandeln, wobei bevorzugt das S-Enantiomer gebildet wird. Ob diese katalytische Aktivität für die *in vivo* Bildung von Resolvinen bedeutsam ist, muss in separaten Tierexperimenten geprüft werden.

**Schlussfolgerung:** Das Bakterium *M. fulvus* gehört zu den wenigen bakteriellen Spezies, deren Genome funktionelle ALOX-Gene enthalten. Eines dieser Gene kodiert für eine Arachidonsäure 12-lipoxygenierende ALOX-Isoform, deren biologische Funktion in weiterführenden Arbeiten näher charakterisiert werden soll. Die Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX-Isoformen mit höher ungesättigten Fettsäuren folgt ähnlichen Regeln wie die Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung. Sie kann jedoch nicht eins zu eins aus dem Muster der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte abgeleitet werden, sondern muss für jede Enzym-Substrat-Kombination experimentell bestimmt werden.

## Abstract

**Introduction:** Lipoxygenases (ALOXs) form a class of nonheme-iron containing lipid peroxidizing enzymes. In contrast to bacterial ALOXs, the biological significance of which are still unknown, mammalian ALOX isoforms have been implicated in maturation, differentiation and inflammation. The reaction specificity of these enzymes is important for their biological roles. This dissertation explores the structural basis of the reaction specificity of different ALOX isoforms. It consists of three sub-projects that are thematically linked: 1. Search for new bacterial ALOX isoforms and their functional characterization. 2. Investigation of the reaction specificity of selected mammalian ALOX isoforms with various polyenoic fatty acids. 3. Studies on the ability of humALOX15 to form 18-HEPE from eicosapentaenoic acid.

**Methodology:** For functional characterization selected ALOX isoforms were recombinantly expressed as N-terminal His-Tag fusion proteins in pro- and eukaryotic expression systems. Their functionality was characterized by *in vitro* activity assays and the pattern of their oxygenation products of various polyenoic fatty acids was analysed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS /MS).

**Results:** The publicly available databases were screened for potential bacterial ALOX sequences using a multi-step searching strategy. A previously unknown ALOX isoform was identified in the genome of *Myxococcus fulvus*. This enzyme was recombinantly expressed in *E. coli* and characterized with respect to its protein chemical and enzymatic properties. The *M. fulvus* lipoxygenase constitutes an arachidonic acid 12-lipoxygenating enzyme. Comparison of the oxygenation products synthesized from different polyenoic fatty acids by mammalian ALOX isoforms disclosed remarkable differences in the reaction specificity of individual ALOX isoforms and these results require reinterpretation of previous literature data. Human ALOX15 oxygenates eicosapentaenoic acid to 18-HEPE with low efficiency (1%) and preferential formation of the

corresponding S-enantiomer was observed. It remains to be explored of whether this catalytic activity is relevant of *in vivo* resolvin formation.

**Conclusions:** *M. fulvus* is one of the few bacterial species whose genomes contain functional ALOX genes. One of these genes encodes for an arachidonic acid 12-lipoxygenating ALOX isoform, the biological relevance of which will be explored in subsequent studies. The reaction specificity of mammalian ALOX isoforms with higher unsaturated fatty acids follows similar rules as the reaction specificity of arachidonic acid oxygenation. However, the specificity depends on the chemical structure of the substrate fatty acid and cannot directly be concluded from the specificity of arachidonic acid oxygenation. It must be determined experimentally for each enzyme-substrate combination.

## 1. Einleitung

### 1.1. Entdeckung der Lipoxygenasen und Interesse an ihrer Untersuchung

Die ersten Vertreter der Lipoxygenasefamilie wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts aus dem Sojamehl isoliert [1]. Sie wurden zunächst unter dem Namen „Lipoxidasen“ bekannt. Die Entdeckung tierischer Lipoxygenasen erfolgte erst mehrere Dekaden später [2]. In diesen Experimenten zeigten die Autoren, dass menschliche Thrombozyten in der Lage sind, exogen angebotene Arachidonsäure *in vitro* zu 12-Hydroxyarachidonsäure umzuwandeln. Aus diesen Daten schlussfolgerten die Autoren auf die Anwesenheit eines Fettsäure-oxygenierenden Enzyms in Blutplättchen, das später als zellspezifische Lipoxygenase identifiziert wurde [3]. Das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung dieser Enzymfamilie reicht über die gesamte Breite der Naturwissenschaften – vom rein akademischen Interesse bis zur Applikation des Wissens in der Lebensmittelindustrie und Medizin. Während die Sojabohnen-Lipoxygenasen von wirtschaftlicher Bedeutung sind [4], werden die tierischen Isoformen wegen ihrer Beteiligung an physiologischen und pathologischen Prozessen untersucht. Wegen ihrer Rolle bei der Pathogenese inflammatorischer [5], hyperproliferativer [6] und neurologischer [7] Erkrankungen können sie einen möglichen Angriffspunkt für deren Pharmakotherapie darstellen. Besondere Aufmerksamkeit in der Medizin erlangte diese Enzymfamilie nach der Strukturidentifizierung von Leukotrienen, die funktionell als „slow reacting substance of anaphylaxis“ beschrieben wurden [8]. Es konnte gezeigt werden, dass Leukotriene durch die katalytische Aktivität der ALOX5 (5-Lipoxygenase) gebildet werden [9]. Diese Erkenntnis initiierte die Suche nach spezifischen ALOX5-Hemmstoffen bzw. Leukotrienrezeptorantagonisten, die in der Folge als verschreibungspflichtige Medikamente gegen Asthma bronchiale zugelassen wurden [10, 11].

Die meisten tierischen Lipoxygenasen sind Nichthämeisen-haltige Dioxygenasen, die eine positions- und stereospezifische Oxygenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) zu Hydroperoxyfettsäuren katalysieren [12]. Außer Lipoxygenasen sind auch Cyclooxygenasen und verschiedene Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen zur PUFA-Oxygenierung fähig [13]. Das menschliche Genom enthält sechs funktionelle Lipoxygenasegene (*ALOX15*, *ALOX12*, *ALOX5*, *ALOX15B*, *ALOX12B*, *ALOXE3*), die u.a. in weißen Blutzellen exprimiert werden. Bei höheren Pflanzen und Tieren kommen Lipoxygenasen weit verbreitet vor. Bei niederen Lebewesen sind diese Enzyme weniger weit verbreitet und wurden in Bakterien nur sporadisch nachgewiesen [14, 15]. Obwohl die biologische Bedeutung bakterieller Lipoxygenasen noch weitgehend unbekannt ist, kann deren Untersuchung bei der Beantwortung von Fragen zur molekularen Evolution dieser Enzyme behilflich sein. Weiterhin kann die Untersuchung bakterieller Lipoxygenase wesentlich dazu beitragen, den Reaktionsmechanismus dieser Enzyme genauer zu

beschreiben und die molekularen Ursachen für wichtige katalytische Eigenschaften dieser Enzyme (z.B. Peroxidaktivierung, Substrataffinität, Reaktionsspezifität u.A.) aufzuklären.

## 1.2. Struktur von Lipoxygenasen

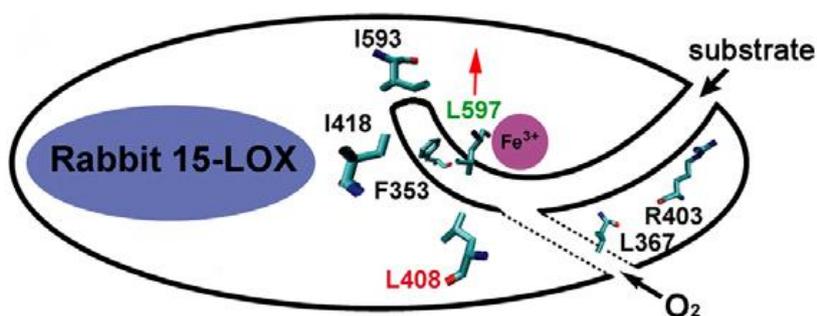
Lipoxygenasen sind monomere Proteine, die aus einer Polypeptidkette von 650 bis 900 Aminosäureresten bestehen. In Cyanobakterien und Korallen werden Fusionsproteine exprimiert, die aus einer N-terminalen Peroxidasedomäne und einer C-terminalen Lipoxygenasedomäne zusammengesetzt sind [16, 17]. Durch Röntgenkristallstrukturanalysen [18-21], Molekulardynamiksimulationen, Fluoreszenzspektroskopie und zahlreiche Mutationsuntersuchungen wurden die molekularen Strukturen mehrerer Lipoxygenasen aufgeklärt und die Forschungsergebnisse wurden in theoretischen Konzepten zusammengefasst, die verschiedene Aspekte der Lipoxygenasereaktion (z.B. Substratbindung, Mechanismus der Wasserstoffabstraktion und der Sauerstoffinsertion, Reaktionsspezifität u.A.) erklären.

Die meisten eukaryotischen Lipoxygenasen (außer Fusionsproteine) bestehen aus zwei abgrenzbaren Domänen. Die N-terminale Domäne ist ca. 120 Aminosäuren lang und besteht überwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern [19]. Sie weist strukturelle Ähnlichkeit zur Membranbindungsdomäne anderer Proteine auf und wird deswegen auch als PLAT(Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin)-Domäne bezeichnet [22]. Einige ALOX-Isoformen (ALOX5) enthalten spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen, die für deren Membranbindungsfähigkeit verantwortlich gemacht wurden. Die Bindung der Lipoxygenasen an Biomembranen moduliert ihre katalytischen Eigenschaften [23], weshalb angenommen wurde, dass die N-terminale Domäne auch regulatorische Funktionen besitzt. Die C-terminale Domäne besteht überwiegend aus  $\alpha$ -Helices und enthält in der Substratbindungstasche das katalytisch aktive Nicht-Hämeisenion. In Lipoxygenasen bestimmter Pilze ist anstatt eines Eisenions ein Manganion koordiniert und übernimmt die katalytische Funktion des Übergangsmetalls [24]. Die räumliche Anordnung der  $\alpha$ -Helices innerhalb der C-terminalen katalytischen Domäne ist bis auf zwei Helices, welche die Substratbindungstasche begrenzen, gut zwischen den Lipoxygenasen verschiedener Spezies konserviert [25]. Das Eisen- bzw. Manganion ist in einer oktahedralen Ligandensphäre koordinativ mit dem Protein verbunden. [18]. Die Eisenligandensphäre besteht aus fünf Aminosäuren (entweder vier Histidine und die Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure oder 3 Histidine, ein Asparagin und die Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure). Als sechster Ligand fungiert ein Wassermolekül bzw. ein OH-Ion, das bei Substratbindung direkt mit dem Substratmolekül interagiert. Die ligandierenden Aminosäuren der Übergangsmetalle (Eisen, Mangan) sind bei allen

Lipoxygenasen hochgradig konserviert und können zur Identifizierung von ALOX-Sequenzen in den Genomen verschiedener Lebensformen verwendet werden.

Bei den meisten ALOX-Isoformen ist die Substratbindungstasche ein U-förmiger Hohlraum, an dessen Basis sich das koordinierte Eisenion befindet. Die Fettsäure wird in der Substratbindungstasche überwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert [25], wobei auch ionische Wechselwirkungen von positiv geladenen Aminosäuren mit der Carboxygruppe der Substratfettsäure und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen von aromatischen Aminosäuren mit den Doppelbindungen der Substratfettsäure bedeutsam sein könnten.

Für 12- und 15-lipoxygenierende ALOX-Isoformen tritt die Fettsäure mit ihrem Methylende in die Substratbindungstasche ein und die negative Ladung ihrer Carboxygruppe wird durch eine positiv geladene Aminosäure (Arginin, Lysin) „neutralisiert“. Für andere Lipoxygenasen wird jedoch auch eine inverse Substratorientierung beschrieben [26]. Bei der rabALOX15 kommt es offenbar im Rahmen der Substratbindung zu einer Konformationsänderung, bei der sich die räumliche Lage bestimmter Helices zueinander verändert [27]. Bei den ALOX15-Orthologen der meisten Säugetiere wird die Tiefe der Substratbindungstasche durch die Größe der Seitenketten von vier Aminosäuren (F353, I418+M419 und I593) bestimmt, die sich am Boden der Bindungstasche befinden. An der Basis der U-förmigen Tasche gegenüber dem koordinierten Eisenion liegt bei manchen Lipoxygenasen noch eine weitere Öffnung, die als Zugangsweg für das Sauerstoffmolekül dienen könnte. In **Abb. 1** ist die schematische Struktur der rabALOX15 mit einigen charakteristischen Aminosäuren dargestellt.



**Abb. 1. Aufbau der Lipoxygenasen am Beispiel der rabALOX15** [modifiziert nach Ivanov, et al. 2010 [27]]. Die Substratbindungstasche ist ein U-förmiger Hohlraum, in dem die Fettsäure mithilfe der hydrophoben Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten zur elektrophilen Attacke durch  $\text{Fe}^{3+}$  positioniert wird. An der Basis dieses Hohlraums befindet sich das oktaedral koordinierte Eisenion. Die Öffnung für den Sauerstoffzugangskanal endet an der gegenüberliegenden Seite der Substratbindungstasche und wird durch die Aminosäure L367 begrenzt. F353, I418 und I593 (Positions determinanten, siehe **Kapitel 1.4.2**) legen die Tiefe der Substratbindungstasche fest. Das Arginin-403 (R403) könnte mit der Carboxygruppe der Substratfettsäure interagieren.

Lipoxygenasen können sowohl als Monomere als auch als kovalente bzw. nicht-kovalente Dimere vorliegen [3, 28]. Dabei wird die quartäre Proteinform von vielen Bedingungen wie Proteinkonzentration [29],  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [30] und Membranbindung [28] reguliert. Es gibt Hinweise darauf, dass innerhalb eines LOX-Dimers beide Monomeren katalytisch aktiv sein können [28]. Eine nicht-kovalente Dimerstruktur könnte eine Ursache für den allosterischen Charakter verschiedener ALOX-Isoformen sein [31].

### **1.3. Nomenklatur und Klassifikation der Lipoxygenasen**

Die ersten entdeckten und charakterisierten tierischen Lipoxygenasen wurden entsprechend ihrer Positionsspezifitäten der Arachidonsäureoxygenierung bezeichnet. Demzufolge wurde die Lipoxygenase, die AA am Kohlenstoffatom-15 oxygeniert, als 15-Lipoxygenase (15-LOX) zu bezeichnen. Weil innerhalb eines Organismus mehrere Lipoxygenasen mit gleicher Produktspezifität existieren, erfolgte bei diesen LOXn zusätzlich die Angabe des Ortes der Erstisolierung. So teilte man die Säugetier-12-Lipoxygenasen in eine Leukozytentyp- und Thrombozytentyp-Form ein [32]. Mit der steigenden Anzahl an beschriebenen LOXn wurden Untersuchungen zur Evolution dieser Enzyme möglich. Dementsprechend konnten die Lipoxygenasen nun anhand ihrer Sequenzähnlichkeit zu den menschlichen ALOX-Isoformen klassifiziert werden [33]. Die sequenzbasierte Klassifizierungsmethode war wegen der hohen Homologiegrade der verschiedenen ALOX-Orthologe von Säugetierenzymen leicht möglich. Für jedes der sechs verschiedenen humanen ALOX-Paraloga (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOX5 und ALOXE3) wurde ein orthologes Enzym bei der Maus (Alox15, Alox15b, Alox12, Alox12b, Alox5, Alox3) gefunden. In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass nicht alle orthologen ALOX-Isoformen des Menschen und der Maus die gleiche Reaktionsspezifität aufweisen. Die AA 15-lipoxygenierende ALOX15 des Menschen (humALOX15) ist bei der Maus ein AA 12-lipoxygenierendes Enzym (mouAlox15). Weiterhin ist die AA 15-lipoxygenierende ALOX15B des Menschen bei der Maus eine AA 8-Lipoxygenase (Alox15b). Aufgrund der begrenzten Sequenzhomologie von ALOX-Isoformen aus evolutionär weit entfernten Spezies kann das sequenzbasierte Konzept nur dann angewendet werden, wenn bei den Sequenzvergleichen einer unbekanntes ALOX-Isoform mit den humanen ALOX-Paralogen deutlich unterschiedliche Grade an Sequenzhomologien festgestellt werden können. Allerdings weisen z.B. bakterielle ALOX-Isoformen einen ähnlich hohen Grad an Sequenzhomologie mit allen humanen oder auch murinen ALOX-Paralogen auf. Damit kann z.B. nicht sicher entschieden werden, ob eine bestimmte bakterielle ALOX-Isoform als ALOX15 oder ALOX15B klassifiziert werden sollte. Innerhalb der Gattung der Säugetiere ist dieser

Nachteil jedoch kaum relevant.

Pflanzliche Lipoxygenasen werden ebenfalls nach ihren Positionsspezifitäten (in diesem Fall aber der LA-Oxygenierung) sowie nach ihrer Phylogenese, aber auch nach ihrem pH-Optimum [34] oder ihrer subzellulären Lokalisation [35] eingeteilt. Es konnte bisher somit keine allgemeingültige LOX-Systematik entwickelt werden, weswegen auch heute noch die sequenz- und spezifitätsbasierte Klassifikationssysteme parallel verwendet werden.

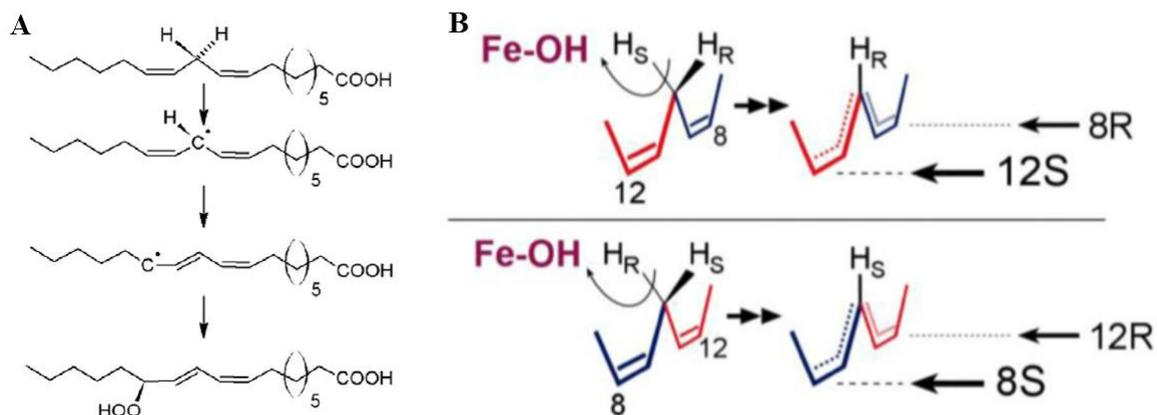
## **1.4. Lipoxygenasereaktion**

### **1.4.1. Mechanismus der Fettsäuredioxygenierung**

Lipoxygenasen katalysieren die positions- und stereospezifische Dioxygenierung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die entweder als freie Fettsäuren oder verestert in Phospholipiden oder anderen Esterlipiden vorliegen. Der molekulare Angriffspunkt bei dieser Oxygenierungsreaktion ist im Regelfall das 1,4-Pentadiensystem, das alle Polyenfettsäuren in einer oder mehreren Kopien enthalten. Das typische Substrat für pflanzliche LOXn ist die Linolsäure (zwei Kohlenstoffdoppelbindungen und damit ein resultierendes 1,4-Pentadienmotiv). Für tierische Enzyme fungiert neben der Linolsäure (LA) die Arachidonsäure (vier Kohlenstoffdoppelbindungen und damit drei resultierende 1,4-Pentadienmotive) als dominantes ALOX-Substrat. Der erste und geschwindigkeitslimitierende Schritt der Dioxygenierungsreaktion ist eine stereoselektive Wasserstoffabstraktion (pro-S- oder pro-R-Wasserstoffatom) von einem bisallylischen Kohlenstoffatom durch einen aktivierten ALOX-Fe<sup>3+</sup>-OH<sup>-</sup>-Komplex [36]. Bei dieser H-Abstraktion kommt es zur Protonübertragung (Protonentunneling) auf die Hydroxygruppe, die am Eisenion gebunden ist, und zur Elektronübertragung (Elektronentunneling) auf das Eisenion, was zu einer Reduktion (ALOX-Fe<sup>3+</sup> + e<sup>-</sup> → ALOX-Fe<sup>2+</sup>) des Enzymeisens führt. Dabei entsteht vorübergehend eine kovalente Bindung zwischen dem Sauerstoff der koordinativ gebundenen Hydroxygruppe und dem zu abstrahierenden H-Atom [37]. Das durch die Wasserstoffabstraktion aus der Fettsäure entstehende Fettsäureradikal enthält ein radikalisches Elektron, das über das gesamte Pentadiensystem delokalisiert ist. Durch eine Umlagerung der Kohlenstoffdoppelbindungen wird eine Sauerstoffinsertion einem Kohlenstoffatom möglich, das zwei Kohlenstoffatome vom Ort der Wasserstoffabstraktion entfernt liegt. Dabei kann sich der Ort der Sauerstoffinsertion in Richtung des Methylendes oder in Richtung des Carboxyendes der Fettsäure befinden. Durch die Sauerstoffinsertion kommt es zur Bildung eines Peroxyradikals. Hinsichtlich seiner Stereochemie erfolgt die Sauerstoffinsertion auf der gegenüberliegenden Seite des Pentadiensystems, von der Wasserstoff abstrahiert wurde. Am Ende des katalytischen Zyklus findet die Übertragung eines Protons und eines Elektrons statt. Das

Elektron wird dabei auf das Peroxyradikal übertragen, wobei ein Peroxyanion entsteht. Das Proton wird dann vom am Eisen gebundenen Wassermolekül auf das Peroxyanion übertragen, wodurch das Fettsäureperoxid entsteht. Dabei wird die katalytisch inaktive ALOX-Fe<sup>2+</sup>-Form in die aktive ALOX-Fe<sup>3+</sup>-Form überführt (Fe<sup>2+</sup>-OH<sub>2</sub> → Fe<sup>3+</sup>-OH<sup>•</sup>). Die Teilschritte der Dioxygenasereaktion sind in der **Abb. 2A** dargestellt.

Da Linolsäure (C18:2) nur ein 1,4-Pentadienmotiv besitzt, ist die Wasserstoffabstraktion nur von einem Kohlenstoffatom (C11) möglich. Untersuchungen mit stereospezifisch markierten Linolsäurederivaten, bei denen entweder das proS- bzw. proR-Wasserstoffatom am Kohlenstoff-11 der Linolsäure durch ein Deuterium oder Tritium ersetzt wurde, zeigten, dass bei der Abstraktion des proS-Wasserstoffs Sauerstoff nur an der 13S- oder 9R-Position eingeführt wird, was zur Bildung von 13S- bzw. 9R-HpODE führt [38, 39]. Nach einer proR-Wasserstoffabstraktion am C11 kommt es dementsprechend zur Bildung von 13R- bzw. 9S-HpODE (**Abb. 2B**).



**Abb. 2. Mechanismus einer Dioxygenase-Reaktion der LOXn.** **A)** Teilreaktionen der Dioxygenase-Reaktion [modifiziert nach Andreou und Feussner 2009 [40]]. Der erste Teilschritt der Reaktion ist die stereo- und positionsspezifische Wasserstoffabstraktion von einem bisallylischen Methylen (1,4-Pentadien). Ihr folgt eine Umlagerung der Kohlenstoffdoppelbindungen. Am Ende wird an einem Kohlenstoffatom, das zwei Positionen vom Ort der H-Abstraktion entfernt liegt, eine Einführung von molekularem Sauerstoff katalysiert. **B)** Schematische Darstellung eines 1,4-Pentadiens zur Erklärung der Positions- und Stereospezifität der Lipoxygenasen [aus Neau et al., 2009 [41]]. Es ist ein C-10 bisallylisches Methylen der Arachidonsäure, in dessen Nähe der aktivierte Eisenkomplex (Fe<sup>3+</sup>-OH<sup>•</sup>) positioniert wird, dargestellt. Das Pentadien ist in zwei verschiedenen Richtungen (Carboxygruppe bzw. Methylgruppe zuerst) angeordnet. Dieses ermöglicht dem Eisenkomplex den Zugang entweder zu einem proS- oder proR-Wasserstoff (H<sub>S</sub> bzw. H<sub>R</sub>). Bei einer H<sub>S</sub>-Abstraktion ist die Sauerstoffefführung entweder an der 8R- oder 12S-Position möglich. Umgekehrt resultieren nach einer H<sub>R</sub>-Abstraktion 8S- oder 12R-Hydroperoxide.

Das bedeutet, dass die Wasserstoffabstraktion und die Sauerstoffinsertion von entgegengesetzten Seiten der Ebene erfolgt, die durch die Doppelbindungen der Fettsäure determiniert wird. Dieses

Konzept wird als antarafacialer Charakter der LOX-Reaktion bezeichnet. Welches der Wasserstoffatome (proR oder proS) vom Kohlenstoffatom-11 der Linolsäure abstrahiert wird, hängt von der Orientierung des Substrates in der Substratbindungstasche ab [42]. Wenn die Fettsäure in die Substratbindungstasche mit ihrem Methylende zuerst eintritt, wird meist eine proS-Wasserstoffabstraktion katalysiert. Die inverse Orientierung der Fettsäure, bei der ihre Carboxygruppe am Boden der Substratbindungstasche liegt, führt zu einer proR-Wasserstoffabstraktion. Diesem Konzept zufolge können bei der Reaktion der Lipoxygenase mit der Linolsäure vier verschiedene Produkte (9R-, 9S-, 13S- und 13R-HpODE) gebildet werden, während bei der Arachidonsäureoxygenierung 12 verschiedene Produkte (5-, 8-, 9-, 11-, 12- und 15-HpETE mit jeweiligen S- und R-Enantiomeren) entstehen können. Tatsächlich wurde bisher die Bildung von drei LA- und zehn AA-Monooxygenierungsprodukten durch ALOX-Isoformen beschrieben [25].

#### **1.4.2. Determinanten der Positionsspezifität (Triadenkonzept) und der Enantioselectivität (Coffa-Determinante)**

Aus der Beschreibung des Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen ist zu entnehmen, dass die Position der Fettsäureoxygenierung von der Orientierung des Substrates in der Substratbindungstasche abhängt (**Kapitel 1.4.1**). Demzufolge könnten ausgehend von der Wasserstoffabstraktion von einem Kohlenstoffatom vier Produkte entstehen, wobei entsprechend des antarafacialen Charakters der Lipoxygenasereaktion die Stereochemie der Produkte durch die Stereoselektivität der initialen Wasserstoffabstraktion festgelegt wird (**Abb. 2B**). Damit ist aber immer noch die Frage nicht geklärt, wovon die Position der Sauerstoffeinführung (zwei Positionen methyl- oder carboxylwärts von der initialen H-Abstraktion entfernt) abhängt. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener LOXn wurde eine Aminosäure entdeckt, die die Präferenz der Sauerstoffeinführung an einem [+2]-Kohlenstoffatom gegenüber der Sauerstoffeinführung an einem [-2]-Kohlenstoffatom (oder umgekehrt) teilweise erklärt. Bei einer großen Anzahl von S-LOXn findet man an der kritischen Stelle der Primärstruktur ein Alanin, bei den meisten R-LOXn ein Glycin. Bei den Alanin-zu-Glycin- bzw. Glycin-zu-Alanin-Mutanten können die Positions- und Stereospezifität des Reaktionsproduktes verändert werden, indem die Position der Sauerstoffeinführung geändert wird. Bei den Alanin-zu-Glycin-Mutanten ausgewählter S-LOXn (z.B. muriner AA 8S-lipoxygenierender Alox15B und humaner AA 15S-lipoxygenierender ALOX15B) verändert sich das Produktmuster zu einer Mischung aus 8S- und 12R-HpETE (murine Alox15b) bzw. 11R- und 15S-HpETE (humane ALOX15B) [42]. Zur Erklärung dieser Beobachtungen wurde die Größe der kritischen Aminosäureseitenkette (Alanin

vs. Glycin) herangezogen. In einem Strukturmodell der 8-lipoxygenierenden murinen Alox15b befindet sich das kritische Alanin in direkter Nachbarschaft des Kohlenstoffatoms-12. Diese Anordnung der Substratfettsäure im Enzym-Substrat-Komplex könnte dazu führen, dass das Sauerstoffmolekül aus sterischen Gründen nicht am Kohlenstoffatom-12 eingebaut werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Einführung von molekularem Sauerstoff am Kohlenstoffatom-8 möglich. Das kleinere Glycin der Alanin-zu-Glycin-Mutante der murinen Alox15b macht dem Sauerstoffmolekül den Weg zum Kohlenstoffatom-12 frei, sodass es bei der Reaktion dieser Enzymmutante mit AA zu einer Produktmischung aus 12R- und 8S-HpETE kommt. Allerdings ist das Coffa-Konzept nur auf ausgewählte LOXn anwendbar.

Arachidonsäure besitzt drei bisallylische Methylene, sodass die Wasserstoffabstraktion an drei unterschiedlichen Kohlenstoffatomen möglich ist. Die ALOX15 des Menschen bildet bei der Reaktion mit AA zwei unterschiedliche chirale Reaktionsprodukte (12S-HpETE und 15S-HpETE) in einem Verhältnis von 1:10. Dieses Produktmuster deutet darauf hin, dass eine Wasserstoffabstraktion vom C10 (12S-HETE Bildung) und vom C13 (15S-HETE Bildung) durch das Enzym katalysiert wird. Bei diesem Enzym müsste das katalytisch aktive Nichteisen in räumlicher Nähe von zwei verschiedenen bisallylständigen Kohlenstoffatomen liegen, was unterschiedliche Positionierungen der Fettsäure in der Substratbindungstasche voraussetzt.

Bereits bevor direkte Daten zur Raumstruktur von Lipoxygenase vorlagen, konnte durch Untersuchungen mit Arachidonsäurederivaten, bei denen die Doppelbindungen der Fettsäure in Richtung des Methylendes verschoben waren, gezeigt werden, dass die Reaktionsspezifität dieser Enzyme keine absolute Enzymeigenschaft ist, sondern von der Struktur des Substrates und damit von der Enzym-Substrat-Interaktion abhängt [43]. Anschließende Mutageneseuntersuchungen an verschiedenen ALOX-Isoformen zeigten, dass nicht nur eine Veränderung der Substratstruktur zu einer veränderten Reaktionsspezifität führt, sondern dass auch der gezielte Austausch bestimmter Aminosäuren ähnliche Veränderungen induziert [44-46]. Die durch diese Mutageneseuntersuchungen identifizierten Aminosäuren wurden nach ihren Erstbeschreibern als Sloane- (Ile418), Borngräber-I-(Phe353) und Borngräber-II-Determinanten (Ile593) bezeichnet. Diese Determinanten wurden zunächst für die humane bzw. Kaninchen-ALOX15 identifiziert und das zugrunde liegende Konzept wurde als Triaden-Konzept bezeichnet. Später konnte gezeigt werden, dass Mutationen der Triadendeterminanten einer großen Anzahl von Säugetier-ALOX15-Orthologen die Reaktionsspezifität der Enzyme verändert. Das Triadenmodell ist für alle bisher getesteten Säugetier-ALOX15-, ALOX12- und ALOX5-Orthologe gültig [47, 48]. Nicht angewendet werden kann dieses Konzept auf ALOX15B- und ALOX12B-Orthologe [48].

Zusammengenommen wird die Positions- und Stereospezifität der durch LOXn katalysierten Reaktion durch die Orientierung des Substrats in der Substratbindungstasche bestimmt.

## 1.5. Lipoxygenasen im Tierreich

### 1.5.1. Verschiedene metabolische Wege der Wirkungsentfaltung

#### 1.5.1.1. Lipoxygenasen und Oxylipine

Die Gesamtheit aller Oxidationsprodukte von PUFAs wird unter dem Begriff „Oxylipine“ zusammenfasst [49]. In tierischen Zellen stellen die Eicosanoide (Produkte der AA-Oxygenierung) eine Teilmenge der Oxylipine dar. In Tieren kann die Initiierung der Oxylipin-Stoffwechselwege durch Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen (COXn) oder Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen katalysiert werden, während bei Pflanzen auch andere Enzyme an der Biosynthese der Oxylipine beteiligt sind [15, 50]. Die biologische Wirkung der Prostaglandine, die ausgehend von der Arachidonsäure durch COXn gebildet werden, ist seit langer Zeit bekannt. COX-Hemmstoffe werden als Arzneimittel bei der Therapie entzündlicher und thrombotischer Erkrankungen eingesetzt [51].

Alle LOX- und COX-Isoformen bevorzugen freie PUFAs als Substrate. Deshalb muss die Initiierung der Eicosanoidbiosynthese zunächst mit der Freisetzung von AA aus Membranphospholipiden beginnen. Diese Reaktion wird durch die Phospholipase A2 katalysiert. Die Phospholipase A2 setzt die Fettsäuren als Antwort auf Zellstimulation aus Membranphospholipiden frei [52]. Danach entsteht eine große Anzahl unterschiedlicher PUFA-Oxygenierungsprodukte und die Vielzahl dieser Produkte wird u.a. durch die unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften verschiedener ALOX-Isoformen bestimmt. In allen Fällen werden dabei die PUFAs zu Hydroperoxy-PUFAs oxygeniert. Diese reaktiven Primärprodukte werden dann entweder durch Glutathionperoxidasen zu entsprechenden Alkoholen reduziert oder zu Sekundärprodukten (durch Hydroperoxidisomerase-Aktivität von ALOX) umgesetzt, die zum weit gefächerten Produktmuster von ALOX-Isoformen beitragen. Abgesehen von der Monooxygenierung freier Polyenfettsäuren können ALOX-Isoformen auch Doppel- und Tripleoxygenierungsreaktionen sowie die Synthese von Leukotrienen (Leukotriensynthaseaktivität) katalysieren [40]. Im Folgenden werden einige der wichtigsten Sekundärprodukte, die durch enzymatische Aktivität tierischer Lipoxygenasen entstehen, näher erläutert (**Abb. 3**).

**Leukotriene.** Die pro-inflammatorische und bronchokonstriktorische Wirkung von Leukotrienen ist seit langer Zeit bekannt und dieses Erkenntnis wurde bereits pharmakologisch bei der Therapie des Asthma bronchiale mit Leukotrienrezeptor-Antagonisten ausgenutzt. Außerdem

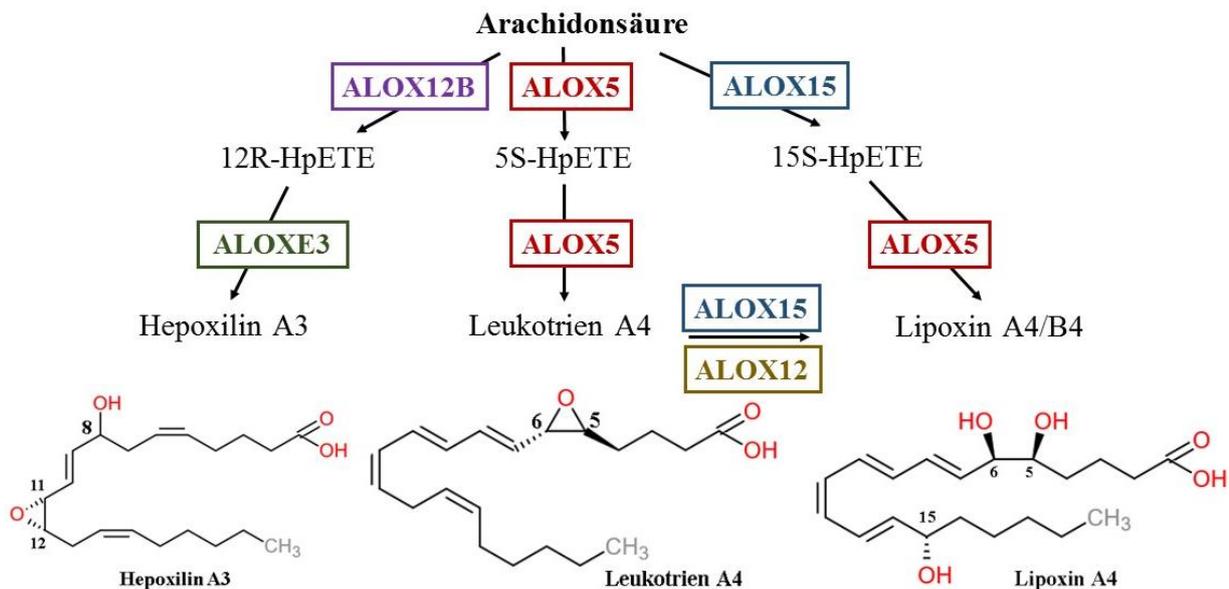
gibt es Hinweise, dass Leukotriene auch bei anderen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis [53], systemischem Lupus erythematoses [54] und multipler Sklerose [55] eine Rolle spielen können. Die biologisch relevanten Leukotriene können hinsichtlich ihrer Struktur in zwei Unterklassen eingeteilt werden: i) Zystein-freie Leukotriene (Leukotrien A4 und Leukotrien B4) und ii) Zysteinylleukotriene (Leukotrien C4, Leukotrien D4, Leukotrien E4). An deren Biosynthese sind neben der ALOX5 auch andere Enzyme (z.B. Leukotrien-A4-Hydrolase, Leukotrien-C4-Synthase,  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase) beteiligt. Die Synthese von Leukotrien A4 ausgehend von der Arachidonsäure erfordert die Dioxygenase- und die Leukotriensynthase-Aktivität der ALOX5 (**Abb. 4**). Infolge der AA-Dioxygenierung entsteht 5S-HpETE, das weiterhin durch die Leukotriensynthase-Aktivität der ALOX5 in ein reaktives 5S,6S-Epoxid der Arachidonsäure (Leukotrien A4) umgewandelt wird. Dieses kann dann durch die Leukotrien-A4-Hydrolase zum Leukotrien B4 oder durch die Leukotrien-C4-Synthase zum Leukotrien C4 umgewandelt werden.

**Lipoxine.** Ausgehend von Arachidonsäure werden auch anti-inflammatorische Lipidmediatoren wie Lipoxine gebildet. Dabei führen mehrere Stoffwechselwege zur Bildung dieser Lipidhormone, wobei zwei konsekutive Dioxygenierungsreaktionen mit einer Leukotriensynthase-Reaktion kombiniert werden. Die beiden Dioxygenierungsreaktionen tragen der Einführung zweier Hydroperoxygruppen am C5 und C15 der AA bei, während die Leukotriensynthase-Aktivität der ALOX5 die Hydroperoxygruppe am C5 der AA in ein 5S,6S-Epoxid umwandelt. Durch eine Epoxidhydrolase wird das Epoxid hydrolysiert, wobei vicinale Hydroxygruppen (**Abb. 4**) entstehen [56]. Es besteht jedoch auch die prinzipielle Möglichkeit, dass Lipoxine durch sequenzielle Tripleoxygenierung aus Arachidonsäure synthetisiert werden können [57].

**Hepoxiline.** Unter bestimmten Reaktionsbedingungen zeigen ALOX-Isoformen eine weitere katalytische Aktivität, nämlich die Hydroperoxidisomerase-Aktivität. Bei Sauerstoffmangel (hypoxische Bedingungen) können ALOX-Isoformen die von ihnen gebildeten Hydroperoxyfettsäuren in Sekundärprodukte umwandeln, indem sie die Peroxygruppe homolytisch spalten. Besonders gut wurde diese katalytische Aktivität für die Sojabohnen-LOX1 untersucht [58]. Unter den tierischen ALOX-Isoformen besitzt vor allem die ALOXE3 eine ausgeprägte Hydroperoxidisomerase-Aktivität (**Abb. 4**). Ausgehend vom 12R-HpETE katalysiert dieses Enzym die Bildung von Hepoxilinen. Die Bildung des 12R-HpETE wird dabei durch die ALOX12B katalysiert.

**Resolvine, Protektine, Maresine.** Lipoxygenasen nutzen außer der Arachidonsäure noch andere Substrate wie  $\alpha$ -Linolen-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäuren, um bioaktive

Lipidmediatoren herzustellen. In groß angelegten diätetischen Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass diese  $\omega$ 3-Fettsäuren gesundheitsfördernde Effekte auslösen. Parallel dazu wurden neue Oxygenierungsprodukte dieser Fettsäuren nachgewiesen, die in piko- bis nanomolaren Konzentrationen potente anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Wirkungen aufweisen [59, 60]. Resolvine der E-Serie werden ausgehend von EPA durch mehrfache Oxygenierungsreaktionen gebildet. Ausgehend von DHA werden die Resolvine der D-Serie, Protektine und Maresine gebildet. An diesen Reaktionen sind vier der sechs humanen ALOX-Isoformen (ALOX5, ALOX12, ALOX15, ALOX15B) beteiligt.



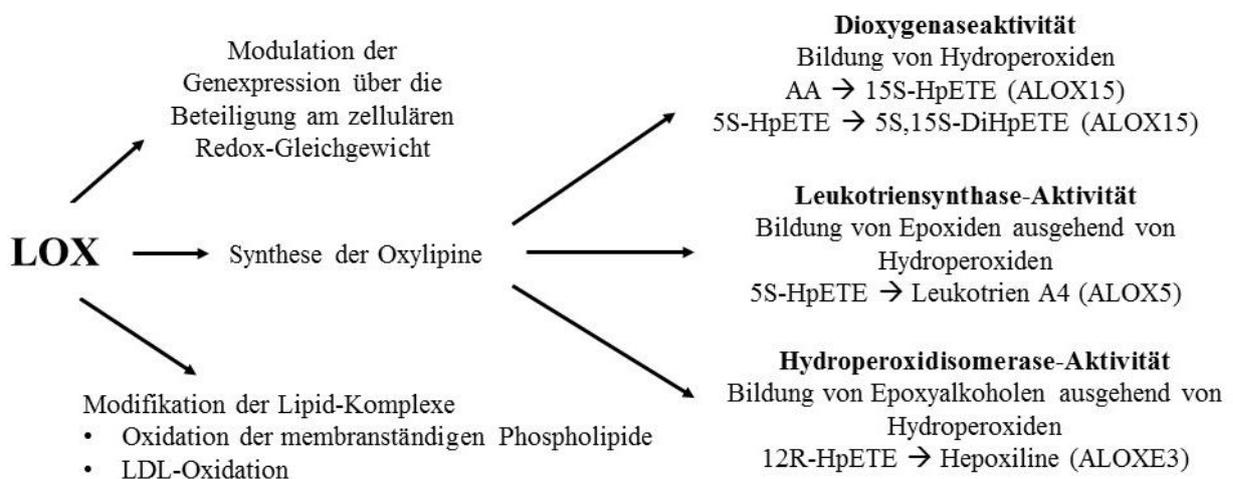
**Abb. 3. Bildung von Eicosanoiden durch humane Lipoxygenasen.** Am Beispiel der AA-Oxygenierung sind drei mögliche Lipoxygenasereaktionen dargestellt. Die klassische Dioxygenierungsreaktion führt zur Bildung der einfachen Hydroperoxide (12R-, 5S- und 15S-HpETE). Die ALOXE3 verfügt über eine ausgeprägte Hydroperoxid-Isomeraseaktivität und wandelt das Hydroperoxid (12R-HpETE) in den Epoxyalkohol (Hepoxilin A3) um. Die ALOX5 besitzt eine Leukotriensynthase-Aktivität und kann die Hydroperoxygruppe des 5S-HpETE in ein Epoxid (Leukotrien A4) umsetzen. Lipoxine (z.B. Lipoxin A4) werden durch die enzymatische Hydrolyse der Epoxidgruppe gebildet, wobei zwei vicinale Hydroxygruppen entstehen. Lipoxin A4 verfügt deswegen über drei Hydroxygruppen.

### 1.5.1.2. Lipoxygenasen und Modifikation komplexer Lipid-Protein-Komplexe sowie ihr Einfluss auf die Genexpression

Außer der Fähigkeit der Lipoxygenasen, freie Fettsäuren zu oxygenieren und damit zur Biosynthese von Lipidmediatoren beizutragen, wurden andere Mechanismen vorgeschlagen, durch welche ALOX-Isoformen ihre biologische Wirkung entfalten (**Abb. 4**). Ein Hinweis auf die Existenz alternativer Wirkmechanismen sind die Spleißvarianten der ALOX15B, die als

Hemmstoffe des Zellzyklus und der Tumorprogression fungieren, obwohl sie keine Fettsäureoxygenaseaktivität mehr aufweisen [61].

Die ALOX15-Orthologe von Säugetieren können Polyenfettsäuren oxygenieren, auch wenn diese in Membranphospholipiden gebunden sind [62]. Die stimulierte ALOX15-Expression in Makrophagen [63] führt zu einer größeren Erhöhung oxygenierter Derivate von membranständigen Phosphatidylethanolaminen (PE) als der freien oxygenierten Fettsäuren. Obwohl eine primäre PUFA-Oxygenierung mit einem anschließenden Einbau der oxygenierter Fettsäuren in die Membranphospholipide nicht auszuschließen ist, weisen die Experimente von Maskrey et al. darauf hin, dass membran-gebundene Phosphatidylethanolamine direkt durch die Lipoxygenase oxygeniert werden. Während die freien Oxylipine ihre Wirkung über GPCRs in einem subpikomolaren Bereich entfalten, können die HETE-Phospholipide über niedrig-affine Wechselwirkungen mit Proteinen oder durch Modifikation der Membranelektronegativität einen Einfluss auf pathophysiologische Prozesse ausüben. Das Anhäufen der oxidierten Phospholipide in der Biomembran könnte dazu führen, dass diese Membranareale von Makrophagen über ihren Oberflächenrezeptor CD36 erkannt werden und dass die betroffene Zelle nachfolgend phagozytiert wird [64].



**Abb. 4. Übersicht über die Stoffwechselwege der Säugetier-Lipoxygenasen.** LOXn können abhängig von der Isoform über verschiedene metabolische Wege ihre biologischen Rollen entfalten. Die Oxylipinsynthese stellt den am besten erforschten Weg dar und setzt mehrere katalytische Lipoxygenase-Aktivitäten voraus. Die „klassische“ Lipoxygenasereaktion (Dioxygenierungsreaktion) spielt vor allem bei der Bildung der einfachen Hydroperoxyfettsäuren und damit bei der Initiierung aller weiteren Kaskaden eine Rolle. Darüber hinaus ist die initiale Dioxygenierung eine Voraussetzung für zwei andere Lipoxygenaseaktivitäten – die Leukotriensynthase- und Hydroperoxidisomerase-Aktivität. Durch die beiden LOX-Aktivitäten werden die Hydroperoxide in Epoxide bzw. Epoxyalkohole umgewandelt. Außer der Oxylipinsynthese können LOXn komplexe Lipide (Biomembranen oder LDL) oxygenieren sowie einen Einfluss auf das zelluläre Redox-Gleichgewicht, über welches die Genexpression moduliert werden kann, ausüben.

Darüber hinaus können Lipoxygenasen die veresterten Fettsäuren von Lipoproteinen oxygenieren. Die durch ALOX15 oxygenierten LDL-Partikel werden von Makrophagen erkannt und phagozytiert. Dadurch spielt diese ALOX-Isoform bei der Entstehung der Schaumzellen – einem pathophysiologischen Korrelat der Atherosklerose – eine Rolle [65]. Außerdem beeinflussen LOXn über ihre stark oxidativ wirkenden Primärprodukte das zelluläre Redoxgleichgewicht. Die durch ALOX-Isoformen hergestellten Fettsäurehydroperoxide erhöhen das Oxidationspotential von Zellen, was einen Einfluss auf die Expressionsregulation Redoxsensitiver Gene hat [66] und auch epigenetische Prozesse moduliert [67].

### **1.5.2. Säugetier-Lipoxygenasen und ihre enzymatischen Eigenschaften**

Die Genome der meisten Säugetiere enthalten sechs oder sieben verschiedene Lipoxygenasegene. Die biologische Wirkung dieser Enzyme kann über ihre charakteristischen enzymatischen Eigenschaften und unterschiedlichen Expressionsmuster erklärt werden. Nachstehend sind die wichtigsten typischen Charakteristika der humanen Lipoxygenaseisoformen aufgeführt.

**ALOX15.** Die ALOX15 wird hauptsächlich in unreifen roten Blutzellen, in eosinophilen Granulozyten, in Bronchialepithelzellen und in IL-4 bzw. IL-13 stimulierten Monozyten/Makrophagen exprimiert [62, 68]. Zu den Besonderheiten dieser Lipoxygenaseisoform zählt ihre duale Positionsspezifität bei der Reaktion mit Arachidonsäure und ihre Fähigkeit, komplexe Esterlipide sowie Lipid-Protein-Komplexe effizient oxygenieren zu können (**Kapitel 1.5.1.2**). Hinsichtlich der Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung können ALOX15-Orthologe von Säugetieren in zwei Klassen eingeteilt werden: i) Arachidonsäure 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe und ii) Arachidonsäure 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Primaten, die evolutionär gesehen über Gibbons klassifiziert sind, exprimieren AA 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Andere Säugetiere exprimieren AA 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Die Gibbon-ALOX15 nimmt eine Zwischenstellung ein, weil sie AA zu beinahe äquimolaren Anteilen von 12- und 15-HpETE umwandelt. Somit kann aus der evolutionären Eingruppierung von Säugetieren auf die Reaktionsspezifität ihrer ALOX15 geschlossen werden [69]. Als Triebkraft für die evolutionäre Veränderung der Positionsspezifität dieser Enzyme wurde ihre unterschiedliche Fähigkeit zur Lipoxinbildung diskutiert. Die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe haben normalisiert auf ihre Arachidonsäureoxygenaseaktivität eine fünffach höhere Lipoxinsynthaseaktivität als die 12-lipoxygenierenden Enzyme [70]. Diese Befunde können dahingehend interpretiert werden, dass

die hochentwickelten Primaten die Entzündungsreaktion durch die Biosynthese der pro-resolutorischen Lipoxine besser kontrollieren können als niedrig entwickelte Säugetiere. Die evolutionäre Umschaltung der Reaktionsspezifität der ALOX15-Ortholge könnte damit einen Teil eines evolutionären Optimierungsprozesses des Immunsystems der Säugetiere darstellen.

**ALOX5.** Die Expression der ALOX5 ist in neutrophilen Granulozyten besonders hoch [71]. Die ALOX5 katalysiert die ersten beiden Reaktionen der Leukotrien-A4-Synthese (**Kapitel 1.5.1.1**). Die weitere Metabolisierung von Leukotrien A4 führt zur Entstehung verschiedener pro-inflammatorisch wirkender Lipidmediatoren wie Leukotrien B4, Leukotrien C4, Leukotriene D4 und Leukotrien E4 (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4). Eine Besonderheit der ALOX5 ist ihre Abhängigkeit von aktivierenden Faktoren wie ATP, Calcium und Phospholipiden [72]. *In vivo* führt die Aktivierung der ALOX5 zu ihrer Translokation aus dem Zytosol zur Kernmembran, wo ein weiterer Aktivator, das 5-Lipoxygenase-Aktivierungsprotein (FLAP), positioniert ist. Die Aktivierung der ALOX5 durch FLAP erhöht vor allem ihre Leukotriensynthaseaktivität [73], wobei die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind.

**ALOX15B.** Die humane ALOX15B wurde in der Haut erstmalig beschrieben und gehört damit gemeinsam mit der ALOX12B und der ALOXE3 zu den epithelialen ALOX-Isoformen [74]. Sie wird aber auch in unstimulierten humanen Monozyten/Makrophagen exprimiert und ist hier die dominante ALOX-Isoform [75]. Im Gegensatz zur ALOX15 besitzt diese Isoform eine strenge Regiospezifität bei der Reaktion mit Arachidonsäure. Für dieses Enzym ist 15-HpETE das alleinige AA-Oxygenierungsprodukt [76]. Die ALOX15B [76] katalysiert wie die ALOX15 die Oxygenierung von 5,6-DiHETE und kann dadurch wie die ALOX15 zur Synthese von Lipoxinen beitragen. Außerdem wurde die Expression der ALOX15B in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen. Eine direkte LDL-Oxygenierung durch die ALOX15B konnte bisher nicht gezeigt werden. Diese ALOX-Isoform kann jedoch über eine Modulation des pro-inflammatorischen Signalings der Makrophagen, durch welches die Sekretion von Chemokinen mit einer nachfolgenden Rekrutierung der T-Zellen und Monozyten initiiert wird, an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sein [77].

**ALOX12.** Die humane ALOX12 kommt in Thrombozyten und ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, sowie in der Epidermis vor [78]. In Thrombozyten ist sie die dominant exprimierte ALOX-Isoform. Freigesetzte AA wird in Blutplättchen nach Zellstimulation durch die COX1 vor allem zu Thromboxan A2 umgewandelt. Parallel konkurriert aber die ALOX12 um dieses Substrat, was zur Synthese von 12-HpETE führt. Außerdem ist die thrombozytäre ALOX12 an der transzellulären Synthese von Lipoxinen, Resolvinen, Protektinen und Maresinen beteiligt [79]. Die ALOX12 besitzt eine Lipoxinsynthaseaktivität, sodass sie Leukotrien A4, das in

neutrophilen Granulozyten synthetisiert wird, zu Lipoxin A4 (LxA4) und/oder Lipoxin B4 (LxB4) umwandeln kann [79]. Es wurde außerdem gezeigt, dass 12-HpETE einen modulierenden Effekt auf die ALOX5 und ihre Leukotriensynthaseaktivität hat, was auf eine Zusammenarbeit von Thrombozyten und Leukozyten im Entzündungsgeschehen hinweist [80].

**ALOX12B und ALOXE3.** Beide Lipoxygenaseisoformen werden in der Epidermis exprimiert und weisen beim Menschen eine Aminosäuresequenzidentität von 54 %. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit und wegen ihrer Beteiligung an der Ausbildung der epidermalen Wasserbarriere werden sie hier zusammen besprochen. Trotz ihres hohen Homologiegrads unterscheiden sich die beiden ALOX-Paraloga hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität. Die ALOX12B ist die einzige humane Lipoxygenaseisoform, die eine R-Oxygenierung katalysiert. Sie hat außerdem im Vergleich zu anderen Isoformen eine schwache enzymatische Aktivität mit AA als Substrat [81]. Die ALOXE3 kann freie Fettsäuren unter physiologischen Bedingungen überhaupt nicht oxygenieren. Unter hyperoxischen Bedingungen und in Gegenwart hoher Hydroperoxidkonzentrationen (Aktivatoren) fungiert das Enzym jedoch als „echte“ Lipoxygenase und bildet ein unspezifisches Muster unterschiedlicher Oxidationsprodukte [82]. Unter normoxischen Bedingungen katalysiert das Enzym die Umwandlung von 12R-HpETE, das durch die ALOX12B aus AA produziert wird, zu Epoxyalkoholen mittels ihrer Hydroperoxidisomerase-Aktivität. Diese Epoxyalkohole, zu deren Bildung auch die ALOX-Isoformen aus Sojabohnen [82], Kaninchenretikulozyten [83, 84] und humanen Blutplättchen [85] fähig sind, wurden als Hepoxiline bezeichnet. *In vivo* trägt die funktionelle Wechselwirkung von ALOX12B und ALOXE3 in der Haut dazu bei, dass die in Ceramiden veresterte Linolsäure über die Bildung des 9R-Hydroperoxids (durch ALOX12B) in einen Epoxyalkohol (durch ALOXE3) umgewandelt wird. Diesen Reaktionen folgt die Hydrolyse der oxygenierten Ceramide. Dieser Schritt ist für die anschließende Entstehung von Ceramid-Protein-Komplexen bedeutsam, die zur Ausbildung der epidermalen Wasserbarriere beitragen [71]. Bisher wurde jedoch noch nicht abschließend geklärt, warum die Ceramide vor ihrer Hydrolyse oxygeniert werden müssen.

### **1.5.3. Beteiligung der Lipoxygenasen an physiologischen und pathologischen Prozessen**

#### **1.5.3.1. Physiologische Funktionen von Lipoxygenasen**

Zur Erklärung der biologischen Rollen von ALOX-Isoformen wurden alternative Hypothesen entwickelt, die sich vor allem auf experimentelle Ergebnisse stützen, die bei Experimenten mit ALOX-Inhibitoren oder mit ALOX-Knockout-Mäusen erhalten wurden. Die systemische Inaktivierung der *Alox5* [86], *Alox12* [87] und *Alox15* Gene [88] zeigte, dass diese genetischen Manipulationen keine groben Auffälligkeiten im Erscheinungsbild der Tiere

induzierten. Im Unterschied zu den unauffälligen Phänotypen der *Alox15*<sup>-/-</sup>, *Alox12*<sup>-/-</sup>, *Alox5*<sup>-/-</sup>-Mäuse starben die *Alox12b*<sup>-/-</sup>-defiziente Tiere in den ersten postnatalen Lebensstunden wegen eines exzessiv hohen epidermalen Wasserverlustes [89]. *Aloxe3*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wobei die Intensität der phänotypischen Symptome im Vergleich zu *Alox12b*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich abgeschwächt war [90]. Die biologische Rolle der *Alox15b* konnte noch nicht geprüft werden, weil derzeit noch keine *Alox15b*-defizienten Mäuse verfügbar sind. Trotz der unauffälligen Phänotypen von *Alox15*-, *Alox12*- und *Alox5*-defizienten Mäusen konnten subtile phänotypische Veränderungen detektiert werden, vor allem wenn die Tiere in Experimenten gestresst wurden. Bevor an dieser Stelle im Detail auf die beobachteten phänotypischen Veränderungen eingegangen wird, die bei ALOX-defizienten Mäusen beobachtet wurden, sollten einige Vorbemerkungen gemacht werden, die bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt werden müssen:

i) Die endogenen Konzentrationen der meisten ALOX-Produkte liegen im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich [13]. Da in vielen *in vitro* Systemen biologische Wirkungen von ALOX-Produkten erst im mikromolaren Bereich beschrieben wurden, muss die Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf die *in vivo* Situation kritisch hinterfragt werden [91].

ii) Aus der Beobachtung, dass *Alox15*<sup>-/-</sup>, *Alox12*<sup>-/-</sup> und *Alox5*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine deutlichen Phänotypen entwickeln, kann nicht geschlossen werden, dass die Enzyme physiologisch irrelevant sind. Ein Grund dafür ist, dass es sich bei den untersuchten K.O.-Mäusen um konventionelle Stammzellknockouts handelt. Bei dieser Methode werden embryonale Stammzellen gentechnisch manipuliert und anschließend selektiert. Nur überlebende Zellen werden zur Herstellung der K.O.-Mäuse verwendet. Bei diesem Vorgehen werden also jene Zellen selektiert, die in der Lage waren, die genetische Manipulation auszugleichen. Diese Zellen und damit auch die daraus hergestellten Tiere könnten einen Weg gefunden haben, die Inaktivierung des entsprechenden Gens funktionell zu kompensieren. Wie dieser mögliche Kompensationsprozess im Einzelnen aussieht, ist bei den final entstandenen K.O.-Mäusen nur schwer nachvollziehbar. Ein Weg, diese Unsicherheit auszugleichen, wäre die Verwendung von induzierbaren Knockout-Mäusen, die aber in der Literatur für ALOX-Isoformen bisher kaum verwendet wurden.

iii) ALOX-Hemmstoffexperimente sind *in vivo* zwar relativ einfach durchzuführen, sofern basale toxikologische Informationen für die Substanzen vorliegen. Trotzdem sollten solche Ergebnisse mit großer Vorsicht interpretiert werden. Hauptursache dafür ist, dass es bis heute keine gut charakterisierten Isoform-spezifischen ALOX-Hemmstoffe gibt [32, 92]. Zwar wurde in der Literatur eine Reihe von ALOX-Hemmstoffen beschrieben [93-95], deren Isoformspezifität wurde jedoch in den meisten Fällen nicht umfassend charakterisiert.

iv) Orthologe ALOX-Isoformen des Menschen und der Maus haben unterschiedliche enzymatische Eigenschaften. Während die humALOX15 ein AA 15-lipoxygenierendes Enzym ist, muss das orthologe Enzym der Maus als 12-Lipoxygenase klassifiziert werden. Diese Unterschiede erschweren eine direkte Übertragung der experimentellen Ergebnisse von Mausmodellen auf den Menschen.

Unter Berücksichtigung der erwähnten Punkte werden im Folgenden mehrere biologische Prozesse beschrieben, an denen Lipoxygenasen beteiligt zu sein scheinen.

**i) Retikulozytenreifung.** In Kaninchenretikulozyten wird die ALOX15 auf hohem Niveau exprimiert [96]. Außerdem wurden große Mengen an ALOX15-Produkten in den Membranlipiden dieser Zellen nachgewiesen [97]. Die Oxygenierung der Membranlipide der Mitochondrienmembranen führt zur Degradation dieser intrazellulären Organellen, was einen wichtigen Schritt im Rahmen der Retikulozytenreifung darstellt [98]. Sollte dieses Reifungskonzept ein Schlüsselprozess bei der Erythropoese sein, konnte man erwarten, dass *Alox15*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen deutlichen hämatopoietischen Phänotyp aufweisen. Dies ist jedoch nicht der Fall, da sämtliche hämatopoietischen Parameter dieser Tiere im Normalbereich liegen [88]. Kürzliche Untersuchungen im Labor von H. Kühn weisen jedoch darauf hin, dass *Alox15*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant verringerte Erythrozytenzahl aufweisen und dass bei diesen Tieren eine Retikulozytose besteht. Außerdem sind die Erythrozyten dieser Tiere durch eine verringerte osmotische Stabilität gekennzeichnet. Transgene Expression der humALOX15 in diesen Mäusen normalisiert die beobachteten Veränderungen (Rademacher et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Weiterhin weisen die Erythrozyten der *Alox15*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Zellen von Normaltieren einen signifikant erhöhten Hämoglobingehalt (Hyperchromie) auf. Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass die ALOX15 bei der murinen Erythropoese bedeutsam ist. Bekannterweise gibt es mehrere Mechanismen, die zum Abbau der Mitochondrien im Rahmen der Retikulozytenreifung beitragen [99, 100]. Damit könnte die genetische Ausschaltung des *Alox15*-Gens durch die Hochregulation der anderen Prozesse funktionell ausgeglichen werden.

**ii) Adipozytenreifung.** Die Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ist für die Adipogenese essenziell [101]. Mehrere ALOX-Produkte fungieren als PPAR $\gamma$ -Aktivatoren [102, 103] und beeinflussen damit die Adipogenese. In murinen Präadipozyten wird die Alox3 auf besonders hohem Niveau exprimiert [104]. Dieses Enzym kann über seine Arachidonsäureoxygenierungsprodukte (Hepoxiline) PPAR $\gamma$  aktivieren und damit zur Adipozytendifferenzierung beitragen. Diese Hypothese wurde durch die funktionelle Inaktivierung

des *Aloxe3*-Gens in der Präadipozytenkultur bestätigt, die *in vitro* zu einer Blockierung der Adipozytenreifung [105] führte.

**iii) ZNS-Entwicklung und Neuroplastizität.** Als lipidoxygenierende Enzyme spielen ALOX-Isoformen eine Rolle beim oxidativen Stress. Weil Neurone verglichen mit anderen Zellen besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress sind, könnte die Funktion und Regulation dieser Enzyme im Nervensystem von besonderem Interesse sein. Den bedeutsamsten Zusammenhang zwischen der Lipoxygenasefehlfunktion und der Störung des Nervensystems entdeckte man durch die Untersuchung genmanipulierter Zebrafischembryonen, bei denen die Expression der 12-lipoxygenierenden *zebALOX1* inaktiviert wurde. Bei diesen Embryonen beobachtete man eine gravierende Störung der ZNS-Entwicklung [106]. Als mögliche Erklärung kann die Funktion von 12-H(p)ETE als Signalmediator des Axonwachstums diskutiert werden [107]. Elektrophysiologische Messungen an stimulierten hippocampalen Neuronen von *Alox15*-defizienten Mäusen deuteten auf eine Beteiligung dieses Enzyms an der Langzeitdepression hin [108, 109]. Verhaltensexperimente an *Alox15*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten außerdem ein vermindertes räumliches Gedächtnis der Versuchstiere [110].

**iv) Ausbildung der epidermalen Wasserbarriere.** Auf der Basis der experimentellen Untersuchungen von *Alox12b*- und *Aloxe3*-K.O.- Mäusen [89, 90] und durch die Entdeckung einer Korrelation zwischen defekten humanen *ALOX12B*- und *ALOXE3*-Genen zum Krankheitsbild der kongenitalen Ichthyose [111] wurde die Beteiligung dieser beiden ALOX-Isoformen an der epithelialen Differenzierung und an der Ausbildung der epidermalen Wasserbarriere postuliert. Das mechanistische Konzept, das diese Befunde erklärt, geht davon aus, dass die *Alox12b* die Ceramide der Epidermis oxygeniert und dass das dabei entstehende 9R-Hydroperoxylinoleoyl- $\omega$ -hydroxyceramid durch die *ALOXE3* in einen C18-Epoxyalkohol umgewandelt wird. Nachfolgend wird die oxygenierte Fettsäure vom Ceramid hydrolysiert und das  $\omega$ -Hydroxyceramid kann eine Bindung mit Proteinen eingehen, die für die Ausbildung der Korneozytenlipidhülle und dementsprechend für die adäquate Funktion der Wasserbarriere relevant ist [112]. Dabei bleibt zunächst ungeklärt, warum nicht-oxygenierte Ceramide nicht hydrolysiert werden können und welche speziellen Lipasen für die Hydrolyse der oxygenierten Lipide verantwortlich sind.

**v) Ferroptose.** Die Ferroptose ist ein Sonderfall der Apoptose (programmierter Zelltod), der sich hinsichtlich der involvierten Mechanismen von der Apoptose deutlich unterscheidet. Die Ferroptose ist durch die Anhäufung von Lipidperoxiden im endoplasmatischen Retikulum (ER) von Zellen charakterisiert [113]. *Alox15* kann durch die Oxygenierung von Polyenfettsäuren als Bestandteil der Membranlipide des ERs die Ferroptose auslösen. Dem Prozess steht die Glutathionperoxidase-4 als ein wichtiger Regulator des zellulären Redox-Gleichgewichtes

entgegen. Dieses Enzym kann die durch Lipoxygenasen gebildeten Lipidhydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen reduzieren, die selbst nicht mehr oxidativ wirken. Die Hydroperoxide sind aber für die Aktivierung der Alox15 nötig [114]. In *Gpx4*-defizienten murinen Fibroblasten kann durch die Hemmung der Alox15 (mittels PD146176) der Zelltod verhindert werden. Allerdings konnten die *Gpx4*-defizienten Zellen auch durch das Antioxidans Vitamin E vor Ferroptose bewahrt werden [115]. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung der Alox15 an der Ferroptose ist das experimentelle Ergebnis, in dem *Alox15*-K.O.-Mäuse gegen die Depletion von Glutathion resistent waren [115]. Die Hemmung der Alox15 wurde daraufhin als effektive Methode zur Prävention der Ferroptose vorgeschlagen [116].

### **1.5.3.2. Beteiligung von Lipoxygenasen an Entzündungsprozessen**

Vielen Erkrankungen liegen gemeinsame pathophysiologische Prozesse zugrunde. Bevor auf einzelne Hinweise zur Beteiligung der Lipoxygenasen an der Krankheitsentstehung einzugehen, wird die Beteiligung der Lipoxygenasen und ihrer Produkte am Entzündungsgeschehen erläutert. Der zeitliche Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion lässt sich in zwei Phasen einteilen [117]. **i) Akute Entzündung:** Diese Phase ist durch das Vorliegen eines entzündungserregenden Reizes und durch die Einwanderung von Immunzellen (zuerst neutrophile Granulozyten und anschließend Lymphozyten) ins entzündlich veränderte Gewebe gekennzeichnet. **ii) Inflammatorische Resolution (Entzündungsheilung):** In dieser Phase kommt es zum Einwandern von resolutorischen Makrophagen, die apoptotische Entzündungszellen phagozytieren und damit das Entzündungsareal „aufräumen“. Dies ist die Voraussetzung für einen strukturellen Neuaufbau des entzündlich veränderten Gewebes. Die inflammatorische Resolution ist damit ein aktiver Vorgang, mit dem die Entzündung beendet wird. Die beiden Entzündungsphasen sind gekennzeichnet durch ein spezifisches Muster an Entzündungszellen, die pro-inflammatorische (in der akuten Entzündungsreaktion) bzw. anti-inflammatorische und resolutorische (in der Phase der inflammatorischen Resolution) Botenstoffe synthetisieren. Unter diesen Botenstoffen befinden sich auch pro-inflammatorische (Prostaglandine, Leukotriene) und resolutorische (Lipoxine, Resolvine) Eicosanoide. Wenn eine akute Entzündung nicht vollständig ausheilt, kann sie in eine chronische Entzündung übergehen, wie das beim Asthma bronchiale, bei der rheumatoiden Arthritis, bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, bei der Psoriasis und bei der Atherosklerose der Fall ist [5].

Leukotriene sind Produkte der ALOX5 und gehören zu den pro-inflammatorischen Eicosanoiden. Ihre Rezeptoren werden u.a. auf Immunzellen und auf den glatten Muskelzellen der Bronchialschleimhaut exprimiert [118]. *Alox5*-defiziente Mäuse zeigen eine abgeschwächte

Immunantwort auf verschiedene bakterielle Erreger aufgrund der verringerten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Leukotrien B4 [119]. Leukotrien B4 wirkt kaum auf die Bronchialmuskulatur, wurde aber als starkes Chemotaxin identifiziert [120]. Lipoxine, Resolvine, Protektine und Maresine sind anti-inflammatorische und pro-resolutorische Entzündungsmediatoren. Sie wirken über Oberflächenrezeptoren von Immunzellen und führen zu einer reduzierten Leukozytenmigration, einer verringerten vaskulären Permeabilität und einer verminderten Synthese pro-inflammatorischer Zytokine. Gleichzeitig stimulieren sie die Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch M2-Makrophagen. Dieser Prozess wird auch als Efferozytose bezeichnet [rezensiert in [117]].

### **1.5.3.3. Beteiligung der Lipoxygenasen an pathologischen Prozessen und mögliche pharmakologische Applikationen**

In der Literatur gibt es eine große Anzahl von Studien, die einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen verschiedenen ALOX-Isoformen und bestimmten Erkrankungen des Menschen postulieren. Bei einer Reihe dieser Untersuchungen ist die Datenlage jedoch nicht überzeugend und die mechanistischen Zusammenhänge bleiben in vielen Fällen unklar. Aus Platzgründen werden an dieser Stelle nur die am besten untersuchten Korrelationen und die daraus abgeleiteten biologischen Funktionen von Säugetier-ALOX-Isoformen erläutert.

**i) Neoplasien.** Die Zellen vieler Tumorentitäten zeigen ein erniedrigtes ALOX15-Expressionsniveau [rezensiert in [6]]. Die sich daraus ergebenden niedrigen Konzentration von ALOX15-Produkten (13-HpODE und 15-HpETE) hemmen die Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ , was die physiologische Apoptose reduziert. Dadurch überwiegt die Zellproliferation, was zum Tumorwachstum beiträgt. Andererseits wurde eine Hochregulation der ALOX15-Expression in humanen Prostatakarzinom-Zellen nachgewiesen [121]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die ALOX15 in verschiedenen Tumorarten sowohl pro- als auch anti-karzinogen wirken kann. Bei ALOX15-exprimierenden Tumoren (z.B. Prostatakarzinom) könnte eine Medikament-induzierte Hemmung der ALOX15 eine neue Therapiemöglichkeit darstellen [122].

**ii) Atherosklerose.** Die Expression der ALOX15 kann sowohl pro- als auch anti-atherogene Effekte induzieren. Während sie durch eine LDL-Oxygenierung die Bildung von Schaumzellen fördert, entfaltet sie über ihre Produkte (z.B. Lipoxine) auch anti-inflammatorische und damit anti-atherogene Wirkungen [75]. In humanen atherosklerotischen Läsionen wird die ALOX15B auf relativ hohem Niveau exprimiert. Weiterhin führt die Downregulation der Expression des *Alox15b*-Gens in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen zu einer Verringerung der

Bildung atherosklerotischer Läsionen und zu einer Hemmung des pro-inflammatorischen Signalings der Makrophagen [77]. Damit konnte eine pro-atherosklerotische Rolle der Alox15b wahrscheinlich gemacht werden.

**iii) Allergische Erkrankungen.** Leukotriene sind als ALOX5-Produkte an der Pathogenese von allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale [123] und allergischer Rhinitis [124] beteiligt. Zysteinylleukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>) sind als Bestandteile der „slow reacting substance of anaphylaxis“ potente Bronchokonstriktoren [123]. Ihre molekulare Aktivität zur Induktion der Bronchokonstriktion liegt deutlich (1000-fach) über der von Histamin [125]. Zysteinylleukotriene verursachen bereits in nanomolaren Konzentrationen eine bronchiale Entzündungsreaktion, bei der es neben einer Bronchokonstriktion auch zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, zu einer Aktivierung eosinophiler Granulozyten, zu einer erhöhten Schleimproduktion und zu einem Umbau der Bronchialstruktur (Atemwegsremodeling) kommt [123]. Leukotriensyntheseinhibitoren (z.B. Zileuton) und Leukotrienrezeptorantagonisten (z.B. Montelukast) werden derzeit als verschreibungspflichtige Medikamente bei der Pharmakotherapie des Asthma bronchiale eingesetzt. In Deutschland sind diese Medikamente vor allem als Add-on-Therapie verfügbar, wenn die inhalativen Kortikoide keine ausreichende therapeutische Wirkung aufweisen [126].

**iv) Neurologische und neurodegenerative Erkrankungen.** Untersuchungen in experimentellen Mausmodellen lieferten Hinweise darauf, dass ALOX-Isoformen an der Pathogenese von Morbus Alzheimer [127] und des traumatischen Hirnschadens beteiligt sind [128]. Prinzipiell kann man die bereits erläuterte ALOX-Beteiligung an der Ferroptose (programmiertem Eisen-abhängigem Zelltodweg) und an der Entzündungsreaktion auch auf das ZNS übertragen. Wie in peripheren Organen wirken Leukotriene auch bei der Hirnschädigung pro-inflammatorisch [7], während Lipoxine [129] und Resolvine eine resolutorische Wirkung zeigen [130]. Die resolutorische Funktion von Lipoxinen und Resolvinen kommt dadurch zum Ausdruck, dass sie eine Rückbildung des Hirnödems induzieren, was große Bedeutung für die Prognose des Schlaganfalls hat. Der Untergang von Nervenzellen (z.B im Rahmen einer Ferroptose), bei dem verschiedene ALOX-Isoformen eine Rolle spielen könnten, ist ein Kennzeichen vieler neurodegenerativer Erkrankungen. Die Beobachtung, dass die Expression der ALOX15 die Ferroptose beschleunigt [115], könnte man durch deren Hemmung bei der Therapie neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen ausnutzen.

**v) Metabolische Erkrankungen.** Es wird vermutet, dass vielen metabolischen Erkrankungen (z.B. Adipositas, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie) eine chronische Entzündungsreaktion zugrunde liegt. Deshalb werden diese Krankheiten manchmal auch als

immunometabolische Erkrankungen bezeichnet [131]. Weil ALOX-Metabolite sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken, können ALOX-Isoformen zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen. Tatsächlich wurde eine erhöhte ALOX15-Expression, die mit einer erhöhten Expressionsrate von Entzündungsmediatoren (IL-6 und IFN $\gamma$ ) korrelierte, bei adipösen Menschen festgestellt [132]. Außer der Produktion von Entzündungsmediatoren beeinflusst die Expression verschiedener ALOX-Isoformen auch die Funktionalität von Inselzellen des Pankreas. Es wurde gezeigt, dass 12-HETE zu einer verminderten Insulinsekretion [133] und zur Apoptose von  $\beta$ -Zellen [134] führt. Außerdem zeigen *Alox15*-defiziente Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber Diabetes mellitus [135].

**vi) Thrombophilie.** Die ALOX12 wird hauptsächlich in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert und ihr dominantes AA-Oxygenierungsprodukt (12-HETE) scheint an der Thrombozytenaggregation beteiligt zu sein [80, 87]. Abhängig vom genutzten Agonisten wurden sowohl pro- als auch anti-aggregatorische Wirkungen von 12-HETE gezeigt. Die Blutplättchen von *Alox12*-defizienten Mäusen haben eine erhöhte Sensitivität gegenüber ADP [87]. Wurde die Thrombozytenaggregation durch Thrombin induziert, konnte eine pro-aggregatorische Wirkung von 12-HETE festgestellt werden [80]. Daher könnten selektive ALOX12-Inhibitoren eine neue Therapieoption bei thrombotischen Erkrankungen darstellen [136].

## 1.6. Pflanzliche Lipoxygenasen: Vorkommen und biologische Funktionen

Die Stoffwechselwege der pflanzlichen Lipoxygenasen unterscheiden sich von denen der tierischen Enzyme in mehreren Aspekten. Da AA in Pflanzen nicht weit verbreitet vorkommt, sind Linol- und Linolensäure die dominanten Lipoxygenasesubstrate. Andererseits verfügen Pflanzen über alternative Enzyme (Allenoxidsynthase, Peroxygenase, Hydroperoxidlyase, Divinylether-Synthase), die an der Oxygenierung von Lipiden beteiligt sind [137]. Wie für die meisten tierischen Lipoxygenasen ist auch für pflanzliche Enzyme die biologische Relevanz noch immer nicht eindeutig geklärt. Auf der Basis funktioneller Untersuchungen wurden mehrere Hypothesen für die biologischen Funktionen pflanzlicher Lipoxygenasen vorgeschlagen, die aber im Einzelnen noch bestätigt werden müssen (**Abb. 3** und **Abb. 4**). Zusammengenommen beteiligen sich pflanzliche LOXn an Signalkaskaden, die während der Pflanzenreife, Organogenese und Aufrechterhaltung der Homöostase stimuliert werden [137]. Trotzdem konnten bislang bei Lipoxygenase-defizienten Pflanzen kaum phänotypische Veränderungen nachgewiesen werden [34]. Das könnte aber vor allem daran liegen, dass im Gegensatz zu tierischen ALOX-Genen, die in verschiedenen tierischen Genomen überwiegend als „single copy genes“ vorliegen, in

pflanzlichen Genomen mehrere Genkopien für eine Lipoxygenase existieren. Deshalb kann der Knockout einer Genkopie durch die Hochregulation einer anderen Genkopie ausgeglichen werden.

Die Hydroperoxide der Linolsäure (9- und 13-HpODE) und der  $\alpha$ -Linolensäure (9-HpOTrE) sind wegen ihrer Fungitoxizität an der Abwehrreaktion gegen phytopathogene Pilze beteiligt [138, 139]. Weiterhin sind bestimmte pflanzliche Lipoxygenasen in der Lage, Leukotriene aus exogen zugesetzter AA [140] sowie Leukotrien-ähnliche Substanzen aus ALA [141] zu synthetisieren. Die biologischen Wirkungen dieser Verbindungen wurden jedoch noch nicht näher untersucht. Die bisher am besten untersuchte biologische Bedeutung pflanzlicher Lipoxygenasen besteht in deren Beteiligung an der Bildung von Jasmonsäurederivaten, die als Reifungshormone wirken. Obwohl an der Bildung dieser Phytohormone viele Enzyme beteiligt sind, spielen Lipoxygenasen eine besondere Rolle, weil sie den ersten Oxygenierungsschritt in der Biosynthesekaskade katalysieren. Dabei entsteht aus ALA 13-HpOTrE. Jasmonate sind unter anderem an der Hochregulation der Expression stressinduzierter Proteine beteiligt [142]. Ein zweiter Weg, wie pflanzliche Lipoxygenasen ihre biologische Wirkung entfalten können, stellt die Oxygenierung komplexer Lipide dar [143]. So konnte beim Keimungsprozess von Gurkensamen gezeigt werden, dass eine spezifische Lipoxygenase die Speicherlipide der Samen oxygeniert und so zur Mobilisierung der Lipidreserven beiträgt. Nachfolgend werden die oxygenierten Fettsäuren der Lipidspeicherorganellen hydrolysiert, ins Zytoplasma freigesetzt, und dann als Energiequelle der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation zugeführt [144].

### **1.7. Bakterielle Lipoxygenasen: Einige Vertreter und mögliche Bedeutung**

Lipoxygenasen wurden lange Zeit als Enzyme angesehen, die ausschließlich in höher entwickelten Lebewesen (wie Säugetieren und höheren Pflanzen) vorkommen. Mit der Verfügbarkeit kompletter Genome von primitiven Lebensformen änderte sich die Situation grundlegend. Durch gezielte Sequenzvergleichsstrategien wurden LOX-ähnliche Sequenzen auch in den Genomen verschiedener Bakterien (Cyanobakterien, Proteobakterien) entdeckt. Mikrobielle ALOX-Isoformen kommen als eigenständige Proteine oder als Fusionsproteine mit anderen Enzymen vor [16, 17]. So kann ein solches Fusionsprotein, welches aus einer Lipoxygenasedomäne und einer Peroxidasedomäne besteht, eine ungesättigte Fettsäure mithilfe ihrer Lipoxygenasedomäne in einer Peroxyfettsäure umwandeln. Die Häm-enthaltende Peroxidasedomäne katalysiert anschließend die Umlagerung der Peroxygruppe zu einem reaktionsfähigen Allenoxid. Vergleichbare Reaktionen finden auch bei der Prostaglandinsynthese in tierischen Zellen statt.

Im Unterschied zu den meisten anderen Bakterienarten sind Cyanobakterien reich an PUFAs, die vor allem in den Membranen ihrer Photosyntheseorganellen (Chloroplasten) enthalten sind. Überraschenderweise kommen ALOX-Isoformen aber auch in Bakterienarten vor, die fast keine Polyenfettsäuren enthalten. So konnte in den 1990-iger Jahren im humanpathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* eine ALOX-Isoform (PA-LOX) identifiziert werden, deren biologische Bedeutung bis heute noch nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Dieses fakultativ humanpathogene Bakterium kann das Lungenepithel von Patienten kolonisieren, die an einer zystischen Fibrose oder einer Antibiotika-resistenten Pneumonie leiden [145]. Das Bakterium exprimiert und sezerniert ein AA 15-lipoxygenierendes Enzym, das ähnlich wie die ALOX15-Orthologe der Säugetiere in der Lage ist, komplexe Esterlipide zu oxygenieren [146]. Auf der Basis der bisher zu diesem Enzym durchgeführten Experimente wurden verschiedene Hypothesen zur biologischen Rolle der PA-LOX vorgeschlagen (**Abb. 24**) [147, 148], von denen aber bislang keine zweifelfrei belegt werden konnte. Kürzlich wurde die Bildung spezifischer ALOX-Produkte (Hepoxiline) durch eine Lipoxygenase aus *Myxococcus xanthus* nachgewiesen [149], aber auch für dieses Enzym konnte die biologische Bedeutung noch nicht geklärt werden.

## 1.8. Ziele der Arbeit

**i) Beschreibung einer neuen bakteriellen Lipoxygenase.** Im Rahmen der Dissertation wurden zunächst die öffentlich verfügbaren bakteriellen Proteindatenbanken nach ALOX-ähnlichen Proteinsequenzen durchsucht. Dabei wurde ein bis dahin unbekanntes Protein aus *Myxococcus fulvus* identifiziert, das aufgrund seiner Sequenzeigenschaften eine funktionelle Lipoxygenase darstellen könnte. Um dessen Funktionalität zu beweisen, wurde das Protein in *E. coli* rekombinant exprimiert und hinsichtlich seiner proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert.

**ii) Untersuchungen zur Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen.** ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetierspezies unterscheiden sich von anderen LOX-Isoformen durch eine ausgeprägte duale Positionsspezifität der AA-Oxygenierung. Für andere Polyenfettsäuren (z.B. ALA, EPA, DHA) wurde die Reaktionsspezifität dieser Enzyme noch nicht systematisch untersucht. Um diese Lücke zu schließen, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Reaktionsspezifitäten der ALOX15-Orthologe ausgewählter Säugetiere mit ALA, EPA und DHA untersucht werden. Dabei sollte vor allem überprüft werden, ob sich das Ausmaß der dualen Positionsspezifität in Abhängigkeit von der verwendeten Substratfettsäure verändert. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Substratfettsäuren präferenziell

oxygeniert wird, wenn AA, EPA und DHA simultan in gleichen Konzentrationen angeboten werden.

**iii) Untersuchungen des Produktmusters der Oxygenierung von EPA und 18-HEPE durch humane ALOX-Paraloge.** Die Biosynthese bestimmter EPA-Oxygenierungsprodukte (Resolvine der E-Serie) beginnt mit einer Oxygenierung der Eicosapentaensäure am C18. Obwohl Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen und CYP450-abhängige Fettsäureoxidasen für die 18-HEPE Bildung verantwortlich gemacht wurden [59], blieb bisher unklar, welche der humanen ALOX-Isoformen zur 18-HEPE-Bildung fähig sind. Das Hauptprodukt der Reaktion der humA LOX15 mit EPA ist 15-HpEPE. Angesichts der dualen Reaktionsspezifität und der hohen Strukturflexibilität der ALOX15 [33] sollte im Rahmen dieser Dissertation geprüft werden, ob humane ALOX-Paraloge (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX5) 18-HEPE als Nebenprodukt bei der EPA-Oxygenierung bilden. Dadurch sollte geprüft werden, ob humane ALOX-Paraloge 18-HEPE und nachfolgend Resolvine der E-Serie synthetisieren können.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien und Standards

Chemikalie	Firma, Stadt, Land
Agarose	Promega, Mannheim, Deutschland
Antibiotika (Ampicillin-Natrium, Chloramphenicol, Kanamycinsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Antifoam 204	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti-His-Antikörper	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
ATP	Roche, Mannheim, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol-Probenpuffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HPLC-Standards: 5S-, 12S-, 15-R/S-HETE; 13R/S-HODE	Cayman Chemicals, distributed by Biomol, Hamburg, Deutschland
HPLC-Lösungsmittel: 2-Propanol, Wasser, n-Hexane, Methanol	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Fettsäuren (Arachidonsäure [(5Z,8Z,11Z,14Z)-Eicosa-5,8,11,14-tetraensäure], Linolsäure [(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure], $\alpha$ -Linolensäure [(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-triensäure], $\gamma$ -Linolensäure [(6Z,9Z,12Z)-Octadeca-6,9,12-triensäure], Eicosapentaensäure [(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eicosa-5,8,11,14,17-pentaensäure] und Docosahexaensäure [(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaensäure])	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	SERVA, Heidelberg, Deutschland

Ponceau S	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Lösung, 1M, pH = 8.0	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween®20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2. Puffer, Lösungen und Nährmedien

Methoden	Puffer	Zusammensetzung
Aktivitätsassay	PBS	13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1 L H <sub>2</sub> O, pH=7.4
	5-LOX Mischung 10x	0.1 mL 10 mM ATP, 0.04 mL 100 mM CaCl <sub>2</sub> xH <sub>2</sub> O (15.702 mg/mL), 2 µL 0.5 M EDTA, 1.4 µL 10 mg/mL 1-Stearyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, 0.86 mL PBS
Agarosegelelektrophorese	TAE-Puffer	40 mM Tris, 2 mM EDTA-Na salt, 29.6 mM Essigsäure, pH 8.5
LB-Agar	LB-Agar	Agar (1,5 %), Trypton (1 %), Hefeextrakt (0,5 %), NaCl (0,5%), NaOH (1 mM)
LB-Medium	LB-Medium	Trypton (1 %), Hefeextrakt (0,5 %), NaCl (0,5 %), NaOH (1 mM)
Proteinexpression	Spurenelemente	50 mg CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 9.55 mg ZnCl <sub>2</sub> , 11.65 mg MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O, 1.65 g FeCl <sub>3</sub> x6H <sub>2</sub> O, 10 mg CuSO <sub>4</sub> , 10 mg CoCl <sub>2</sub> , 10.75 mL Na <sub>2</sub> -EDTA-Lösung (=2 g)
	Nährmedium	pro 1 L: 2.00 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 6.12 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.50 g NH <sub>4</sub> Cl, 14.60g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3.60 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1.00 tri-Ammoniumcitrat, 0.24 g Trypton/Pepton, 0.48 g Hefeextrakt, 40 mg Dextrin, 1 µL Spurenelemente, 5 mg Thiamin-HCl, 36.95 mg MgSO <sub>4</sub>
Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	Imidazol-Puffer	0.1 M Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10 mM (25 bzw. 200 mM) Imidazol, pH 8.0
SDS-PAGE	Stackinggel-Puffer	0.5 M Tris/HCl, 0.4 % (v/v) SDS, pH 6.75
	Trenngel-Puffer	1.5 M Tris/HCl, 0.6 % (v/v) SDS, pH 8.8
	Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycine, 0.1 % (v/v) SDS, pH 8.3
Transformation	SOC-Medium	10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose, 20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt

Western Blot	Transferpuffer	1x Rapid Transferpuffer (VWR Life Science, Darmstadt, Deutschland)
	Waschpuffer	PBS/0.3 % Tween® 20

### 2.3. Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Firma, Stadt, Land
DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Promega, Madison, USA
NucleoBond® Xtra MIDI Plus	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	
NucleoSpin® Plasmid MN	
LigaFast™ rapid DNA Ligation	Promega, Madison, USA
PfuUltra II Hotstart PCR Master Mix	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Restriktionsenzyme: <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>XbaI</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

### 2.4. Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektoren	Firma, Stadt, Land
pcDNA3.1(-)	Invitrogen, Karlsbad, USA
pCR2.1-TOPO®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pET 28b	Merck, Darmstadt, Deutschland
pFastBac HTB	Invitrogen, Karlsbad, USA

### 2.5. *E. coli* Stämme

Zellstamm	Firma, Stadt, Land
BL21 (DE3)pLysS	Invitrogen, Karlsbad, USA
Rosetta(DE3)pLysS	Novagen, Darmstadt, Deutschland
XL1 Blue	Stratagene, La Jolla, USA

### 2.6. Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
G359F	Up: CTG CGC TGC AGC GAG TTC AAC ACG CAC CAG ATG Down: CAT CTG GTG CGT GTT GAA CTC GCT GCA GCG CAG

F424I+I425M	Up: GGG GTG TTC GAC GAC ATC ATG GCC ACG GGC GGC CCC Down: GGG GCC GCC CGT GGC CAT GAT GTC GTC GAA CAC CCC
A410G	Up: GCC ATC AAC GAG GGC GGT CGC AAG GGA CTG CTC Down: GAG CAG TCC CTT GCG ACC GCC CTC GTT GAT GGC

### 3. Methoden

#### 3.1. Datenbankrecherchen und Sequenzalignments für *Myxococcus fulvus* Lipoxygenase

Die NCBI-Proteindatenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) wurde nach bakteriellen Lipoxygenase durchsucht. Dafür wurde das Stichwort „Lipoxygenase“ als Suchkriterium eingegeben, wobei nur die Proteinsequenzen aus dem Bakterienreich berücksichtigt wurden. Die positiven Suchergebnisse (Hits) wurden anschließend nach dem Molekulargewicht sortiert, wobei alle Proteine mit einem Molekulargewicht < 60 kDa und > 100 kDa eliminiert wurden (erstes Filterkriterium).

Die meisten bisher beschriebenen katalytisch aktiven Lipoxygenasen haben gemeinsame Eigenschaften [150]. So besitzen alle bisher charakterisierten Lipoxygenasen zwei Metallbindungskuster (proximaler und distaler Metallbindungskuster), die das katalytisch essenzielle Übergangsmetall (Eisen, Mangan) ligandieren. Diese beiden Metallbindungskuster haben eine konservierte Aminosäuresequenz (proximaler Metallbindungskuster His-AS1-AS2-AS3-AS4-His, distaler Metallbindungskuster His-AS5-AS6-AS7-His/Asn/Ser). Das Vorkommen dieser beiden Aminosäurekluster wurde als zweites Filterkriterium eingebaut. Als drittes Filterkriterium fungierte der Abstand der beiden Metallbindungskuster. Nur diejenigen Proteinsequenzen wurden positiv selektiert, bei denen der Klusterabstand mindestens 150, aber höchstens 200 AS betrug. Für weitere Experimente wurde die Lipoxygenase aus *Myxococcus fulvus* (MF-LOX1) als eine der ersten positiv selektierten Sequenzen [i) Molekulargewicht zwischen 60 und 100 kDa, ii) Vorhandensein zweier Metallbindungskuster und iii) Abstand der Metallbindungskuster zwischen 150 und 200 AS] gewählt. Die Proteinsequenz der MF-LOX1 ist in der NCBI-Datenbank unter dem Zugriffscode WP\_046712474.1 hinterlegt. Die korrespondierende Nukleinsäuresequenz ist in der gleichen Datenbank unter dem Zugriffscode NZ\_FOIB01000010.1 (complement 205294..207324) zu finden. Die Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzalignments der MF-LOX1 mit anderen bereits bekannten Lipoxygenasen wurden mithilfe des ClustalOmega Programms durchgeführt.

### 3.2. Klonierung der Lipoxygenase-cDNA in verschiedene Expressionsvektoren

Die aus einer Bakterienkolonie isolierte genomische DNA von *Myxococcus fulvus* wurde vom Leibnitz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Klon DSM 16525) bezogen. Die MF-LOX1 cDNA wurde mit spezifisch hergestellten Primern, welche die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BamHI* (upstream: 5'-GGA TCC ATG ACT GTC GAG TAC AAG-3', downstream: 5'-AAG CTT TTA GAC GGT GAT GCC GCA-3') enthielten, mittels genomischer PCR amplifiziert. Die Amplifizierung des kodierenden Bereiches des *MF-LOX1*-Gens wurde durch die elektrophoretischen Analysen der Amplifizierungsprodukte bestätigt. Das PCR-Produkt wurde in einen linearisierten pCR2.1-TOPO® Vektor ligiert, der dadurch zyklisiert wurde. Dieser rekombinante Klonierungsvektor wurde in *E. coli* XL-1 Blue Zellen transformiert und die Bakterienzellen wurden auf einer Kanamycin/LB-Agarplatte ausplattiert. Mehrere isoliert gewachsene Bakterienklone wurden selektiert und im LB-Medium für 16 h kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit aus der Bakterienkultur isoliert. MF-LOX1 enthaltende Klone wurden mittels der Probespaltung (mit *HindIII* und *BamHI*) und der anschließenden Agarosegelelektrophorese identifiziert. Die erfolgreiche Einführung des MF-LOX1-Inserts sowie der korrekte Leserahmen wurden mit der Nukleotidsequenzierung (Eurofins Gemonics, Ebersberg, Deutschland) bestätigt.

Zur nachfolgenden Proteinexpression im bakteriellen System wurde die MF-LOX1 aus dem pCR2.1-TOPO® Klonierungsvektor in den prokaryotischen Expressionsvektor pET-28b (+) Vektor umkloniert. Die Proteinexpression in Insekten- bzw. in HEK293-Zellen erforderte ebenfalls eine Umklonierung des MF-LOX1-Inserts in die eukaryotischen Expressionsvektoren pFastBac HTB (Insektenzellexpression) und pcDNA3.1(-) (Expression in HEK293-Zellen). Zu diesem Zweck wurde das jeweilige Leerplasmid und das MF-LOX1 enthaltende rekombinante Klonierungsplasmid mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* gespalten. Die Spaltprodukte wurden mithilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden mit dem MF-LOX1-Insert und dem linearisierten Klonierungsvektor, die anhand der Länge ihrer Nukleinsäuresequenz identifiziert werden konnten, wurden aus dem Gel unter der UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten. Anschließend wurde die MF-LOX1-DNA und der Klonierungsvektor mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit aus dem Gel isoliert und mit dem LigaFast™ rapid DNA Ligationskit zusammenligiert. Anschließend wurde das rekombinante Plasmid in *E. coli* XL-1 Blue Zellen transformiert und die Zellen wurden auf einer Kanamycin/LB-Platte ausplattiert. Isoliert gewachsene Klone wurden selektiert und in 1 mL Flüssigkulturen angezüchtet. Die Plasmid-DNA wurde aus der Bakterienkultur mit dem NucleoSpin® Plasmid MN Kit isoliert.

Nach einer Probespaltung wurden die MF-LOX1 positiven Klone durch Sequenzierung geprüft. Alle drei oben beschriebenen rekombinanten Expressionsvektoren wurden auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Nur bei der Umklonierung des MF-LOX1-Inserts vom pCR2.1-TOPO® Vektor in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-) wurden die Restriktionsenzyme *XbaI* und *HindIII* verwendet, weil der pcDNA3.1(-) Vektor keine Restriktionsstelle für *BamHI* in seiner Multicloning-Site aufweist. Nach der Bestätigung der erfolgreichen Umklonierung wurde für jedes Expressionsplasmid eine MIDI-Präparation mit dem NucleoBond® Xtra MIDI Plus Kit hergestellt. Die Expressionsplasmide für die bakterielle Expression der MF-LOX1 (pET-28b (+)) und für die Expression der rekombinanten MF-LOX1 in Sf9 Zellen (Insektenzellexpression, pFastBac HTB), enthielten eine Nukleotidsequenz, die für ein N-terminales His<sub>6</sub>-Tagpeptid kodiert. Dieses Peptid besitzt eine hohe Affinität zu einer Ni-NTA-Matrix und diese Eigenschaft wurde bei der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie ausgenutzt (**Kapitel 3.5**).

### 3.3. Ortsgerichtete Mutagenese

Der Einfluss der Veränderung der Borngräber-I(BGI)-, Sloane(SL)- und Coffa(CO)-Determinanten auf die enzymatische Aktivität der MF-LOX1 und ihr Produktmuster sollte durch die Mutagenese einzelner Aminosäuren ermittelt werden. Dazu wurden folgende MF-LOX1-Mutanten konstruiert: BGI-Mutante Gly359Phe, SL-Mutante Phe424Ile+Ile425Met und CO-Mutante Ala410Gly. Für die Herstellung der Mutanten wurden spezifische Mutageneseprimer und der Pfu Ultra II HotStart 2x PCR Master Mix (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) verwendet. Das pET-28b(+)-Plasmid, das die cDNA für die Wildtyp-MF-LOX1 enthielt, wurde mithilfe von Mutageneseprimern (**Kapitel 2.6**), Master Mix und der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* amplifiziert. Nach der PCR wurde der nicht-mutierte Mutterstrang der Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease *Dpn-I* (Thermo Fisher Scientific) verdaut und der mutierte Strang verdoppelt. *E. coli* XL-Blue Zellen wurden mit dem mutierten rekombinanten Plasmid transformiert und auf einer Kanamycin/LB-Agarplatte ausplattiert. Isoliert gewachsene Bakterienklone wurden selektiert und in einer 1 mL Flüssigkultur angezchtet. Nach der Inkubationszeit wurden die Plasmide aus der Bakterienkultur mit dem NucleoSpin Plasmid Easy Pure Kit präpariert und die erfolgreiche Mutagenese wurde mit einer Plasmid-DNA Sequenzierung bestätigt.

### 3.4. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen

Die ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere (Mensch, humALOX15; Schimpanse,

chiALOX15; Orang-Utan, ponALOX15; Gibbon, gibALOX15; *Macaca mulatta*, macALOX15, Kaninchen, rabALOX15; Schwein, pigALOX15; Ratte, ratALOX15; Maus, mouALOX15), die humane ALOX15B (humALOX15B), die humane ALOX12 (humALOX12) und die MF-LOX1 wurden in *E. coli* exprimiert. Da die bakteriellen Expressionsraten der humanen ALOX5 (humALOX5) nur gering waren, wurde dieses Enzym im Insektenzellensystem exprimiert. Im gleichen System wurden auch die MF-LOX1 und die PA-LOX (*Pseudomonas aeruginosa*) exprimiert. Der Ausgangspunkt der Proteinexpression waren die rekombinanten Plasmide (pET-28b(+), pFastBac HT und pcDNA3.1(-)), welche den kodierenden Bereich der cDNA der oben genannten Lipoxygenasegene enthielten. Alle Proteinsequenzen, die in bakteriellem oder Insektenzellensystem exprimiert wurden, enthielten einen His<sub>6</sub>-Tag an ihrem N-Terminus. Die Transformation der Bakterienzellen mit dem leeren Expressionsplasmid diente bei der Expression in *E. coli* als Negativkontrolle. Die parallele Expression der Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PA-LOX) sowohl im bakteriellen als auch im Insektenzellensystem wurde zum Vergleich der Proteinausbeute der MF-LOX1 Expression verwendet.

### 3.4.1. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen in *E. coli*

Für die Proteinexpression im bakteriellen System wurden die Bakterienzellen der *E. coli*-Stämme BL21(DE3)pLysS oder Rossetta2(DE3)pLysS verwendet. Die kompetenten Zellen wurden mit den rekombinanten Expressionsplasmiden transformiert. Die Bakterien wurden nach 1-stündiger Inkubationszeit im SOC-Medium auf Kanamycin/Chloramphenicol-Platten ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Isoliert gewachsene Klone wurden präpariert und in 1 mL LB-Medium-Flüssigkulturen (50 µg/mL Kanamycin, 35 µg/mL Chloramphenicol) überführt. Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurde die optische Dichte der Flüssigkultur bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) photometrisch (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0.1-0.15 in einer 1:50-Verdünnung der Flüssigkultur wurden die 1 mL Flüssigkulturen in 50 mL Kulturen (Beschreibung der Zusammensetzung des Nährmediums siehe **Kapitel 2.2**) überführt und bei 30° C unter Schütteln inkubiert. Zum bakteriellen Nährmedium wurden Antibiotika und 5 µL Antifoam Reagenz 204 zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde das Kulturwachstum photometrisch überprüft und die Proteinexpression durch die Aktivierung des lac-Operons mit 50 µL 1M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Nach weiteren 24 h bei 22 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (2000xg, 10 min, 4°C), das Zellpellet wurde in 3 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 2 mM EDTA aufgenommen und die Bakterienzellen wurden mittels Ultraschall lysiert (Digital Sonifier, W-250 D Microtip Max 70 % Amplitude, Model 0102C (CE),

Brandon Ultraschall, Fürth, Deutschland). Der Lysatüberstand wurde nach der Zentrifugation (10.000xg, 10 min, 4 °C) als Enzymquelle für weitere Experimente verwendet.

### **3.4.2. Expression der rekombinanten Lipoxygenasen im Insektenzellsystem**

Für die Proteinexpression in Insektenzellen der Sf9-Zelllinie (ATCC® CRL-1711, Invitrogen) mussten die rekombinanten Expressionsplasmide als pFastBacHT Vektoren vorliegen. Die Herstellung der Plasmide und der rekombinanten Baculoviren wurden gemäß der Anleitung zum Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde zunächst das rekombinante Plasmid pFastBacHT in kompetente Zellen des *E. coli* Stammes DH10BacTM (Invitrogen) transformiert. Die in Bakterienzellen rekombinierte Bacmid-DNA wurde mit dem MN Plasmid-Kit Bac 100 isoliert. Unter dem Zusatz von Cellfectin®II Reagent (Thermo Fisher Scientific) wurden anschließend Insektenzellen mit dem rekombinanten Bacmid transfiziert. Mit dem so produzierten rekombinanten Baculovirus wurden die Sf9-Zellen infiziert, um den Virustiter zu erhöhen. Anschließend wurde die 50 mL-Zellkultur, die aus  $2 \times 10^6$  Zellen/mL im Insect XPRESS Medium (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) bestand, mit 5 mL rekombinantem Baculovirus (MOI = 1) infiziert und in Erlenmeyerkolben bei 27 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Beurteilung der Proteinsyntheseeffizienz wurden die toten Sf9-Zellen regelmäßig gezählt. Nach 72 h wurden die Zellen pelletiert (1.500xg, 10 min, 4 °C) und in 3 mL PBS mit 2 mM EDTA aufgenommen. Die Sf9-Zellen wurden durch Ultraschall lysiert und die Zelltrümmer (15.000xg, 10 min, 4 °C) wurden abzentrifugiert. Der Lysatüberstand konnte als LOX-Quelle verwendet werden.

### **3.4.3. Expression der MF-LOX1 in HEK293-Zellen**

Neben den Insektenzellen wurden auch HEK293-Zellen (LGC Standards, Wesel, Deutschland) zur eukaryotischen Proteinexpression der MF-LOX1 verwendet. Das Expressionsplasmid pcDNA3.1(-) mit dem MF-LOX1-Insert wurde, wie im **Kapitel 3.2** beschrieben, hergestellt. Die HEK293-Zellen wurden in 6-Well-Platten mit 2 mL 10 % FCS-DMEM-Lösung (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) ausgesät ( $4 \times 10^5$  Zellen/Well) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 194 µL Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) verdünnt und 6 µL von TransIT®-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, USA) wurden zugegeben. Die Lösung wurde nun für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die HEK293-Zellen wurden mit dieser Lösung transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37°C wurden die Zellen geerntet, indem sie vom Boden der 6-Well-Platte durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren abgelöst

wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 0.5 mL PBS (2 mM EDTA) resuspendiert. Zur Kontrolle der Enzymexpression wurden Aktivitätsassays durchgeführt. Dazu wurde zu der oben beschriebenen Zellsuspension Arachidonsäure (Endkonzentration 160  $\mu$ M) zugegeben und die Zellen mit Ultraschall lysiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 1 mg festem NaBH<sub>4</sub> gestoppt, was gleichzeitig zur Reduktion der entstandenen Hydroperoxyfettsäuren führte. Die Lösung wurde mit 50  $\mu$ L 100 % Essigsäure angesäuert und auf 1 mL mit MeOH aufgefüllt. Als negative bzw. positive Kontrollen dienten die Transfektion der HEK293-Zellen mit leerem Expressionsplasmid bzw. die parallele Expression der humALOX15.

### **3.5. Reinigung, Entsalzung und Aufkonzentrierung von Proteinpräparationen**

Für bestimmte Experimente wurde eine gereinigte, entsalzte und konzentrierte Proteinlösung der MF-LOX1 benötigt. Für die Reinigung des Proteins wurde die Affinitätschromatographie an einer Protino® Ni-NTA-Matrix (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Lysatüberstand einer 50 mL *E. coli* bzw. Insektenzellkultur auf die Chromatographiesäule mit der Ni-NTA-Matrix (1 mL Gelbettvolumen) gegeben und dreimal mit 1 mL einer 10 mM Imidazolösung gewaschen. Anschließend wurde das rekombinante His-Tag Fusionsprotein mit einer 200 mM Imidazolösung in 5 Fraktionen zu je 300  $\mu$ L eluiert. Mithilfe der SDS-PAGE (**Kapitel 3.6**) wurde der MF-LOX1-Gehalt in den verschiedenen Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie bestimmt und die MF-LOX1 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

Zur Umpufferung des rekombinanten Proteins in PBS wurde eine Gelchromatographie auf einer Econo-Pac® 10 DG Säule (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Enzympool der Affinitätschromatographie auf die Bio-Gel® P-6DG Säule (Bio-Rad) gegeben, sodass das rekombinante Protein in die Säulenmatrix eindringen konnte. Anschließend wurde das Protein mit PBS bzw. einem anderen Puffer eluiert.

Die so umpufferte Proteinpräparation wurde anschließend mit einem Corning Spin-X UF 6 mL Proteinkonzentrator (Corning, New-York, USA) konzentriert. Dieser Konzentrator war mit einer Polyethersulfonmembran (PES) mit einer Porengröße von 5 kDa bestückt. Zur Konzentrierung wurde die Proteinlösung so lange zentrifugiert, bis sich ihr Volumen auf ein Fünftel des Ausgangsvolumens reduziert hatte. Nach der Konzentrierungsprozedur wurde die Proteinkonzentration mittels des Bradford-Testes [151] bestimmt. Dafür wurden 800  $\mu$ L Bradford-Lösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) mit 200  $\mu$ L H<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ L Proteinlösung zusammenpipettiert. Die Lichtabsorption der Proteinlösung wurde bei 595 nm gemessen. Die

Messskala wurde mit verschiedenen Serumalbuminlösungen bekannter Konzentrationen geeicht und der lineare Teil der Kalibrierungskurve wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt.

### **3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Enzympräparationen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Aliquots der Lysatüberstände bzw. Ni-NTA-Agarose-Fractionen (präpariert wie im **Kapitel 3.5** beschrieben) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und eine elektrische Spannung von 200 V wurde angelegt. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Gel mit Page Blue Protein Staining Solution (Thermo Fischer Scientific) gefärbt.

Zum spezifischen Nachweis des MF-LOX1-Proteins wurde ein Western Blot durchgeführt. Die mittels der SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteinbanden wurden auf eine Nitrozellulosemembran (NC-Membran) übertragen. Dafür wurden das Polyacrylamidgel und die NC-Membran aufeinandergelegt und in einer Blotkammer einer zur Membranoberfläche senkrecht verlaufenden elektrischen Spannung von 200 V ausgesetzt. Zur Beurteilung der Proteinübertragungseffizienz wurde die NC-Membran erst mit PBS/0.3 % Tween® 20 gewaschen und dann mit Ponceau-S-Rot (in 3 %-iger Trichloressigsäure gelöst) gefärbt. Nach der Entfärbung der Membran mit destilliertem Wasser wurde diese mit 5 % Trockenmilch geblockt. Anschließend wurde die NC-Membran 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur mit einem Anti-His-Tag Antikörper (Invitrogen, Karlsbad, USA) inkubiert, der als nachweisbares Markerenzym eine Peroxidase enthielt. Die Anfärbung des Blots erfolgte mit einer Luminol-Lösung (SERVA, Heidelberg, Deutschland), wobei die Lichtemission bei 425 nm in Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS-1000 plus (Fujifilm Imaging Systems, Düsseldorf, Deutschland) quantifiziert wurde.

### **3.7. Aktivitätsassays für rekombinante Lipoxygenasen**

#### **3.7.1. PUFA-Oxygenierungsassays mit ALOX15-Orthologen**

Die katalytische Aktivität der ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere wurde in *in vitro* Assays mit verschiedenen PUFAs als Oxygenierungssubstrate gemessen. Abhängig vom Substratansatz wurden die  $\omega$ -3 PUFAs (Eicosapentaensäure [EPA], Docosahexaensäure [DHA]) oder  $\omega$ -6 PUFAs (Arachidonsäure [AA], Linolsäure [LA] und gamma-Linolensäure [GLA]) als alleiniges Substrat angesetzt. In einer separaten Versuchsreihe wurde eine Mischung aus AA, EPA und DHA, in einer anderen Reihe eine Mischung aus AA, LA und LeA als Substrate verwendet.

Die finale Substratkonzentration betrug 160  $\mu\text{M}$ . Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 5-50  $\mu\text{L}$  Enzympräparation aus dem Lysatüberstand zu einer in PBS gelösten PUFA (Ansatzvolumen 500  $\mu\text{L}$ ) gestartet und nach 4 min mit  $\text{SnCl}_2$  gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde auf 1 mL mit eiskaltem Methanol aufgefüllt. Nach der Zentrifugation der Ansätze zur Entfernung der präzipitierten Proteine wurden diese Proben für HPLC-Analysen verwendet. Für die Festlegung der einzusetzenden Volumina der Lysatüberstände wurde die AA-Oxygenaseaktivität der verschiedenen Enzympräparationen getestet. Die Ergebnisse dieser Vorversuche wurden dafür genutzt, vergleichbare AA-Oxygenaseaktivitäten der verschiedenen Enzympräparationen in den Hauptversuchen einzusetzen.

### **3.7.2. EPA- und 18-HEPE-Oxygenierungsassays mit humanen Lipoxigenasen**

Die Produktmuster der verschiedenen humanen ALOX15-Paraloga (humALOX15, humALOX12, humALOX5, humALOX15B) bei ihrer Oxygenierung verschiedener PUFAs wurden bereits in der Vergangenheit untersucht. Bei diesen Experimenten wurden jedoch unterschiedliche Enzympräparationen der nativen Enzyme verwendet, sodass die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar waren. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Produktmuster der Reaktion der verschiedenen rekombinanten humanen ALOX-Isoformen mit EPA und 18-HEPE unter identischen experimentellen Bedingungen quantifiziert. Dabei wurden auch die Enantiomere von 18-HEPE (18S-HEPE und 18R-HEPE) als Substrate der ALOX-Isoformen einzeln und in racemischer Mischung getestet. Für diese Versuche war es wichtig, saubere (Hydroxy-)Fettsäurepräparationen zu verwenden, die praktisch frei von Autooxidationsprodukten waren. Dies gelang durch RP-HPLC-Reinigung der Fettsäuresubstrate. Im finalen Reaktionsansatz wurde eine Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingestellt. Weil in einer Reihe der Experimente die humALOX5 als Enzym verwendet wurde und diese ALOX-Isoform andere experimentelle Bedingungen (Anwesenheit von EDTA,  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP und Phospholipide) benötigt, wurden dem Reaktionsansatz für alle ALOX-Isoformen diese Substanzen zugesetzt (finale Konzentrationen: EDTA 0.1 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  0.4 mM, ATP 0.1 mM, Phosphatidylcholin 1.4  $\mu\text{g/ml}$ ). Als Enzympräparationen dienten die Lysatüberstände, von denen entsprechend ihrer AA-Oxygenaseaktivität 1 bis 25  $\mu\text{L}$  eingesetzt wurden. Zu einer EPA- bzw. 18R/S-HEPE-Lösung in PBS (Ansatzvolumen 0.25 mL) wurden die Enzympräparate zugegeben, gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 25  $\mu\text{L}$  0.1 M  $\text{SnCl}_2$  gestoppt und 250  $\mu\text{L}$  eiskaltes Methanol zugegeben. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000xg, 10 min, 4 °C) entfernt.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurden zwei Enzyme sequenziell zum

Reaktionsansatz zugesetzt (simultane Anwesenheit beider Enzyme). Nach der 15-minütigen Inkubationszeit der Substratfettsäuren mit der humALOX15, humALOX15B und humALOX12 wurde die Reaktion nicht gestoppt, sondern es wurde anschließend die humALOX5 zugegeben. Nach weiteren 15 min wurde die Reaktionsmischung wie im oberen Absatz beschrieben behandelt. Die einzelnen Inkubationen, die jeweils aus einem Substrat (EPA, 18S-HEPE, 18R-HEPE bzw. racemischer 18-HEPE) bzw. einem oder zwei ALOX-Isoformen bestanden, wurden als Dreifachwerte (drei voneinander unabhängige Reaktionsansätze) durchgeführt.

### **3.8. Enzymatische und proteinchemische Charakterisierung der MF-LOX1**

#### **3.8.1. Zeitabhängigkeit**

In dieser Versuchsanordnung wurde die AA-Oxygenierung durch die MF-LOX1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Es wurden die Inkubationszeiten von 1, 2, 5, 10 und 30 min ausgewählt. Zu 200  $\mu$ L der 200  $\mu$ M AA-Lösung (in PBS) wurden 50  $\mu$ L Lysatüberstand zugegeben. Die Ansätze wurden verschiedene Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationsperioden wurden die Reaktionsprodukte mit  $\text{SnCl}_2$  reduziert und 200  $\mu$ L Methanol wurden zugegeben. Nach der Abzentrifugation (14.000xg, 10 min, 4 °C) der präzipitierten Proteine wurden die Reaktionsprodukte mittels LC-MS/MS analysiert.

#### **3.8.2. Temperatur- und pH-Abhängigkeit**

Um den Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung zu untersuchen, wurde die Reaktion der MF-LOX1 bei verschiedenen Reaktionstemperaturen untersucht. Die Inkubationen wurden bei Temperaturen zwischen 5 und 45 °C in einem 5 °C-Abstand durchgeführt (5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C). Zu 200  $\mu$ L PBS (160  $\mu$ M EPA als Substrat) wurden 50  $\mu$ L eiskalten Lysatüberstand der MF-LOX1-Präparation zugegeben, sodass die finale Reaktionstemperatur errechnet werden konnte. Die Ansätze wurden kurz gevortext und für 1 min inkubiert. Danach wurden 25  $\mu$ L einer gesättigten methanolischen  $\text{SnCl}_2$ -Lösung (10 mg/mL) zugegeben und die im Ansatz enthaltenen Proteine durch die Zugabe von 250  $\mu$ L eiskaltem MeOH denaturiert. Präzipitiertes Protein wurde abzentrifugiert (14.000xg, 10 min, 4 °C).

Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die MF-LOX1-Reaktion untersucht. Dafür wurde ein Tris/Borat-Puffer (50 mM Tris/HCl und 50 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) hergestellt und mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Der Reaktionsansatz bestand aus der im Puffer verdünnten EPA der finalen Konzentration von 130  $\mu$ M und aus 50  $\mu$ L Lysatüberstand. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurden die Ansätze wie oben beschrieben aufgearbeitet.

### **3.8.3. Substratspezifität und Produktstruktur**

Für die Bestimmung der Substratspezifität und Produktstruktur wurden drei  $\omega$ -3 PUFAs (EPA, DHA und  $\alpha$ -Linolensäure [ $\alpha$ LeA]) und drei  $\omega$ -6 PUFAs (AA, LA und  $\gamma$ -Linolensäure [ $\gamma$ LeA]) verwendet. Dafür wurden die Fettsäurelösungen gleicher Konzentrationen von 160  $\mu$ M mit jeweils 50  $\mu$ L bakteriellem Lysatüberstand 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Terminierung der Reaktion wurde wie im **Kapitel 3.8.3** beschrieben, vorgegangen.

### **3.8.4. $K_M$ -Wert**

Im Folgenden wurde die Affinität der MF-LOX1 zu EPA untersucht und der  $K_M$ -Wert sowie die  $V_{max}$  wurden bestimmt. Dazu wurden PBS-Fettsäurelösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 200  $\mu$ M, jeweils 0.5 mL Ansatzvolumen), die mit 50  $\mu$ L Lysatüberstand 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Ansätze mit 25  $\mu$ L SnCl<sub>2</sub> (10 mg/mL) reduziert, auf 500  $\mu$ L mit eiskaltem MeOH aufgefüllt und abzentrifugiert.

### **3.8.5. Bestimmung des Eisengehaltes der MF-LOX1**

Für die Bestimmung des Eisengehaltes der Wildtyp-MF-LOX1 und ihrer Sloane-Mutante (Phe424Ile+Ile425Met) wurde die mithilfe der Affinitätschromatographie gereinigte und entsalzte Enzympräparation der MF-LOX1 verwendet. Außer Eisen wurde auch die Konzentration anderer Übergangsmetalle wie Kobalt, Zink und Mangan in der finalen MF-LOX1-Präparation bestimmt. Außerdem wurden die Enzympräparationen aus der bakteriellen und Insektenzellexpression separat getestet, um einen möglichen Einfluss der Expressionsbedingungen auf den Eisengehalt der MF-LOX1 zu untersuchen. Zur Quantifizierung des Gehaltes an Übergangsmetallen wurde eine Atomabsorptionsspektrometrie der finalen Enzympräparation auf einem Perkin-Elmer Life Sciences AA800 Instrument (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), das mit dem AS800 Autosampler ausgestattet war, durchgeführt.

### **3.8.6. Aktivitätsassays unter hyperoxischen Bedingungen**

Die Sauerstoffaffinität der MF-LOX1 wurde durch Inkubation des Enzyms mit PUFA-Lösungen ermittelt, in denen verschiedene Sauerstoffkonzentrationen eingestellt wurden. Dafür wurden zwei 10 mL EPA-Lösungen (160  $\mu$ M EPA in PBS) hergestellt, die entweder mit Argongas (anaerobe Lösung) oder mit Sauerstoff (hyperoxische Lösung) gesättigt wurden. Danach wurde eine gasdicht verschließbare photometrische Messküvette (0.75 mL, verschlossen mit einem Stopfen mit zwei Kapillaren) mit Argongas gefüllt, um Luftsauerstoff auszuschließen.

Anschließend wurden die unterschiedlich begasten (anaeroben bzw. hyperoxischen) EPA-Lösungen in verschiedenen Mengenverhältnissen in die Küvette gegeben, sodass die Messküvette vollständig gefüllt wurde. Durch die Mischung von anaerober und hyperoxischer Lösung konnten die finalen Sauerstoffkonzentrationen in den Messlösungen von 0.085 mM, 0.256 mM, 0.64 mM und 1.21 mM errechnet werden. Durch die in den Stopfen eingearbeiteten Kapillaren konnten anschließend 45 µL der gereinigten und entsalzten Enzympräparation zugefügt werden, die vorher unter Argonatmosphäre auf Eis (anaerobisiert) gelagert wurde. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit wurde das ganze Volumen aus der Küvette in ein Eppendorfgefäß mit NaBH<sub>4</sub>-Kristallen überführt und aufs Eis gestellt. Die Produktbildung der EPA-Oxygenierung wurde bei 235 nm spektrophotometrisch überprüft.

### **3.8.7. Isoelektrische Fokussierung**

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der rekombinanten MF-LOX1 erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Dazu wurde ein vorgefertigtes IEF Gels (Bio-Rad) und IEF-Standards (Proteine mit bekanntem isoelektrischem Punkt) verwendet. Die IEF-Standardmischung beinhaltete folgende Proteine: Phycocyanin, IP 4.45-4.75; β-Laktoglobulin B, IP 5.1; bovine Carboanhydrase, IP 6.0; humane Carboanhydrase, IP 6.5; equines Myoglobin, IP 6.8/7.0; humanes Hämoglobin A, IP 7.1; humanes Hämoglobin C, IP 7.5; Linsenlektin, IP 7.8/8.0/8.2; Cytochrom C, IP 9.6. Die rekombinante MF-LOX1 (10 µg im 10 mM Tris-Puffer mit 25 % Glycerol) und die IEF-Standardmischung wurden 2.5 h bei steigender Spannung zwischen 100 und 500 V analysiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit der Page Blue Protein Staining Solution gefärbt. Zur Berechnung des isoelektrischen Punktes für MF-LOX1 wurden die Wanderungsstrecken der Standardproteine mit bekannten isoelektrischen Punkten analysiert.

### **3.8.8. Membranoxygenierung**

Die Fähigkeit der MF-LOX1, biologische Membranen zu oxygenieren, wurde durch Inkubationen des Enzyms mit submitochondrialen Partikeln aus Rinderherzen untersucht. Diese Modellmembranen repräsentieren inside-out-Vesikel der inneren Mitochondrienmembranen und stellen ein geeignetes Modells substrat für die Membranoxygenaseaktivität von ALOX15-Orthologen dar. Zu 650 µL einer MF-LOX1-Präparation (7 mg/mL MF-LOX1-Protein) wurden submitochondriale Partikel mit einer Endkonzentration des Membranproteins von 1.2 mg/mL zugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit NaBH<sub>4</sub> terminiert und der Reaktionsansatz wurde mit 40 µL 100 %-iger Essigsäure angesäuert. Für die Lipidextraktion [152] wurden zu den Mischungen 1.7 mL MeOH

und 0.85 mL CHCl<sub>3</sub> zugegeben. Die Ansätze wurden 1 min lang gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden weitere 0.85 mL CHCl<sub>3</sub> und 0.85 mL PBS zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde wieder 1 min gevortext. Nach der Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen, von welchen die untere in ein frisches Gefäß überführt wurde. Das Lösungsmittel wurde an einem Rotationsverdampfer (Heidolph VV2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland) verdampft und die zurückgebliebenen Lipide wurden in 420 µL anaerobem MeOH und 80 µL 40 %-iger anaerober KOH-Lösung gelöst. Zur Spaltung der Esterlipide wurden die Proben bei 60 °C 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe angesäuert (40 µL konzentrierte Essigsäure) und das Präzipitat wurde abzentrifugiert. Die Hydrolysate wurden anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Die PUFA-Oxidationsprodukte (konjugierte Diene) wurden dabei bei 235 nm, die nicht-oxygenierten PUFAs bei 210 nm verfolgt. Zur Quantifizierung der Membranoxygenaseaktivität wurden die Mengen an konjugierten Dienen (Summe von HETE- und HODE-Isomeren) sowie die Menge nicht-oxygenierter Linolsäure und Arachidonsäure (dominante PUFAs in Mitochondrieninnenmembranen) im Hydrolysat ermittelt. Das Verhältnis der konjugierten Diene zu nicht-oxygenierten Fettsäuren, welches den Oxygenierungsgrad der Membranlipide widerspiegelt, wurde als Maß für die Membranoxygenaseaktivität der MF-LOX1 bestimmt [153]. Als positive Kontrolle diente die rabALOX15, deren Membranoxygenaseaktivität schon lange bekannt ist [62].

### **3.9. Analytische Methoden**

#### **3.9.1. Reverse- und Normal-Phasen-HPLC**

Die LOX-Aktivitätsassays wurden mittels RP-HPLC an einer Nucleosil C-18 Säule analysiert (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland; 250 × 4 mm, 5 µm Partikelgröße). Die mobile Phase des HPLC-Systems bestand aus einer Mischung von Methanol, Wasser und Essigsäure im Volumenverhältnis von 85:15:0.1. Als Flussrate der mobilen Phase wurde 1 mL/min eingestellt. Die Quantifizierung der Lichtabsorption bei 235 nm erfolgte mit einem Hewlett-Packard Diode Array Durchflussdetektor und erlaubte der Rückschluss auf die Menge der gebildeten konjugierten Diene.

Wenn verschiedene Fettsäuren als ALOX-Substrate eingesetzt wurden, konnten deren Produkte nicht immer durch eine RP-HPLC aufgetrennt werden. In diesem Fall wurden weitere Analysen der Reaktionsprodukte mittels Normal-Phase-HPLC auf der Nucleosil 100-5 Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße) durchgeführt. Die zu analysierenden Substanzen wurden nach dem Durchfluss durch die RP-HPLC-Säule aufgefangen, das Lösungsmittel wurde verdampft und die zurückbleibenden Lipide wurden in 0.2 mL n-Hexane/2-Propanol/Essigsäure (100:2:0,1 v/v/v)

aufgenommen. Die präparierten konjugierten Diene wurden auf der NP-HPLC-Säule mit der mobilen Phase n-Hexane/ 2-Propanol/ Essigsäure (100:2:0,1 v/v/v) mit einer Flussrate von 1 mL/min analysiert. Hier wurden die konjugierten Diene wieder bei 235 nm verfolgt. Die Retentionszeiten der konjugierten Diene wurden durch die Injektion authentischer Standards (5-, 12- und 15-HETE sowie 13-HODE) ermittelt. Für die Quantifizierung der Reaktionsprodukte der Lipoxygenasereaktion wurden die Flächeninhalte unter den Chromatogrammpeaks integriert und unter Berücksichtigung von Standards in Stoffmengen der Produkte umgerechnet.

### **3.9.2. Chiral LC-MS/MS für die 18-HEPE-Analytik**

Zur chromatographischen Auftrennung von R- und S-Enantiomeren der Hydroxyfettsäuren wurde die Chiral-Phasen-HPLC mit anschließender Massenspektrometrie angewendet. Diese Analytik wurde im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch von M. Blum durchgeführt. Das Vorgehen ist von Blum et al. beschrieben [154]. Die Proben wurden durch die Polysaccharidsäule Lux-Amylose-1 (150 × 2 mm, 3 µm Partikelgröße, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit der mobilen Phase aus Methanol, Wasser und Essigsäure geleitet. Die Volumenverhältnisse der mobilen Phasen änderten sich linear von 70:30:0.05 zu 80:20:0.05 (v/v/v) über 16 min und die Flussrate von 0.2 mL/min wurde eingestellt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Single-Quad-ESI-MIS (Shimadzu LCMS 2010-EV) im negativen Ionisierungsmodus analysiert.

### **3.10. Computergestützte Analyse**

Die Graphiken, Tabellen und statistische Auswertung der meisten Versuche wurden mit Microsoft Excel 2016 (Washington, USA) angefertigt. Die Auswertung der Chromatogramme wurde mit dem Programm LabSolutions LCsolution Version 1.25 (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) durchgeführt. Für die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes sowie von  $v_{max}$  der MF-LOX1 für Sauerstoff und Eicosapentaensäure sowie Anfertigung der Michaelis-Menten-Kurven wurde das Programm SigmaPlot (Systat Software Inc., Chicago, USA) verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Proteinchemische und enzymatische Charakterisierung von MF-LOX1

#### 4.1.1 Identifizierung potenzieller Lipoxygenasegene im Genom von *Myxococcus fulvus*

Bei unserer Suche nach potenziellen bakteriellen ALOX-Isoformen wurde die potentielle ALOX-Isoform aus *Myxococcus fulvus* identifiziert, deren vollständige Proteinsequenz in der NCBI-Proteindatenbank unter dem Zugriffscode WP\_046712474.1 hinterlegt ist. Diese Proteinsequenz besteht aus 676 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 76.5 kDa, was mit Molekulargewichten anderer bereits charakterisierter ALOX-Isoformen übereinstimmt. Durch die Alignments der LOX-Aminosäuresequenz aus *Myxococcus fulvus* (MF-LOX1) mit Aminosäuresequenzen der humALOX15 (Mensch, AAA36182.1) und der rabALOX15 (Kaninchen, NP\_001075751.1) wurden zwei Metallbindungskuster identifiziert. Bei der MF-LOX1 werden die Metall-ligandierenden Aminosäuren durch das Histidin367 sowie das Histidin372 (proximaler Metallbindungskuster) und das Histidin549 sowie das Asparagin553 (distaler Metallbindungskuster) repräsentiert. Die beiden Metallbindungskuster sind durch 176 Aminosäuren voneinander getrennt. Als fünfter Ligand der Eisenkoordination dient üblicherweise die Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure [18], die bei der MF-LOX1 durch Valin676 repräsentiert wird. Die in anderen ALOX-Isoformen am häufigsten vorkommende C-terminale Aminosäure ist Isoleucin. Das gilt unter anderen für humALOX15, rabALOX15 sowie Sojabohnen-15-Lipoxygenase (*Glycine max*, NP\_001075751.1). Es wurden allerdings auch katalytisch aktive ALOX-Isoformen beschrieben, die als N-terminale Aminosäure kein Isoleucin enthalten. Dies gilt zum Beispiel für eine Pilz-Lipoxygenase aus *Gaeumannomyces graminis* (AAK81882.2) und für eine bakterielle Lipoxygenase aus *Myxococcus xanthus* (WP\_011551853.1), die als C-terminale Aminosäure jeweils Valin tragen. Weil lediglich die Carboxygruppe der C-terminalen Aminosäure für die Eisenkoordination entscheidend ist, sollte die chemische Struktur der Aminosäure für die Ligandierung des Übergangsmetalls keine Rolle spielen.

Die Genome von Organismen, bei denen bereits eine Lipoxygenase identifiziert worden ist, enthalten häufig mehrere Lipoxygenasegene. So hat der Mensch beispielsweise sechs verschiedene Lipoxygenasegene, die jeweils für eine funktionell aktive Lipoxygenase kodieren. Das Genom von *Myxococcus fulvus* verfügt ebenfalls über zwei hypothetische Lipoxygenasegene (WP\_046712474.1, in dieser Arbeit als MF-LOX1 bezeichnet und SEU34910.1, in dieser Arbeit als MF-LOX2 bezeichnet), deren Aminosäurehomologiegrad 21.4 % beträgt. Weil angenommen wird, dass Bakterien ihre Lipoxygenasegene durch horizontalen Gentransfer von höher

entwickelten Organismen erworben haben [155], ergab sich die Frage, welche der humanen ALOX-Isoformen der MF-LOX1 am ähnlichsten ist. Durch duale Aminosäurealignments der MF-LOX1 mit allen humanen ALOX-Isoformen konnte festgestellt werden, dass der Homologiegrad der MF-LOX1 zu allen humanen Enzymen nur ca. 30 % beträgt. Damit ist es nicht möglich festzulegen, welcher humanen ALOX-Isoform die MF-LOX1 funktionell entspricht. Weitere Aminosäurealignments mit tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen ALOX-Isoformen ergaben außerdem, dass außerhalb der Bakteriengattung *Myxococcus* keine andere bisher identifizierte ALOX-Isoform einen Aminosäurehomologiegrad von > 40 % zur MF-LOX1 aufweist. Damit ist es derzeit nicht möglich, die Verwandtschaftsverhältnisse der MF-LOX1 zu anderen ALOX-Isoformen näher zu charakterisieren.

**Zfg.: Die *Myxococcus fulvus* LOX1 (MF-LOX1) weist nur eine geringe (< 40%) Aminosäureidentität zu den meisten bisher identifizierten LOXn auf. Damit kann keine verlässliche Verwandtschaftsbeziehung zu Lipoxygenasen anderer Spezies hergestellt werden.**

Nach dem Beginn meiner Arbeiten wurden zwei Lipoxygenasene in einer anderen *Myxococcus*gattung (*M. xanthus*) identifiziert. Auch diese Enzyme [WP\_011551853.1 [156], hier bezeichnet als MX-LOX1; WP\_011551854.1 [157], hier bezeichnet als MX-LOX2] wurden rekombinant exprimiert und ihre katalytischen Aktivitäten wurden bestimmt. Die beiden Lipoxygenasen aus *M. xanthus* zeigen untereinander eine Aminosäureidentität von lediglich 19.7 %. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich beide Enzyme auch hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften voneinander unterscheiden sollten. Die Aminosäuresequenzalignments der Lipoxygenasen aus beiden *Myxococcus*-Spezies (**Tab. 1**) zeigen, dass die MX-LOX1 eine 85.8 %-ige Identität zur MF-LOX1 aufweist. Vergleichbar beträgt der Homologiegrad der MX-LOX2 und MF-LOX2 85.7 %. In der **Abb. 5** sind die Ergebnisse des Alignments von MF-LOX1 (in dieser Arbeit erstmals beschrieben) und MX-LOX2 dargestellt und die Eisenliganden sind hervorgehoben. Wenn man duale Sequenzalignments von Säugetier-ALOX15-Orthologen durchführt (z.B. humALOX15 gegen rabALOX15 oder humALOX15 gegen pigALOX15), betragen die Aminosäureidentitäten zwischen 70 und 80 %. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die beiden *Myxococcus*-Spezies jeweils zwei unterschiedliche Lipoxygenasene beinhalten, die paarweise ortholog sein können.

**Zfg.: *M. fulvus* und *M. xanthus* besitzen jeweils zwei unterschiedliche Lipoxygenasene, die paarweise ortholog sein können. Eine verwandtschaftliche Zuordnung der beiden MF-ALOX-Paralogen zu humanen ALOX-Isoformen ist nicht möglich.**

WP_011551854.	1	MSASVTRRGGADRRWDGRARGMGTGMMFAGLRRWMGALGGKGRESGSNE	50
WP_046712474.	1	MTVEYKLRIRTSTKL-----GAGTDANISVV-----LVGTRGESGPH-	37
WP_011551854.	51	VLDAEELSRWYSGLALEERLAI SRELAPRVRAVREPAREPSTLPVAVGRL	100
WP_046712474.	38	VLDKPFHNDFEAGAEDVYSVQASDDL GALL-LLRFGNTGGIAADWLLDHA	86
WP_011551854.	101	VFEQDGPQGPIMPMMHIKVELWDRDFGTPDDFLGEG-FTSDGCF SIRYDP	149
WP_046712474.	87	WVTAGERQWSFPFFR-----WVRAGATVDVLEGTAKLARHAGC-----ER	126
WP_011551854.	150	ADAGVNDLPDLEVRFFEPQHSFRPDGRVVEAWCRIGSEKGPDDHGGLHYD	199
WP_046712474.	127	ETAARRELEARRRMPWRPAEATEG-LPGALDLSEAQPLPKDELYRGLT	175
WP_011551854.	200	FGTLRLPYWEYDPTTPLARLLVTEEGTPPTAYAPGRALAMLKAVAPIELV	249
WP_046712474.	176	EGSYEVVIARTLASIKLHPLLLTKAWNGLVDIFDFFKGLEVPRLAPRWQD	225
WP_011551854.	250	KRRHLQGR LGQAPSLDRIQADYPEAMTVRMERE---SPGSTRIDAFFG	295
WP_046712474.	226	DLEFARQAVQGINPLHITLIPQLPQGMPLTDEDVKGVLSPGTTLARALDS	275
WP_011551854.	296	ERLLNGMFSTLMDGDPEAPGDPEAFRLYFPWNAYEQDGVHCLPDVDVRLR	345
WP_046712474.	276	KRIFLLDFDILEDIPMYRKVDEEDGVEER-RW---APAARCLLYLD-DLR	319
WP_011551854.	346	LVEGRLLPVRIILGMREPGATAPGSPVTRRSYTPADGEA-WEAAKRMARV	394
WP_046712474.	320	----QLRPLAIQLG-RDGGK----DEV----FTPNDDTYDWLAAKIYLRC	356
WP_011551854.	395	SATLETELGNHLGQCHFNVEQYATAAHRNLRRS-PLRWLLMPLHREV VLI	443
WP_046712474.	357	SEGNTHQMVAHALRTHFVAEPPFVMATMRNLPDPHPVYKLLRRHFRYTLAI	406
WP_011551854.	444	NHSANGFLVGP TGYITRASALTERSVETRLLHLMGSYDWK--GFAPAPP-	490
WP_046712474.	407	NEGARKGLLSAGGVFDDFIATGGPDKGHLQLGKKGYQRWKLTDNRPRPDF	456
WP_011551854.	491	-----ICESHRYARAAGLFWRLVGEHVDA---FFAHEGAALEAQWS	528
WP_046712474.	457	ERRGVLDPAVLPYYPYRDDALPLWDALEEYVGGVLRVYFYPTDADLEGD-T	505
WP_011551854.	529	EVRRFSDDL VGHSAPA--FVCRYLRATVPGRAAPWFVRSERMDLDAKVAA	576
WP_046712474.	506	EMQHWKDLTEHGLPVDKLPCRELSRV-----DDLVDILT TVVF	544
WP_011551854.	577	THAKAVSAVTRTDAPQPGEMEALKQLCRYVIYFATFRHAWANNLQWDDAG	626
WP_046712474.	545	TVSVQFAAVNYL-----QYEHYAFVFNAPLCMRREPPRQKGT LRAEDIP	588
WP_011551854.	627	EVLYACLGLRWGKA--GALSTEADHDVAPPPEEATEMLWISWMLSKTSYG	674
WP_046712474.	589	EMIPSKSQILWQVAIGRALSSFGDDEEYLLNEGG---WREEYFQEPEVK	634
WP_011551854.	675	FLLAN-EEADVHPRFVECLRAHAAEF SALGMDIRTVSSRINI	715
WP_046712474.	635	ALRERFEQRLVAQRDVVAARNAGA QVPYTVLSPDRIPC GIV	676

**Abb. 5. Duales Aminosäurealignment der MF-LOX1 (WP\_046712474.1) mit der MX-LOX2 (WP\_011551854.1).** Die vermutlichen Eisenliganden sowie die Determinanten für die Positions- und Stereospezifität sind farblich markiert: grün – Eisenliganden, gelb – Coffa-Determinante, rot – Borngräber-I-Determinante, blau – Sloane-Determinanten.

**Tab. 1. Aminosäureidentitätsgrade der ALOX-Isoformen aus *Myxococcus fulvus* und *Myxococcus xanthus* in Prozent (%).** Es wurden bereits zwei Lipoxygenasegene in *Myxococcus xanthus* beschrieben (WP\_011511853.1 und WP\_011551854.1). Im Genom von *Myxococcus fulvus* wurden zwei vermutliche Lipoxygenasesequenzen identifiziert (WP\_046712474.1 und SEU34910.1). Zur Bestimmung der Aminosäureidentitätsgrade wurden duale Sequenzalignments durchgeführt.

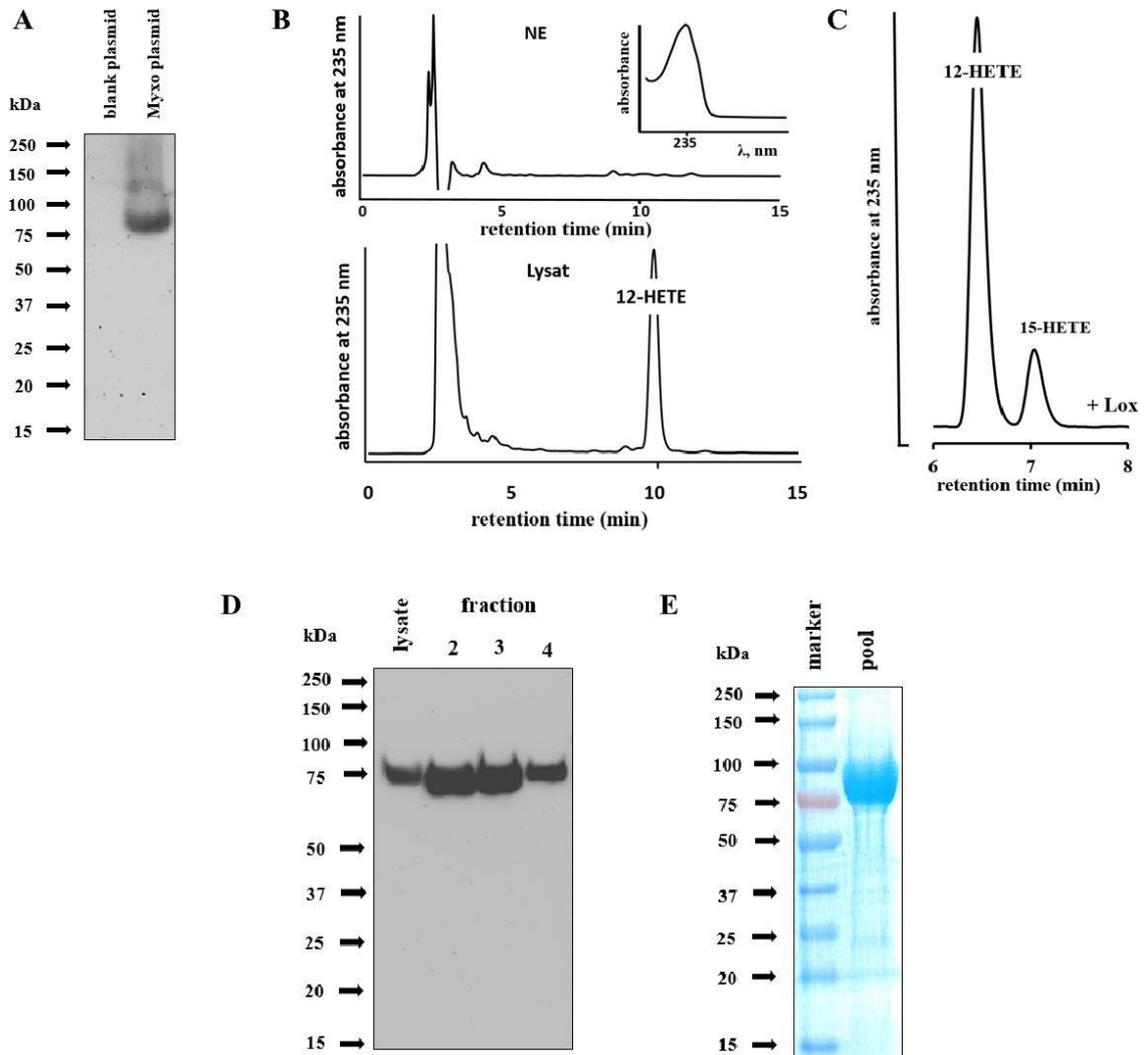
Enzym	WP_011511853.1 (MX-LOX1)	WP_011551854.1 (MX-LOX2)	WP_046712474.1 (MF-LOX1)	SEU34910.1 (MF-LOX2)
WP_011511853.1 (MX-LOX1)	100	19.7	85.8	21.1
WP_011551854.1 (MX-LOX2)	19.7	100	19.7	85.7
<b>WP_046712474.1 (MF-LOX1)</b>	85.8	19.7	100	21.4
SEU34910.1 (MF-LOX2)	21.1	85.7	21.4	100

#### 4.1.2. Rekombinante Expression der MF-LOX1

Um zu überprüfen, ob MF-LOX1 eine funktionelle ALOX-Isoform repräsentiert, wurde das Enzym als N-terminales His<sub>6</sub>-Tag Fusionsprotein in *E. coli* rekombinant exprimiert. Nach der Expression wurden die Bakterienzellen durch Ultraschall fragmentiert und die Lipoxygenase konnte mithilfe von Western Blot mit Anti-His-Tag-Antikörpern im Bakterienlysat nachgewiesen werden (**Abb. 6A**). Zu weiteren Zwecken wurde das rekombinante Protein an einer Ni-NTA-Matrix aufgereinigt. Das Matrix-gebundene Protein wurde mit einer 200 µM Imidazol-Lösung in 5 Fraktionen zu je 0.2 mL eluiert, wobei die Fraktionen 2, 3 und 4 das rekombinante Protein enthielten (**Abb. 6D**). Diese Fraktionen wurden vereinigt und für weitere Charakterisierungsexperimente verwendet. Durch die Affinitätschromatographie auf der Ni-NTA-Matrix konnte eine zu > 95 % reine Enzympräparation gewonnen werden (**Abb. 6E**).

Zur Ermittlung der katalytischen Aktivität der Lipoxygenase wurden Aktivitätsassays durchgeführt. Dafür wurden die Reaktionsprodukte, die innerhalb einer 1-minütigen Inkubation der MF-LOX1-Proteinpräparation mit AA gebildet wurden, quantifiziert. Die Reaktionsprodukte wurden zunächst mittels RP-HPLC analysiert. Die Injektion von HPLC-Standards (5-HETE, 12-HETE und 15-HETE) erlaubte, das Hauptprodukt als 8- bzw. 12-HETE zu identifizieren (**Abb. 6B**). Weil 8- und 12-HETE unter unseren chromatographischen Bedingungen nicht aufgetrennt werden konnten, wurden die Reaktionsprodukte mittels RP-HPLC präpariert und anschließend mittels NP-HPLC weiter untersucht (**Abb. 6C**). Auf diese Weise konnte die MF-LOX1 als AA 12-lipoxygenierendes Enzym identifiziert werden.

Weil das gereinigte Protein für die Aktivitätsassays verwendet wurde, konnte die spezifische Aktivität des Enzyms in Form der molekularen Wechselzahl bestimmt werden. Diese betrug für die in *E. coli* exprimierte MF-LOX1 mit EPA als Substrat  $(3.1 \pm 1.2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (n=3).



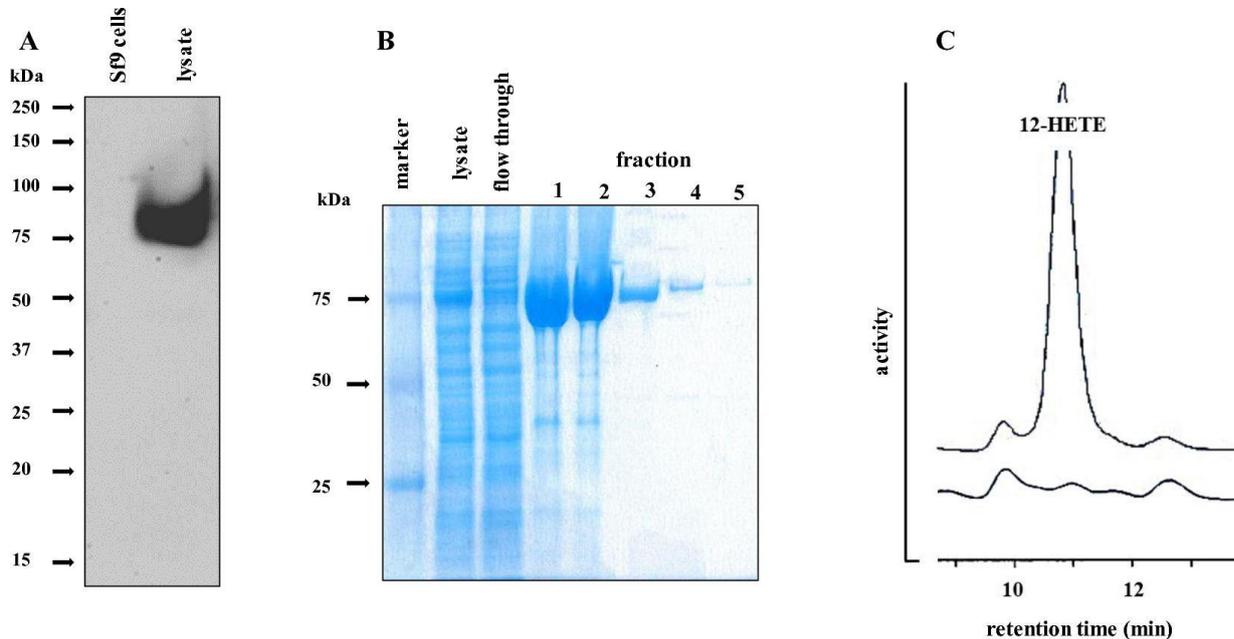
**Abb. 6. Bakterielle Expression und Proteinreinigung der MF-LOX1.** MF-LOX1 wurde als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. **A)** Immunoblot: Die Bakterien wurden nach 72-stündiger Inkubationszeit mithilfe des Ultraschalls lysiert, die Zelltrümmer wurden mittels der Zentrifugation entfernt. Mit einem Aliquot des Lysatüberstandes wurde die SDS-PAGE durchgeführt, die aufgetrennten Proteinbanden wurden auf die NC-Membran transferiert und die Membran wurde mit Anti-His-Antikörpern gefärbt. Linke Spalte: Bakterienzellen wurden mit einem leeren Plasmid transformiert. Rechte Spalte: Bakterienzellen wurden mit einem rekombinanten Plasmid transformiert. **B)** Lipoxygenase-Aktivitätsassay (RP-HPLC): Zur Prüfung der Enzymaktivität wurde die AA-Lösung mit einem Aliquot bakteriellen Lysatüberstandes inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC analysiert, wobei die Retentionszeiten der authentischen Standardlösungen berücksichtigt wurden. Oben: Nichtenzymkontrolle (statt eines Enzyms wurde Puffer eingesetzt). Unten: Enzym-Inkubation mit einem Aliquot bakteriellen Lysatüberstandes. **C)** Lipoxygenase-Aktivitätsassay (NP-HPLC): Ein Aliquot bakteriellen Lysatüberstandes wurde mit einer AA-Lösung inkubiert und die Reaktionsprodukte wurden mittels NP-HPLC analysiert. **D)** Proteinreinigung: Affinitätschromatographie des rekombinanten His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteins wurde an einer Ni-NTA-Agarose-Säule durchgeführt und die Aliquots verschiedener Elutionsfraktionen wurden mittels Immunoblot analysiert. **E)** Reinheitsgrad der finalen Enzympräparation: Die Elutionsfraktionen 2 bis 4 der Affinitätschromatographie wurden zusammengemischt und mittels SDS-PAGE und finaler Färbung mit einer Page Blue Protein Staining Solution gefärbt.

Dieser Wert ist mehr als zwei Größenordnungen geringer als der Wert, der für die humALOX15 bei ihrer Reaktion mit LA errechnet werden konnte [158] und vier Größenordnungen geringer als die Wechselzahl einer vergleichbaren Proteinpräparation der Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* bei der AA-Oxygenierung [147]. Allerdings wurden in der Vergangenheit LOXn beschrieben, deren katalytische Aktivität *in vitro* mit der Wechselzahl der MF-LOX1 vergleichbar ist. Dies ist z.B. der Fall für die humALOX5, die unter den in dieser Publikation beschriebenen experimentellen Bedingungen eine katalytische Aktivität von  $0.06 \text{ s}^{-1}$  aufweist [159]. Die molekularen Ursachen für die vergleichsweise geringe spezifische Aktivität der MF-LOX1 wurden an dieser Stelle nicht weiter untersucht. Als mögliche Gründe kommen u.a. eine partielle Fehlfaltung des Enzyms bzw. ein geringer Eisengehalt (**Kapitel 4.1.3**) in Frage.

Sollte eine partielle Fehlfaltung des rekombinanten Proteins die Ursache für die geringe spezifische Aktivität sein, bestünde die Möglichkeit, ein besseres Enzympräparat zu erhalten, wenn ein alternatives Expressionssystem verwendet würde. Deshalb wurde die MF-LOX1 im Baculovirus-Insektenzellsystem in Sf9-Zellen exprimiert (**Abb. 7**). Die Enzymausbeute der Bakterienkultur betrug  $118.2 \pm 17.3 \text{ mg/L}$  Kultur ( $n=3$ ), während aus der Insektenzellkultur  $92 \text{ mg/L}$  Flüssigkultur ( $n=1$ ) Protein isoliert wurde. Damit sind die beiden Expressionsstrategien hinsichtlich ihres Expressionsniveaus ähnlich effizient. Leider konnte die spezifische katalytische Aktivität der MF-LOX1 durch die Expression in Insektenzellen nicht verbessert werden. Die Wechselzahl dieser MF-LOX1-Präparation mit EPA als Substrat betrug  $2.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $n=1$ ).

Schließlich wurde auch eine Proteinexpression in HEK293-Zellen durchgeführt. Nach der Transfektion von HEK293-Zellen mit dem rekombinanten pcDNA3.1(-) Expressionsplasmid und einer 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen der 6-Well-Platte pelletiert. Die Zellen aus fünf Wells wurden für den Aktivitätsassay vereinigt ( $2 \times 10^6$  Zellen /ml PBS) und in Gegenwart von exogen zugegebener AA (Endkonzentration  $160 \mu\text{M}$ ) durch Ultraschall lysiert. Leider zeigte sich im Rahmen der Aktivitätsassays keine signifikante Bildung von Lipoxygenaseprodukten. Im Gegensatz dazu konnten bei der parallel durchgeführten Expression der humALOX15 (Positivkontrolle) deutliche Mengen an 15-HETE als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei der Expression der MF-LOX1 wurden auch in der Nichtenzymkontrolle (Negativkontrolle) keine spezifischen Lipoxygenaseprodukte detektiert. Die Zellen aus dem sechsten Well der 6-Wellplatte wurden für eine Westernblot-Analyse mit Anti-His-Tag-Antikörpern verwendet. Leider konnte auch mit dieser Methode kein immunreaktives Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der parallel durchgeführten Expression der humALOX15 (Positivkontrolle) eine deutliche immunreaktive Bande. Damit wurde festgestellt, dass die MF-LOX1 sich im HEK293-Zellsystem nicht effizient exprimieren lässt.

**Zfg.:** Die MF-LOX1 konnte als N-terminales His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* mit einer Expressionsrate von  $118.2 \pm 17.3$  mg (n=3) rekombinantem Protein pro Liter Flüssigkultur exprimiert und an einer Ni-NTA-Matrix gereinigt werden. Bei Verwendung von EPA als Substrat betrug die spezifische Aktivität des finalen Enzympräparates  $(3.1 \pm 1.2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

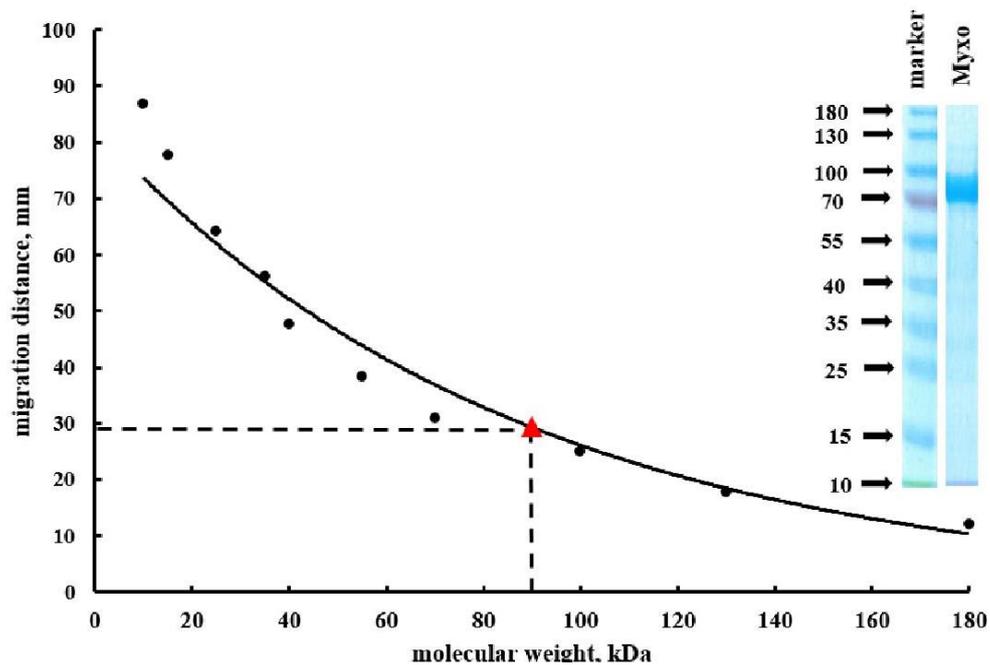


**Abb. 7. Eukaryotische Expression der rekombinanten MF-LOX1 in Sf9-Zellen.** Das rekombinante His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsprotein wurde in Insektenzellen (Sf9-Zelllinie) exprimiert. **A)** Immunoblot: Die Sf9-Zellen wurden mit rekombinantem Baculovirus infiziert (siehe **Kapitel 3.4.2**) und nach einer 72-stündiger Inkubationszeit mittels Ultraschall lysiert. Die Zelltrümmer wurden mithilfe der Zentrifugation entfernt. Ein Aliquot des zellulären Lysatüberstandes wurde für SDS-PAGE eingesetzt und das Protein wurde danach auf eine NC-Membran übertragen. Die NC-Membran wurde mit Anti-His-Antikörpern gefärbt. Linke Spalte: Lysatüberstand der nicht-infizierten Sf9-Zellen. Rechte Spalte: Lysatüberstand der mit rekombinantem Baculovirus infizierten Zellen. **B)** Aufreinigung der in Sf9-Zellen exprimierten MF-LOX1: Der Lysatüberstand einer Insektenzellpräparation wurde mittels der Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt, mit Aliquots der Elutionsfraktionen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die Proteinbanden wurden mit einer Page Blue Protein Staining Solution gefärbt. **C)** Aktivitätsassay der in Sf9-Zellen exprimierten MF-LOX1: Eine AA-Lösung wurde mit einem MF-LOX1-Aliquot inkubiert und die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC analysiert. Eine Nichtenzymkontrolle (-Lox, Puffer statt Proteinpräparation) wurde als negative Kontrolle durchgeführt.

#### 4.1.3. Proteinchemische Charakterisierung der MF-LOX1

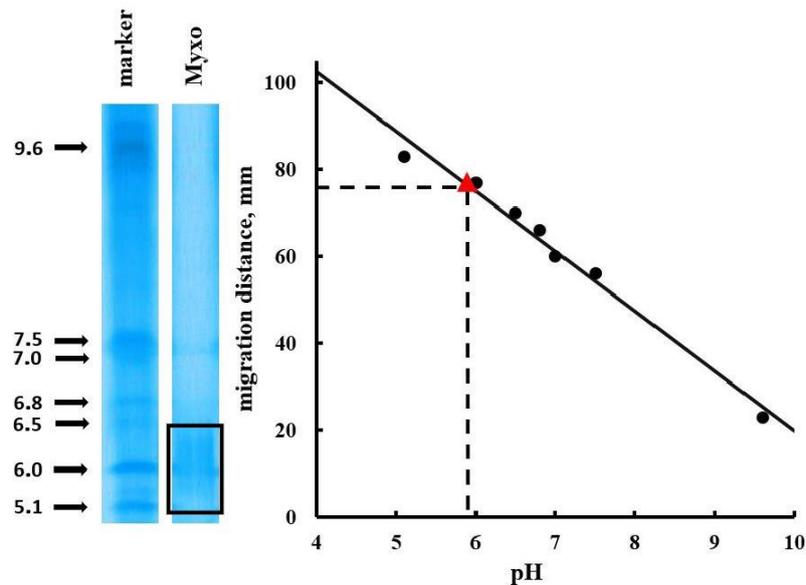
Die MF-LOX1 wurde als His<sub>6</sub>-Tag Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Durch das Anfügen des His<sub>6</sub>-Tags an den N-Terminus der MF-LOX1 wurde die Aminosäuresequenz um 32 Aminosäuren verlängert. Die zusätzliche Aminosäuresequenz ergab sich aus der Klonierungsstrategie der MF-LOX1 cDNA in den pET28b(+) Expressionsvektor. Dadurch wurde das theoretisch errechnete Molekulargewicht von 76.5 kDa, das sich aus der Summe der Molekulargewichte der Aminosäuren ergibt, auf 79.8 kDa erhöht. Durch die Analyse der

Laufstrecken der Proteinbanden in einem Acrylamidgel (SDS-PAGE) wurde ein Molekulargewicht der denaturierten MF-LOX1 von 90.3 kDa bestimmt (Abb. 8).



**Abb. 8. Bestimmung des Molekulargewichtes der rekombinanten MF-LOX1.** Ein Aliquot einer gereinigten Präparation der in *E. coli* exprimierte MF-LOX1 (Kapitel 3.4.1 und Kapitel 3.5) wurde mittels SDS-PAGE analysiert und das Polyacrylamidgel wurde mit einer Page Blue Protein Staining Solution gefärbt. Die Migrationsstrecken von Proteinbanden einer Standardproteinmischung mit bekannten Molekulargewichten wurden zur Berechnung des Molekulargewichtes des MF-LOX1 His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteins analysiert.

Der theoretisch errechnete isoelektrische Punkt des MF-LOX1 His<sub>6</sub>-Tag Fusionsproteins beträgt 5.8. Dieser Wert ergibt sich aus der Aminosäuresequenz des rekombinanten Fusionsproteins, wobei alle Aminosäuren gleichgewichtet sind. Dies ist jedoch bei nativ gefalteten Proteinen nicht der Fall. Insofern können sich der theoretische (vollständig entfaltetes Protein) und der experimentelle isoelektrische Punkt eines Proteins deutlich voneinander unterscheiden. Die isoelektrische Fokussierung der nativen MF-LOX1 zeigte mehrere Proteinbanden, die im pH-Bereich zwischen 5.1 und 6.5 wanderten (Abb. 9). Diese Ergebnisse deuten auf eine strukturelle Mikroheterogenität der finalen Enzympräparation hin. Dabei scheinen sich verschiedene Enzymmoleküle leicht unterschiedlich zu falten, sodass sich andere Aminosäuren an der Proteinoberfläche wiederfinden. Dadurch wird die Oberflächenladung der partiell anders gefalteten Proteinmoleküle verändert, was zu verschiedenen nativen isoelektrischen Punkten führt.



**Abb. 9. Isoelektrische Fokussierung des MF-LOX1-Fusionsproteins.** Ein Aliquot einer gereinigten Präparation der in *E. coli* exprimierte MF-LOX1 (Kapitel 3.4.1 und 3.5) sowie ein Aliquot der Proteinstandardmischung mit bekannten Protein-pH-Werten wurden mittels der Elektrophorese analysiert. Die Berechnung des isoelektrischen Punktes der nativen MF-LOX1 erfolgte durch die Analyse von Wanderungstrecken bekannter Proteinbanden.

Alle in der Literatur beschriebenen Lipoxygenasen enthalten in ihrem katalytischen Zentrum entweder ein Eisen- oder ein Manganion [160, 161]. Um das Vorhandensein eines Übergangsmetalls in der MF-LOX1 zu überprüfen, wurde eine gereinigte und entsalzte Enzympräparation hergestellt und der Gehalt an Übergangsmetallen mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Es konnten keine signifikanten Mengen an Mangan, Zink und Kobalt in der gereinigten MF-LOX1-Präparation nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Eisenkonzentration zeigte einen signifikant höheren Wert als im Entsalzungspuffer, der als Referenzprobe diente. Wenn die Eisenkonzentration der Enzymlösung auf die MF-LOX1-Konzentration umgerechnet wurde, ergab sich ein Eisengehalt der MF-LOX1 von 5.6 % (Tab. 2). Aus diesen Daten ließ sich schlussfolgern, dass nur etwa jedes 20-igste Enzymmolekül mit Eisen beladen war. Diese geringe Eisenbeladung muss als wesentlicher Faktor für die geringe katalytische Aktivität der MF-LOX1 diskutiert werden. Daraufhin wurde versucht, die Eiseninkorporation der MF-LOX1-Proteinpräparation zu erhöhen. Dafür wurden zwei unterschiedliche Strategien angewendet: **i)** Die MF-LOX1 wurde in einem Kulturmedium exprimiert, das mit Eisensalzen angereichert war ( $\text{Fe}^{3+}$ -Endkonzentration von 250  $\mu\text{M}$ , gleiche Strategie wie in [162] verwendet). Leider konnte mit dieser Strategie die spezifische Aktivität des Enzyms nicht erhöht werden. **ii)** Um die Eisenbindungsfähigkeit des Enzyms zu verbessern, wurde die C-terminale Aminosäure (Val676), die als Eisenligand fungiert, mittels Mutagenese verändert. Da bei den meisten LOX-Isoformen Ile als C-terminale Aminosäure fungiert, bestand die

Möglichkeit, dass der Val676Ile-Austausch zu einer MF-LOX1-Mutante führt, die eine höhere Eisenaffinität aufweist. Leider konnten diese Überlegungen experimentell nicht bestätigt werden, da die Enzymmutante in den Aktivitätsassays nicht aktiv war.

In weiterführenden Experimenten (**Kapitel 3.3**) haben wir verschiedene Enzymvarianten hergestellt, bei denen die Aminosäuren, die potentiell für die Reaktionsspezifität der MF-LOX1 verantwortlich sein könnten, mutiert wurden. Dabei fiel auf, dass die Phe424Ile+Ile425Met Mutante eine deutlich höhere spezifische Aktivität aufwies. Um herauszufinden, ob diese erhöhte katalytische Aktivität auf eine stärkere Eisenbeladung des Enzyms zurückzuführen ist, wurde auch für diese Mutante eine Eisenbestimmung durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Eisenbeladung dieses Enzympräparats 4-fach höher war als beim Wildtypenzym.

**Tab. 2. Eisengehalt der gereinigten rekombinanten MF-LOX1 und ihrer Sloane-Mutante.** MF-LOX1 und ihre Sloane-Mutante Phe424Ile+Ile425Met wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die mittels Affinitätschromatographie gereinigten Proteinpräparationen wurden für die Bestimmung des Eisengehaltes verwendet.

Parameter	Eisengehalt (µmol/L)	Proteinkonzentration (µmol/L)	Eisengehalt (%)
Wildtyp	0.750	13.44	5.6
SL (Phe424Ile + Ile425Met)	0.835	3.838	22

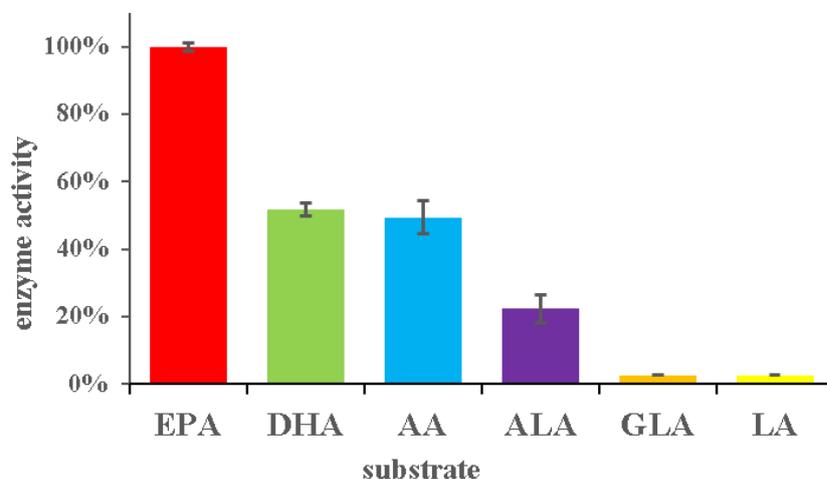
**Zfg.:** Die rekombinante MF-LOX1 wies ein Molekulargewicht von 90 kDa auf und zeigte in der analytischen isoelektrischen Fokussierung eine strukturelle Mikroheterogenität. Der Eisengehalt des rekombinanten Proteins war 5.6 %, was einen inkompletten Eiseneinbau anzeigt. Der geringe Eisengehalt kann als Ursache für die niedrige spezifische Aktivität des Enzyms diskutiert werden.

#### 4.1.4. Enzymatische Charakterisierung der MF-LOX1

In den meisten der nachfolgend beschriebenen Versuche wurden die Reaktionsansätze zur Untersuchung der enzymatischen Charakteristika der MF-LOX1 für 1 min inkubiert. Diese relativ kurze Inkubationszeit ergab sich aus der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Lipoxygenasereaktion. Dafür wurden die Reaktionsansätze für unterschiedliche Zeiten (von 1 bis 30 min) inkubiert und die Produktmengen mittels RP-HPLC quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass es bei längeren Inkubationszeiten zu keiner verstärkten Bildung von Hydroxyfettsäuren kommt. Im Gegenteil war die Produktausbeute einer 5-minütigen Inkubation geringer als die bei einer 1-minütigen Reaktion. Dieses Ergebnis kann z.B. durch eine weitere Metabolisierung der primären Hydroperoxyfettsäuren (Bildung von Sekundärprodukten aus den primären

Oxygenierungsprodukten) erklärt werden. Alternativ könnte eine schnelle Selbstinaktivierung des Enzyms, wie sie für andere ALOX-Isoformen beschrieben wurde [163], und eine geringe Thermostabilität der MF-LOX1 (siehe unten) zu dieser ungewöhnlichen Reaktionskinetik beitragen.

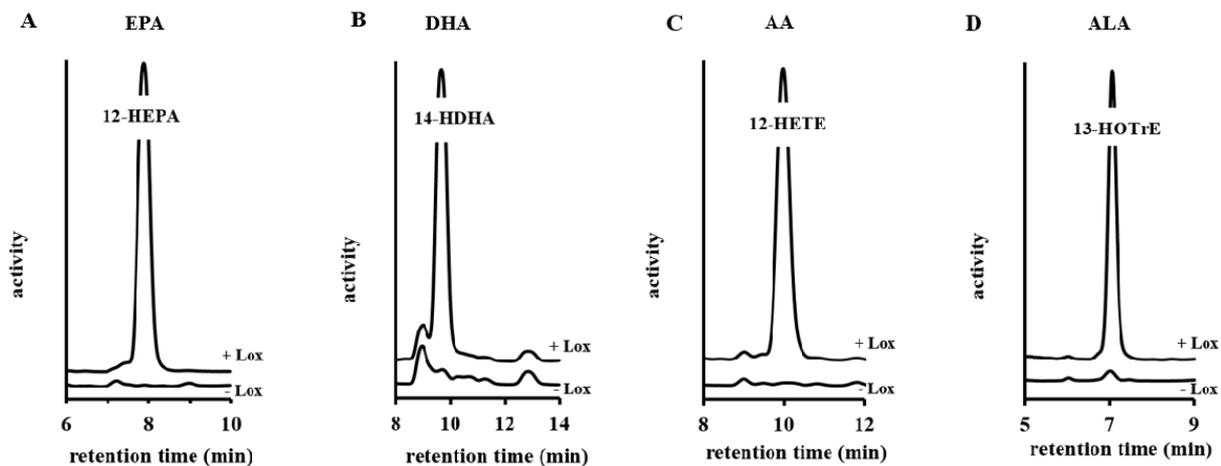
Die MF-LOX1 erwies sich bei der Reaktion mit AA als ein 12-lipoxygenierendes Enzym. Um die Substratspezifität und das Produktmuster der Reaktion mit anderen Fettsäuren zu testen, wurde die MF-LOX1 mit verschiedenen  $\omega$ -3-PUFAs (ALA, EPA, DHA) und  $\omega$ -6-PUFAs (LA, GLA und AA) inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass die MF-LOX1 am effektivsten EPA verstoffwechselt (**Abb. 10**). Mit gradual reduzierter Effizienz wurden AA, DHA und ALA oxygeniert. Keine Oxygenierungsprodukte konnten nachgewiesen werden, wenn GLA und LA als Substrate verwendet wurden.



**Abb. 10. Substratspezifität der MF-LOX1.** Die Aliquots der MF-LOX1-Präparation wurden mit Lösungen verschiedener PUFAs (EPA, DHA, AA, ALA, GLA und LA) inkubiert und die Mengen an Reaktionsprodukten (konjugierten Dienen) wurden quantifiziert. Dabei wurde die Menge an EPA-Reaktionsprodukten als 100 % gesetzt.

Für die Identifizierung der chemischen Struktur der Reaktionsprodukte wurden Parallelinkubationen der Fettsäuren mit der humALOX15 durchgeführt. Da die Reaktionsprodukte dieses Enzyms bereits früher identifiziert worden waren [164], konnten die Produktmuster dieser Inkubationen zu Vergleichszwecken herangezogen werden. Die humALOX15 oxygeniert die EPA am C15 (15-HpEPE) und C12 (12-HpEPE), wobei 12-HpEPE ein Nebenxygenierungsprodukt darstellt. Ähnlich sind die n-9-Oxygenierungsprodukte von AA und DHA (12-HpETE und 14-HpDHA) Nebenprodukte der humALOX15. Bei vergleichenden HPLC-Analysen wurde festgestellt, dass die Hauptoxygenierungsprodukte der MF-LOX1 mit EPA, AA und DHA mit

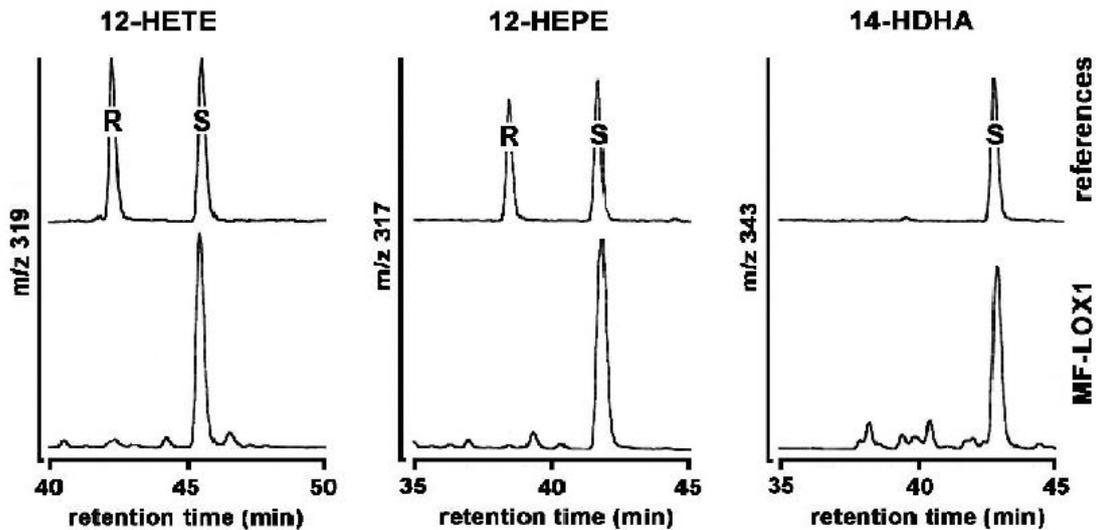
Nebenoxygenierungsprodukten der humALOX15 (12-HpEPE, 12-HpETE und 14-HpDHA) co-chromatographierten (**Abb. 11A-C**). ALA wurde durch beide Lipoxygenasen (MF-LOX1 und humALOX15) zu einem Hauptprodukt oxygeniert, welches in der RP-HPLC mit einem authentischen Standard von 13-HOTrE (n-3) [(13S,9Z,11E,15Z)-13-Hydroxyoctadeca-9,11,15-triensäure] co-chromatographierte (**Abb. 11D**).



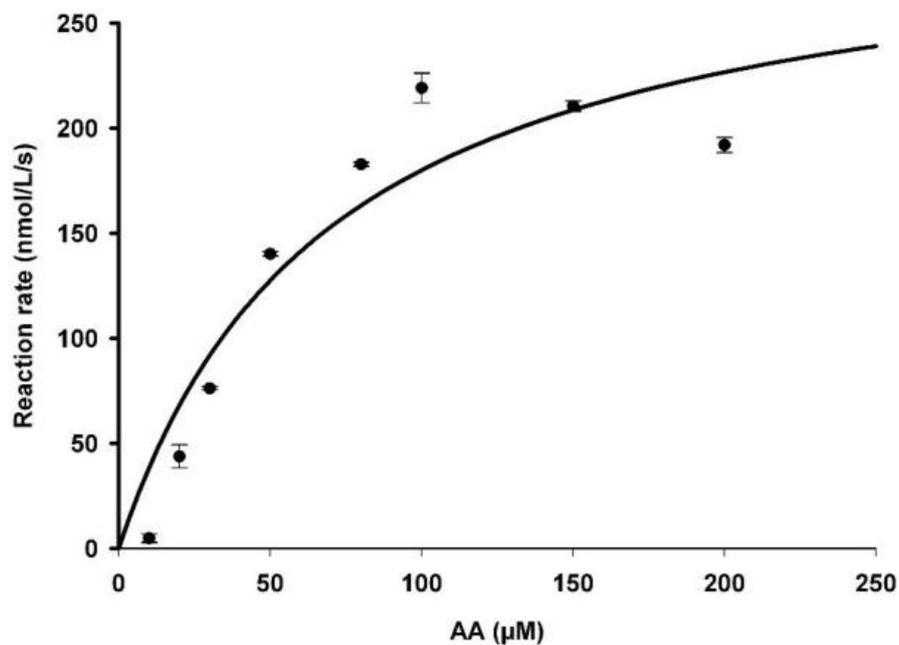
**Abb. 11. Hauptprodukte der durch MF-LOX1 katalysierten PUFA-Oxygenierung.** Die Fettsäurelösungen wurden mit Aliquots einer MF-LOX1-Präparation inkubiert (+Lox) und die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC analysiert. Zu jeder Fettsäure-Protein-Inkubation wurde jeweils eine Nichtenzymkontrolle (Puffer statt Proteinaliquot, -Lox) durchgeführt. Die Identifikation konjugierter Diene erfolgte durch Analyse von Produkten einer durch humALOX15 katalysierten Fettsäureoxygenierung.

Da die Reaktionsprodukte der meisten Lipoxygenasen chiral sind [42], wurde der Grad der optischen Reinheit der MF-LOX1-Reaktionsprodukte geprüft. Dafür wurde eine CP-HPLC/MS durchgeführt und die Chromatogramme wurden bei verschiedenen Massen-zu-Ladungsverhältnissen ( $m/z$ ) verfolgt:  $m/z$  319 für 12-HETE,  $m/z$  317 für 12-HEPE und  $m/z$  343 für 14-HDHA. Bei diesen Analysen konnte eine starke Dominanz (> 95%) des S-Enantiomers festgestellt werden (**Abb. 12**).

Die kinetischen Eigenschaften der MF-LOX1-Reaktion wurden mit EPA als Modellsubstrat untersucht. Ein  $K_M$ -Wert von 70  $\mu\text{M}$  konnte errechnet werden (**Abb. 13**), indem die Reaktionsgeschwindigkeit der Fettsäureoxygenierung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration analysiert wurde. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden Werte, die für MX-LOX2 (mit EPA 52  $\mu\text{M}$ ) und PA-LOX (mit AA 50  $\mu\text{M}$ ) [146, 157] ermittelt wurden. Bei hohen Substratkonzentrationen (150 und 200  $\mu\text{M}$ ) fallen die Reaktionsgeschwindigkeiten ab, was auf eine Substrathemmung hindeutet. Eine solche Substrathemmung wurde auch für andere ALOX-Isoformen bereits beschrieben [165].

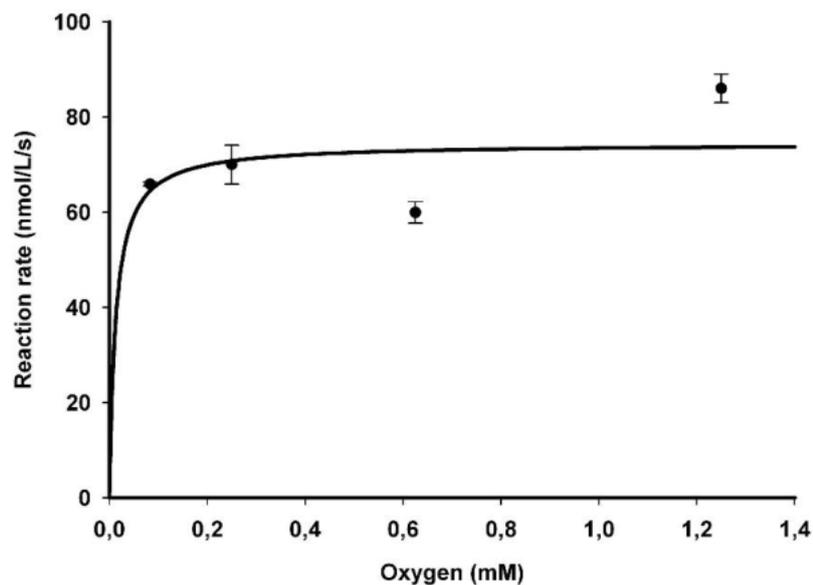


**Abb. 12. Enantioselektivität der durch MF-LOX1 gebildeten Produkte.** Die Hauptreaktionsprodukte (für AA 12-HETE, für EPA 12-HEPE und für DHA 14-HDHA) der MF-LOX1 wurden nach dem Durchlauf durch eine RP-HPLC-Säule aufgefangen und mittels CP-HPLC/MS analysiert. Die Analysen der Proben wurden von M. Blum (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) durchgeführt.



**Abb. 13. Bestimmung der Reaktionskinetik der MF-LOX1 mit EPA als Modells substrat.** Die Aliquots des bakteriellen Lysatüberstandes einer MF-LOX1-Präparation wurden mit EPA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC analysiert und die Reaktionsraten wurden gegen die Fettsäurekonzentrationen aufgetragen. Den entstandenen Punkten (vier Messungen pro Punkt) wurde eine Michaelis-Menten-Kurve angepasst und der  $K_M$ -Wert wurde berechnet.

Da Lipoxygenasen eine Fettsäureoxygenierung katalysieren, ist molekularer Sauerstoff dafür nötig. Die Affinitäten verschiedener ALOX-Isoformen zum Sauerstoff wurden bereits früher untersucht, wobei  $K_M$ -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich erhalten wurden [166]. Eine Ausnahme stellte dabei die Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PA-LOX) dar. Deren Sauerstoffaffinität ist vergleichsweise gering ( $K_M$ -Wert = 0.4 mM). Das bedeutet, dass dieses Enzym unter normoxischen Bedingungen nicht unter Substratsättigung arbeitet [167]. Um die Sauerstoffaffinität der MF-LOX1 zu bestimmen, wurden die Produkte einer 1-minütigen Reaktion, die bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt wurde, quantifiziert. Wenn die Michaelis-Menten-Kurve an die erhobenen Werte angepasst wurde, wurde ein  $K_M$ -Wert für Sauerstoff von 12  $\mu$ M berechnet (**Abb. 14**).

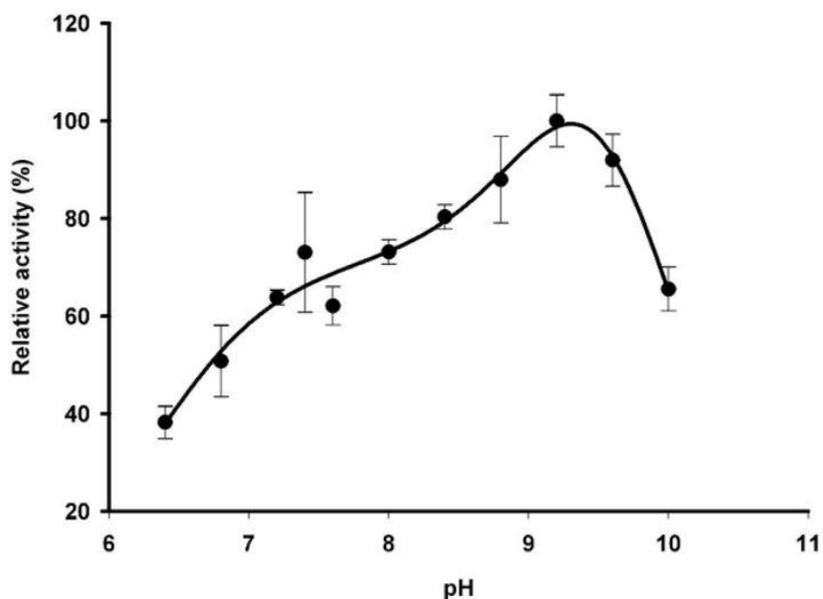


**Abb. 14. Untersuchung der Sauerstoffaffinität der MF-LOX1.** Verschiedene Volumina anaerober (mit Argon begast) und aerober (mit Sauerstoff begast) EPA-Lösungen wurden mit partiell anaeroben Aliquots der MF-LOX1-Enzympräparation für 1 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC quantifiziert und die Reaktionsgeschwindigkeiten der MF-LOX1 wurden pro Sauerstoffkonzentration vierfach bestimmt. Den entstandenen Werten wurde eine Michaelis-Menten-Kurve angepasst.

An dieser Stelle müssen experimentelle Ungenauigkeiten, die bei der Berechnung des  $K_M$ -Wertes in Kauf genommen wurden, erläutert werden: **i)** Die durch Mischung von  $O_2$ -gesättigtem und  $O_2$ -freiem Puffer erzielten Sauerstoffkonzentrationen wurden nicht direkt gemessen, sondern wurden aus den verwendeten Volumenverhältnissen berechnet. **ii)** Die meisten Messungen wurden bei Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt, die deutlich über dem ermittelten  $K_M$ -Wert lagen ( $K_M$ -Wert = 12  $\mu$ M bei eingesetzten Sauerstoffkonzentrationen von 0.085 mM, 0.256 mM, 0.64 mM und 1.21 mM). **iii)** Durch einfaches Begasen der anaeroben Pufferlösung mit Argon ist es

nicht möglich, vollständig anaerobe Bedingungen herzustellen. Trotz dieser Ungenauigkeiten deuten die erhaltenen Resultate darauf hin, dass die MF-LOX1, wie die meisten anderen ALOX-Isoformen, eine hohe Affinität zum Sauerstoff aufweist.

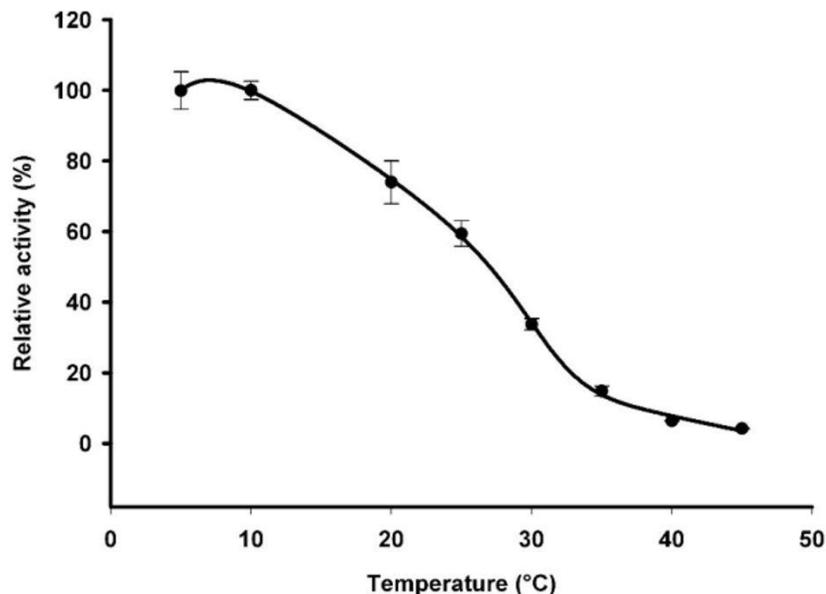
Die meisten Lipoxygenasen haben ihre optimalen Reaktionsbedingungen bei neutralen oder leicht alkalischen pH-Werten [158, 168]. Das ist u.a. auch darauf zurückzuführen, dass unter schwach alkalischen Bedingungen die Löslichkeit der Fettsäuresubstrate besser ist als bei sauren pH-Werten. Unsere Daten zur pH-Abhängigkeit der EPA-Oxygenierung durch die MF-LOX1 (**Abb. 15**) zeigen ein pH-Optimum von 9.2. Für die MX-LOX1, die eine hohe Sequenzidentität zur hier untersuchten MF-LOX1 aufweist, gibt es widersprüchliche Angaben zu ihrem pH-Optimum. In einer Untersuchung wurde ein optimaler pH-Wert von 3 bestimmt [156]. In einer anderen Studie wurde ein optimaler pH von 8.5 ermittelt [169]. Die Ursachen für diese sehr unterschiedlichen pH-Abhängigkeiten wurden nicht näher untersucht. Sie könnten aber mit den unterschiedlichen Messsystemen zu tun haben.



**Abb. 15. Bestimmung des pH-Optimums der durch MF-LOX1 katalysierten EPA-Oxygenierungsreaktion.** Der Puffer wurde durch die Mischung eines 10 mM Borat-Puffers und eines 10 mM Phosphat-Puffers mit der nachfolgenden Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl oder 1 M NaOH hergestellt. Dem Puffer wurden die Aliquots der MF-LOX1-Enzympräparation sowie EPA zugesetzt. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte reduziert und weiterhin quantifiziert. Die relativen Enzymaktivitäten (bezogen auf den höchsten Wert bei pH=9.2) wurden gegen die pH-Werte aufgetragen. Es wurden jeweils vier Messungen pro einen pH-Wert durchgeführt.

Zur Vervollständigung der enzymatischen Charakterisierung der MF-LOX1 wurde die Temperaturabhängigkeit der MF-LOX1-Reaktion untersucht. Dabei konnte ein Temperaturoptimum zwischen 5 und 10 °C bestimmt werden (**Abb. 16**). Bei Temperaturen über

15 °C nahm die Reaktionsgeschwindigkeit kontinuierlich ab. Auf der Basis dieser Daten war es unmöglich, die Aktivierungsenergie der MF-LOX1-Reaktion zu berechnen. Der Verlust der katalytischen Aktivität der MF-LOX1 bei höheren Temperaturen deutet auf eine geringe Thermostabilität der MF-LOX1 hin. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der ungewöhnlichen Reaktionskinetik des Enzyms. Wenn die MF-LOX1 bereits bei Raumtemperatur an Aktivität verliert, kann man auch keinen linearen Anstieg der Produktbildung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Raumtemperatur erwarten.



**Abb. 16. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit einer durch MF-LOX1 katalysierten EPA-Oxygenierung.** Die EPA-Lösungen wurden auf entsprechende Temperaturen gebracht, danach wurden die MF-LOX1-Aliquots zugesetzt. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte quantifiziert und die relativen Aktivitäten (bezogen auf die höchste Enzymaktivität bei 5 °C) wurden gegen Temperaturen aufgetragen. Die Enzymaktivitäten bei jeweiligen Temperaturen wurden viermal gemessen.

**Zfg:** Die Affinitäten ( $K_M$ -Wert) der MF-LOX1 zu EPA und Sauerstoff sind vergleichbar mit den entsprechenden Parametern anderer ALOX-Isoformen. Das Enzym ist thermolabil und zeigt ein leicht basisches pH-Optimum ( $pH_{opt}=9.2$ ). Wie die humALOX15 besitzt es eine breite Substratspezifität und unterliegt bei hohen Fettsäurekonzentrationen einer deutlichen Substrathemmung. Die meisten Polyenfettsäuren werden durch MF-LOX1 zu n-9-Oxygenierungsprodukten umgewandelt, wobei jeweils das S-Enantiomer überwiegt.

#### 4.1.5. Mutanten der MF-LOX1 und ihre Eigenschaften

Wie die meisten ALOX-Isoformen weisen auch ALOX15-Orthologe von Säugetieren eine hohe Reaktionsspezifität auf. Für ALOX15-Orthologe wurde postuliert, dass die Raumstruktur der Substratbindungstasche, die wesentlich durch die Aminosäuresequenz der Enzyme bestimmt wird,

für diese hohe Positionsspezifität verantwortlich ist [43]. Durch ein multiples Sequenzalignment der MF-LOX1 mit gut charakterisierten Säugetier-ALOX15-Orthologen wurden die Determinanten des Triadenkonzeptes spezifiziert (**Abb. 5**). Die Borngräber-I-Determinante ist bei der MF-LOX1 durch das Glycin<sup>359</sup> repräsentiert, während die korrespondierende Position der humALOX15 von Phenylalanin<sup>353</sup> besetzt ist. An den Stellen der Sloane-Determinanten sind bei der MF-LOX1 Phenylalanin<sup>424</sup> und Isoleucin<sup>425</sup> zu finden. Die korrespondierenden Aminosäurereste sind bei der humALOX15 durch das Isoleucin<sup>418</sup> und das Methionin<sup>419</sup> besetzt. Die Borngräber-II-Determinante ist bei beiden Lipoxygenasen durch ein Isoleucin (Isoleucin<sup>603</sup> bei der MF-LOX1 und Isoleucin<sup>593</sup> bei der humALOX15) repräsentiert. Derzeit wurde die Gültigkeit des Triaden-Konzeptes, das ursprünglich für die ALOX15-Orthologe von Säugetieren entwickelt wurde, unter bakteriellen LOXn nur an der MX-LOX2 [157] und der PA-LOX [146] überprüft. Diese Daten zeigen, dass das Triaden-Konzept zumindest teilweise auf die MX-LOX2 übertragen werden kann, da eine Veränderung eines kleineren Threonins<sup>398</sup> (Borngräber-I-Determinante) in ein sperrigeres Tyrosin (T<sup>398</sup>Y, Borngräber-I-Mutante) zu einer Veränderung der Positionsspezifität des Proteins (von einem 12-lipoxygenierenden zu einem 15-lipoxygenierenden Enzym) führte [157]. Für die PA-LOX konnte dieses Konzept nicht bestätigt werden. Die mögliche Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes auf die Reaktionsspezifität der MF-LOX1 wurde durch die Herstellung verschiedener Mutanten untersucht. Die Aminosäuren, die bei der MF-LOX1 an den Stellen der Borngräber-I- und Sloane-Determinanten zu finden sind, wurden zu korrespondierenden Aminosäuren der gut untersuchten humALOX15 mutiert. Folglich wurden die Borngräber-I- (Gly<sup>359</sup>Phe) und Sloane-Mutante (Phe<sup>424</sup>Ile+Ile<sup>425</sup>Met) konstruiert. Die Gly<sup>359</sup>Phe-Mutante war katalytisch inaktiv, weswegen keine Schlussfolgerung über die Reaktionsspezifität gezogen werden konnte. Die Expression der Sloane-Mutante (Phe<sup>424</sup>Ile+Ile<sup>425</sup>Met) ergab eine katalytisch aktive Lipoxygenase, deren relative katalytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym das 4.7-fache (Gain-of-function-Mutante) betrug. Das Produktmuster der AA-Oxygenierung wurde durch diese Mutationen jedoch nicht verändert. Damit ist das Triadenkonzept auf die MF-LOX1 nicht anwendbar.

Die Stereochemie der gesamten ALOX-Reaktion setzt sich aus den sterischen Mechanismen von drei Elementarreaktionen zusammen: i) Ort und Chiralität der Wasserstoffabstraktion, ii) Richtung der Radikalverschiebung, iii) Position und Chiralität der Sauerstoffinsertion (**Kapitel 1.4.2**). Die Elementarprozesse i) und ii) bestimmen die Positionsspezifität der ALOX-Isoform, der Elementarprozess iii) bestimmt die Enantioselektivität. Hinsichtlich ihrer Enantioselektivität können ALOX-Isoformen in zwei Klassen (S-LOXs und R-LOXs) eingeteilt werden. Die meisten S-LOXn haben an einer kritischen Stelle ein Alanin,

während R-LOXn an der korrespondierenden Stelle ein Glycin besitzen. Die Umwandlung dieses Alanins in ein Glycin (Ala-vs.-Gly-Hypothese) führt bei bestimmten Lipoxygenasen zu einem Anstieg an R-Lipoxygenierungsprodukten [38]. Die MF-LOX1 ist ein 12S-lipoxygenierendes Enzym und entsprechend der Ala-vs.-Gly-Hypothese würde man an der kritischen Stelle ein Alanin erwarten. Dies ist bei der MF-LOX1 auch der Fall. Aus der Hypothese geht außerdem hervor, dass durch die Umwandlung eines Alanins in ein Glycin die relative Erhöhung an R-Lipoxygenierungsprodukten zu erwarten ist. Deshalb wurde eine MF-LOX1-Mutante, die an der kritischen Stelle statt eines Alanins ein Glycin trägt (Coffa-Mutante: Ala410Gly), konstruiert. Die rekombinante Expression der Coffa-Mutante sowie die Quantifizierung und Aufklärung ihrer Reaktionsprodukte konnten keine Veränderung der Positions- und Stereospezifität des Enzyms induzieren. Wie auch das Wildtyp-Enzym wandelte die Ala410Gly-Mutante der MF-LOX1 AA in das Hauptprodukt 12S-HpETE um. Zusammengefasst sprechen die Mutageneseexperimente dafür, dass die MF-LOX1 weder dem Triadenkonzept noch der Ala-vs.-Gly-Hypothese folgt.

**Zfg: Weder das Triadenkonzept noch die Ala-vs.-Gly-Hypothese, die beide zur Erklärung der Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen entwickelt wurden, lassen sich auf die MF-LOX1 anwenden. Deshalb bleibt unklar, wie die Reaktionsspezifität dieses Enzyms erklärt werden kann.**

#### 4.1.6. Membranoxygenierungsaktivität der MF-LOX1

Mehrere Lipoxygenaseisoformen (humALOX15, rabALOX15, PA-LOX) können neben freien Fettsäuren auch Esterlipide oxygenieren, selbst wenn diese Bestandteile von Biomembranen sind [65, 146, 158]. Um zu testen, ob die MF-LOX1 Biomembranen oxygenieren kann, wurde eine MF-LOX1-Enzympräparation mit submitochondrialen Partikeln (inside-out Vesikel von Mitochondrieninnenmembranen) aus Rinderherzen für 15 min inkubiert. Diese Membranen hatten sich in der Vergangenheit als gutes Substrat für die Membranoxygenierungsaktivität der rabALOX15 bewährt. Als positive Kontrolle diente ein Reaktionsansatz mit der rabALOX15. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte reduziert, die Esterlipide extrahiert [152] und anschließend unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Die Mengen der dabei entstandenen freien Hydroxyfettsäuren (12-HETE+15-HETE+13-HODE) wurden mittels HPLC quantifiziert und auf die in den Hydrolysaten anwesenden nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren, vor allem AA+LA, bezogen. Für die Quantifizierung des Oxygenierungsgrades der Membranlipide errechneten wir den (HETEs+HODE)/(AA+LA)-Quotienten. Aus **Tab. 3** geht hervor, dass die Membranoxygenaseaktivität der rabALOX15 dreifach höher als die Membranoxygenaseaktivität

der MF-LOX1 ist. Dabei wurden die Proteinkonzentrationen der MF-LOX1 und rabALOX15 so gewählt, dass sie ungefähr über gleiche katalytische Umsatzraten der Arachidonsäure zu den jeweiligen Hauptprodukten verfügten. Wenn man diese Daten auf die in den Membranoxygenierungsassays eingesetzten Mengen der beiden Enzyme normiert, wird dieser Unterschied noch deutlicher. In Inkubationsansätzen mit der MF-LOX1 wurde die Enzympräparation der Endkonzentration von 7 mg/mL eingesetzt, während in Reaktionsansätzen mit der rabALOX15 7 µg/mL Protein verwendet wurde. Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass die MF-LOX1 verglichen mit der rabALOX15 eine vernachlässigbare Membranoxygenaseaktivität aufweist.

**Tab. 3. Untersuchungen zur Membranoxygenierungsaktivität der MF-LOX1.** Die gereinigte und aufkonzentrierte MF-LOX1-Enzympräparation (7 mg/mL) und gereinigte rabALOX15-Präparation (7 µg/mL) wurden mit in PBS gelösten submitochondrialen Partikeln aus Rinderherzen (Proteinkonzentration 1.2 mg/mL) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Lipidextraktion (**Kapitel 3.8.8**) wurden die Mengen an freien Hydroxyfettsäuren (HODE + HETEs) und an nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren (LA + AA) mittels HPLC ermittelt. Anschließend wurde der Quotient aus oxygenierten und nicht-oxygenierten PUFAs (OH-PUFA/PUFA-ratio) berechnet.

Enzym	OH-PUFA/PUFA-Verhältnis (Mol/Mol %)
rabALOX15	0.65 ± 0.28 (n=2)
MF-LOX1	0.22 ± 0.03 (n=4)

**Zfg.:** Verglichen mit der rabALOX15 besitzt die MF-LOX1 *in vitro* keine Membranoxygenaseaktivität.

## 4.2. Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologe von Säugetieren mit verschiedenen PUFAs

### 4.2.1. Reaktionsspezifität der humALOX15 mit ausgewählten ω-3- und ω-6-PUFAs

Nach dem Evolutionskonzept [70] verfügen die ALOX15-Orthologe von Säugetieren über unterschiedliche Reaktionsspezifitäten der Fettsäureoxygenierung. Weniger entwickelte Primaten und andere Säugetiere (z.B. Makaken, Schweine, Mäuse, Ratten) exprimieren AA 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Im Gegensatz dazu besitzen höhere Primaten (Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Gorilla) AA 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe [170]. Ausnahmen stellen die ALOX15-Orthologe des Kaninchens (rabALOX15) und der Kängururatte dar, die als weniger weit entwickelte Säugetiere AA 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe besitzen [69]. Obwohl die Reaktionsspezifität der humALOX15 mit AA bereits seit den frühen 90-iger Jahren [171] als geklärt angesehen werden kann, gab es bislang nur vereinzelte Untersuchungen zur Reaktionsspezifität dieses Enzyms mit anderen Polyenfettsäuren. Um diese

Wissenslücke zu schließen, wurde die Reaktionsspezifität dieser Enzyme mit verschiedenen PUFAs im Rahmen einer Wissenschaftskooperation untersucht. Hier konnten zunächst die bisherigen Erkenntnisse zur Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung bestätigt werden (**Tab. 4, Abb. 17A**). Ähnlich wie AA wurden EPA und DHA durch die humALOX15 hauptsächlich zu den n-6-Oxygenierungsprodukten 15-HpEPE bzw. 17-HpDHA oxygeniert. Daneben entstanden aber auch relativ große Mengen an n-9-Oxygenierungsprodukten 12-HpEPE bzw. 14-HpDHA (**Abb. 17B** und **Abb. 17C**). Die duale Positionsspezifität der humALOX15 wurde nachfolgend als Quotient vom n-6- zum n-9-Lipoxygenierungsprodukt quantifiziert. Für AA wurde ein 15-HpETE/ 12-HpETE-Quotient von 93 zu 7 bestimmt. Der Anteil am n-9-Oxygenierungsprodukt (12-HpEPE) war deutlich höher (16 %), wenn EPA als Substrat verwendet wurde. Noch höher war der n-9-Oxygenierungsanteil (14-HpDHA, 41 %) in Inkubationsansätzen mit DHA. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die humALOX15 eine duale Positionsspezifität mit allen getesteten PUFAs aufweist und dass der Ausprägungsgrad der dualen Reaktionsspezifität von der Substratfettsäure abhängt. Mit der Erhöhung der Anzahl an Fettsäuredoppelbindungen wurde auch der Anteil an n-9-Oxygenierungsprodukten höher.

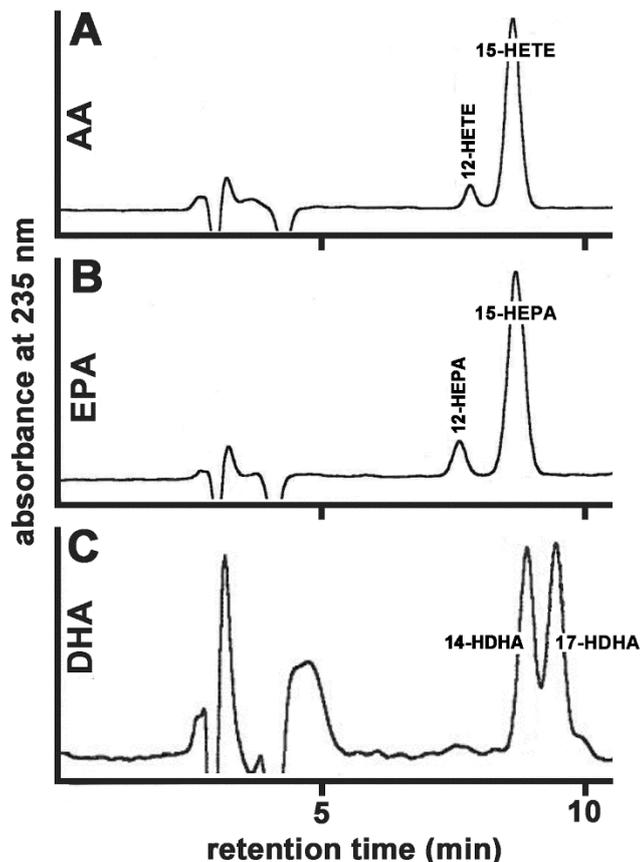
**Zfg: Die humALOX15 zeigt mit AA, EPA und DHA eine duale Positionsspezifität. Je mehr Doppelbindungen das Fettsäuresubstrat enthielt, desto ausgeprägter war das Ausmaß der dualen Reaktionsspezifität.**

#### 4.2.2. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs

Bei der Analyse der Reaktionsprodukte, die bei der Oxygenierung von AA durch die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe (chiALOX15, ponALOX15 und rabALOX15) entstanden, wurden ähnliche Ergebnisse wie bei der humALOX15 erzielt. Der relative Anteil an 12-HETE betrug zwischen 5 und 8 % und die duale Positionsspezifität wurde damit bestätigt. Ähnlich betrug der relative Anteil am Nebenoxigenierungsprodukt (15-HETE) bei 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (macALOX15, pigALOX15, ratALOX15 und mouALOX15) zwischen 0.5 und 10 %. Die gleichzeitig untersuchten Reaktionsspezifitäten der humALOX15B und humALOX12 zeigten, dass die beiden Enzyme über eine singuläre Positionsspezifität verfügen, weil der relative Anteil an Nebenoxigenierungsprodukten (12-HETE bei der humALOX15B und 15-HETE bei der humALOX12) unter 0.5 % lag.

Wenn EPA als Oxygenierungssubstrat verwendet wurde, war die duale Reaktionsspezifität der 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe deutlich stärker ausgeprägt. Außer der rabALOX15 (hier lag der relative Anteil an 12-H(p)EPE 3.4%) betrug der relative Anteil am

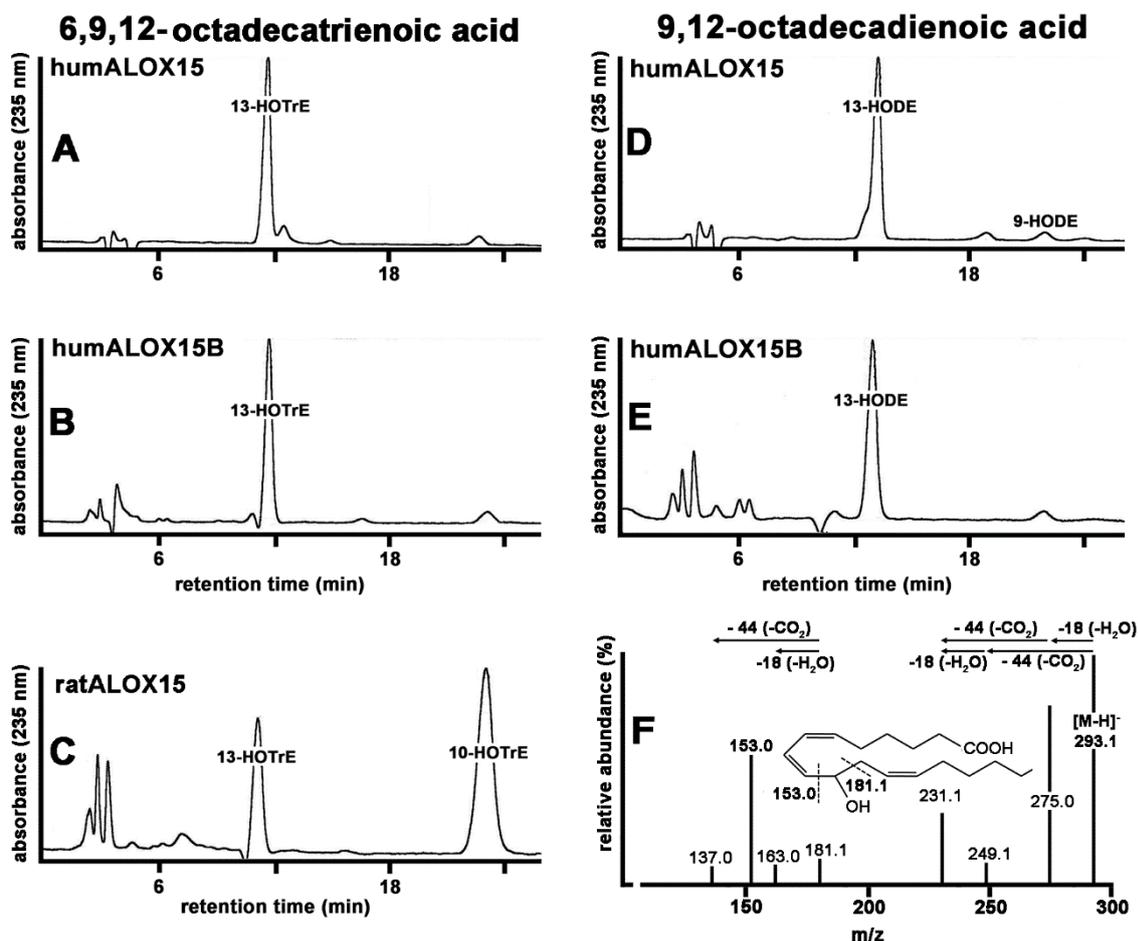
Nebenoxygenierungsprodukt (12-HEPE) zwischen 13 und 16 %. Im Gegensatz dazu war das Produktmuster der EPA-Oxygenierung durch vier getestete 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe nicht einheitlich. Die macALOX15 und pigALOX15 bildeten als Hauptoxygenierungsprodukt 12-H(p)EPE (relativer Anteil 83 % und 65 %). Umgekehrt wurde 15-H(p)EPE als Hauptoxygenierungsprodukt der ratALOX15 und mouALOX15 (relativer Anteil 67 % und 76 % entsprechend) nachgewiesen. Bei der humALOX15B und humALOX12 wurde wiederum eine unikale Positionsspezifität beobachtet. Die Nebenoxygenierungsprodukte (12-H(p)EPE bei der ALOX15B und 15-H(p)EPE bei der ALOX12) konnten lediglich in Spuren detektiert werden.



**Abb. 17. Reaktionsspezifität der humALOX15 mit C20- und C22-PUFAs (NP-HPLC).** Die rekombinante humALOX15 wurde als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, die Bakterien wurden mithilfe von Ultraschall zerstört und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Aliquots des bakteriellen Lysatüberstandes wurden mit Fettsäurelösungen für 5 min inkubiert und die Reaktionsprodukte wurden mithilfe der NP-HPLC aufgetrennt. **A)** AA als Substrat. **B)** EPA als Substrat. **C)** DHA als Substrat.

Wie aus der **Abb. 17C** hervorgeht, verfügt die humALOX15 über eine duale Positionsspezifität und oxygeniert DHA zu nahezu äquimolaren Anteilen zu 17-H(p)DHA und 14-H(p)DHA. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Chimpansen-ALOX15 (chiALOX15) und

Orang-Utan-ALOX15 (ponALOX15) beobachtet. Für die chiALOX15 betrug das Verhältnis vom n-6- zum n-9-Produkt 1.3, für die ponALOX15 lag dieser Wert bei 1.7. Die duale Positionsspezifität der rabALOX15 war jedoch nicht so deutlich ausgeprägt, denn der relative Anteil am Nebenprodukt betrug nur 8 %. Die getesteten 12-lipoxygenisierenden ALOX15-Enzyme hatten alle wiederum das n-9-Oxygenierungsprodukt (14-H(p)DHA) als Hauptprodukt. Interessanterweise wiesen die macALOX15 und die mouALOX15 eine unikale Positionsspezifität auf, weil keine signifikanten Mengen an 17-H(p)DHA gebildet wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die pigALOX15 und ratALOX15 eine duale Positionsspezifität, wobei der relative Anteil an 17-H(p)DHA 23 % bzw. 46 % betrug. Für die humALOX15B und humALOX12 konnte die unikale Positionsspezifität auch mit DHA bestätigt werden.



**Abb. 18. Reaktionsspezifität einzelner LOX-Isoformen mit Octadeca-9Z,12Z-diensäure (LA) und Octadeca-6Z,9Z,12Z-triensäure (GLA).** Die rekombinanten humALOX15, humALOX15B und ratALOX15 wurden als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen in *E. coli* exprimiert, die Bakterien wurden mithilfe von Ultraschall zerstört und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden mit LA- oder GLA-Lösung für 5 min inkubiert und danach mit SnCl<sub>2</sub> reduziert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels NP-HPLC aufgetrennt. **A)** humALOX15 mit GLA. **B)** humALOX15 mit GLA. **C)** ratALOX15 mit GLA. **D)** humALOX15 mit LA. **E)** humALOX15 mit LA. **F)** Fragmentstruktur des durch die humALOX15 gebildeten LA-Hauptoxygenierungsproduktes.

Das Produktmuster von ALOX15-Orthologen wurde auch mit GLA, die weniger Doppelbindungen als AA, EPA und DHA enthält, untersucht. Wenn GLA, die über drei Doppelbindungen und dementsprechend über zwei bisallylständige Methylengruppen (n-8 und n-11) verfügt, als Substrat für 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe eingesetzt wurde, konnte 13-H(p)OTrE (n-6-Oxygenierungsprodukt) als Hauptprodukt nachgewiesen werden (**Abb. 18A** und **Abb. 18B**). Der relative Anteil am Nebenprodukt (10-H(p)OTrE) betrug zwischen 9.1 und 14.2 %. Umgekehrt war 10-H(p)OTrE das Hauptprodukt der GLA-Oxygenierungsreaktion durch 12-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen (**Abb. 18C**). Zur Bestätigung der Produktstruktur von 10-H(p)OTrE wurde die Massenspektrometrie durchgeführt (**Abb. 18F**). Die Ergebnisse der AA-, EPA-, DHA- und GLA-Oxygenierung durch ALOX15-Isoformen sind in **Tab. 4 - Tab. 7** zusammengefasst.

**Tab. 4. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraensäure (AA) als Substrat.** Rekombinante Enzyme wurden als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen exprimiert. 5-25 µL der Lysatüberstände wurden mit in PBS gelöster AA (160 µM Endkonzentration) für 5 min inkubiert. Nach der Reduktion der Inkubationsansätze mit SnCl<sub>2</sub> wurden die Produkte präpariert und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung für n=4 aufgeführt.

Enzyme	Haupt-produkt	rel. Anteil (%)	Nebenprodukt	rel. Anteil (%)	n-6/n-9-Verhältnis
<b>Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme</b>					
humALOX15	15-HETE	92.6±0.6	12-HETE	7.4±0.6	12.5
chiALOX15	15-HETE	92.5±0.6	12-HETE	7.5±0.6	12.3
ponALOX15	15-HETE	92.3±0.5	12-HETE	7.7±0.5	12.1
rabALOX15	15-HETE	95.1±0.2	12-HETE	4.9±0.2	19.4
humALOX15B	15-HETE	99.9±0.2	12-HETE	0.1±0.2	>100
<b>Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme</b>					
macALOX15	12-HETE	99.8±0.2	15-HETE	0.2±0.2	<0.01
ratALOX15	12-HETE	96.7±2.6	15-HETE	3.3±2.6	0.03
mouALOX15	12-HETE	89.4±1.0	15-HETE	10.6±1.0	0.12
pigALOX15	12-HETE	93.4±5.8	15-HETE	6.6±5.8	0.07
humALOX12	12-HETE	100.0±0	15-HETE	0±0	<0.01

**Tab. 5. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaensäure (EPA) als Substrat.** Rekombinante Enzyme wurden als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen exprimiert. 5-25 µL der Lysatüberstände wurden mit in PBS gelöster EPA (160 µM Endkonzentration) für 5 min inkubiert. Nach der Reduktion der Inkubationsansätze mit SnCl<sub>2</sub> wurden die Produkte präpariert und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung für n=4 aufgeführt.

Enzyme	Haupt-produkt	rel. Anteil (%)	Nebenprodukt	rel. Anteil (%)	n-6/n-9-Verhältnis
<b>Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme</b>					
humALOX15	15-HEPE	84.8±1.3	12-HEPE	15.6±1.3	5.4
chiALOX15	15-HEPE	84.6±0.6	12-HEPE	15.4±0.6	5.5
ponALOX15	15-HEPE	86.6±0.9	12-HEPE	13.4±0.9	6.5
rabALOX15	15-HEPE	96.6±0.7	12-HEPE	3.4±0.7	28.7
humALOX15B	15-HEPE	99.4±1.0	12-HEPE	0.6±1.0	>100
<b>Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme</b>					
macALOX15	12-HEPE	83.4±0.9	15-HEPE	16.6±0.9	0.2
ratALOX15	15-HEPE	66.6±0.7	12-HEPE	33.4±0.7	2.0
mouALOX15	15-HEPE	75.7±0.9	12-HEPE	24.3±0.9	3.1
pigALOX15	12-HEPE	65.3±1.3	15-HEPE	34.7±1.3	0.53
humALOX12	12-HEPE	100±0	15-HEPE	0±0	<0.01

**Tab. 6. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaensäure (DHA) als Substrat.** Rekombinante Enzyme wurden als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen exprimiert. 5-25 µL der Lysatüberstände wurden mit in PBS gelöster DHA (160 µM Endkonzentration) für 5 min inkubiert. Nach der Reduktion der Inkubationsansätze mit SnCl<sub>2</sub> wurden die Produkte präpariert und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung für n=4 aufgeführt.

Enzyme	Haupt-produkt	rel. Anteil (%)	Nebenprodukt	rel. Anteil (%)	n-6/n-9-Verhältnis
<b>Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme</b>					
humALOX15	17-HDHA	58.9±5.5	14-HDHA	41.1±5.5	1.4
chiALOX15	17-HDHA	56.6±4.3	14-HDHA	43.4±4.3	1.3
ponALOX15	17-HDHA	61.0±9.0	14-HDHA	39.0±9.0	1.6
rabALOX15	17-HDHA	92.0±0.8	14-HDHA	8.0±0.8	11.5
humALOX15B	17-HDHA	98.0±2.0	14-HDHA	2.0±2.0	48.3
<b>Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme</b>					
macALOX15	14-HDHA	100.0±0	17-HDHA	0±0	<0.01
ratALOX15	14-HDHA	53.8±7.3	17-HDHA	46.2±7.3	0.86
mouALOX15	14-HDHA	100±0	17-HDHA	0±0	<0.01
pigALOX15	14-HDHA	90.1±9.1	17-HDHA	9.9±11.4	0.11
humALOX12	14-HDHA	100±0	17-HDHA	0±0	<0.01

**Tab. 7. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit Octadeca-6Z,9Z,12Z-triensäure (GLA) als Substrat.** Rekombinante Enzyme wurden als His<sub>6</sub>-Tag-Fusionsproteinen exprimiert. 5-25 µL der Lysatüberstände wurden mit in PBS gelöster GLA (57 µM Endkonzentration) für 5 min inkubiert. Zusätzlich waren in der Lösung jeweils 57 µM AA und LA vorhanden. Nach der Reduktion der Inkubationsansätze mit SnCl<sub>2</sub> wurden die Produkte präpariert und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als Einzelmessungen aufgeführt.

Enzyme	Hauptprodukt	rel. Anteil (%)	Nebenprodukt	rel. Anteil (%)	n-6/n-9-Verhältnis
<b>Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme</b>					
humALOX15	13-HOTrE	90.9	10-HOTrE	9.1	10.03
chiALOX15	13-HOTrE	89.8	10-HOTrE	10.2	7.64
ponALOX15	13-HOTrE	85.8	10-HOTrE	14.2	6.05
rabALOX15	13-HOTrE	87.7	10-HOTrE	12.3	7.14
humALOX15B	13-HOTrE	88.4	10-HOTrE	11.6	8.82
Mittelwert ± Standardabweichung	13-HOTrE	88.5±1.8	10-HOTrE	11.5±2.0	7.94±1.54
<b>Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme</b>					
macALOX15	10-HOTrE	80.6	13-HOTrE	19.4	0.24
ratALOX15	10-HOTrE	70.2	13-HOTrE	29.8	0.42
mouALOX15	10-HOTrE	71.7	13-HOTrE	28.3	0.39
pigALOX15	10-HOTrE	80.1	13-HOTrE	19.9	0.25
Mittelwert ± Standardabweichung	10-HOTrE	75.7±5.5	13-HOTrE	24.4±5.5	0.33±0.09

**Zfg:** Die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere hängt vom Enzym und von der chemischen Struktur der Fettsäure ab. Die Spezifität der Oxygenierung anderer PUFAs kann nicht sicher aus dem Muster der AA-Oxygenierungsprodukte vorhergesagt werden und muss deshalb für jede Enzym-Substrat-Kombination experimentell bestimmt werden.

#### 4.2.3. Substratpräferenz von Säugetier-ALOX15-Orthologen

Die oben beschriebenen Versuche wurden nur mit einer einzelnen Fettsäure als Substrat durchgeführt. Diese Assays spiegeln aber die *in vivo* Verhältnisse nur unzureichend wider. In Folge einer Zellaktivierung kommt es zur Aktivitätssteigerung der Phospholipase A2, die anschließend unterschiedliche Polyenfettsäuren aus den Membranphospholipiden freisetzt. Damit stehen parallel unterschiedliche PUFAs als ALOX-Substrate zur Verfügung. Um diese Verhältnisse zu simulieren, haben wir Aktivitätsassays durchgeführt, bei denen unterschiedliche Substratfettsäuren (AA+EPA+DHA bzw. LA+GLA) in äquimolaren Konzentrationen in den Aktivitätsassays vorhanden waren. Diese Experimente sollten zwei Fragen beantworten: i) Präferieren die verschiedenen ALOX15-Orthologe eine Fettsäure, wenn mehrere Fettsäuren

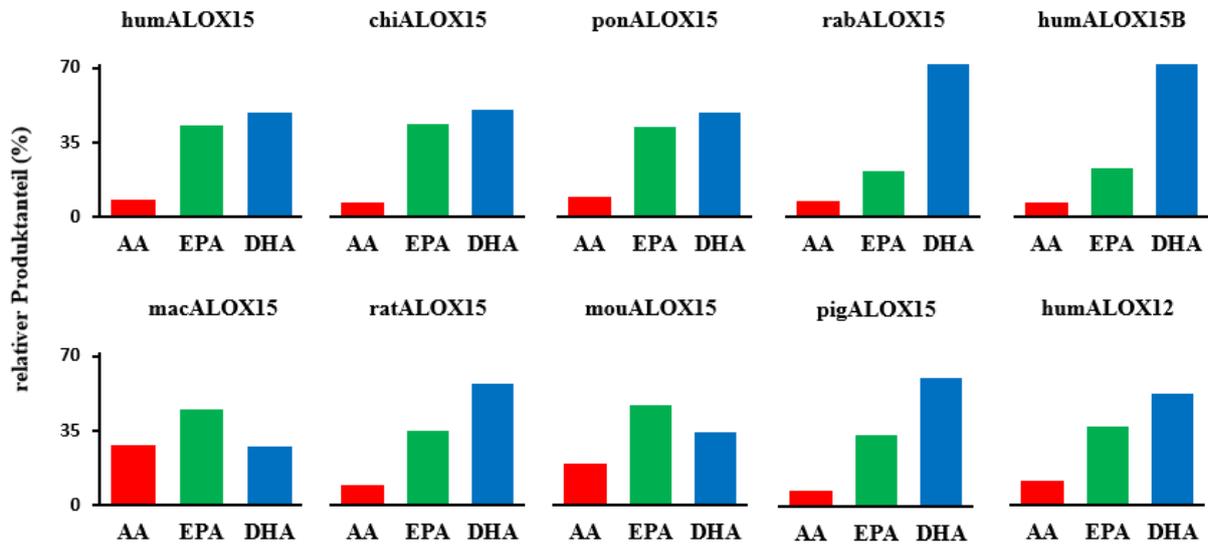
simultan angeboten werden? **ii**) Verändert sich die Reaktionsspezifität der ALOX-Isoformen durch die simultane Anwesenheit anderer Fettsäuren im Inkubationsansatz? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die Fettsäuren den ALOX15-Orthologen sowie der humALOX15B und der humALOX12 als äquimolare Mischung angeboten. Nach der Inkubationsperiode wurden die Oxygenierungsprodukte der verschiedenen PUFAs mittels HPLC quantifiziert. Bei den meisten getesteten ALOX-Isoformen (außer mouALOX15 und macALOX15) bildeten die DHA-Oxygenierungsprodukte den größten Anteil (ca. 50 %) am Muster der gebildeten Produkte (**Abb. 19**). Interessanterweise wurde kein signifikanter Unterschied ( $p=0.40$ ) gefunden, wenn der relative Anteil an DHA-Oxygenierungsprodukten zwischen AA 12- ( $46.0 \pm 14.4$  %) und AA 15-lipoxygenierenden ( $58.1 \pm 12.1$  %) ALOX15-Orthologen verglichen wurde. Der relative Anteil an EPA-Oxygenierungsprodukten betrug bei AA 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen  $39.1 \pm 6.1$  % und bei AA 15-lipoxygenierenden Enzymen  $34.4 \pm 11.6$  %. Hier gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden ALOX15-Gruppen ( $p=0.87$ ). AA wurde durch alle getesteten ALOX15-Orthologe am schlechtesten oxygeniert. Der relative Anteil an AA-Oxygenierungsprodukten betrug zwischen 6.5 % (bei humALOX15B) und 27 % (bei macALOX15). Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen 15- und 12-lipoxygenierenden Enzymen ( $p=0.13$ ).

Ähnliche Experimente wurden mit einem Fettsäuregemisch aus LA und GLA durchgeführt (**Abb. 20**). Den höheren relativen Anteil hatten die Oxygenierungsprodukte von GLA und machten zwischen 66.5 % (bei pigALOX15) und 77.4 % (bei ratALOX15) aus. Es bestand aber kein signifikanter Unterschied im relativen Anteil an GLA-Oxygenierungsprodukten zwischen AA 12- ( $72.3 \pm 5.3\%$ ) und 15- ( $67.8 \pm 0.7\%$ ) lipoxygenierenden LOXn ( $p=0.1$ ). Diese Daten bestätigen die oben aufgeführte Schlussfolgerung, dass die Fettsäuren mit einer höheren Anzahl an Doppelbindungen (GLA mit drei Doppelbindungen im Gegensatz zu LA mit zwei Doppelbindungen) bevorzugt oxygeniert werden.

**Zfg: Werden verschiedenen Säugetier-ALOX15-Orthologen simultan verschiedene Fettsäuren in gleicher Konzentration angeboten, scheinen die Fettsäuren mit der höheren Anzahl an Doppelbindungen präferentiell oxygeniert zu werden.**

Zur Beantwortung der zweiten Frage (verändert das Vorhandensein mehrerer Fettsäuren im Reaktionsansatz die Reaktionsspezifität von ALOX-Isoformen) wurde nach den HPLC-Analysen das Verhältnis von n-6-/n-9-Oxygenierungsprodukten errechnet (für AA 15-H(p)ETE/12-H(p)ETE, für EPA 15-H(p)EPE/12-H(p)EPE und für DHA 17-H(p)DHA/14-H(p)DHA) und die

ermittelten Quotienten wurden paarweise mit denen verglichen, die sich bei den Einsubstratinkubationen ergeben hatten (Tab. 4 - Tab. 7). Die Ergebnisse sind in der Tab. 8 und in Abb. 19 zusammengefasst.



**Abb. 19. Die Substratpräferenz von ALOX15-Isoformen für C20- und C22-PUFAs.** Die in PBS gelöste äquimolare Fettsäuremischung (AA, EPA und DHA, jeweils 58  $\mu$ M) wurde mit Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände für 5 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels LC/MS analysiert. Für die Bestimmung der relativen Produktbildung wurden die Hauptprodukte der PUFA-Oxygenierung (für AA 12- und 15-HETE, für EPA 12- und 15-HEPE, für DHA 14- und 17-HDHA) quantifiziert. Der relative Anteil an jeweiligen Fettsäureoxygenierungsprodukten wurde auf die Summe der Oxygenierungsprodukte aller zugesetzten Fettsäuren (AA+EPA+DHA) bezogen. Für jede Kombination des ALOX15-Enzyms mit einer äquimolaren Fettsäuremischung wurde eine Einzelmessung durchgeführt. Die Analysen der Proben wurden von L. Kutzner als Mitglied der Arbeitsgruppe von H. Schebb (Universität Wuppertal) durchgeführt.

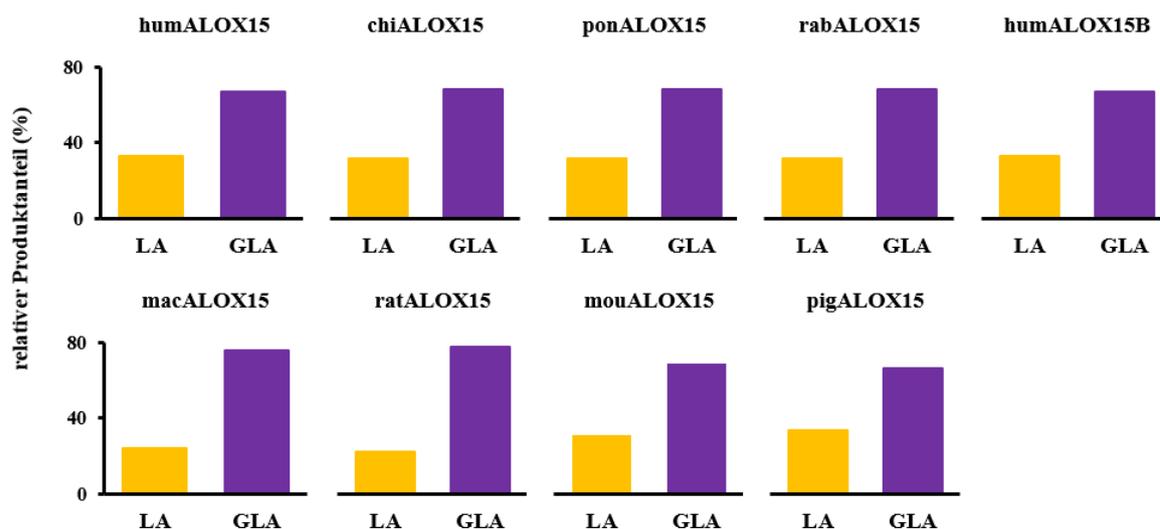
Für die AA 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe waren die n-6/n-9-Quotienten der AA-Reaktionsprodukte in den Einzelinkubationen und in der Fettsäuremischung nicht signifikant unterschiedlich (Einzelinkubationen  $19.4 \pm 3.57$  und Mischung  $11.43 \pm 11.39$ ,  $p=0.675$ ). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Anwesenheit mehrerer Fettsäuren in der Reaktionslösung keinen wesentlichen Einfluss auf die Positionsspezifität der AA-Oxygenierung hat. Die singuläre Positionsspezifität der humALOX15B veränderte sich in Anwesenheit von DHA und EPA ebenfalls nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Positionsspezifitäten der DHA- und EPA-Oxygenierung beurteilt wurden. Das Vorhandensein mehrerer Fettsäuren in Reaktionsansätzen der AA 12-lipoxygenierenden Enzyme führte ebenfalls nicht zu einer signifikanten ( $p=0.48$ ) Veränderung der Positionsspezifität der EPA- und DHA-Oxygenierung. Interessanterweise oxygenierten die ratALOX15 und die mouALOX15 EPA wie in den Einzelinkubationen nicht vorwiegend zu 12-H(p)EPE, wie man aus dem Produktmuster der AA-

Oxygenierung hätte schlussfolgern können, sondern zu 15-H(p)EPE. Auch für die humALOX12 konnten keine Unterschiede in der Reaktionsspezifität festgestellt werden, wenn das Enzym mit einem oder mit mehreren Fettsäuresubstraten inkubiert wurde. Eine Ausnahme stellt die macALOX15 dar. Mit diesem Enzym betrug der n-6/n-9-Quotient in den EPA-Einzelinkubationen 0.2, in der Mischinkubation jedoch < 0.01. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Anwesenheit anderer Fettsäuren die Spezifität der EPA-Oxygenierung für dieses Enzym erhöht wird. Die molekularen Ursachen für diesen Effekt wurden nicht näher untersucht.

**Tab. 8. Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Isoformen mit einzelnen Substraten sowie mit einer äquimolaren PUFA-Mischung.** 5-25 µL des bakteriellen Lysatüberstandes von ALOX15-Isoformen wurden mit einzelnen PUFAs (160 µM AA, 160 µM EPA, 160 µM DHA) oder mit einer äquimolaren PUFA-Mischung (AA, EPA und DHA, jeweils 58 µM) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte mit SnCl<sub>2</sub> reduziert und präpariert. Die Reaktionsprodukte wurden weiterhin mittels LC/MS von L. Kutzner (Universität Wuppertal) analysiert. Aus den Primärdaten wurden die spezifischen Koeffizienten (n-6/n-9-Verhältnis) für AA (15-HETE/12-HETE-Quotient), EPA (15-HEPE/12-HEPE-Quotient) und DHA (17-HDHA/14-HDHA-Quotient) berechnet. Für jede Kombination des ALOX15-Enzyms mit einer äquimolaren Fettsäuremischung wurde eine Einzelmessung durchgeführt.

Produkte	AA-Oxygenierungsprodukte		EPA-Oxygenierungsprodukte		DHA-Oxygenierungsprodukte	
	AA+EPA+DHA	AA 160 µM	AA+EPA+DHA	EPA 160 µM	AA+EPA+DHA	DHA 160 µM
Spezifität	15-HETE/12-HETE-Verhältnis		15-HEPE/12-HEPE-Verhältnis		17-HDHA/14-HDHA-Verhältnis	
<b>Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme</b>						
humALOX15	5.8	12.5	6.0	5.4	1.4	1.4
chiALOX15	6.0	12.3	5.6	5.5	1.5	1.3
ponALOX15	5.4	12.0	6.2	6.5	1.3	1.6
rabALOX15	28.5	19.4	47.4	28.4	10.8	11.5
humALOX15B	>100	>100	>100	>100	>100	48.3
<b>Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme</b>						
macALOX15	<0.01	<0.01	<0.01	0.2	0.0	<0.01
ratALOX15	0.21	0.03	1.9	2.0	0.45	0.86
mouALOX15	0.03	0.12	2.5	3.1	0.03	<0.01
pigALOX15	0.14	0.09	0.56	0.53	0.07	0.11
humALOX12	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

**Zfg:** Die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Fettsäuren im Reaktionsansatz führt nicht zu einer Veränderung der Positionsspezifität der meisten getesteten ALOX15-Orthologe, der humALOX12 und der humALOX15B.



**Abb. 20. Die Substratpräferenz der ALOX15-Isoformen für C18-PUFAs.** Die in PBS gelöste äquimolare Mischung (aus LA, GLA und AA, jeweils 58  $\mu$ M) wurde mit Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände für 5 min inkubiert. Die Hauptprodukte der LA- und GLA-Oxygenierung (13-HODE bzw. 10-HOTrE + 13-HOTrE) wurden mittels der kombinierten Anwendung von RP-HPLC und NP-HPLC quantifiziert. Die Quantifizierung der Oxygenierungsprodukte der Arachidonsäure wurde aus der Berechnung der relativen Produktbildung ausgeschlossen. Damit wurden die relativen Anteile an einer LA- und GLA-Oxygenierung auf das Gesamtprodukt der PUFA-Oxygenierung (LA+GLA) bezogen. Für jede Kombination des ALOX15-Enzyms mit einer äquimolaren Fettsäuremischung wurden vier Einzelmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ohne Standardabweichung aufgeführt.

#### 4.2.4. Reaktionsspezifität der gibALOX15

Nach dem Evolutionskonzept der ALOX15-Reaktionsspezifität stellt die gibALOX15 eine Übergangsform im Rahmen der evolutionären Entwicklung von AA 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (niedere Primaten und andere Säugetiere) zu AA 15-lipoxygenierenden Enzymen (höhere Primaten, einschließlich des Menschen) dar. Dieses Enzym weist eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität mit AA auf und wandelt dieses Substrat zu fast gleichen Mengen von 12- und 15-H(p)ETE um [70]. Um zu untersuchen, ob diese ausgeprägte duale Reaktionsspezifität auch für andere Fettsäuren zutrifft, wurden AA, EPA und DHA als einzelne Substrate und vergleichend in der äquimolaren Mischung getestet. Wenn AA als Substrat eingesetzt wurde, betrug der n-6/n-9 Quotient (15-HETE/12-HETE Verhältnis) 2.0 (**Tab. 9**). Unter diesen experimentellen Bedingungen war damit das n-6-Oxygenierungsprodukt (15-HETE) das dominante Reaktionsprodukt. EPA wurde zu fast gleichen Teilen in 15-HEPE und 12-HEPE umgewandelt, sodass auch mit dieser Fettsäure eine ausgeprägte duale Positionsspezifität zu beobachten war. Bei der Oxygenierung von DHA entstanden ebenfalls fast gleiche Mengen an 14-H(p)DHA (n-9-Oxygenierungsprodukt) und 17-H(p)DHA (n-6-Oxygenierungsprodukt).

Vergleicht man die n-6/n-9-Quotienten für AA ( $n-6/n-9 = 2.0$ ), EPA ( $n-6/n-9 = 0.98$ ) und DHA ( $n-6/n-9 = 0.54$ ), können zwei Rückschlüsse gezogen werden. **i)** Die gibALOX15 zeigt mit allen drei PUFAs eine ausgeprägte duale Positionsspezifität, was konsistent mit dem postulierten evolutionären Übergangscharakter des Enzyms ist. **ii)** Der relative Anteil an n-9-Oxygenierungsprodukten erhöht sich mit der steigenden Anzahl an Doppelbindungen im Fettsäuremolekül.

**Tab. 9. Reaktionsspezifität der gibALOX15 mit verschiedenen PUFAs.** Der Lysatüberstand der rekombinanten gibALOX15-Präparation wurde mit verschiedenen PUFAs (AA, EPA und DHA, jeweils in Endkonzentration von 160  $\mu\text{M}$ ) sowie mit einer äquimolaren Mischung dieser Fettsäuren (jeweils 58  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionsprodukte mit  $\text{SnCl}_2$  reduziert, präpariert und mittels LC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ) aufgeführt. Die Analysen der Proben wurden von L. Kutzner als Mitglied der Arbeitsgruppe von H. Schebb (Universität Wuppertal) durchgeführt.

Substrat		n-6-Oxygenierung	rel. Anteil (%)	n-9-Oxygenierung	rel. Anteil (%)	n-6/n-9-Verhältnis
individuelle Substrate	AA	15-HETE	66.8 $\pm$ 0.6	12-HETE	33.2 $\pm$ 0.6	2.0
	EPA	15-HEPE	49.0 $\pm$ 5.8	12-HEPE	51.0 $\pm$ 5.8	0.98
	DHA	17-HDHA	35.0 $\pm$ 1.5	14-HDHA	65.0 $\pm$ 1.5	0.54
Substrate in Mischung	AA	15-HETE	58.3 $\pm$ 1.9	12-HETE	41.7 $\pm$ 1.9	1.4
	EPA	15-HEPE	44.3 $\pm$ 1.3	12-HEPE	55.7 $\pm$ 1.3	0.79
	DHA	17-HDHA	24.4 $\pm$ 3.6	14-HDHA	75.6 $\pm$ 3.6	0.33

Bei der Untersuchung der Positionsspezifität der gibALOX15 in einem Reaktionsansatz mit einer äquimolaren Fettsäuremischung wurde die ausgeprägte duale Positionsspezifität dieses Enzyms mit allen getesteten PUFAs bestätigt. Die n-6/n-9-Quotienten für AA ( $n-6/n-9 = 1.4$ ), EPA ( $n-6/n-9 = 0.79$ ) und DHA ( $n-6/n-9 = 0.33$ ) wurden auch in diesen Mischinkubationen mit zunehmender Anzahl der Doppelbindungen der Substratfettsäure immer kleiner, die ausgeprägte duale Reaktionsspezifität blieb aber erhalten. Die Analyse der Substratpräferenz der gibALOX15 zeigte, dass dieses Enzym AA aus einer äquimolaren Mischung von AA+EPA+DHA besser als EPA und DHA (relative Anteile an Fettsäureoxygenierungsprodukten: AA 43.1 $\pm$ 2.2%, EPA 28.3 $\pm$ 1.1% und DHA 28.5 $\pm$ 2.8%) oxygeniert. Damit unterscheidet sich dieses ALOX15-Ortholog von denen des Menschen und anderer Säugetiere, die überwiegend DHA bevorzugen (**Abb. 19**).

**Zfg.:** Aus einer äquimolaren Mischung von AA, EPA und DHA bevorzugte die gibALOX15 AA als Substrat. Das Enzym weist mit allen getesteten Polyenfettsäuren eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität, wobei das Verhältnis von n-6- und n-9-Oxygenierungsprodukten mit der Anzahl der Doppelbindungen im Fettsäuremolekül abnahm.

### 4.3. Untersuchung der sekundären und tertiären Oxygenierungsprodukte der humanen Lipoxygenasen

#### 4.3.1. HEPEs als primäre Reaktionsprodukte der EPA-Oxygenierung durch humane ALOX-Paraloge

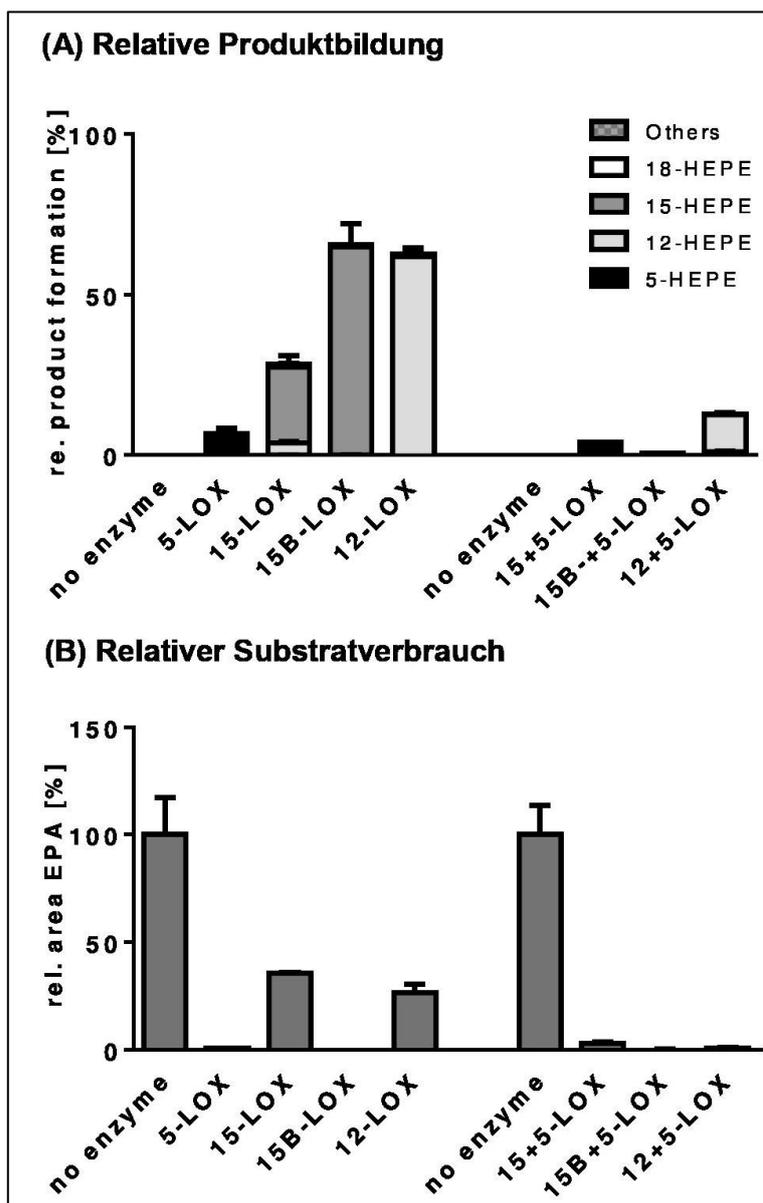
Die Bildung von Monohydroperoxyfettsäuren bei der einfachen PUFA-Oxygenierung durch humane ALOX-Isoformen wurde schon in vielen *in vitro* Assays untersucht [74, 172, 173]. In späteren Jahren wurden zusätzlich zu den Monooxygenierungsprodukten eine große Anzahl von sekundären LOX-Produkten (Leukotriene, Lipoxine, Hepoxiline, Resolvine, Protektine und Maresine) identifiziert und deren biologischen Wirkungen beschrieben [71, 174-176]. Im Unterschied zu primären Reaktionsprodukten stellen einige dieser neu entdeckten Sekundärprodukte Mehrfachoxidationsprodukte dar, die zwei oder drei Hydro(pero)xygruppen tragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sekundärprodukte der EPA-Oxygenierung durch verschiedene humane ALOX-Paraloge näher untersucht. Dabei wurde EPA mit rekombinanten humanen ALOX-Isoformen (humALOX15, humALOX12, humALOX15B und humALOX5) für 15 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden präpariert und mittels LC/MS analysiert.

Zunächst wurde die Bildung der primären EPA-Oxygenierungsprodukte (HEPEs) untersucht. Die relative Produktbildung sowie der relative Substratverbrauch sind in der **Abb. 21** zusammengefasst. Die **Abb. 21A** zeigt die relative Produktbildung einer EPA-Oxygenierungsreaktion durch humane ALOX-Isoformen, wobei nur die Primärprodukte quantifiziert wurden. Erwartungsgemäß stellte 5-H(p)EPE das Hauptprodukt der EPA Oxygenierungsreaktion dar, die durch die humALOX5 katalysiert wurde. 15-H(p)EPE war Hauptprodukt der humALOX15 und humALOX15B. Die humALOX12 bildete fast ausschließlich 12-H(p)EPE. Bezieht man die durch die humALOX5 gebildete Menge an 5-H(p)ETE auf die im Ansatz verfügbare EPA-Menge, konnte errechnet werden, dass lediglich 4 % des verfügbaren Substrates in der Inkubationsperiode zu 5-H(p)EPE umgewandelt wurden. Der gleichzeitig gemessene Substratverbrauch (**Abb. 21B**) zeigte aber, dass nahezu 100 % der ursprünglich verfügbaren EPA-Menge verbraucht wurden. Daraus kann abgeleitet werden, dass während dieser *in vitro* Inkubation mehr als 95 % der initialen EPA-Menge in Sekundärprodukte umgewandelt wurden. Für die humALOX15 betrug der relative Anteil der 15-H(p)EPE Bildung ca. 28 % der verfügbaren EPA-Konzentration, während ein Substratverbrauch von 64 % quantifiziert werden konnte. Diese Daten belegen, dass EPA durch die humALOX15 zu ungefähr gleichen Anteilen in das primäre Oxygenierungsprodukt 15-H(p)EPE und in Sekundärprodukte umgewandelt wurde. Für die humALOX15B und die humALOX12 betrug die Bildung der Primärprodukte [15-H(p)EPE für die humALOX15B und 12-H(p)EPE für die humALOX12] ca. 60 % des

Substratumsatzes. Auch für diese Enzyme scheint ein beträchtlicher Teil des Substrates in sekundäre Reaktionsprodukte umgewandelt worden zu sein. Durch die ALOX15B wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen die gesamte EPA-Menge umgesetzt, wobei der relative Anteil an Sekundärprodukten ca. 35 % ausmachen sollte. Im Falle der humALOX12 wurden 27 % der ursprünglichen eingesetzten EPA-Menge nicht umgesetzt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass weitere 11 % der eingesetzten EPA zu Sekundärprodukten umgewandelt wurden.

Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass die von uns detektierten Monooxygenierungsprodukte nur für die humALOX12 und die humALOX15B tatsächlich die dominanten Reaktionsprodukte darstellen. Für diese Enzyme konnten mehr als 60 % des Substratumsatzes in Form der Monooxygenierungsprodukte wiedergefunden werden. Völlig anders sehen die Verhältnisse für die humALOX5 und die humALOX15 aus. Hier tragen die primären Oxygenierungsprodukte 15-H(p)EPE und 5-H(p)EPE vergleichsweise wenig (28 % für die humALOX15, 5% für die humALOX5) zum Muster der Reaktionsprodukte bei.

In einer anderen experimentellen Anordnung wurden auch die Oxygenierungsprodukte einer kombinierten enzymatischen Reaktion untersucht. Dafür wurde EPA zunächst mit einer humanen ALOX-Isoform (humALOX15, humALOX15B, humALOX12) für 15 min inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die humALOX5 zugegeben und die Reaktionslösung wurde weitere 15 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte und der Substratverbrauch wurden mittels LC-MS/MS analysiert (**Abb. 21**). Dabei wurden relevante Mengen an primären Oxygenierungsprodukten (15-, 12- und 5-H(p)EPE) nur in Inkubationsansätzen mit humALOX12+humALOX5 nachgewiesen. In den anderen Inkubationsansätzen konnten lediglich kleinere Mengen der primären Oxygenierungsprodukte (< 5% des Substratverbrauches) identifiziert werden. Bei der Quantifizierung des Substratverbrauches wurde deutlich, dass in allen kombinierten Inkubationsansätzen fast keine EPA nach der Inkubationszeit mehr nachzuweisen war (100%-iger Substratverbrauch). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass die primären Oxygenierungsprodukte nicht notwendigerweise auch die mengenmäßig dominanten ALOX-Produkte darstellen. Die Diskrepanz zwischen Substratschwund und der Bildung von primären Oxygenierungsprodukten deutet darauf hin, dass es bei der Umsetzung von EPA durch menschliche ALOX-Isoformen zur Bildung von noch unbekanntem Produkten kommt, die bisher noch nicht charakterisiert worden sind. Ob diese „Produktlücke“ durch die Bildung von Mehrfachoxygenierungsprodukten geschlossen werden kann, muss in weiterführenden Analysen untersucht werden.

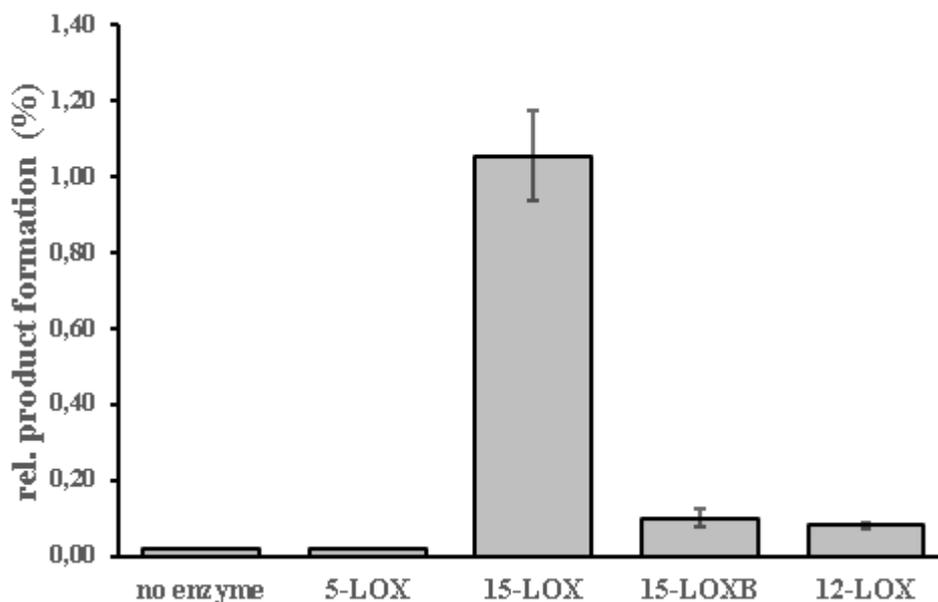


**Abb. 21. Die Produktbildung und der Substratverbrauch der durch die humanen ALOX-Isoformen katalysierten EPA-Oxygenierung.** In der ersten Versuchsreihe wurden EPA-Lösungen für 15 min mit einem Aliquot einer humanen Lipoxygenaseisoform (humALOX5, humALOX15, humALOX15B oder humALOX12) inkubiert. In der zweiten Versuchsreihe wurden andere EPA-Lösungen ebenfalls für 15 min mit einer humanen LOX (humALOX15, humALOX15B oder humALOX12) inkubiert, wobei die Reaktion nach der Inkubationszeit nicht terminiert wurde. Stattdessen wurde ein Aliquot der humALOX5 zugesetzt. **A)** Relative Bildung primärer Oxygenierungsprodukte (H(p)EPEs) einer durch humane LOXn katalysierten EPA-Oxygenierung (bezogen auf 10  $\mu$ M Substrat). Links: relative Produktbildung einer EPA-Oxygenierung durch einzelne LOXn. Rechts: relative Produktbildung einer EPA-Oxygenierung durch zwei in der Reihe zugegebenen LOXn. **B)** Der relative Substratverbrauch (bezogen auf 10  $\mu$ M Substrat) einer durch humane LOXn katalysierten Reaktion. Links: Relativer Substratverbrauch einer EPA-Oxygenierung durch eine einzelne LOX-Isoform. Rechts: Relativer Substratverbrauch einer EPA-Oxygenierung durch zwei in der Reihe zugegebenen LOXn. Die Analysen der Proben wurden von L. Kutzner als Mitglied der Arbeitsgruppe von H. Schebb (Universität Wuppertal) durchgeführt.

**Zfg:** Die simultane Quantifizierung der Bildung der EPA-Monooxygenierungsprodukte durch verschiedene humane ALOX-Isoformen ergab eine „Produktlücke“. Für alle getesteten humanen ALOX-Paraloge war der Substratschwund deutlich größer als die Bildung der Monooxygenierungsprodukte. Diese Daten deuten darauf hin, dass 5-HEPE, 12-HEPE und 15-HEPE möglicherweise nicht die dominanten ALOX15-Produkte der durch Lipoxygenase katalysierten EPA-Oxygenierung sind.

#### 4.3.2. Bildung von 18-HEPE als Präkursor für E-Serien-Resolvine durch die humALOX15

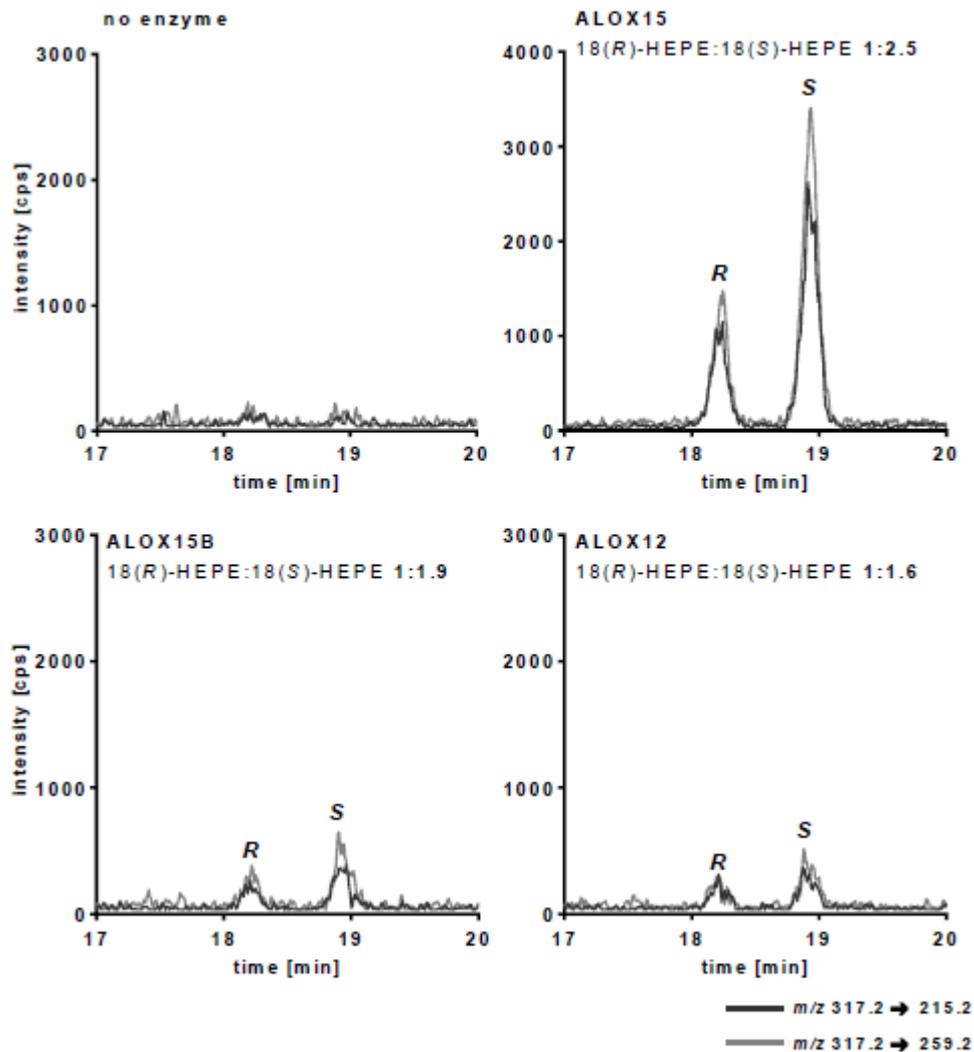
18-HEPE ist ein Oxygenierungsprodukt von EPA, das für die Bildung von Resolvinen der E-Serie benötigt wird. In der Literatur wurde beschrieben, dass 18-HEPE durch die Aspirin-modifizierte Cyclooxygenase-2 (COX-2) gebildet werden kann [177]. Theoretisch wäre es aber auch denkbar, dass 18-HEPE durch enzymatische Aktivität von ALOX-Isoformen entstehen kann. Die Bildung von 18-HEPE durch eine Lipoxygenasereaktion würde eine Wasserstoffabstraktion vom C16 der Substratfettsäure und eine [+2]-Radikalumlagerung implizieren. In früheren Experimenten (**Kapitel 4.2.1** und **4.2.2**) wurde das Produktmuster der EPA-Oxygenierung durch humane ALOX-Isoformen (humALOX15, humALOX15B und humALOX12) untersucht. Dabei konnten zwei dominante EPA-Oxygenierungsprodukte (15- und 12-H(p)EPE) identifiziert werden. Aus diesem Produktmuster wurde geschlossen, dass die humALOX15 bei der EPA-Oxygenierung eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität aufweist, während die humALOX15B (alleinige 15-HpEPE-Bildung) und humALOX12 (alleinige 12-HpEPE-Bildung) über singuläre Positionsspezifitäten verfügen. Da die humALOX15 eine Wasserstoffabstraktion von zwei bisallylständigen Kohlenstoffatomen (C10 und C13 von EPA) katalysieren kann, bestand die theoretische Möglichkeit, dass auch eine Wasserstoffabstraktion vom C16 der Substratfettsäure möglich ist. Um zu prüfen, ob humane ALOX-Paraloge in der Lage sind, aus EPA 18-HEPE zu bilden, wurde EPA mit rekombinanten humanen ALOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX5) einzeln sowie in Kombination mit der humALOX5 inkubiert und die Produktmuster der Reaktionen wurden analysiert. Aus der **Abb. 22** kann abgeleitet werden, dass die humALOX15 18-HEPE bildete, auch wenn die relative Produktbildung (bezogen auf die Bildung des Hauptproduktes 15-HEPE) nur ca. 1.1 % betrug. Bei den Inkubationen mit der humALOX15B und humALOX12 konnten ebenfalls kleine Mengen an 18-HEPE (ca. 0.1 %, bezogen auf die Bildung der Hauptprodukte 15- bzw. 12-HEPE) nachgewiesen werden. Um die Autooxidationsprozesse als 18-HEPE-Quelle auszuschließen, wurde eine Nichtenzymkontrolle mitgeführt, bei der das Enzym durch PBS ersetzt wurde. Dabei wurden nur sehr geringe Mengen an 18-HEPE detektiert.



**Abb. 22. Bildung von 18-HEPE durch humane ALOX-Isoformen.** 10  $\mu$ M EPA-Lösungen wurden mit einer einzelnen LOX-Isoform (humALOX5, humALOX15, humALOX15B, humALOX12) für 15 min inkubiert (n=4). 18-HEPE wurde mittels LC-MS/MS detektiert und ihre Stoffmenge wurde auf die ursprüngliche EPA-Menge relativiert. Die Analysen der Proben wurden von L. Kutzner als Mitglied der Arbeitsgruppe von H. Schebb (Universität Wuppertal) durchgeführt.

Da ALOX-Isoformen üblicherweise über eine hohe Stereospezifität verfügen [42], wurde eine chirale Analytik des durch die humALOX15 gebildeten 18-HEPE durchgeführt [154]. Das Mengenverhältnis beider Enantiomere betrug 2.5. Durch diese Erkenntnis und unter Berücksichtigung der frühen Experimente mit der humALOX15, die üblicherweise die Bildung eines S-Enantiomers zeigten, konnte auf das Überwiegen des S-Enantiomers von 18-HEPE zurückgeschlossen werden. (**Abb. 23**). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den früher publizierten Daten, die belegen, dass die humALOX15 AA dominant zu 15S-HpETE und 12S-HpETE umwandelt, wobei der Anteil der jeweiligen R-Isomere unter 10 % liegt [158]. Die hier beobachtete dominante Bildung von 18S-H(p)EPE und die Abwesenheit von 18-HEPE in der Nichtenzymkontrolle belegen, dass 18-HEPE durch die humALOX15 gebildet werden kann. Allerdings ist die Synthesekapazität dieses Enzyms für 18-H(p)EPE deutlich geringer als für 15-H(p)EPE (nur ca. 1.1 %) und der Grad der Enantioselektivität ist deutlich reduziert (> 90% bei der 15-HEPE-Bildung vs. ca. 70 % bei der 18-HEPE-Bildung). Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass die humALOX15 EPA zu 18-HEPE umwandeln kann, wobei die Reaktion mit deutlich verringerter Enantioselektivität abläuft. Bei den anderen ALOX-Isoformen ist der Grad der Enantioselektivität noch geringer. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Stereochemie der 18-HEPE-Bildung durch die humALOX15 besser kontrolliert werden kann als durch die anderen

humanen ALOX-Isoformen.



**Abb. 23. Bildung von 18-HEPE bei der Inkubation humaner ALOX-Isoformen mit EPA.** Aliquots rekombinanter ALOX-Paraloge des Menschen wurden mit 10  $\mu$ M EPA für 15 min inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Chiral-LC-MS analysiert. Die Chromatogramme sind für die Inkubationsansätze der humALOX15, humALOX15B und humALOX12 sowie für die Nichtenzymkontrolle gezeigt. Die Analysen der Proben wurden von M. Blum (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) durchgeführt.

**Zfg:** EPA kann durch verschiedene humane ALOX-Isoformen zu 18-HEPE umgewandelt werden, wobei erwartungsgemäß die humALOX15 den besten Umsatz zeigt. Obwohl 18-HEPE nur ein Nebenprodukt (1.1 % bezogen auf die Bildung des Hauptproduktes 15-HEPE) der EPA-Oxygenierung ist, konnte eine stereoselektive Präferenz für das 18S-Enantiomer (S/R-Verhältnis = 7:3) nachgewiesen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Biologische Bedeutung der Lipoxygenase aus *Myxococcus fulvus* und ihr Vergleich mit bekannten bakteriellen Lipoxygenasen

#### 5.1.1. Das Vorkommen von Lipoxygenasegenen in der Bakteriengattung *Myxococcus*

Das Vorkommen von Lipoxygenasen in Prokaryoten wurde bereits 1973 durch die Beschreibung einer Lipoxygenase in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen [178]. Seitdem wurde die Gruppe der entdeckten und charakterisierten bakteriellen LOXn um mehrere LOX-Vertreter erweitert. Zum Ursprung der Lipoxygenasen in Bakterien wurden zwei Theorien entwickelt. Eine Theorie besagt, dass Prokaryoten ihre Lipoxygenasen durch horizontalen Gentransfer aus höher entwickelten Organismen erwarben. Die zweite Theorie postuliert, dass die ALOX-Isoformen von Eukaryoten und Prokaryoten einen gemeinsamen Vorfahren hatten [155]. Obwohl neuere Untersuchungen eher für einen horizontalen Gentransfer sprechen, kann die Frage, welche der beiden gegensätzlichen Theorien korrekt ist, heute noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die bis zum Jahr 2013 charakterisierten bakteriellen ALOX-Isoformen wurden von Hansen et al. anhand ihrer Proteinsequenzen in drei Gruppen eingeteilt [14]. Zur ersten Gruppe (Gruppe 1) gehören die ALOX-Isoformen aus Cyanobakterien, deren Vertreter (*Acaryochloris marina*, *Cyanothece sp.*, *Anabaena sp.* und *Nostoc punctiforme*) Lipoxygenasegene besitzen, die für katalytisch aktive Proteine mit gesicherter Lipoxygenaseaktivität kodieren. Für die cyanobakteriellen Enzyme wird angenommen, dass sie mit den pflanzlichen Enzymen einen gemeinsamen Vorfahren hatten, weil die Lipoxygenasesequenzen beider Enzymfamilien (cyanobakterielle und pflanzliche LOXn) sich untereinander nur wenig unterscheiden. Diese Hypothese wird unter anderem durch die Endosymbiontentheorie gestützt. Entsprechend dieser Theorie entwickelten sich die pflanzlichen Plastiden aus Prokaryoten, die Cyanobakterien sehr ähnlich waren [179]. Die Vertreter der beiden anderen bakteriellen LOX-Gruppen (Gruppe 2A und 2B nach Hansen et al.) kommen in Proteobakterien vor [14]. Zur Gruppe 2A gehören die bereits gut charakterisierten Lipoxygenasen aus *Pseudomonas aeruginosa* [146, 180] und *Burkholderia thailandensis* [181]. Im Gegensatz dazu lagen zum Beginn meiner Arbeiten nur fragmentarisch funktionelle Daten zur Charakterisierung bakterieller LOXn vor, die der Gruppe 2B zugeordnet werden können. Keine der bis dahin bekannten potenziellen Lipoxygenasesequenzen, die der Gruppe 2B zugeordnet wurde, konnte bis zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme als rekombinantes Protein hinsichtlich ihrer proteinchemischen und katalytischen Eigenschaften charakterisiert werden. Damit war zu damaligem Zeitpunkt noch unklar, ob die vorhandenen genomischen Proteinsequenzen, die in die Gruppe 2B klassifiziert

wurden, tatsächlich für funktionelle ALOX-Enzyme kodieren. Aus diesem Grund unternahmen wir im Rahmen dieser Doktorarbeit den Versuch, eine bakterielle Lipoxygenase aus *Myxococcus fulvus*, die nach Hansen et al. in die Gruppe 2B einzuordnen war, rekombinant zu exprimieren und hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu charakterisieren.

Nach dem Beginn meiner Arbeiten wurden in einer anderen *Myxococcus*-Gattung (*M. xanthus*) zwei Lipoxygenasegene beschrieben. Beide Gene (WP\_011551853.1, WP\_011551854.1) kodieren für katalytisch aktive ALOX-Isoformen, die auf der Aminosäureebene nur einen geringen Grad (19.7 %) an Sequenzidentität aufweisen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass beide Enzyme nicht durch kürzliche Genduplikation entstanden sind, sondern sich in der Evolution separat voneinander entwickelten. Die rekombinante Expression dieser beiden Lipoxygenaseisoformen identifizierte MX-LOX1 als eine Arachidonsäure 11S-Lipoxygenase [169] und MX-LOX2 als eine AA 12S-Lipoxygenase [157]. Das Genom von *Myxococcus fulvus* verfügt ebenfalls über zwei Lipoxygenasegene, deren Sequenzhomologiegrad ebenso bei ca. 20 % liegt (**Tab. 1**). Da die Lipoxygenasen aus *M. fulvus* und *M. xanthus* paarweise sehr ähnlich (86 %-iger Homologiegrad) sind, kann angenommen werden, dass diese Enzyme orthologe Proteine in den beiden *Myxococcus*-Spezies darstellen. Ein ähnlicher Homologiegrad kann für die ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere errechnet werden. So weisen die ALOX15 der Maus (mouALOX15) und die des Menschen (humALOX15) einen Homologiegrad von 74 % auf. Das entsprechende Enzym des Schweins (pigALOX15) und die humALOX15 zeigen sogar eine 86 %-ige Aminosäureidentität. Sollten die ALOX-Isoformen der beiden *Myxococcus*-Species (MF-LOX1 und MX-LOX1 bzw. MX-LOX2 und MF-LOX2) tatsächlich paarweise ortholog sein, muss man davon ausgehen, dass sie ähnliche proteinchemische und enzymatische Eigenschaften aufweisen. Diese Vermutung lässt sich aber aufgrund der für die MX-LOX1 [156] und MF-LOX1 (diese Arbeit) vorliegenden funktionellen Daten nicht bestätigen: **i)** Die MX-LOX1 wurde als eine AA 11S-Lipoxygenase identifiziert. Im Gegensatz dazu ist die MF-LOX1 aber ein AA 12S-lipoxygenierendes Enzym. Damit entspricht die MF-LOX1 hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität eher der mit ihr weniger verwandten MX-LOX2. **ii)** Beide Studien zur MX-LOX1 [156, 169] untersuchten das pH-Optimum der Fettsäureoxygenaseaktivität unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen. Laut Qian et al. [156] liegt das pH-Optimum für MX-LOX1 bei pH=3.0, während An et al. einen Wert von 8.5 angeben. Ein stark saures pH-Optimum (pH=3) ist für ALOX-Isoformen eher ungewöhnlich, weil die meisten bisher untersuchten Enzyme ein pH-Optimum im neutralen oder alkalischen Bereich aufweisen. Für die MF-LOX1, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurde, lag das pH-Optimum (pH<sub>opt</sub>=9.2) im alkalischen Bereich. **iii)** Die MX-LOX1 besitzt eine höhere

Bindungsaffinität für LA im Vergleich zu AA ( $K_M=48 \mu\text{M}$  für LA und  $K_M=262 \mu\text{M}$  für AA) [156]. Unter unseren experimentellen Bedingungen wird LA von der MF-LOX1 jedoch nicht oxxygeniert, sodass die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes nicht möglich war. **iv)** Die MX-LOX1 ist ein eher stabiles Enzym und hat sein Temperaturoptimum ( $T_{\text{opt}}$ ) von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  [156]. Ein ähnliches Temperaturoptimum wurde für dieses Enzym in einem anderen Messsystem bestimmt [169]. Im Gegensatz dazu lag das Temperaturoptimum der AA-Oxygenierung durch die MF-LOX1 zwischen  $5$  und  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  (**Abb. 16**). Bei höheren Messtemperaturen wurden deutlich geringere Oxygenaseaktivitäten gemessen und diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die rekombinante MF-LOX1 strukturell instabil ist und schon bei niederen Temperaturen inaktiviert wird. **v)** Für die rekombinanten MX-LOX-Isoformen konnte ein Eisengehalt von  $60 \%$  bzw.  $96.5 \%$  [156, 169] quantifiziert werden. Im Unterschied dazu enthielt die rekombinante MF-LOX1-Präparation (diese Arbeit) nur  $5.6 \%$  Eisen und eine Eisensupplementierung des Kulturmediums führte nicht zu einer verbesserten Eiseninkorporation. Um auszuschließen, dass andere Übergangsmetalle als katalytisch aktive prosthetische Gruppe fungieren, wurde auch der Mangan-, Cobalt- und Zinkgehalt der MF-LOX1-Präparation bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte lagen aber deutlich unter den Eisenwerten. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der MF-LOX1 um eine Mangan-abhängige Lipoxygenase handelt. Berücksichtigt man die geringe Eisenbeladung der rekombinanten MF-LOX1 bei der Berechnung der theoretischen spezifischen katalytischen Aktivität und korrigiert die gemessenen Daten auf eine Eisenbeladung von  $100 \%$ , kann für den EPA-Umsatz eine Wechselzahl von  $0.55 \pm 0.21 \text{ s}^{-1}$  errechnet werden. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die Wechselzahl des EPA-Umsatzes durch die MX-LOX1 [169]. **vi)** Sowohl für die MX-LOX1 [169] als auch für MF-LOX1 (diese Arbeit) wurden Mutageneseuntersuchungen durchgeführt, um zu prüfen, ob die Ala-vs.-Gly-Hypothese [42] auf die Enzyme anwendbar ist. Beide Enzyme sind funktionelle S-Lipoxygenasen und tragen an der kritischen Stelle ihrer Aminosäuresequenz ein Alanin. Entsprechend der Ala-vs.-Gly-Hypothese [42] sollte ein Alanin-zu-Glycin-Austausch zu einer Umwandlung beider Enzyme in R-LOXn führen. Ein entsprechender Aminosäureaustausch bei der MF-LOX1 (Ala410Gly) führte nicht zu einer Veränderung der Enantioselektivität des Enzyms (diese Arbeit). In der Tat wurde als Hauptprodukt der AA-Oxygenierung durch die mutierte MF-LOX1 wie auch durch das Wildtypenzym 12S-HETE identifiziert. 8R-HETE, welches bei Anwendbarkeit des Ala-vs.-Gly-Konzeptes als dominantes AA-Oxygenierungsprodukt erwartet worden wäre, konnte nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die MF-LOX1 nicht dem Ala-vs.-Gly-Konzept folgt. Demgegenüber wandelte die Ala420Gly-Mutante der MX-LOX1 AA in eine Mischung aus 11S- und 15R-HETE [169] um. Damit folgt diese Lipoxygenase

zumindest partiell der Ala-vs.-Gly-Hypothese. Aus den oben aufgeführten Punkten **i-vi** wird ersichtlich, dass sich die MF-LOX1 (diese Arbeit) und MX-LOX1 [169] hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden. Damit scheint es trotz des hohen Grades an Sequenzhomologie, den beide Enzyme miteinander teilen, unwahrscheinlich zu sein, dass es sich bei diesen zwei Enzymen um funktionelle Äquivalente in den beiden *Myxococcus*-Spezies handelt.

### 5.1.2. Geringer Eisengehalt und niedrige katalytische Aktivität der MF-LOX1

Die Untersuchungen der katalytischen Aktivität der MF-LOX1 zeigten eine relativ geringe Wechselzahl unserer Enzympräparationen [ $(3.1 \pm 1.2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  mit EPA]. Andere tierische [158], pflanzliche [182, 183] und bakterielle [181, 184] ALOX-Isoformen weisen deutlich höhere katalytische Aktivitäten auf. Zur Klärung der Ursachen für diese Beobachtung wurden die Metallkonzentrationen in den MF-LOX1-Präparationen bestimmt. Der Eisengehalt des Wildtyp-Enzyms betrug dabei 5.6 %. Interessanterweise verfügte die MF-LOX1 Phe424Ile+Ile425Met-Doppelmutante über eine fünffach höhere katalytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Der Eisengehalt dieser Mutante betrug 22 %, was das Vierfache des Eisengehaltes des Wildtyp-Enzyms ausmacht. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wurde die Hypothese formuliert, dass die niedrige katalytische Aktivität der rekombinanten MF-LOX1 überwiegend durch niedrige Eiseninkorporation erklärt werden kann. Wenn man von einer 100%-igen Eiseninkorporation der MF-LOX1 ausgeht, kann eine katalytische Aktivität von  $0.55 \pm 0.21 \text{ s}^{-1}$  (n=3) berechnet werden. Diese Wechselzahl ist zwar immer noch geringer als der entsprechende Wert für die rabALOX15 und humALOX15 [33, 158], Sojabohnen-LOX [182, 183] und die bakteriellen Lipoxygenasen aus *Pseudomonas aeruginosa* [146, 180], *Burkholderia thailandensis* [181] und *Acaryochloris marina* [184]. Sie ist aber vergleichbar mit den Wechselzahlen anderer ALOX-Präparationen wie mit der der humALOX5 [159].

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für geringen Eisengehalt unserer rekombinanten MF-LOX1-Präparation wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Um herauszufinden, ob die angewandte Expressionsstrategie in *E. coli* dafür verantwortlich sein könnte, wurde die Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* parallel zur MF-LOX1 im gleichen prokaryotischen Expressionssystem exprimiert. Der für PA-LOX-Präparation bestimmte Eisengehalt entsprach einem Eisenatom pro ein Enzymmolekül, während die MF-LOX1-Präparation nur zu 5.6 % mit Eisen beladen wurde. Da das Expressionsniveau der beiden LOXn vergleichbar war, schieden Probleme mit der Eisenversorgung des Expressionssystems als Ursachen für die geringe Eisenbeladung der MF-LOX1 aus. Alternativ kann als mögliche Ursache

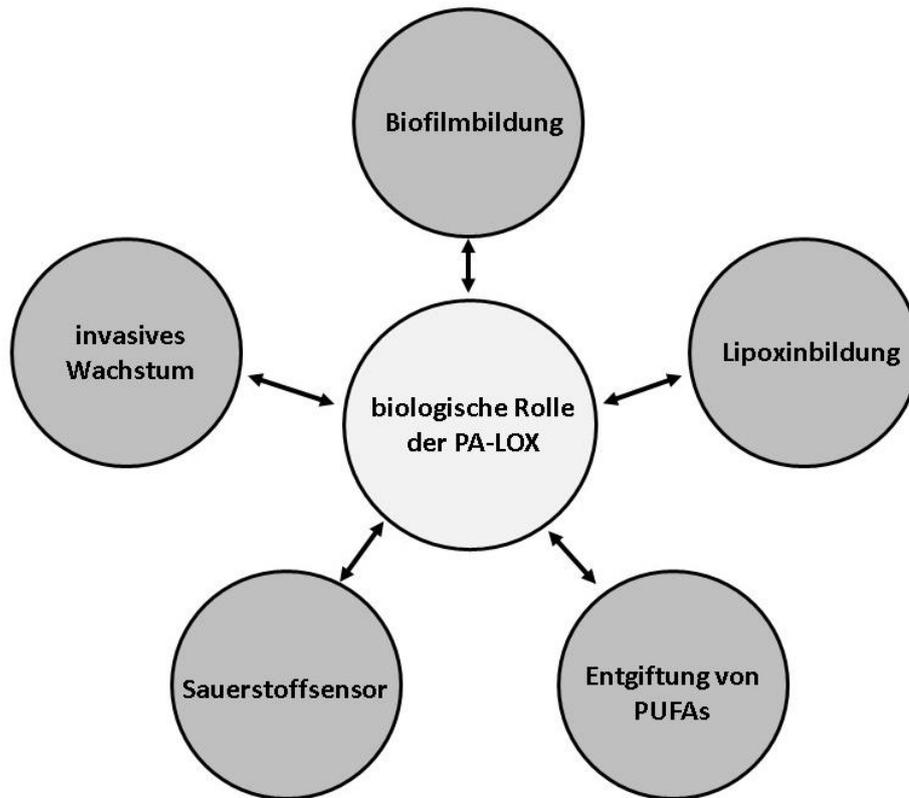
für den begrenzten Eiseneinbau diskutiert werden, dass das primäre Translationsprodukt (apoMF-LOX1), welches noch kein Eisen enthält, bei rekombinanter Expression partiell fehlgefaltet wird, wodurch der nachträgliche Eiseneinbau behindert sein könnte. Das Problem, dass bei der rekombinanten Expression verschiedener ALOX-Isoformen vergleichsweise wenig Eisen eingebaut wird, wurde auch für die Enzyme anderer Spezies beobachtet [162, 181]. Allerdings konnte der Eisengehalt einer rekombinant exprimierten bakteriellen Lipoxygenase aus dem Cyanobakterium *Cyanothece sp. PCC 8801* durch Fe<sup>3+</sup>-Supplementation des bakteriellen Nährmediums verbessert werden [162]. Leider führte ein ähnliches Vorgehen bei der rekombinanten Expression der MF-LOX1 (diese Arbeit) nicht zur angestrebten Erhöhung der Eiseneinbaurrate. Abschließend wurde getestet, ob Mutationen der C-terminalen Aminosäure zu einer verbesserten Eisenbeladung und einer Erhöhung der katalytischen Aktivität führen. Die C-terminale Aminosäure von ALOX-Isoformen ist an der Ligandierung des Nichthämeisens beteiligt. Bei den meisten Lipoxygenasen findet sich an dieser Stelle ein Isoleucin, dessen Carboxygruppe als fünfter Eisenligand fungiert. Die MF-LOX1 trägt an dieser Stelle ein Valin. Leider führte ein Valin-zu-Isoleucin-Austausch bei der MF-LOX1 (Val767Ile-Mutante) zu einem katalytisch inaktiven Enzym, wobei die molekularen Ursachen für die katalytische Inaktivität nicht weiter untersucht wurden.

Ein weiterer Grund für die geringe katalytische Aktivität der MF-LOX1 stellt die große Thermolabilität des Enzyms dar. Das Enzym zeigte die höchste katalytische Aktivität bei Reaktionstemperaturen zwischen 5 und 10 °C. Bei höheren Temperaturen fiel die katalytische Aktivität deutlich ab. Andere Lipoxygenasen (darunter auch bakterielle LOXn) haben Temperaturoptima zwischen 20 und 30 °C [169, 181, 185]. Die molekularen Ursachen für die hohe Thermolabilität der MF-LOX1, die auf subtilen Temperatur-induzierten Strukturfluktuationen beruhen könnte, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

### **5.1.3. Mögliche biologische Bedeutung der Lipoxygenase für *Myxococcus fulvus***

Den ALOX15-Isoformen der Säugetiere werden diverse Funktionen bei der Zelldifferenzierung, der Immunantwort und bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zugeschrieben [71, 92]. Die pflanzlichen Lipoxygenasen scheinen ebenfalls multiple physiologische Funktionen zu erfüllen. Sie spielen zum Beispiel eine Rolle bei den Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen [186]. Weitgehend unklar sind jedoch die biologischen Funktionen bakterieller Lipoxygenasen. Zwar wurde eine Reihe von Hypothesen zur biologischen Bedeutung dieser Enzyme publiziert (siehe weiter im Text), für keines dieser Szenarien gibt es

jedoch abschließende Beweise. Für die am besten untersuchte bakterielle Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* werden derzeit mehrere Szenarien diskutiert (**Abb. 24**):



**Abb. 24. Mögliche biologische Rollen der Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa*** [modifiziert nach Wong et al. [187]]. Aufgrund verschiedener enzymatischer Charakteristika der Lipoxygenase aus *Pseudomonas aeruginosa* (wie z.B. Lipoxinsynthese- und Membranoxygenaseaktivität sowie niedriger Sauerstoffaffinität) wurden verschiedene Szenarien zur biologischen Rolle dieses Enzyms vorgeschlagen.

**i) Biofilmbildung:** Es wird vermutet, dass bakterielle ALOX-Isoformen an der Bildung von Biofilmen beteiligt sind. Wenn planktonische Bakterien spezifische Bindungsstellen erkennen, einer subletalen Antibiotikakonzentration ausgesetzt sind oder an Nährstoffmangel leiden, können sie Biofilme bilden [188-191]. In diesen sozial organisierten Bakterienkolonien übernehmen bestimmte Bakterien bestimmte Funktionen, was einer Arbeitsteilung innerhalb der Bakterienkolonie gleichkommt, gleichzeitig aber eine gezielte Kommunikation zwischen den Mitgliedern der Kolonie erfordert. Untersuchungen mit Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa*, die keine funktionelle Lipoxygenase exprimieren, ergaben, dass das Enzym (PA-LOX) für die Ausbildung von Biofilmen gebraucht wird [147]. Obwohl die molekulare Grundlage für diesen Befund experimentell nicht aufgeklärt werden konnte, vermuten die Autoren, dass die PA-LOX für die interzelluläre Kommunikation bedeutsam sein könnte. Myxobakterien verfügen ebenfalls über ein komplexes soziales Verhalten und bilden Biofilme aus [192, 193]. Damit könnte die MF-

LOX1 für diesen Prozess ebenfalls bedeutsam sein. Zur Prüfung dieser Hypothese wären Experimente mit lebenden Myxobakterien nötig, für die in unserem Labor nicht die nötigen Voraussetzungen existieren.

**ii) Nahrungsquellen:** Bakterien stehen mit anderen Organismen in Konkurrenz um Nahrungsressourcen. Ein Weg zur Schaffung zusätzlicher Nahrungsquellen stellt die Tötung von Nahrungskonkurrenten durch Zellyse dar. Zielzellen sind aber durch eine zelluläre Biomembran geschützt und geben ihre Nahrungsreserven nicht ohne weiteres frei. Für die PA-LOX wurde gezeigt, dass sie die Membranphospholipide von Zielzellen oxygenieren kann, was zur Lyse der Zielzelle führt [146, 148]. Damit kann die Lipoxygenase den Bakterien im Kampf ums Überleben einen evolutionären Vorteil verschaffen. Obwohl Myxobakterien für Menschen nicht pathogen sind, werden sie als Raubbakterien klassifiziert. Sie sind in der Lage, andere Organismen zum Zweck des Nahrungsgewinns abzutöten und deren Nährstoffe für ihren Eigenbedarf zu nutzen [194, 195]. Ihre Eigenschaft, lebende oder tote Zyanobakterien und Hefezellen lysieren zu können, wurde in mehreren Experimenten nachgewiesen [196]. Obwohl die Membranoxygenaseaktivität der MF-LOX1 in unseren *in vitro* Experimenten nur begrenzt (im Vergleich zur rabALOX15) war, könnte dies unter *in vivo* Bedingungen anders sein.

**iii) Evasionsmechanismus.** Die Expression bakterieller Lipoxygenasen könnte einen Evasionsmechanismus darstellen. Wenn die Bakterien höhere Organismen infizieren, versucht das Immunsystem der Wirte, die Pathogene zu bekämpfen. Manche Bakterien entwickelten daher im Laufe der Evolution Strategien, die es ihnen ermöglichen, den antibiotischen Wirkungen des Immunsystems zu entgehen. So könnten Bakterien z.B. bei der Infektion von Wirten Substanzen produzieren, welche die Funktionalität des Abwehrsystems der Wirte abschwächen. So wäre es u.a. denkbar, dass bakterielle ALOX-Isoformen anti-inflammatorische Metabolite (z.B. Lipoxine oder Resolvine) bilden, welche die Immunantwort herunterregulieren können [197-199]. Die PA-LOX verfügt über eine Lipoxinsynthase-Aktivität [146]. Lipoxine stellen Sekundärprodukte der Lipoxygenasereaktion dar, an deren Biosynthese mehrere ALOX-Isoformen beteiligt sind. Im Rahmen der Lipoxinsynthese muss AA an drei Kohlenstoffatome oxygeniert werden [200]. Leider liegen bislang keine experimentellen Daten zur Fähigkeit zur Bildung von anti-inflammatorischen Produkten durch die MF-LOX1 vor. Außerdem ist *Myxococcus fulvus* kein humanpathogenes Bakterium, sodass eine mögliche Lipoxinsynthaseaktivität der MF-LOX1 als mögliches Evasionsmechanismus bei der Infektion des Menschen nicht relevant wäre.

**iv) Sauerstoffsensoren:** Die Affinität der ALOX15-Orthologe der Säugetiere für Sauerstoff ist hoch, da  $K_M$ -Werte für Sauerstoff zwischen 3 und 30  $\mu\text{M}$  bestimmt wurden [166]. Die PA-LOX hat aber im Vergleich zu anderen ALOX-Isoformen nur eine geringe Sauerstoffaffinität ( $K_M$

> 400  $\mu\text{M}$ ) [167]. Im Allgemeinen sind die kinetischen Eigenschaften von Enzymen, wie z.B. deren Substrataffinität, die Grundlage dafür, dass Enzyme als Sensorproteine fungieren können [201]. Ausgehend von der niedrigen Sauerstoffaffinität der PA-LOX kann ihre Wirkung als Sauerstoffsensoren vermutet werden. Die MF-LOX1 hat aber relativ hohe Sauerstoffaffinität ( $K_M=12 \mu\text{M}$ ). Damit arbeitet sie bereits bei einem Sauerstoffpartialdruck, der unter normoxischen Bedingungen in Zellen und Geweben herrscht, unter Sättigungsbedingungen. Das bedeutet, dass eine Veränderung der Sauerstoffkonzentration im Bereich von über 50  $\mu\text{M}$  nicht mehr zu einer Variation der ALOX-Aktivität führt. Dies spricht gegen die mögliche Rolle der MF-LOX1 als Bestandteil eines möglichen zellulären Sauerstoffsensors.

**v) Entgiftungsfunktion:** Ungesättigte Fettsäuren wirken auf den bakteriellen Stoffwechsel toxisch [202, 203]. So hemmt Linolsäure zum Beispiel das Wachstum von *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 [202] und Ölsäure wirkt toxisch auf *Streptococcus pyogenes* M49 [204]. Zur „Entgiftung“ von Ölsäure exprimiert *S. pyogenes* eine Ölsäurehydratase, welche Wasser an die Doppelbindung der Ölsäure anlagert und damit die Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen in eine Einfachbindung umwandelt [204]. EPA und DHA sind für Bakterien toxischer als PUFAs mit wenigen Doppelbindungen wie LA [205]. LA ist ihrerseits toxischer als gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren [206]. Obwohl Lipoxygenasen die Anzahl der Doppelbindungen nicht reduzieren, kommt es bei der Lipoxygenasereaktion zu einer Doppelbindungskonjugation, was die chemische Reaktivität der Doppelbindungen verändert und weitere Umwandlungsreaktionen der Hydroperoxyfettsäuren initiiert. Leider wurde bisher noch nicht untersucht, ob die Expression der MF-LOX1 tatsächlich zu einer Reduktion der PUFA-Toxizität beiträgt. Entsprechende Untersuchungen erfordern die Arbeit mit potenziell pathogenen Bakterien, die in unseren Räumlichkeiten nicht durchgeführt werden dürfen.

#### **5.1.4. Substratpräferenz der MF-LOX1 und zelluläre Fettsäurekomposition von *Myxococcus fulvus***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substratspezifität der MF-LOX1 für verschiedene  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-PUFAs untersucht. Generell kommen PUFAs in bakteriellen Zellmembranen nur in geringen Mengen vor. Bei *Myxococcus fulvus* sind LA (2.7 % der gesamten FS-Menge) und GLA (1.25 % der gesamten FS-Menge) als PUFAs nachweisbar, während andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren nur in Spuren vorkommen [207]. Interessanterweise konnte die MF-LOX1 diese beiden Fettsäuren unter unseren *in vitro* Bedingungen nicht oxygenieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MF-LOX1 in den Bakterien selbst keine verwertbaren Substrate findet, sodass eine

Funktion des Enzyms beim interzellulären Signaling eher unwahrscheinlich ist. Wenn dem Bakterium jedoch von außen AA, ALA, EPA oder DHA angeboten wird, können entsprechende Oxygenierungsprodukte gebildet werden.

Insgesamt ähnelt die Substratspezifität der MF-LOX1 der humALOX12. Bei dieser ALOX-Isoform ist AA ein besseres Substrat als LA [208]. Weiterhin konnten wir zeigen, dass EPA und DHA noch bessere Substrate als AA für die humALOX12 sind (**Abb. 19**). In den von uns durchgeführten Aktivitätsassays mit der humALOX12 beobachteten wir eine Steigerung der Aktivität dieses Enzyms mit der steigenden Anzahl der Doppelbindungen (**Abb. 19**). Ähnliche Schlussfolgerungen konnten für die MF-LOX1 gezogen werden (**Abb. 10**). Interessanterweise ist LA auch kein Substrat für humALOX5 [208], mit der MF-LOX1 hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz am nächsten verwandt ist. Die MX-LOX2 zeigt eine ähnliche Substratspezifität [157] wie die MF-LOX1. PUFAs kommen bei *Myxococcus xanthus* ebenfalls nur in geringen Mengen vor, wobei die am meisten verbreiteten ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und ALA sind. MX-LOX2 kann LA, ALA und AA besser als andere PUFAs oxygenieren. Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass die Substratpräferenzen der myxobakteriellen Lipoxygenasen (MF-LOX1 und MX-LOX2) der zellulären Fettsäurezusammensetzung nicht entsprechen. Daraus könnte man ableiten, dass die Bereitstellung exogener Substrate für die *in vivo* Aktivität dieser Enzyme bedeutsam ist.

Für cyanobakterielle Lipoxygenaseisoformen ist die Situation anders. Bei diesen Bakterien entspricht die Substratspezifität der Enzyme der Fettsäurezusammensetzung der Bakterien. Bei *Cyanothece sp.* und *Acaryochloris marina* stellt LA eine dominante PUFA der zellulären Biomembran dar [162]. Die Lipoxygenase aus *Acaryochloris marina* besitzt eine hohe Affinität zu LA [184]. Damit könnte man vermuten, dass sich diese bakterielle Lipoxygenase an die zelluläre Fettsäurezusammensetzung anpasste. Für die Lipoxygenase aus *Cyanothece sp.* wurde die Substratspezifität bisher leider noch nicht untersucht.

## **5.2. Produktmuster der ALOX-Isoformen von Säugetieren mit verschiedenen Substraten**

### **5.2.1. Biologische Bedeutung der Positionsspezifität von Lipoxygenasen**

Das menschliche Genom verfügt über sechs verschiedene Lipoxygenasegene (paraloge Gene), die zeitlich (z.B. verschiedene Phasen der Entzündungsreaktion) und räumlich (z.B. in verschiedenen Zellen und Geweben) differentiell exprimiert werden. Die humanen paralogen ALOX-Gene kodieren für Enzyme, die sich hinsichtlich ihrer Primärprodukte, die aus Arachidonsäure gebildet werden, unterscheiden. Die ALOX5 wandelt Arachidonsäure in 5S-

HpETE um, während das Hauptprodukt der AA-Oxygenierung durch die humALOX15B fast ausschließlich 15S-HpETE ist.

Primäre Reaktionsprodukte humaner ALOX-Paraloge stellen ebenfalls Substrate für diese Enzyme dar. So kann die humALOX5 zum Beispiel 5S-HpETE in 5,6-Leukotrien A<sub>4</sub> umwandeln [71], das seinerseits durch andere Enzyme in pro-inflammatorische Leukotriene transformiert werden kann. Die humALOX15 kann diese Produkte hingegen nicht bilden. Andererseits sind sowohl humALOX5 als auch humALOX15 an der Bildung von Resolvinen der E-Serie beteiligt, deren anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Wirkung beschrieben wurden [175]. Damit sind nicht nur die Positionsspezifitäten einzelner Lipoxygenasen, sondern auch die Zusammenarbeit mehrerer Enzymisoformentypen für die Synthese biorelevanter Mehrfachoxygenierungsprodukte von Bedeutung.

Die Reaktionsspezifitäten von ALOX-Isoformen einer Spezies können sich voneinander unterscheiden, können aber auch identisch sein. So besitzen z.B. die Alox15 und die Alox12 der Maus eine ähnliche Reaktionsspezifität mit AA. In Gegensatz dazu zeigt die murine Alox5 eine abweichende Reaktionsspezifität. Manchmal zeigen aber auch orthologe Enzyme verschiedener Spezies unterschiedliche Reaktionsspezifitäten. So konnte die humALOX15 als AA 15-lipoxygenierendes Enzym identifiziert werden. In Gegensatz dazu fungiert die murine Alox15 als AA 12-Lipoxygenase. Die humALOX15B ist ein AA 15-lipoxygenierendes Enzym während das murine Ortholog (mouAlox15b) AA 8-lipoxygenierend wirkt. Umfangreichere Untersuchungen zur Reaktionsspezifität orthologer ALOX15-Isoformen verschiedener Säugetiere zeigten, dass höhere Primaten (höher entwickelt als Gibbons, einschließlich des Menschen) ALOX15-Orthologe exprimieren, die AA in 15-HpETE umwandeln. Im Gegensatz dazu exprimieren niedrigere Primaten (weniger weit entwickelt als Gibbons) und andere Säugetiere AA 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Bisher sind zwei Ausnahmen von diesem Evolutionskonzept der ALOX15-Spezifität bekannt. Die ALOX15-Orthologe des Kaninchens und der Kängururatte wurden als 15-lipoxygenierende Enzyme klassifiziert [69], obwohl die beiden Spezies evolutionär weit unter Gibbons eingruppiert sind. Nach der Evolutionshypothese veränderte sich die Reaktionsspezifität im Laufe der Evolution zugunsten der C15-Oxygenierungsprodukte. Die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe können ausgehend von 5-HETE bzw. 5,15-DiHETE Lipoxine (antiinflammatorische Metabolite) bilden. Ein Vergleich der Lipoxinsyntheseaktivitäten von AA 12- und AA 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen zeigte, dass die Lipoxinsyntheseaktivität von AA 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen deutlich höher ist als die Aktivität der AA 12-lipoxygenierenden Enzyme. Aus diesen Daten wurde abgeleitet, dass eine mögliche Ursache für die evolutionäre Veränderung der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologe darin bestehen

könnte, dass AA 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe effektiver anti-inflammatorische Lipoxine bilden können. Damit können die hochentwickelten Primaten die Entzündungsreaktion besser kontrollieren als niederentwickelte Säugetiere [15].

Ähnliche Überlegungen könnten für die Biosynthese von Resolvinen der E-Serie angestellt werden. So kann z.B. Resolvin E3 (17,18-Dihydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,15E-eicosapentaensäure) ausgehend von 18-HEPE durch 15-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen gebildet werden [209]. Wird 18-HEPE jedoch von 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen oxygeniert, sollte 12,18-DiHEPE entstehen, für das bisher keine Resolvineigenschaften nachgewiesen wurden. Deswegen kann man vermuten, dass im Laufe der Evolution die Resolvinsynthaseaktivität der ALOX15-Orthologe verbessert worden ist. Diese Verbesserung kann als Optimierung der Kontrolle der Entzündungsreaktion angesehen werden. Zur Stützung unserer Hypothese müssten jedoch Experimente durchgeführt werden, mit denen die Fähigkeit von AA 12- und AA 15-lipoxygenierenden ALOX15-Isoformen getestet wird, unter identischen experimentellen Bedingungen aus 18-HEPE Resolvin E3 zu synthetisieren.

Die meisten bereits beschriebenen Lipoxygenasen verfügen über eine singuläre Positionsspezifität, wobei das Hauptprodukt über 90 Prozent aller gebildeten Reaktionsprodukte ausmacht. Eine duale Positionsspezifität wurde jedoch für die ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere beschrieben [158, 210, 211]. Die ALOX15 des Gibbons zeigt eine sehr ausgeprägte duale Reaktionsspezifität. Bei ihrer Reaktion mit AA werden nahezu äquimolare Mengen an 12-H(p)ETE und 15-H(p)ETE gebildet [70]. Verwendet man artifizielle PUFAs als ALOX-Substrate, wurde sogar für die Sojabohnen-Lipoxygenase-1 eine duale Reaktionsspezifität beschrieben, obwohl AA fast ausschließlich zu 15S-HpETE oxygeniert wird [43]. Zum Verständnis der variablen Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen wurden mehrere Hypothesen entwickelt. Entsprechend der Orientierungshypothese können PUFAs am aktiven Zentrum von ALOX-Isoformen unterschiedlich orientiert werden. Dabei können die Fettsäuren in die Substratbindungstasche entweder mit dem Methylende [43] oder mit dem Carboxylende [12, 212] eintreten. Eine alternative Erklärung für variable Positionsspezifitäten der LOXn könnte die Tiefe der Substratbindungstasche sein. Diese Tiefe bestimmt, wie weit die Fettsäure in die Substratbindungstasche eindringen kann [213, 214]. Schließlich ist auch eine Kombination beider Hypothesen denkbar.

Unsere Untersuchungen zur Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen mit unterschiedlichen PUFAs zeigten, dass aus der Reaktionsspezifität eines Enzyms mit AA nicht automatisch die Spezifität der Oxygenierung anderer Substratfettsäuren abgeleitet werden kann. So zeigt z.B. die humALOX15 mit AA eine duale Reaktionsspezifität, wobei als Hauptprodukt

15-H(p)ETE zu ca. 90 % und als Nebenprodukt 12-H(p)ETE zu 10 % gebildet wird. Würde man dieses Ergebnis auf die Oxygenierung von DHA eins zu eins übertragen, würde sich ein Produktmuster ergeben, das zu 90 % aus 17-HDHA und 10 % aus 14-HDHA besteht. Experimentell haben wir jedoch die Bildung von 17-HDHA und 14-HDHA in sehr ähnlichen Mengen beobachtet. Damit kann geschlossen werden, dass die Reaktionsspezifität und damit das Produktmuster einer ALOX-Isoform von der verwendeten Substratfettsäure abhängen und für jede ALOX-PUFA-Kombination experimentell bestimmt werden müssen.

### **5.2.2. Biologische Bedeutung der Substratpräferenz von Lipoxygenasen für zellulären Stoffwechsel**

Ähnlich wie die Positionsspezifität ist auch die Substratelektivität für die biologische Rolle von Lipoxygenasen von großer Bedeutung. Die humALOX5 und die humALOX12 können zum Beispiel Linolsäure nicht oxygenieren [208], obwohl diese Fettsäure in allen Säugetierzellen in hohen Konzentrationen vorkommt [215]. Im Gegensatz dazu wandeln die humALOX15 und die humALOX15B LA problemlos in 13-H(p)ODE um. Will man die Affinität einer ALOX-Isoform zu einer ausgewählten Fettsäure quantifizieren, muss man den  $K_M$ -Wert (Maß für die Substrataffinität) experimentell bestimmen. Dieser Wert charakterisiert die Substratkonzentration, bei der das Enzym 50 % seiner Maximalgeschwindigkeit erreicht. Arbeitet das Enzym unter den Bedingungen der Substratsättigung kann dessen Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) ermittelt werden. Dieses Maß besitzt die Dimension einer Reaktionsgeschwindigkeit (z.B. Mol Produktbildung pro L x s oder  $M \times s^{-1}$ ). Die molekulare Umsatzrate oder Wechselzahl ist ein weiteres Maß für  $V_{max}$ . Dieser Wert, bei dem  $V_{max}$  auf die verfügbare Enzymkonzentration normiert wird, gibt an, wie viele Mole Substrat in einer Sekunde durch ein Mol Enzym in Produkt umgewandelt werden kann. Deshalb wird die molekulare Umsatzrate, die als  $k_{cat}$  bezeichnet wird, in Mol Substratumwandlung pro Mol Enzym  $\times s^{-1}$  oder kurz in  $s^{-1}$  angegeben. Eine Wechselzahl von  $1 s^{-1}$  bedeutet, dass unter den Bedingungen der Substratsättigung ein Mol Enzym die Umwandlung eines Mols Substrat zu seinem Produkt katalysiert.

Für die *in vivo* Situation ist die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) jedoch wenig aussagekräftig, da unter diesen Bedingungen die Konzentrationen der verfügbaren PUFA-Substrate häufig deutlich unter den jeweiligen  $K_M$ -Werten liegen und damit die Substratkonzentration geschwindigkeitsbestimmend wirkt. So liegt z.B. die intrazelluläre Konzentration an freier (nicht-veresterter) AA in nicht-stimulierten Leukozyten bei ungefähr  $1 \mu M$  [216]. Der  $K_M$ -Wert der humALOX15 bei der Reaktion mit AA befindet sich jedoch im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich [208, 217]. Am Beispiel der humALOX15 und AA wurde gezeigt, dass die

Enzyme *in vivo* niemals unter Substratsättigungsbedingungen arbeiten und die Bestimmung der Wechselzahl jeweiliger Enzym-Substrat-Reaktionen die Reaktion *in vivo* nicht abbilden kann. Aus diesem Grund verwendet man für die Beurteilung der Enzymeffizienz einen anderen Parameter. Der Quotient  $k_{cat}/K_M$  wird als katalytische Effizienz des Enzyms bezeichnet und charakterisiert die Fähigkeit eines Enzyms am besten, ein bestimmtes Substrat in das korrespondierende Produkt umzuwandeln. Dieser Quotient berücksichtigt sowohl die Affinität des Enzyms als auch seine Umsatzrate. Je höher der  $k_{cat}/K_M$ -Quotient ist, desto effektiver wirkt ein Enzym.

Die Notwendigkeit der Untersuchung der Enzymreaktionen, bei denen der Lipoxygenase gleichzeitig mehrere Substrate (verschiedene PUFAs) angeboten werden, entsteht dadurch, dass eine bestimmte Fettsäure intrazellulär nie als einziges Lipoxygenasesubstrat vorliegt. Der größte Anteil an PUFAs liegt in den Zellen nicht frei vor, sondern ist in Form der Membranphospholipide gespeichert. Durch die Aktivierung einer Phospholipase A2 wird die Hydrolyse der Phospholipide ausgelöst, was zu einer Freisetzung von PUFAs führt. Diese Hydrolyse ist jedoch nicht PUFA-spezifisch, sodass verschiedene PUFAs freigesetzt werden, die dann gleichzeitig im Zytosol vorhanden sind. Aus diesem Grund sollten PUFA-Mischungen mit ALOX15-Isoformen inkubiert werden, wenn es darum geht, *in vivo* Verhältnisse realitätsnah abzubilden. Eine Arbeitsgruppe hat zum Beispiel eine Inkubation der humALOX15 mit einer Substratmischung aus AA und LA bei einer Fettsäureendkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  durchgeführt und dabei eine Präferenz für AA gezeigt. Man würde vermuten, dass dieses experimentelle Design [208] die *in vivo* Bedingungen besser simuliert, weil die experimentellen Substratkonzentrationen den *in vivo* Konzentrationen angepasst sind (intrazelluläre AA-Konzentration liegt bei ca. 1  $\mu\text{M}$ ). Es gibt jedoch einen weiteren Fakt zu berücksichtigen. Zwar liegt die tatsächlich gemessene totale intrazelluläre Konzentration der freien Fettsäuren in einstelligem mikromolarem Bereich. Es ist bisher jedoch unklar, welcher „effektiven“ PUFA-Konzentration die Lipoxygenasen intrazellulär ausgesetzt sind. Dabei wird die „effektive“ PUFA-Konzentration unter anderem durch subzelluläre Lokalisation der Lipoxygenasen beeinflusst [218]. Das bedeutet z.B., dass einige Lipoxygenasen während ihrer Aktivität mit Membranen assoziiert sind. Hier setzt die Phospholipase A2 die PUFAs aus Phospholipiden frei, weshalb die lokale Fettsäurekonzentration in der ALOX-Nähe auch deutlich höher sein könnte als die zytosolischen Konzentrationen.

Aufgrund des gleichzeitigen Vorhandenseins mehrerer Lipoxygenasesubstrate und folglich auch ihrer Produkte entsteht auch die Möglichkeit, dass die kinetischen Konstanten der Lipoxygenasereaktion durch mehrere Metabolite (Fettsäuren oder Hydroxyfettsäuren) moduliert werden können. Es wurde für humALOX15 zum Beispiel gezeigt, dass ihre Substratpräferenz (Verhältnis der  $k_{cat}/K_M$ -Quotienten für jeweilige Fettsäuren) durch Lipoxygenaseprodukte

verändert wird [208]. Deshalb können sich die kinetischen Konstanten, die für die Inkubationen eines Enzyms mit einer einzigen Fettsäure bzw. mit einer Fettsäuremischung bestimmt wurden, deutlich voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund müsste man dann für die Untersuchung von Produktmustern, die durch Fettsäureoxygenierung durch Lipoxygenasen *in vivo* entstehen, das Vorhandensein mehrerer Fettsäuren und ihrer Oxygenierungsprodukte *in vitro* simulieren. Da solche Simulationen auch die allosterischen Effekte verschiedener ALOX-Produkte einschließen müssen, ergibt sich ein hoch komplexes kinetisches System, für dessen Beschreibung deutlich mehr kinetische Daten zur Verfügung stehen müssen, als das bisher der Fall ist. Hier mangelt es insbesondere an Daten zu den allosterischen Effekten der komplexen ALOX-Produkte.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen entschieden wir uns, verschiedene Fettsäuremischungen mit ALOX15-Orthologen zu inkubieren und die Substratpräferenzen anhand der Produktbildung zu beurteilen. In früheren Arbeiten [208] wurden solche Mischinkubationen nur mit AA+LA Mischungen für die humanen 15-lipoxygenierenden ALOX15-Paraloge durchgeführt. Wir haben die Substratpräferenz verschiedener ALOX15-Orthologe aus Mischungen von AA+EPA+DHA und LA+GLA untersucht. Diese Experimente ergaben, dass Säugetier-ALOX15-Orthologe DHA als Substrat präferieren, wenn in der Inkubationsmischung zusätzlich AA und EPA anwesend waren (**Abb. 19**). Aus einer LA-GLA Mischung wurde GLA präferentiell oxygeniert. Weiterhin stellten wir fest, dass die Menge der aus einer solchen Fettsäuremischung gebildeten Oxygenierungsprodukte mit der Anzahl der Doppelbindungen in der Substratfettsäure anstieg. Zwar sind  $\omega$ -6-PUFAs (AA + LA) die dominanten PUFAs in menschlichen Zellen, ihr relativer Anteil hängt aber strikt von der Art er aufgenommenen Nahrung ab [219, 220]. Dadurch kann die intrazelluläre Konzentration freier EPA mit der AA-Konzentration vergleichbar werden [221]. Da ALOX15-Isoformen  $\omega$ -3-PUFAs präferentiell oxygenieren (**Abb. 19**), können Oxygenierungsprodukte von EPA und DHA durchaus in höheren Mengen auftreten als das für die AA- und LA-Oxygenierungsprodukte der Fall ist.

### 5.2.3. Produktmuster von ALOX15-Isoformen der höheren Primaten mit DHA

Unsere Untersuchungen der Reaktionsprodukte der ALOX15-Orthologe der höheren Primaten (Mensch, Schimpanse, Orang-Utan) ergaben, dass diese Enzyme über eine ausgeprägte duale Positionsspezifität bei der Reaktion mit DHA verfügen. Das Nebenprodukt der DHA-Oxygenierung 14-H(p)DHA (n-9-Oxygenierung) machte bis zu ca. 40 % der Summe des Haupt- und Nebenproduktes (14-H(p)DHA) aus (**Tab. 6, Abb. 19**). Bemerkenswert war ebenfalls, dass der Grad der dualen Positionsspezifität dieser ALOX15-Isoformen mit steigender Anzahl der

Doppelbindungen in der Fettsäure zunahm. Während der Anteil am Nebenprodukt der AA-Oxygenierung ca. 8 % betrug, stieg er bereits bei der EPA-Oxygenierung auf 16 % an und betrug ca. 40 % bei der DHA-Oxygenierung (**Tab. 4-Tab. 6**). Unter den 12-lipoxygenierenden ALOX15-Isoformen zeigten die ratALOX15 und pigALOX15 eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität mit DHA als Substrat (n-6/n-9-Verhältnis 0.89 und 0.31), während die macALOX15 und mouALOX15 dominant 14-H(p)DHA synthetisierten. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das Produktmuster der ALOX15-Reaktion sehr von der Säugetierspezies und von der chemischen Struktur der Fettsäure abhängt. Interessanterweise ist diese Beobachtung nicht auf die humALOX15B und humALOX12 zu übertragen. In allen Reaktionsansätzen mit  $\omega$ -3 (EPA, DHA) und  $\omega$ -6 PUFAs (LA, GLA, AA) wiesen diese Lipoxygenase-Isoformen eine ausgeprägte singuläre Positionsspezifität auf.

Die subtil unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten der AA-Oxygenierung durch die humALOX15 (duale Positionsspezifität) und humALOX15B (singuläre Positionsspezifität) können für den zellulären AA-Metabolismus eine wichtige Rolle spielen. Monozyten und Makrophagen, die mit IL-4 behandelt wurden, exprimieren beide Lipoxygenaseparaloga (ALOX15 und ALOX15B). Die Zellen können mithilfe dieser beiden AA 15-lipoxygenierenden Enzyme Arachidonsäure in 15-H(p)ETE umwandeln. Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob dieses Produkt durch die enzymatische Aktivität der ALOX15 oder der ALOX15B entsteht. Auf der Basis unserer Untersuchungen können wir einen Vorschlag machen, wie diese Frage beantwortet werden kann. Wenn man den Zellen DHA anstatt AA als Oxygenierungssubstrat anbieten würde, könnte man aus der Mischung der entstehenden Oxygenierungsprodukte schlussfolgern, welches der beiden Enzyme maßgeblich für die Produktbildung verantwortlich ist. Wenn im Produktmuster dominant 17-H(p)DHA, aber fast kein 14-H(p)DHA vorhanden wäre, spräche dieses Resultat für die katalytische Aktivität der ALOX15B. Wenn die Produktmischung aus ähnlichen Anteilen von 17-H(p)DHA und 14-H(p)DHA bestehen würde, sollte die ALOX15 für die Produktbildung verantwortlich sein. Sollten beide Enzyme an der Produktbildung beteiligt sein, müsste sich ein Produktmuster ergeben, bei dem 14-HDHA zwischen 10-40 % variiert.

Die Positionsspezifitäten von Lipoxygenaseisoformen spielen auch bei der Bildung von Mehrfachoxygenierungsprodukten eine wichtige Rolle. Weil die ALOX15 sowohl 14-H(p)DHA als auch 17-H(p)DHA aus DHA bilden kann, ist sie in der Lage, die Wasserstoffabstraktion an zwei bisallylischen Methylengruppen dieser Fettsäure (n-8 und n-11) zu katalysieren. Im Gegensatz dazu kann die ALOX15B und die ALOX12 die Wasserstoffabstraktion nur an einem bisallylischen Methylene (n-8 bei der ALOX15B und n-11 bei der ALOX12) ausführen. Diese

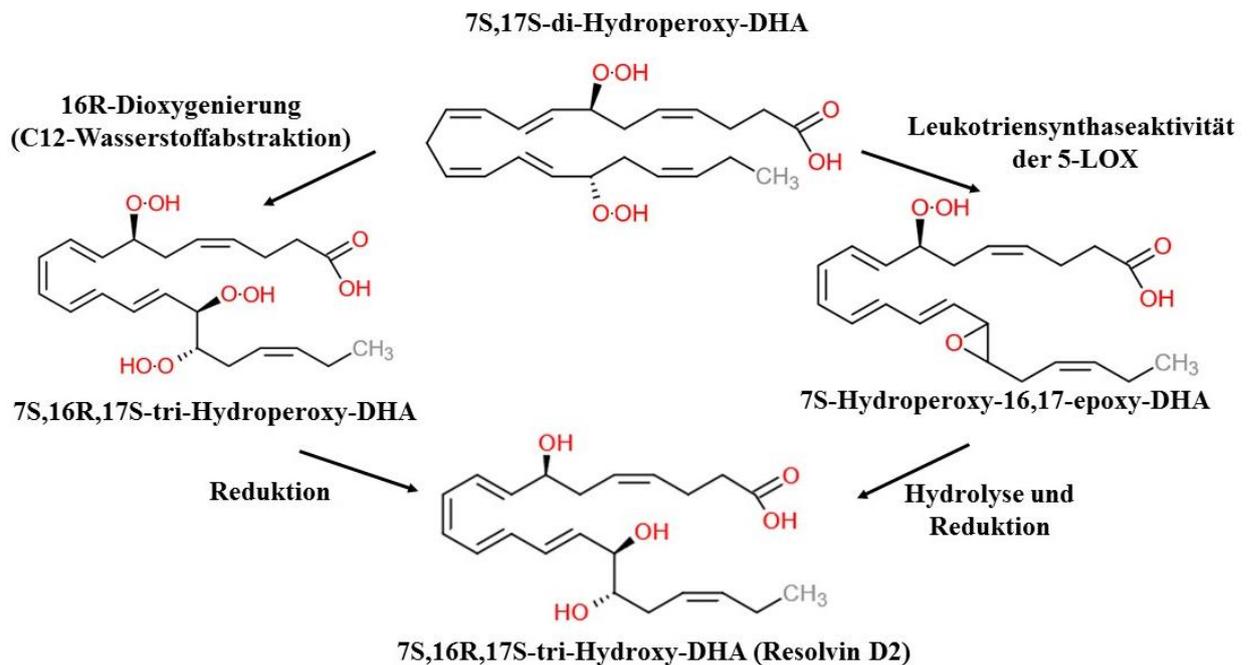
Eigenschaft würde für die Sekundärprodukte bedeuten, dass die ALOX15 im Unterschied zur ALOX12 und ALOX15B imstande ist, ohne Mitwirkung anderer ALOX-Isoformen DHA in Doppeloxygenierungsprodukte umzuwandeln.

Für die Bildung von Tripleoxygenierungsprodukten könnte die ausgeprägte duale Positionsspezifität der ALOX15-Orthologe mit DHA ebenfalls bedeutsam sein. Die Bildung des anti-inflammatorisch wirkenden Resolvins D2 (7S,16R,17S-tri-Hydroxydocosahexensäure) wie auch des anti-inflammatorisch wirkenden AA-Produktes Lipoxin B [222] kann unter Beteiligung zweier Enzymaktivitäten (Dioxygenaseaktivität und Leukotriensynthaseaktivität, **Abb. 4**) erfolgen. Die dreifache separate Dioxygenierung von DHA (Tripleoxygenierungsweg der Resolvinbildung) beinhaltet eine S-Wasserstoffabstraktion vom C-9 (C7-Oxygenierung) und vom C-15 (C17-Oxygenierung) sowie eine R-Wasserstoffabstraktion vom C-12 (C16-Oxygenierung). Alternativ kommt es intermediär nach der C17-Dioxygenierung zur Bildung eines C16-C17-Epoxids, wobei diese Reaktion ebenfalls durch eine Wasserstoffabstraktion vom C12 initiiert wird. Das C16-C17-Epoxid kann anschließend durch enzymatische bzw. nicht-enzymatische Hydrolyse in C16-C17-Diol umgewandelt werden (Epoxidweg der Resolvinsynthese). Zwei mögliche Wege der Biosynthese von Resolvin D2 sind exemplarisch in **Abb. 25** dargestellt. Weil die ALOX15 die Wasserstoffabstraktion an beiden bisallylischen Methylenen (C12 und C15) durchführen kann, könnte sie in der Lage sein, mithilfe der ALOX5, aber ohne Mitwirkung der ALOX12, Resolvin D2 zu bilden. Im Gegensatz dazu sollte es für die ALOX15B und ALOX12, die über eine strenge singuläre Positionsspezifität verfügen, weniger gut möglich sein, Resolvin D2 zusammen mit der ALOX5 zu bilden. Welche Bedeutung der Tripleoxygenierungsweg bei der Resolvin-D2-Bildung *in vivo* spielt, ist aber mittlerweile noch nicht klar. Zur Biosynthese von Resolvin D1 (7S,8R,17R-tri-Hydroxydocosahexensäure) gibt es Hinweise, dass seine Bildung über eine C7-C8- bzw. C16-C17-Epoxidierung erfolgt [223]. Dafür haben Sun et al. 17-H(p)DHA mit polymorphkernigen Neutrophilen, die eine 5-Lipoxygenase exprimieren, inkubiert und die Reaktion mit saurer Methanollösung reduziert. Dabei konnten sie die Entstehung von 8- bzw. 16-Methoxy-7S,17S-diHDHA, die jedoch nicht quantifiziert wurde, nachweisen. Eine alternative Methode zur Unterscheidung der beiden Biosynthesewege von Resolvin D2 wäre die Inkubation der 15-Lipoxygenase mit 7S,17S-diHpDHA unter 18-Sauerstoffatmosphäre mit der nachfolgenden Quantifizierung der Sauerstoffinkorporation [222].

#### **5.2.4. Einfluss mehrerer PUFAs auf die Stereoselektivität der Lipoxygenasen**

Die ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere zeigen in Abhängigkeit von der verwendeten Substratfettsäure eine unterschiedlich ausgeprägte duale Positionsspezifität (**Tab. 4-**

**Tab. 6).** Um diese Ergebnisse zu erhalten, inkubierten wir die rekombinant exprimierten ALOX15-Orthologe separat mit verschiedenen Fettsäuren. Für die Untersuchungen der Substratpräferenzen wurde hingegen eine Fettsäuremischung verwendet, die zu gleichen Teilen aus mehreren PUFAs bestand. In früheren Untersuchungen wurde beschrieben, dass die Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen von den Reaktionsbedingungen abhängt. So konnten für die Sojabohnen-LOX-1 gezeigt werden, dass sich das Produktmuster veränderte, wenn eine Substratfettsäure in Phospholipidmizellen inkorporiert wurde. Freie Linolsäure wurde durch dieses Enzym fast ausschließlich zu 13-HODE oxygeniert und 15-HETE ist das dominante Reaktionsprodukt der AA. Wurden die Substratfettsäuren in Form von Phospholipidmizellen angeboten, wurde hingegen aus AA 5-HETE und aus LA 9-HODE als Hauptprodukte gebildet [224]. Die Stereoselektivität der humALOX5 konnte durch Einführung von Deuterium am Kohlenstoff-7 der Arachidonsäure verändert werden. Statt der C7-Wasserstoffabstraktion kam es bei diesem veränderten Substrat zu einer C10-Wasserstoffabstraktion und dementsprechend zur Bildung von 8-HpETE [159].



**Abb. 25. Zwei mögliche Wege der Biosynthese von Resolvin D2.** Ausgehend von 7S,17S-di-Hydroperoxy-DHA kann die Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms-16 über zwei Wege erfolgen. Die 16R-Dioxygenierung (Tripledioxygenierungsweg der Resolvinsynthese) könnte durch die 15-Lipoxygenase katalysiert werden. Andererseits kann die Leukotriensyntheseaktivität der 5-Lipoxygenase die 16,17-Epoxidierung bewirken. Das Epoxid kann daraufhin enzymatisch oder nicht-enzymatisch in Diol überführt werden.

In unseren Experimenten wollten wir herausfinden, ob die Zusammensetzung der Substratmischung (eine Fettsäure vs. mehrere Fettsäuren) zu einer Veränderung der Reaktionsspezifität verschiedener ALOX-Isoformen führt. Sollte dies der Fall sein, könnten die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zur Reaktionsspezifität von ALOX-Isoformen nicht eins zu eins auf die *in vivo* Situation übertragen werden, da *in vivo* immer mehrere PUFAs gleichzeitig vorhanden sind. Unsere Inkubationen der ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere zeigten jedoch, dass mit einer äquimolaren Fettsäuremischung aus AA, EPA und DHA die gleichen Reaktionsprodukte gebildet wurden, die auch bei den Einzelinkubationen mit den verschiedenen Fettsäuren nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die zusätzlich in der Lösung vorhandenen Fettsäuren sowie ihre Produkte keinen bedeutenden Einfluss auf die Reaktionsspezifität der getesteten Enzyme haben. Verallgemeinernd kann man aus diesen Daten schlussfolgern, dass die Anwesenheit verschiedener Fettsäuren die Reaktionsspezifität mit einer isolierten Fettsäure kaum verändert. Diese Daten sind für die Interpretation von komplexen ALOX-Produktmustern, die unter *in vivo* Bedingungen gebildet werden, bedeutsam.

### **5.3. Quantitative Untersuchungen der Produktmuster humaner Lipoxygenasen**

#### **5.3.1. Produktmuster der humanen Lipoxygenasen mit EPA**

Zu den Hauptprodukten humaner Lipoxygenasen bei der Reaktion mit EPA zählen 5S-HEPE (katalysiert durch humALOX5), 12S-HEPE (humALOX12) und 15S-HEPE (humALOX15 und humALOX15B). Andere Dioxygenierungsprodukte (8-, 11- und 18-HEPE) wurden nur in geringen Mengen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Monooxygenierungsprodukte können auch im Blutplasma und in menschlichen Gewebeextrakten nachgewiesen werden, wobei die Konzentrationen der einzelnen Produktisomere in mittlerem pikomolaren Bereich liegen [225, 226]. Leider existieren nur wenige Untersuchungen zu biologischen Wirkungen dieser EPA-Oxygenierungsprodukte [226-228].

In unseren Experimenten zur EPA-Oxygenierung beobachteten wir eine gravierende „Produktlücke“. Bei der Quantifizierung des Substratverbrauchs (EPA-Schwund) und der Produktbildung (HEPE-Bildung) konnten wir feststellen, dass die Bildung der dominanten Oxygenierungsprodukte (HEPE-Isomere) durch humane ALOX-Paraloge durchschnittlich weniger als 50 % des Substratverbrauchs entsprach. Bei bestimmten ALOX-Paralogen (ALOX5 und ALOX15) war dieser Anteil noch deutlich geringer. Zusätzliche Untersuchungen, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, sollen in der Zukunft klären, worauf diese „Produktlücke“ zurückzuführen ist. Möglich ist u.a., dass die primären ALOX-Produkte

(Hydro(pero)xyfettsäuren), selbst durch verschiedene ALOX-Isoformen nochmals oxygeniert werden und dann als doppeloxygenierte PUFAs in der Reaktionsmischung vorliegen.

Die Bildung von Doppeloxygenierungsprodukten wurde bereits vor fast 30 Jahren für die Sojabohnen-LOX1 bei der Reaktion mit AA untersucht [200, 212]. Van Os et al. bestimmten die kinetischen Parameter der ersten und zweiten Oxygenierungsreaktion und stellten fest, dass die primäre Dioxygenierung (Umwandlung von AA in 15-HpETE) deutlich effizienter als die zweite Dioxygenierung (Umwandlung von 15-HpETE in 5,15- bzw. 8,15-diHpETE) ist. Als mögliche Ursache für diese kinetischen Unterschiede wurden eine Enzyminaktivierung durch Monooxygenierungsprodukte (Peroxidinaktivierung) und veränderte kinetische Konstanten diskutiert. Darüber hinaus könnte die Veränderung der Sauerstoffkonzentration im Reaktionsansatz zur verringerten Effektivität der zweiten Dioxygenierungsreaktion beitragen [200]. Außerdem kann man die Reaktionsgeschwindigkeiten der zweifachen Dioxygenierung durch den pH-Wert der Inkubationslösung modulieren, da bei höheren pH-Werten die doppelte Dioxygenierung fast vollständig erlischt [200, 212]. Dobson et al. konnten bei der Reaktion der Sojabohnen-Lipoxygenase mit EPA zwei Doppeloxygenierungsprodukte 5,15-diHEPE und 8,15-diHEPE nahezu in äquimolaren Mengen nachweisen. 8,15-diHEPE konnte außerdem aus tierischen Zellen isoliert werden [229]. Die biologische Rolle dieser Mehrfachoxygenierungsprodukte wurde noch nicht untersucht. Weil sowohl die Monooxygenierungsprodukte (12- und 18-HEPE) als auch die verschiedenen oxygenierten 18-HEPE-Derivate biologisch aktiv sind, könnte man vermuten, dass die anderen Mehrfachoxygenierungsprodukte (wie zum Beispiel 5,15- oder 8,15-diHEPE) ebenfalls über antiinflammatorische Wirkungen verfügen. Auch wenn ihre Potenz niedriger als die der Resolvine sein sollte, könnten sie durch ihre höheren intrazellulären Konzentrationen die gleiche Gesamtauswirkung auf das Entzündungsgeschehen haben wie Resolvine.

### **5.3.2. Bildung von 18-HEPE durch die humALOX15**

In den letzten Jahren rückten vor allem die Sekundärprodukte humaner Lipoxygenasen, die ausgehend vom EPA-Monooxygenierungsprodukt 18-HEPE gebildet werden, in den Fokus des Interesses [230, 231]. Sowohl 18-HEPE als auch dessen Oxygenierungsprodukte sind biologisch aktiv. 18-HEPE kann zum Beispiel kardiales Remodeling bei Druckbelastung vorbeugen [232]. Resolvine der E-Serie (18-HEPE-Derivate) können bereits in piko- bis nanomolaren Konzentrationen anti-inflammatorische und entzündungsauflösende Wirkungen induzieren [233, 234]. Im Gegensatz zur enzymatischen Biosynthese von Resolvinen der E-Serie ausgehend von 18-HEPE gibt es kaum Experimente zur enzymatischen Herkunft dieses Resolvin-Präkursors.

Serhan et al. berichteten über die Bildung von 18R-HEPE durch die Aspirin-behandelte Cyclooxygenase-2 (COX2) bei ihrer Reaktion mit EPA. Ferner konnte 18-HEPE in Makrophagen nachgewiesen werden [232]. 18-HEPE kann auch durch Vertreter der Cytochrom-P450 (CYP450) Monooxygenasen gebildet werden [235]. Leider wurde in diesen Experimenten die 18-HEPE-Bildung nicht exakt quantifiziert und mit der Bildung anderer ALOX-Produkte verglichen. Zur Bildung der Resolvine der E-Serie ausgehend von ihrem Präkursor 18-HEPE existieren deutlich mehr Daten. Neutrophile Granulozyten können 18-HEPE in Resolvine der E-Serie umwandeln [177]. Weitere Studien zeigten, dass 5- und 15-lipoxygenierende ALOX-Isoformen ausgehend von 18-HEPE Resolvin E1 (5S,12R,18-triHEPE), Resolvin E2 (5S,18-diHEPE) sowie Resolvin E3 (17,18-diHEPE) bilden können [209, 236].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob 18-HEPE auch durch rekombinante ALOX-Isoformen gebildet werden kann. Angesichts der Tatsache, dass die humane ALOX15 über eine ausgeprägte duale Positionsspezifität bei der Reaktion mit EPA verfügt, könnte sie neben 15-HEPE und 12-HEPE auch 18-HEPE als Nebenprodukt bei der Reaktion mit EPA bilden. Tatsächlich haben wir nachweisen können, dass dieses Enzym in der Lage ist, 18-HEPE ausgehend von EPA zu bilden. Die Untersuchung zur Enantiomerzusammensetzung des gebildeten Produktes zeigte, dass 18-HEPE zu über 70 Prozent aus dem S-Enantiomer bestand. Auch wenn die gebildete Produktmenge bezogen auf die Bildung von 15-HEPE nur etwa 1.1 % betrug, könnte die humAALOX15 für die Synthese von 18-HEPE im Menschen relevant sein. Um den Ursprung von 18-HEPE *in vivo* zu bestimmen und dieser der Enzymaktivität entweder der Cyclooxygenase-2 oder Lipoxygenase eindeutig zuzuweisen, könnte man zum Beispiel Makrophagen, die beide Enzyme exprimieren, jeweils mit COX- bzw. LOX-Hemmstoffen inkubieren und den Einfluss der Inhibitoren auf die Konzentration von 18-HEPE untersuchen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Isoformspezifität der meisten derzeit verfügbaren ALOX-Hemmstoffe nicht sehr hoch ist, was die Identifizierung bestimmter ALOX-Isoformen als 18-HEPE-Quellen problematisch gestaltet.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] R.B. Koch, B. Stern, C.G. Ferrari, Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase (s), *Arch Biochem Biophys* 78(1) (1958) 165-79.
- [2] M. Hamberg, B. Samuelsson, Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(9) (1974) 3400-4.
- [3] A.M. Aleem, J. Jankun, J.D. Dignam, M. Walther, H. Kuhn, D.I. Svergun, E. Skrzypczak-Jankun, Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure, *J Mol Biol* 376(1) (2008) 193-209.
- [4] S. Hayward, T. Cilliers, P.J.C.R.i.F.S. Swart, F. Safety, Lipoxygenases: From isolation to application, 16(1) (2017) 199-211.
- [5] M. Peters-Golden, W.R. Henderson, Jr., Leukotrienes, *N Engl J Med* 357(18) (2007) 1841-54.
- [6] M. Colakoglu, S. Tuncer, S. Banerjee, Emerging cellular functions of the lipid metabolizing enzyme 15-Lipoxygenase-1, *Cell Prolif* 51(5) (2018) e12472.
- [7] M.L. Wang, X.J. Huang, S.H. Fang, Y.M. Yuan, W.P. Zhang, Y.B. Lu, Q. Ding, E.Q. Wei, Leukotriene D4 induces brain edema and enhances CysLT2 receptor-mediated aquaporin 4 expression, *Biochem Biophys Res Commun* 350(2) (2006) 399-404.
- [8] R.C. Murphy, S. Hammarstrom, B. Samuelsson, Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9) (1979) 4275-9.
- [9] B.A. Jakschik, T. Harper, R.C. Murphy, The 5-lipoxygenase and leukotriene forming enzymes, *Methods Enzymol* 86 (1982) 30-7.
- [10] J.S. Kelloway, Zafirlukast: the first leukotriene-receptor antagonist approved for the treatment of asthma, *Ann Pharmacother* 31(9) (1997) 1012-21.
- [11] S.E. Wenzel, A.K. Kamada, Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma, *Ann Pharmacother* 30(7-8) (1996) 858-64.
- [12] H. Kuhn, T. Schewe, S.M. Rapoport, The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58 (1986) 273-311.
- [13] L.L. Mazaleuskaya, A. Salamatipour, D. Sarantopoulou, L. Weng, G.A. FitzGerald, I.A. Blair, C. Mesaros, Analysis of HETEs in human whole blood by chiral UHPLC-ECAPCI/HRMS, *J Lipid Res* 59(3) (2018) 564-575.
- [14] J. Hansen, A. Garreta, M. Benincasa, M.C. Fuste, M. Busquets, A. Manresa, Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach, *Appl Microbiol Biotechnol* 97(11) (2013) 4737-47.
- [15] T. Horn, S. Adel, R. Schumann, S. Sur, K.R. Kakularam, A. Polamarasetty, P. Redanna, H. Kuhn, D. Heydeck, Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling, *Prog Lipid Res* 57 (2015) 13-39.
- [16] R. Koljak, O. Boutaud, B.H. Shieh, N. Samel, A.R. Brash, Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein, *Science* 277(5334) (1997) 1994-6.
- [17] C. Schneider, K. Niisuke, W.E. Boeglin, M. Voehler, D.F. Stec, N.A. Porter, A.R. Brash, Enzymatic synthesis of a bicyclobutane fatty acid by a hemoprotein lipoxygenase fusion protein from the cyanobacterium *Anabaena PCC 7120*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(48) (2007) 18941-5.
- [18] J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel, The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase, *Science* 260(5113) (1993) 1482-6.
- [19] S.A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M.F. Browner, The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, *Nat Struct Biol* 4(12) (1997) 1003-9.
- [20] M.L. Oldham, A.R. Brash, M.E. Newcomer, Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality, *J Biol Chem* 280(47) (2005) 39545-52.

- [21] N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, M.T. Waight, D.B. Neau, W.E. Boeglin, A.R. Brash, M.E. Newcomer, The structure of human 5-lipoxygenase, *Science* 331(6014) (2011) 217-9.
- [22] J. Rizo, T.C. Sudhof, C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain, *J Biol Chem* 273(26) (1998) 15879-82.
- [23] G. Mei, A. Di Venere, E. Nicolai, C.B. Angelucci, I. Ivanov, A. Sabatucci, E. Dainese, H. Kuhn, M. Maccarrone, Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability, *Biochemistry* 47(35) (2008) 9234-42.
- [24] A. Wennman, E.H. Oliw, S. Karkehabadi, Crystallization and preliminary crystallographic analysis of manganese lipoxygenase, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70(Pt 4) (2014) 522-5.
- [25] M.E. Newcomer, A.R. Brash, The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis, *Protein Sci* 24(3) (2015) 298-309.
- [26] K. Schwarz, S. Borngraber, M. Anton, H. Kuhn, Probing the substrate alignment at the active site of 15-lipoxygenases by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. Evidence for an inverse substrate orientation, *Biochemistry* 37(44) (1998) 15327-35.
- [27] I. Ivanov, D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V.B. O'Donnell, H. Kuhn, M. Walther, Molecular enzymology of lipoxygenases, *Arch Biochem Biophys* 503(2) (2010) 161-74.
- [28] A.K. Hafner, M. Cernescu, B. Hofmann, M. Ermisch, M. Hornig, J. Metzner, G. Schneider, B. Brutschy, D. Steinhilber, Dimerization of human 5-lipoxygenase, *Biol Chem* 392(12) (2011) 1097-111.
- [29] W. Shang, I. Ivanov, D.I. Svergun, O.Y. Borbulevych, A.M. Aleem, S. Stehling, J. Jankun, H. Kuhn, E. Skrzypczak-Jankun, Probing dimerization and structural flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering, *J Mol Biol* 409(4) (2011) 654-68.
- [30] C.W. Parker, S. Aykent, Calcium stimulation of the 5-lipoxygenase from RBL-1 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 109(3) (1982) 1011-6.
- [31] I. Ivanov, W. Shang, L. Toledo, L. Masgrau, D.I. Svergun, S. Stehling, H. Gomez, A. Di Venere, G. Mei, J.M. Lluch, E. Skrzypczak-Jankun, A. Gonzalez-Lafont, H. Kuhn, Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes?, *Proteins* 80(3) (2012) 703-12.
- [32] C.D. Funk, The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice, *Biochim Biophys Acta* 1304(1) (1996) 65-84.
- [33] I. Ivanov, H. Kuhn, D. Heydeck, Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15), *Gene* 573(1) (2015) 1-32.
- [34] J.N.J.A.r.o.p.b. Siedow, Plant lipoxygenase: structure and function, 42(1) (1991) 145-188.
- [35] D. Shibata, A. Slusarenko, R. Casey, D. Hildebrand, E. Bell, Lipoxygenases, *Plant Molecular Biology Reporter* 12(2) (1994) S41-S42.
- [36] M.R. Egmond, G.A. Veldink, J.F. Vliegthart, J. Boldingh, C-11 H-abstraction from linoleic acid, the rate-limiting step in lipoxygenase catalysis, *Biochem Biophys Res Commun* 54(3) (1973) 1178-84.
- [37] N. Lehnert, E.I. Solomon, Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase, *J Biol Inorg Chem* 8(3) (2003) 294-305.
- [38] G. Coffa, A.N. Imber, B.C. Maguire, G. Laxmikanthan, C. Schneider, B.J. Gaffney, A.R. Brash, On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant, *J Biol Chem* 280(46) (2005) 38756-66.
- [39] M. Hamberg, Stereochemistry of hydrogen removal during oxygenation of linoleic acid by singlet oxygen and synthesis of 11(S)-deuterium-labeled linoleic acid, *Lipids* 46(2) (2011) 201-6.
- [40] A. Andreou, I. Feussner, Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism, *Phytochemistry* 70(13-14) (2009) 1504-10.

- [41] D.B. Neau, N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, W. Boeglin, A.R. Brash, M.E. Newcomer, The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity, *Biochemistry* 48(33) (2009) 7906-15.
- [42] G. Coffa, C. Schneider, A.R. Brash, A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases, *Biochem Biophys Res Commun* 338(1) (2005) 87-92.
- [43] H. Kuhn, H. Sprecher, A.R. Brash, On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme, *J Biol Chem* 265(27) (1990) 16300-5.
- [44] D.L. Sloane, R. Leung, C.S. Craik, E. Sigal, A primary determinant for lipoxygenase positional specificity, *Nature* 354(6349) (1991) 149-52.
- [45] S. Borngräber, R.-J. Kuban, M. Anton, H. Kühn, Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases, *Journal of molecular biology* 264(5) (1996) 1145-1153.
- [46] S. Borngraber, M. Browner, S. Gillmor, C. Gerth, M. Anton, R. Fletterick, H. Kuhn, Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity, *J Biol Chem* 274(52) (1999) 37345-50.
- [47] I. Ivanov, A.B. Golovanov, C. Ferretti, M. Canyelles-Nino, D. Heydeck, S. Stehling, J.M. Lluch, A. Gonzalez-Lafont, H. Kuhn, Mutations of Triad Determinants Changes the Substrate Alignment at the Catalytic Center of Human ALOX5, *ACS Chem Biol* 14(12) (2019) 2768-2782.
- [48] P. Chaitidis, S. Adel, M. Anton, D. Heydeck, H. Kuhn, T. Horn, Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms, *J Lipid Res* 54(5) (2013) 1397-409.
- [49] W.H. Gerwick, M. Moghaddam, M. Hamberg, Oxylin metabolism in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids, *Arch Biochem Biophys* 290(2) (1991) 436-44.
- [50] C. Wasternack, I. Feussner, The Oxylin Pathways: Biochemistry and Function, *Annu Rev Plant Biol* 69 (2018) 363-386.
- [51] G. de Gaetano, M.B. Donati, C. Cerletti, Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors, *Trends Pharmacol Sci* 24(5) (2003) 245-52.
- [52] G. Lambeau, M.H. Gelb, Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2, *Annu Rev Biochem* 77 (2008) 495-520.
- [53] L.X. Zheng, K.X. Li, F.F. Hong, S.L. Yang, Pain and bone damage in rheumatoid arthritis: role of leukotriene B4, *Clin Exp Rheumatol* 37(5) (2019) 872-878.
- [54] T. Wu, C. Xie, J. Han, Y. Ye, J. Weiel, Q. Li, I. Blanco, C. Ahn, N. Olsen, C. Putterman, R. Saxena, C. Mohan, Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus, *PLoS One* 7(6) (2012) e37210.
- [55] A. Mirshafiey, F. Jadidi-Niaragh, Immunopharmacological role of the leukotriene receptor antagonists and inhibitors of leukotrienes generating enzymes in multiple sclerosis, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32(2) (2010) 219-27.
- [56] A.R. Green, C. Freedman, J. Tena, B.E. Tourdot, B. Liu, M. Holinstat, T.R. Holman, 5 S,15 S-Dihydroperoxyeicosatetraenoic Acid (5,15-diHpETE) as a Lipoxin Intermediate: Reactivity and Kinetics with Human Leukocyte 5-Lipoxygenase, Platelet 12-Lipoxygenase, and Reticulocyte 15-Lipoxygenase-1, *Biochemistry* 57(48) (2018) 6726-6734.
- [57] H. Kuhn, R. Wiesner, L. Alder, B.J. Fitzsimmons, J. Rokach, A.R. Brash, Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase via sequential oxygenation of the substrate, *Eur J Biochem* 169(3) (1987) 593-601.
- [58] J. Verhagen, A.A. Bouman, J.F. Vliegthart, J. Boldingh, Conversion of 9-D- and 13-L-hydroperoxylinoleic acids by soybean lipoxygenase-1 under anaerobic conditions, *Biochim Biophys Acta* 486(1) (1976) 114-20.

- [59] M. Arita, C.B. Clish, C.N. Serhan, The contributions of aspirin and microbial oxygenase to the biosynthesis of anti-inflammatory resolvins: novel oxygenase products from omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Biochem Biophys Res Commun* 338(1) (2005) 149-57.
- [60] S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti, N. Chiang, G. Fredman, C.N. Serhan, Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving microRNAs, *Am J Pathol* 180(5) (2012) 2018-27.
- [61] R.G. Snodgrass, B. Brune, Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages, *Front Pharmacol* 10 (2019) 719.
- [62] T. Schewe, W. Halangk, C. Hiebsch, S.M. Rapoport, A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria, *FEBS Lett* 60(1) (1975) 149-52.
- [63] B.H. Maskrey, A. Bermudez-Fajardo, A.H. Morgan, E. Stewart-Jones, V. Dioszeghy, G.W. Taylor, P.R. Baker, B. Coles, M.J. Coffey, H. Kuhn, V.B. O'Donnell, Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase, *J Biol Chem* 282(28) (2007) 20151-63.
- [64] M.E. Greenberg, X.M. Li, B.G. Gugu, X. Gu, J. Qin, R.G. Salomon, S.L. Hazen, The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes, *J Biol Chem* 283(4) (2008) 2385-96.
- [65] H. Kuhn, B.J. Thiele, A. Ostareck-Lederer, H. Stender, H. Suzuki, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, Bacterial expression, purification and partial characterization of recombinant rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase, *Biochim Biophys Acta* 1168(1) (1993) 73-8.
- [66] M.K. Yu, P.J. Moos, P. Cassidy, M. Wade, F.A. Fitzpatrick, Conditional expression of 15-lipoxygenase-1 inhibits the selenoenzyme thioredoxin reductase: modulation of selenoproteins by lipoxygenase enzymes, *J Biol Chem* 279(27) (2004) 28028-35.
- [67] G.H. Kim, J.J. Ryan, S.L. Archer, The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease, *Antioxid Redox Signal* 18(15) (2013) 1920-36.
- [68] H. Kuhn, J. Belkner, H. Suzuki, S. Yamamoto, Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities, *J Lipid Res* 35(10) (1994) 1749-59.
- [69] N. Kozlov, L. Humeniuk, C. Ufer, I. Ivanov, A. Golovanov, S. Stehling, D. Heydeck, H. Kuhn, Functional characterization of novel ALOX15 orthologs representing key steps in mammalian evolution supports the Evolutionary Hypothesis of reaction specificity, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864(3) (2019) 372-385.
- [70] S. Adel, F. Karst, A. Gonzalez-Lafont, M. Pekarova, P. Saura, L. Masgrau, J.M. Lluch, S. Stehling, T. Horn, H. Kuhn, D. Heydeck, Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(30) (2016) E4266-75.
- [71] J.Z. Haeggstrom, C.D. Funk, Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease, *Chem Rev* 111(10) (2011) 5866-98.
- [72] A.W. Ford-Hutchinson, M. Gresser, R.N. Young, 5-Lipoxygenase, *Annu Rev Biochem* 63 (1994) 383-417.
- [73] J. Gerstmeier, M.E. Newcomer, S. Dennhardt, E. Romp, J. Fischer, O. Werz, U. Garscha, 5-Lipoxygenase-activating protein rescues activity of 5-lipoxygenase mutations that delay nuclear membrane association and disrupt product formation, *FASEB J* 30(5) (2016) 1892-900.
- [74] A.R. Brash, W.E. Boeglin, M.S. Chang, Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12) (1997) 6148-52.
- [75] S.J. Wuest, M. Cruet, C. Gemperle, C. Loretz, M. Hersberger, Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages, *Atherosclerosis* 225(1) (2012) 121-7.
- [76] A.R. Green, S. Barbour, T. Horn, J. Carlos, J.A. Raskatov, T.R. Holman, Strict Regiospecificity of Human Epithelial 15-Lipoxygenase-2 Delineates Its Transcellular Synthesis Potential, *Biochemistry* 55(20) (2016) 2832-40.

- [77] L.U. Magnusson, A. Lundqvist, M.N. Karlsson, K. Skalen, M. Levin, O. Wiklund, J. Boren, L.M. Hulten, Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis, *PLoS One* 7(8) (2012) e43142.
- [78] Y. Takahashi, G.R. Reddy, N. Ueda, S. Yamamoto, S. Arase, Arachidonate 12-lipoxygenase of platelet-type in human epidermal cells, *J Biol Chem* 268(22) (1993) 16443-8.
- [79] M. Romano, X.S. Chen, Y. Takahashi, S. Yamamoto, C.D. Funk, C.N. Serhan, Lipoxin synthase activity of human platelet 12-lipoxygenase, *Biochem J* 296 ( Pt 1) (1993) 127-33.
- [80] B. Porro, P. Songia, I. Squellerio, E. Tremoli, V. Cavalca, Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 964 (2014) 26-40.
- [81] D. Sun, M. McDonnell, X.S. Chen, M.M. Lakkis, H. Li, S.N. Isaacs, S.H. Elsea, P.I. Patel, C.D. Funk, Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment, *J Biol Chem* 273(50) (1998) 33540-7.
- [82] Y. Zheng, A.R. Brash, On the role of molecular oxygen in lipoxygenase activation: comparison and contrast of epidermal lipoxygenase-3 with soybean lipoxygenase-1, *J Biol Chem* 285(51) (2010) 39876-87.
- [83] Y. Chawengsub, N.T. Aggarwal, K. Nithipatikom, K.M. Gauthier, S. Anjaiah, B.D. Hammock, J.R. Falck, W.B. Campbell, Identification of 15-hydroxy-11,12-epoxyeicosatrienoic acid as a vasoactive 15-lipoxygenase metabolite in rabbit aorta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(3) (2008) H1348-56.
- [84] R.W. Bryant, T. Schewe, S.M. Rapoport, J.M. Bailey, Leukotriene formation by a purified reticulocyte lipoxygenase enzyme. Conversion of arachidonic acid and 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to 14, 15-leukotriene A<sub>4</sub>, *J Biol Chem* 260(6) (1985) 3548-55.
- [85] P. Falardeau, M. Hamberg, B. Samuelsson, Metabolism of 8,11,14-eicosatrienoic acid in human platelets, *Biochim Biophys Acta* 441(2) (1976) 193-200.
- [86] X.S. Chen, J.R. Sheller, E.N. Johnson, C.D. Funk, Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene, *Nature* 372(6502) (1994) 179-82.
- [87] E.N. Johnson, L.F. Brass, C.D. Funk, Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6) (1998) 3100-5.
- [88] D. Sun, C.D. Funk, 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* 271(39) (1996) 24055-62.
- [89] N. Epp, G. Furstenberger, K. Muller, S. de Juanes, M. Leitges, I. Hausser, F. Thieme, G. Liebisch, G. Schmitz, P. Krieg, 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function, *J Cell Biol* 177(1) (2007) 173-82.
- [90] P. Krieg, S. Rosenberger, S. de Juanes, S. Latzko, J. Hou, A. Dick, U. Kloz, F. van der Hoeven, I. Hausser, I. Esposito, M. Rauh, H. Schneider, Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation, *J Invest Dermatol* 133(1) (2013) 172-80.
- [91] J.T. Huang, J.S. Welch, M. Ricote, C.J. Binder, T.M. Willson, C. Kelly, J.L. Witztum, C.D. Funk, D. Conrad, C.K. Glass, Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase, *Nature* 400(6742) (1999) 378-82.
- [92] H. Kuhn, S. Banthiya, K. van Leyen, Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochim Biophys Acta* 1851(4) (2015) 308-30.
- [93] S. Whitman, M. Gezginci, B.N. Timmermann, T.R. Holman, Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase, *J Med Chem* 45(12) (2002) 2659-61.
- [94] K. Sekiya, H. Okuda, Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein, *Biochem Biophys Res Commun* 105(3) (1982) 1090-5.

- [95] D.K. Luci, J.B. Jameson, 2nd, A. Yasgar, G. Diaz, N. Joshi, A. Kantz, K. Markham, S. Perry, N. Kuhn, J. Yeung, E.H. Kerns, L. Schultz, M. Holinstat, J.L. Nadler, D.A. Taylor-Fishwick, A. Jadhav, A. Simeonov, T.R. Holman, D.J. Maloney, Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-((2-hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)benzenesulfonamide derivatives as potent and selective inhibitors of 12-lipoxygenase, *J Med Chem* 57(2) (2014) 495-506.
- [96] S.M. Rapoport, T. Schewe, R. Wiesner, W. Halangk, P. Ludwig, M. Janicke-Hohne, C. Tannert, C. Hiebsch, D. Klatt, The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte, *Eur J Biochem* 96(3) (1979) 545-61.
- [97] H. Kuhn, A.R. Brash, Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells, *J Biol Chem* 265(3) (1990) 1454-8.
- [98] T. Schewe, 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme, *Biol Chem* 383(3-4) (2002) 365-74.
- [99] S. Rapoport, W. Dubiel, M. Muller, Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of ATP hydrolysis, *FEBS Lett* 180(2) (1985) 249-52.
- [100] R.L. Schweers, J. Zhang, M.S. Randall, M.R. Loyd, W. Li, F.C. Dorsey, M. Kundu, J.T. Opferman, J.L. Cleveland, J.L. Miller, P.A. Ney, NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49) (2007) 19500-5.
- [101] E.D. Rosen, P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, R.M. Mortensen, PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro, *Mol Cell* 4(4) (1999) 611-7.
- [102] L. Nagy, P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, R.M. Evans, Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma, *Cell* 93(2) (1998) 229-40.
- [103] Y.S. Song, D.H. Lee, J.H. Yu, D.K. Oh, J.T. Hong, D.Y. Yoon, Promotion of adipogenesis by 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 123 (2016) 1-8.
- [104] L. Madsen, R.K. Petersen, M.B. Sorensen, C. Jorgensen, P. Hallenborg, L. Pridal, J. Fleckner, E.Z. Amri, P. Krieg, G. Furstenberger, R.K. Berge, K. Kristiansen, Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process, *Biochem J* 375(Pt 3) (2003) 539-49.
- [105] P. Hallenborg, C. Jorgensen, R.K. Petersen, S. Feddersen, P. Araujo, P. Markt, T. Langer, G. Furstenberger, P. Krieg, A. Koppen, E. Kalkhoven, L. Madsen, K. Kristiansen, Epidermis-type lipoxygenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity, *Mol Cell Biol* 30(16) (2010) 4077-91.
- [106] U. Haas, E. Raschperger, M. Hamberg, B. Samuelsson, K. Tryggvason, J.Z. Haeggstrom, Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(51) (2011) 20479-84.
- [107] M. Nishiyama, A. Hoshino, L. Tsai, J.R. Henley, Y. Goshima, M. Tessier-Lavigne, M.M. Poo, K. Hong, Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> channels sets the polarity of nerve growth-cone turning, *Nature* 423(6943) (2003) 990-5.
- [108] A.J. DeCostanzo, I. Voloshyna, Z.B. Rosen, S.J. Feinmark, S.A. Siegelbaum, 12-Lipoxygenase regulates hippocampal long-term potentiation by modulating L-type Ca<sup>2+</sup> channels, *J Neurosci* 30(5) (2010) 1822-31.
- [109] S.J. Feinmark, R. Begum, E. Tsvetkov, I. Goussakov, C.D. Funk, S.A. Siegelbaum, V.Y. Bolshakov, 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses, *J Neurosci* 23(36) (2003) 11427-35.

- [110] S.M. Shalini, C.F. Ho, Y.K. Ng, J.X. Tong, E.S. Ong, D.R. Herr, G.S. Dawe, W.Y. Ong, Distribution of Alox15 in the Rat Brain and Its Role in Prefrontal Cortical Resolvin D1 Formation and Spatial Working Memory, *Mol Neurobiol* 55(2) (2018) 1537-1550.
- [111] G. Richard, Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis, in: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*(R), Seattle (WA), 1993.
- [112] Y. Zheng, H. Yin, W.E. Boeglin, P.M. Elias, D. Crumrine, D.R. Beier, A.R. Brash, 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, *J Biol Chem* 286(27) (2011) 24046-56.
- [113] W.S. Yang, B.R. Stockwell, Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation, *Trends Cell Biol* 26(3) (2016) 165-176.
- [114] K. Schnurr, J. Belkner, F. Ursini, T. Schewe, H. Kuhn, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products, *J Biol Chem* 271(9) (1996) 4653-8.
- [115] A. Seiler, M. Schneider, H. Forster, S. Roth, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Radmark, W. Wurst, G.W. Bornkamm, U. Schweizer, M. Conrad, Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death, *Cell Metab* 8(3) (2008) 237-48.
- [116] V.E. Kagan, G. Mao, F. Qu, J.P. Angeli, S. Doll, C.S. Croix, H.H. Dar, B. Liu, V.A. Tyurin, V.B. Ritov, A.A. Kapralov, A.A. Amoscato, J. Jiang, T. Anthonyuthu, D. Mohammadyani, Q. Yang, B. Proneth, J. Klein-Seetharaman, S. Watkins, I. Bahar, J. Greenberger, R.K. Mallampalli, B.R. Stockwell, Y.Y. Tyurina, M. Conrad, H. Bayir, Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis, *Nat Chem Biol* 13(1) (2017) 81-90.
- [117] M.O. Freire, T.E. Van Dyke, Natural resolution of inflammation, *Periodontol* 2000 63(1) (2013) 149-64.
- [118] R. Mashima, T. Okuyama, The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives, *Redox Biol* 6 (2015) 297-310.
- [119] C.H. Serezani, C. Lewis, S. Jancar, M. Peters-Golden, Leukotriene B4 amplifies NF-kappaB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression, *J Clin Invest* 121(2) (2011) 671-82.
- [120] A.W. Ford-Hutchinson, M.A. Bray, M.V. Doig, M.E. Shipley, M.J. Smith, Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes, *Nature* 286(5770) (1980) 264-5.
- [121] U.P. Kelavkar, N.S. Harya, J. Hutzley, D.J. Bacich, F.A. Monzon, U. Chandran, R. Dhir, D.S. O'Keefe, DNA methylation paradigm shift: 15-lipoxygenase-1 upregulation in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer by atypical promoter hypermethylation, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4) (2007) 185-97.
- [122] A. Orafaie, M.M. Matin, H. Sadeghian, The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment, *Cancer Metastasis Rev* 37(2-3) (2018) 397-408.
- [123] R.K. Singh, R. Tandon, S.G. Dastidar, A. Ray, A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma, *J Asthma* 50(9) (2013) 922-31.
- [124] B. Cobanoglu, E. Toskala, A. Ural, C. Cingi, Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis, *Curr Allergy Asthma Rep* 13(2) (2013) 203-8.
- [125] S.E. Dahlen, P. Hedqvist, S. Hammarstrom, B. Samuelsson, Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi, *Nature* 288(5790) (1980) 484-6.
- [126] E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, J.M. FitzGerald, P. Gibson, K. Ohta, P. O'Byrne, S.E. Pedersen, E. Pizzichini, S.D. Sullivan, S.E. Wenzel, H.J. Zar, Global

strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur Respir J* 31(1) (2008) 143-78.

[127] D. Pratico, V. Zhukareva, Y. Yao, K. Uryu, C.D. Funk, J.A. Lawson, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress, *Am J Pathol* 164(5) (2004) 1655-62.

[128] T.S. Anthonymuthu, E.M. Kenny, H. Bayir, Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury, *Brain Res* 1640(Pt A) (2016) 57-76.

[129] X.H. Ye, Y. Wu, P.P. Guo, J. Wang, S.Y. Yuan, Y. Shang, S.L. Yao, Lipoxin A4 analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion, *Brain Res* 1323 (2010) 174-83.

[130] V.L. Marcheselli, S. Hong, W.J. Lukiw, X.H. Tian, K. Gronert, A. Musto, M. Hardy, J.M. Gimenez, N. Chiang, C.N. Serhan, N.G. Bazan, Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression, *J Biol Chem* 278(44) (2003) 43807-17.

[131] A.C. Araujo, C.E. Wheelock, J.Z. Haeggstrom, The Eicosanoids, Redox-Regulated Lipid Mediators in Immunometabolic Disorders, *Antioxid Redox Signal* 29(3) (2018) 275-296.

[132] A.D. Dobrian, D.C. Lieb, Q. Ma, J.W. Lindsay, B.K. Cole, K. Ma, S.K. Chakrabarti, N.S. Kuhn, S.D. Wohlgemuth, M. Fontana, J.L. Nadler, Differential expression and localization of 12/15 lipoxygenases in adipose tissue in human obese subjects, *Biochem Biophys Res Commun* 403(3-4) (2010) 485-90.

[133] S.J. Persaud, D. Muller, V.D. Belin, I. Kitsou-Mylona, H. Asare-Anane, A. Papadimitriou, C.J. Burns, G.C. Huang, S.A. Amiel, P.M. Jones, The role of arachidonic acid and its metabolites in insulin secretion from human islets of langerhans, *Diabetes* 56(1) (2007) 197-203.

[134] R.R. Nazarewicz, W.J. Zenebe, A. Parihar, M.S. Parihar, M. Vaccaro, C. Rink, C.K. Sen, P. Ghafourifar, 12(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) increases mitochondrial nitric oxide by increasing intramitochondrial calcium, *Arch Biochem Biophys* 468(1) (2007) 114-20.

[135] D. Bleich, S. Chen, B. Zipser, D. Sun, C.D. Funk, J.L. Nadler, Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice, *J Clin Invest* 103(10) (1999) 1431-6.

[136] B.E. Tourdot, M. Holinstat, Targeting 12-Lipoxygenase as a Potential Novel Antiplatelet Therapy, *Trends Pharmacol Sci* 38(11) (2017) 1006-1015.

[137] A. Grechkin, Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway, *Prog Lipid Res* 37(5) (1998) 317-52.

[138] T. Kato, Y. Maeda, T. Hirukawa, T. Namai, N. Yoshioka, Lipoxygenase Activity Increment in Infected Tomato Leaves and Oxidation Product of Linolenic Acid by Its In Vitro Enzyme Reaction, *Biosci Biotechnol Biochem* 56(3) (1992) 373-5.

[139] T. Namai, T. Kato, Y. Yamaguchi, T.J.B. Hirukawa, biotechnology, biochemistry, Anti-rice blast activity and resistance induction of C-18 oxygenated fatty acids, *57(4)* (1993) 611-613.

[140] T. Shimizu, O. Radmark, B. Samuelsson, Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3) (1984) 689-93.

[141] D.E. Sok, M.R. Kim, Enzymatic formation of 9,16-dihydro(pero)xyoctadecatrienoic acid isomers from alpha-linolenic acid, *Arch Biochem Biophys* 277(1) (1990) 86-93.

[142] R.A. Creelman, E. Bell, J.E. Mullet, Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic Acid biosynthesis, *Plant Physiol* 99(3) (1992) 1258-60.

[143] M. Maccarrone, P.G. van Aarle, G.A. Veldink, J.F. Vliegenthart, In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2, *Biochim Biophys Acta* 1190(1) (1994) 164-9.

[144] I. Feussner, C. Wasternack, H. Kindl, H. Kuhn, Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25) (1995) 11849-53.

- [145] H.H. Dar, Y.Y. Tyurina, K. Mikulska-Ruminska, I. Shrivastava, H.C. Ting, V.A. Tyurin, J. Krieger, C.M. St Croix, S. Watkins, E. Bayir, G. Mao, C.R. Armbruster, A. Kapralov, H. Wang, M.R. Parsek, T.S. Anthonymuthu, A.F. Oguniola, B.A. Flitter, C.J. Freedman, J.R. Gaston, T.R. Holman, J.M. Pilewski, J.S. Greenberger, R.K. Mallampalli, Y. Doi, J.S. Lee, I. Bahar, J.M. Bomberger, H. Bayir, V.E. Kagan, *Pseudomonas aeruginosa* utilizes host polyunsaturated phosphatidylethanolamines to trigger theft-ferroptosis in bronchial epithelium, *J Clin Invest* 128(10) (2018) 4639-4653.
- [146] S. Banthiya, J. Kalms, E. Galemou Yoga, I. Ivanov, X. Carpena, M. Hamberg, H. Kuhn, P. Scheerer, Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochim Biophys Acta* 1861(11) (2016) 1681-1692.
- [147] J.D. Deschamps, A.F. Oguniola, J.B. Jameson, 2nd, A. Yasgar, B.A. Flitter, C.J. Freedman, J.A. Melvin, J.V. Nguyen, D.J. Maloney, A. Jadhav, A. Simeonov, J.M. Bomberger, T.R. Holman, Biochemical and Cellular Characterization and Inhibitor Discovery of *Pseudomonas aeruginosa* 15-Lipoxygenase, *Biochemistry* 55(23) (2016) 3329-40.
- [148] M. Aldrovandi, S. Banthiya, S. Meckelmann, Y. Zhou, D. Heydeck, V.B. O'Donnell, H. Kuhn, Specific oxygenation of plasma membrane phospholipids by *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase induces structural and functional alterations in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863(2) (2018) 152-164.
- [149] J.U. An, Y.S. Song, K.R. Kim, Y.J. Ko, D.Y. Yoon, D.K. Oh, Biotransformation of polyunsaturated fatty acids to bioactive hepoxilins and trioxilins by microbial enzymes, *Nat Commun* 9(1) (2018) 128.
- [150] T. Gehring, D. Heydeck, A. Niewianda, K. Janek, H. Kuhn, Do lipoxygenases occur in viruses?: Expression and characterization of a viral lipoxygenase-like protein did not provide evidence for the existence of functional viral lipoxygenases, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 138 (2018) 14-23.
- [151] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- [152] E.G. Blish, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* 37(8) (1959) 911-7.
- [153] H. Kuhn, J. Belkner, R. Wiesner, A.R. Brash, Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase, *J Biol Chem* 265(30) (1990) 18351-61.
- [154] M. Blum, I. Dogan, M. Karber, M. Rothe, W.H. Schunck, Chiral lipidomics of monoepoxy and monohydroxy metabolites derived from long-chain polyunsaturated fatty acids, *J Lipid Res* 60(1) (2019) 135-148.
- [155] H. Porta, M. Rocha-Sosa, Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?, *Microbiology* 147(Pt 12) (2001) 3199-200.
- [156] H. Qian, B. Xia, Y. He, Z. Lu, X. Bie, H. Zhao, C. Zhang, F. Lu, Expression, purification, and characterization of a novel acidic Lipoxygenase from *Myxococcus xanthus*, *Protein Expr Purif* 138 (2017) 13-17.
- [157] J.U. An, S.H. Hong, D.K. Oh, Regiospecificity of a novel bacterial lipoxygenase from *Myxococcus xanthus* for polyunsaturated fatty acids, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1863(8) (2018) 823-833.
- [158] H. Kuhn, J. Barnett, D. Grunberger, P. Baecker, J. Chow, B. Nguyen, H. Bursztyjn-Pettegrew, H. Chan, E. Sigal, Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase, *Biochim Biophys Acta* 1169(1) (1993) 80-9.
- [159] M. Mittal, R.B. Kumar, N. Balagunaseelan, M. Hamberg, C. Jegerschold, O. Radmark, J.Z. Haeggstrom, A. Rinaldo-Matthis, Kinetic investigation of human 5-lipoxygenase with arachidonic acid, *Bioorg Med Chem Lett* 26(15) (2016) 3547-51.
- [160] C. Su, E.H. Oliw, Manganese lipoxygenase. Purification and characterization, *J Biol Chem* 273(21) (1998) 13072-9.

- [161] H.W. Chan, Soya-bean lipoxygenase: an iron-containing dioxygenase, *Biochim Biophys Acta* 327(1) (1973) 32-5.
- [162] A. Andreou, C. Gobel, M. Hamberg, I. Feussner, A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor, *J Biol Chem* 285(19) (2010) 14178-86.
- [163] S. Rapoport, B. Hartel, G. Hausdorf, Methionine sulfoxide formation: the cause of self-inactivation of reticulocyte lipoxygenase, *Eur J Biochem* 139(3) (1984) 573-6.
- [164] L. Kutzner, K. Goloshchapova, D. Heydeck, S. Stehling, H. Kuhn, N.H. Schebb, Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(7) (2017) 666-675.
- [165] P. Ludwig, H.G. Holzhutter, A. Colosimo, M.C. Silvestrini, T. Schewe, S.M. Rapoport, A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes, *Eur J Biochem* 168(2) (1987) 325-37.
- [166] I. Juranek, H. Suzuki, S. Yamamoto, Affinities of various mammalian arachidonate lipoxygenases and cyclooxygenases for molecular oxygen as substrate, *Biochim Biophys Acta* 1436(3) (1999) 509-18.
- [167] J. Kalms, S. Banthiya, E. Galemou Yoga, M. Hamberg, H.G. Holzhutter, H. Kuhn, P. Scheerer, The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase Ala420Gly mutant explains the improved oxygen affinity and the altered reaction specificity, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(5) (2017) 463-473.
- [168] I. Lang, C. Gobel, A. Porzel, I. Heilmann, I. Feussner, A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120, *Biochem J* 410(2) (2008) 347-57.
- [169] J.U. An, D.K. Oh, Stabilization and improved activity of arachidonate 11S-lipoxygenase from proteobacterium *Myxococcus xanthus*, *J Lipid Res* 59(11) (2018) 2153-2163.
- [170] H. Kuhn, L. Humeniuk, N. Kozlov, S. Roigas, S. Adel, D. Heydeck, The evolutionary hypothesis of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs, *Prog Lipid Res* 72 (2018) 55-74.
- [171] E. Sigal, D. Grunberger, E. Highland, C. Gross, R.A. Dixon, C.S. Craik, Expression of cloned human reticulocyte 15-lipoxygenase and immunological evidence that 15-lipoxygenases of different cell types are related, *J Biol Chem* 265(9) (1990) 5113-20.
- [172] X.S. Chen, A.R. Brash, C.D. Funk, Purification and characterization of recombinant histidine-tagged human platelet 12-lipoxygenase expressed in a baculovirus/insect cell system, *Eur J Biochem* 214(3) (1993) 845-52.
- [173] C.D. Funk, H. Gunne, H. Steiner, T. Izumi, B. Samuelsson, Native and mutant 5-lipoxygenase expression in a baculovirus/insect cell system, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8) (1989) 2592-6.
- [174] M. Romano, Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins, *ScientificWorldJournal* 10 (2010) 1048-64.
- [175] M.G. Duvall, B.D. Levy, DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation, *Eur J Pharmacol* 785 (2016) 144-155.
- [176] C.R. Pace-Asciak, Pathophysiology of the hepoxilins, *Biochim Biophys Acta* 1851(4) (2015) 383-96.
- [177] C.N. Serhan, C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, K. Gronert, Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing, *J Exp Med* 192(8) (2000) 1197-204.
- [178] K. Shimahara, Y. Hashizume, Properties of a Lipoxygenase-Like Enzyme Produced by *Pseudomonas-Aeruginosa* Strain a-4, *J Ferment Technol* 51(3) (1973) 183-189.
- [179] G.I. McFadden, Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids, *J Phycol* 37(6) (2001) 951-959.

- [180] A. Garreta, S.P. Val-Moraes, Q. Garcia-Fernandez, M. Busquets, C. Juan, A. Oliver, A. Ortiz, B.J. Gaffney, I. Fita, A. Manresa, X. Carpena, Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *FASEB J* 27(12) (2013) 4811-21.
- [181] J.U. An, B.J. Kim, S.H. Hong, D.K. Oh, Characterization of an omega-6 linoleate lipoxygenase from *Burkholderia thailandensis* and its application in the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid, *Appl Microbiol Biotechnol* 99(13) (2015) 5487-97.
- [182] M.R. Egmond, M. Brunori, P.M. Fasella, The steady-state kinetics of the oxygenation of linoleic acid catalysed by soybean lipoxygenase, *Eur J Biochem* 61(1) (1976) 93-100.
- [183] M. Maccarrone, M.L. Salucci, G. van Zadelhoff, F. Malatesta, G. Veldink, J.F. Vliegthart, A. Finazzi-Agro, Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability, *Biochemistry* 40(23) (2001) 6819-27.
- [184] B. Gao, W.E. Boeglin, A.R. Brash, Omega-3 fatty acids are oxygenated at the n-7 carbon by the lipoxygenase domain of a fusion protein in the cyanobacterium *Acaryochloris marina*, *Biochim Biophys Acta* 1801(1) (2010) 58-63.
- [185] X. Lu, J. Zhang, S. Liu, D. Zhang, Z. Xu, J. Wu, J. Li, G. Du, J. Chen, Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 97(13) (2013) 5793-800.
- [186] H. Porta, M. Rocha-Sosa, Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features, *Plant Physiol* 130(1) (2002) 15-21.
- [187] C.F. Wong, H. Idris, *Pseudomonas Aeruginosa: A Review and Directions for Research*, Nova Science Publishers, Incorporated 2019.
- [188] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, P. Tribedi, Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review, *Arch Microbiol* 198(1) (2016) 1-15.
- [189] L.R. Hoffman, D.A. D'Argenio, M.J. MacCoss, Z. Zhang, R.A. Jones, S.I. Miller, Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation, *Nature* 436(7054) (2005) 1171-5.
- [190] H. Horn, S. Lackner, Modeling of biofilm systems: a review, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 146 (2014) 53-76.
- [191] E. Karatan, P. Watnick, Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms, *Microbiol Mol Biol Rev* 73(2) (2009) 310-47.
- [192] R. Welch, D. Kaiser, Cell behavior in traveling wave patterns of myxobacteria, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26) (2001) 14907-12.
- [193] G.J. Velicer, L. Kroos, R.E. Lenski, Loss of social behaviors by *myxococcus xanthus* during evolution in an unstructured habitat, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21) (1998) 12376-80.
- [194] A.D. Morgan, R.C. MacLean, K.L. Hillesland, G.J. Velicer, Comparative analysis of *myxococcus* predation on soil bacteria, *Appl Environ Microbiol* 76(20) (2010) 6920-7.
- [195] R. Keane, J. Berleman, The predatory life cycle of *Myxococcus xanthus*, *Microbiology* 162(1) (2016) 1-11.
- [196] H. Reichenbach, The ecology of the myxobacteria, *Environ Microbiol* 1(1) (1999) 15-21.
- [197] A. Ryan, C. Godson, Lipoxins: regulators of resolution, *Curr Opin Pharmacol* 10(2) (2010) 166-72.
- [198] C.N. Serhan, N. Chiang, Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution, *Curr Opin Pharmacol* 13(4) (2013) 632-40.
- [199] C.N. Serhan, J. Dalli, R.A. Colas, J.W. Winkler, N. Chiang, Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome, *Biochim Biophys Acta* 1851(4) (2015) 397-413.
- [200] E.P. Dobson, C.J. Barrow, J.A. Kralovec, J.L. Adcock, Controlled formation of mono- and dihydroxy-resolvins from EPA and DHA using soybean 15-lipoxygenase, *Journal of Lipid Research* 54(5) (2013) 1439-1447.

- [201] E. Berra, E. Benizri, A. Ginouves, V. Volmat, D. Roux, J. Pouyssegur, HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia, *EMBO J* 22(16) (2003) 4082-90.
- [202] D.L. Greenway, K.G. Dyke, Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*, *J Gen Microbiol* 115(1) (1979) 233-45.
- [203] M.K. Raychowdhury, R. Goswami, P. Chakrabarti, Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria, *J Appl Bacteriol* 59(2) (1985) 183-8.
- [204] A. Volkov, A. Liavonchanka, O. Kamneva, T. Fiedler, C. Goebel, B. Kreikemeyer, I. Feussner, Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence, *J Biol Chem* 285(14) (2010) 10353-61.
- [205] M.R. Maia, L.C. Chaudhary, L. Figueres, R.J. Wallace, Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen, *Antonie Van Leeuwenhoek* 91(4) (2007) 303-14.
- [206] H. Galbraith, T.B. Miller, A.M. Paton, J.K. Thompson, Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol, *J Appl Bacteriol* 34(4) (1971) 803-13.
- [207] R. Garcia, D. Pistorius, M. Stadler, R. Muller, Fatty acid-related phylogeny of myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 Fatty acids, *J Bacteriol* 193(8) (2011) 1930-42.
- [208] A.T. Wecksler, V. Kenyon, J.D. Deschamps, T.R. Holman, Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation, *Biochemistry* 47(28) (2008) 7364-75.
- [209] Y. Isobe, M. Arita, S. Matsueda, R. Iwamoto, T. Fujihara, H. Nakanishi, R. Taguchi, K. Masuda, K. Sasaki, D. Urabe, M. Inoue, H. Arai, Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid, *J Biol Chem* 287(13) (2012) 10525-34.
- [210] R.W. Bryant, J.M. Bailey, T. Schewe, S.M. Rapoport, Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid, *J Biol Chem* 257(11) (1982) 6050-5.
- [211] H. Kuhn, V.B. O'Donnell, Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases, *Prog Lipid Res* 45(4) (2006) 334-56.
- [212] C.P. Van Os, G.P. Rijke-Schilder, H. Van Halbeek, J. Verhagen, J.F. Vliegthart, Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps, *Biochim Biophys Acta* 663(1) (1981) 177-93.
- [213] R.K. Hughes, D.M. Lawson, A.R. Hornostaj, S.A. Fairhurst, R. Casey, Mutagenesis and modelling of linoleate-binding to pea seed lipoxygenase, *Eur J Biochem* 268(4) (2001) 1030-40.
- [214] R.K. Hughes, S.I. West, A.R. Hornostaj, D.M. Lawson, S.A. Fairhurst, R.O. Sanchez, P. Hough, B.H. Robinson, R. Casey, Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers, *Biochem J* 353(Pt 2) (2001) 345-55.
- [215] P. Araujo, T.T. Nguyen, L. Froyland, J. Wang, J.X. Kang, Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices, *J Chromatogr A* 1212(1-2) (2008) 106-13.
- [216] F.H. Chilton, A.N. Fonteh, M.E. Surette, M. Triggiani, J.D. Winkler, Control of arachidonate levels within inflammatory cells, *Biochim Biophys Acta* 1299(1) (1996) 1-15.
- [217] B.A. Burrall, M. Cheung, A. Chiu, E.J. Goetzl, Enzymatic properties of the 15-lipoxygenase of human cultured keratinocytes, *J Invest Dermatol* 91(4) (1988) 294-7.

- [218] A.R. Brash, Arachidonic acid as a bioactive molecule, *J Clin Invest* 107(11) (2001) 1339-45.
- [219] J.P. Schuchardt, I. Schneider, I. Willenberg, J. Yang, B.D. Hammock, A. Hahn, N.H. Schebb, Increase of EPA-derived hydroxy, epoxy and dihydroxy fatty acid levels in human plasma after a single dose of long-chain omega-3 PUFA, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 109-111 (2014) 23-31.
- [220] J.P. Schuchardt, A.I. Ostermann, L. Stork, L. Kutzner, H. Kohrs, T. Greupner, A. Hahn, N.H. Schebb, Effects of docosahexaenoic acid supplementation on PUFA levels in red blood cells and plasma, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 115 (2016) 12-23.
- [221] K.S. Olsen, L. Aksnes, L. Froyland, E. Lund, C. Rylander, Vitamin D status and PUFA ratios in a national representative cross-section of healthy, middle-aged Norwegian women-the Norwegian Women and Cancer Post-Genome Cohort, *Scand J Public Health* 42(8) (2014) 814-20.
- [222] N. Ueda, C. Yokoyama, S. Yamamoto, B.J. Fitzsimmons, J. Rokach, J.A. Oates, A.R. Brash, Lipoxin synthesis by arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes, *Biochem Biophys Res Commun* 149(3) (1987) 1063-9.
- [223] Y.P. Sun, S.F. Oh, J. Uddin, R. Yang, K. Gotlinger, E. Campbell, S.P. Colgan, N.A. Petasis, C.N. Serhan, Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation, *J Biol Chem* 282(13) (2007) 9323-34.
- [224] G. Began, E. Sudharshan, A.G. Appu Rao, Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles, *Biochemistry* 38(42) (1999) 13920-7.
- [225] J.P. Schuchardt, S. Schmidt, G. Kressel, I. Willenberg, B.D. Hammock, A. Hahn, N.H. Schebb, Modulation of blood oxylipin levels by long-chain omega-3 fatty acid supplementation in hyper- and normolipidemic men, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 90(2-3) (2014) 27-37.
- [226] C. Wang, W. Liu, L. Yao, X. Zhang, X. Zhang, C. Ye, H. Jiang, J. He, Y. Zhu, D. Ai, Hydroxyeicosapentaenoic acids and epoxyeicosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease, *Br J Pharmacol* 174(14) (2017) 2358-2372.
- [227] T. Onodera, A. Fukuhara, J. Shin, T. Hayakawa, M. Otsuki, I. Shimomura, Eicosapentaenoic acid and 5-HEPE enhance macrophage-mediated Treg induction in mice, *Sci Rep* 7(1) (2017) 4560.
- [228] C. von Schacky, A.J. Marcus, L.B. Safier, H.L. Ullman, N. Islam, M.J. Broekman, S. Fischer, Platelet-neutrophil interactions. 12S,20- and 5S,12S-dihydroxyeicosapentaenoic acids: two novel neutrophil metabolites from platelet-derived 12S-hydroxyeicosapentaenoic acid, *J Lipid Res* 31(5) (1990) 801-10.
- [229] E.C. Pope, A.F. Rowley, The heart of *Ciona intestinalis*: eicosanoid-generating capacity and the effects of precursor fatty acids and eicosanoids on heart rate, *J Exp Biol* 205(Pt 11) (2002) 1577-83.
- [230] C.N. Serhan, S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R.L. Moussignac, Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals, *J Exp Med* 196(8) (2002) 1025-37.
- [231] C.N. Serhan, M. Arita, S. Hong, K. Gotlinger, Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers, *Lipids* 39(11) (2004) 1125-32.
- [232] J. Endo, M. Sano, Y. Isobe, K. Fukuda, J.X. Kang, H. Arai, M. Arita, 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling, *J Exp Med* 211(8) (2014) 1673-87.
- [233] S.K. Orr, R.A. Colas, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan, Proresolving actions of a new resolvin D1 analog mimetic qualifies as an immunoresolvent, *Am J Physiol-Lung C* 308(9) (2015) L904-L911.

- [234] R. Menon, P. Krzyszczak, F. Berthiaume, Pro-Resolution Potency of Resolvins D1, D2 and E1 on Neutrophil Migration and in Dermal Wound Healing, *Nano Life* 7(1) (2017).
- [235] Y. Isobe, M. Itagaki, Y. Ito, S. Naoe, K. Kojima, M. Ikeguchi, M. Arita, Comprehensive analysis of the mouse cytochrome P450 family responsible for omega-3 epoxidation of eicosapentaenoic acid, *Sci Rep* 8(1) (2018) 7954.
- [236] E. Tjonahen, S.F. Oh, J. Siegelman, S. Elangovan, K.B. Percarpio, S. Hong, M. Arita, C.N. Serhan, Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis, *Chem Biol* 13(11) (2006) 1193-202.

## **7. Eidesstaatliche Erklärung**

„Ich, Kateryna Goloshchapova, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Reaktionsspezifität ausgewählter pro- und eukaryotischer Lipoxygenasen“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 8. Anteilserklärung

Kateryna Goloshchapova hat folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Kutzner, L., **Goloshchapova, K.**, Heydeck, D., Stehling, S., Kuhn, H., & Schebb, N. H. (2017). Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(7), 666-675.

Beitrag im Einzelnen:

- a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und Planung aller Experimente wurden von K. Goloshchapova, L. Kutzner, N. Schebb und H. Kühn gemeinsam vorgenommen.
- b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: S. Stehling und D. Heydeck klonierten die Lipoxygenaseisoformen und präparierten die rekombinanten Enzyme. Die Experimente zu Inkubationen humaner Lipoxygenasen mit einzelnen Fettsäuren wurden gemeinsam von K. Goloshchapova und H. Kühn durchgeführt. Die Experimente zu Inkubationen humaner Lipoxygenasen mit Fettsäuremischungen sowie die Produktextraktion wurden von K. Goloshchapova vorgenommen. H. Kühn und K. Goloshchapova führten die HPLC-Analysen der Reaktionsprodukte durch. LC/MS-Analysen wurden von L. Kutzner und N. Schebb vorgenommen.
- c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde von H. Kühn und L. Kutzner durchgeführt. An der Überarbeitung des Manuskripts hatten alle Koautoren Anteil.

**Goloshchapova, K.**, Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., & Kuhn, H. (2018). Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. *MicrobiologyOpen*, e775.

Beitrag im Einzelnen:

- a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption aller Experimente wurde in Zusammenarbeit von K. Goloshchapova, H. Kühn und D. Heydeck durchgeführt. Zum größten Teil wurden die Experimente von K. Goloshchapova geplant.
- b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Der Großteil der Experimente zur Expression der Lipoxygenase aus *Myxococcus fulvus* im bakteriellen Expressionssystem sowie zu anschließender Charakterisierung dieser Lipoxygenaseisoform anhand ihrer proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften wurde vom K. Goloshchapova unter

methodischer Anleitung von D. Heydeck und S. Stehling durchgeführt. Die Enzymexpression im Insektenzellsystem wurde von S. Stehling vorgenommen. M. Blum führte die Chiralphasenanalytik durch.

- c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde von H. Kühn vorgenommen. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren Anteil. Außerdem nahm K. Goloshchapova an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Kutzner L., **Goloshchapova K.**, Jübermann M., Blum M., Rothe M., Kirsch S.F., Schunck W.H., Kühn H. & Schebb N.H. Human lipoxygenases form a complex pattern of di- and tri-oxygenated compound from EPA. (in preparation)

Beitrag im Einzelnen:

- a) Konzeption und Planung der Arbeiten: L. Kutzner, K. Goloshchapova, H. Kühn, N. Schebb und W. Schunck waren an der Konzeption und Planung der Arbeiten beteiligt.
- b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: K. Goloshchapova und H. Kühn führten die Inkubationen von EPA mit den verschiedenen rekombinanten ALOX-Isoformen durch. L. Kutzner, N. Schebb, M. Rothe, M. Jübermann, M. Blum, S. Kirsch und W. Schunck waren an der Produktanalytik und der Auswertung der experimentellen Daten beteiligt.
- c) Schreiben der Publikation: L. Kutzner gestaltete den ersten Publikationsentwurf und alle Koautoren wirken beim Schreiben des endgültigen Manuskripts mit.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Publikationsliste

- 1) Kutzner, L., **Goloshchapova, K.**, Heydeck, D., Stehling, S., Kuhn, H., & Schebb, N. H. (2017). Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(7), 666-675.
- 2) **Goloshchapova, K.**, Stehling, S., Heydeck, D., Blum, M., & Kuhn, H. (2018). Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. *MicrobiologyOpen*, e775.
- 3) Kutzner, L., **Goloshchapova, K.**, Rund, K. M., Jübermann, M., Blum, M., Rothe, M., Kirsch, S. F., Schunck, W. H., Kühn, H., & Schebb, N. H. (2020). Human lipoxygenase isoforms form complex patterns of double and triple oxygenated compounds from eicosapentaenoic acid. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1865(12), 158806.

## **11. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir den erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zuerst gebührt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn, der meine Promotionsarbeit als mein Doktorvater betreut hat. Für seine unaufhörliche Unterstützung und Ideengebung, die meine Auseinandersetzung mit dem Promotionsthema förderten, möchte ich mich herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Dagmar Heydeck und Frau Sabine Stehling für die intensive Einarbeitung in die experimentellen Methoden sowie kontinuierliche Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente bedanken. Sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Außerdem bedanke ich mich bei der ehemaligen Mitarbeiterin Frau Dr. Marbach-Breitrück, die immer die erste Anlaufstelle für meine Fragen war. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Nils Schebb und Laura Kutzner für die wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken.