

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

DISSERTATION

Rekombinante Expression von Säugetierlipoxygenasen und
ortsgerichtete Mutagenese der Sequenzdeterminante für die
Reaktionsspezifität

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Vogel

aus Neuruppin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn
 2. Prof. Dr. Ivo Feußner
 3. Prof. Dr. Claus Wasternack

Datum der Promotion: 07. September 2012

**Meinen Eltern
und Großeltern**

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1. Allgemeine Darstellung der Lipoxygenasen | 1 |
| 1.1.1. Funktionsweise der Lipoxygenasen | 2 |
| 1.1.1.1. Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen | 2 |
| 1.1.2. Vorkommen und Nomenklatur | 4 |
| 1.1.3. Biologische Bedeutung der Lipoxygenasen..... | 5 |
| 1.1.3.1. Entzündung und Asthma bronchiale | 5 |
| 1.1.3.2. Atherosklerose | 7 |
| 1.1.3.3. Kanzerogenese | 8 |
| 1.1.3.4. Weitere Funktionen..... | 9 |
| 1.2. Struktur der Lipoxygenasen | 9 |
| 1.2.1. Kristall- und Primärstruktur von Lipoxygenasen..... | 9 |
| 1.2.2. Die N-terminale Domäne von Lipoxygenasen..... | 10 |
| 1.2.3. Die C-terminale Domäne von Lipoxygenasen..... | 11 |
| 1.2.4. Substratbindungstasche | 12 |
| 1.2.5. Strukturelle Grundlagen der Reaktionsspezifität | 13 |
| 1.2.6. Ursachen für die Stereoselektivität | 16 |
| 1.3. Ziel der Arbeit | 18 |
| 2. MATERIALIEN UND METHODEN | 19 |
| 2.1. Materialien..... | 19 |
| 2.1.1. Chemikalien und Biochemikalien | 19 |
| 2.1.2. Nährmedien, Puffer und Lösungen | 19 |
| 2.1.3. Enzyme und Kits | 20 |
| 2.1.4. Plasmide und Oligonukleotide | 20 |
| 2.1.5. Bakterienstämme..... | 21 |
| 2.2. Molekularbiologische Methoden | 22 |
| 2.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese..... | 22 |
| 2.3. Expression der rekombinanten Lipoxygenase | 22 |
| 2.3.1. Ligation der Primaten-12/15-Lipoxygenase-cDNA in pQE-9..... | 23 |
| 2.3.2. Transformation des Primaten-12/15-LOX-pQE9-Plasmids..... | 24 |
| 2.3.3. Expression des Enzyms..... | 24 |
| 2.3.4. Reinigung der (His) ₆ -LOX über Nickel-TED | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.5. Weitere Reinigung der (His) ₆ -LOX über Resource Q-Säule | 26 |
| 2.4. Analytische Methoden..... | 26 |
| 2.4.1. Messung der Lipoxygenaseaktivität..... | 26 |
| 2.4.1.1. Photometrischer Aktivitätsassay | 26 |
| 2.4.1.2. HPLC-Aktivitätsassay | 27 |
| 2.4.2. Produktanalyse | 27 |
| 2.4.2.1. Umkehrphasen-HPLC | 27 |
| 2.4.2.2. Normalphasen-HPLC | 27 |
| 2.4.2.3. Chiralphasen-HPLC | 29 |
| 2.4.3. Proteinbestimmung..... | 29 |
| 2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 29 |
| 2.4.5. Western Blot..... | 29 |
| 2.4.6. Quantifizierung der Proteinexpression..... | 30 |
| 2.5. Untersuchungen der Membranbindungseigenschaften von LOXn..... | 30 |
| 2.5.1. Trunkation der N-terminalen Domäne der LOX..... | 30 |
| 2.5.2. Membranbindungsassay | 31 |
| 2.6. Statistische Auswertung..... | 31 |
| 3. ERGEBNISSE..... | 32 |
| 3.1. Expression und Charakterisierung von Primaten-12/15-LOXn..... | 32 |
| 3.1.1. Expression der 12/15-LOX von <i>Pongo pygmaeus</i> | 33 |
| 3.1.2. Expression der 12/15-LOX von <i>Macaca mulatta</i> | 33 |
| 3.2. Ortsgerichtete Mutagenese und Einfluss auf die Reaktionsspezifität..... | 34 |
| 3.2.1. Mutagenese der 12/15-LOX von <i>Pongo pygmaeus</i> | 35 |
| 3.2.1.1. Untersuchungen von Einzelmutationen | 35 |
| 3.2.1.2. Untersuchungen von Doppelmutationen..... | 36 |
| 3.2.1.3. Untersuchungen von Trippelmutationen..... | 37 |
| 3.2.2. Mutagenese der 12/15-LOX von <i>Macaca mulatta</i> | 38 |
| 3.3. Einfluss von A-zu-G-Mutationen auf die Reaktionsspezifität..... | 42 |
| 3.3.1. A-zu-G-Mutation der 12/15-LOX von <i>Pongo pygmaeus</i> | 42 |
| 3.3.2. A-zu-G-Mutation der 12/15-LOX von <i>Macaca mulatta</i> | 42 |
| 3.4. Trunkationsexperimente und Membranbindungsstudien | 43 |
| 3.4.1. Einfluss der Deletion der N-terminalen Domäne auf die katalytische Aktivität..... | 45 |
| 3.4.2. Einfluss der Deletion der N-terminalen Domäne auf die Membranbindung | 46 |
| 4. DISKUSSION | 50 |
| 4.1. Raumstruktur von Lipoxygenasen | 51 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.2. | Stärken und Schwächen des Triadenkonzeptes | 52 |
| 4.3. | Ursachen der Stereoselektivität | 57 |
| 4.4. | Die Bedeutung der N-terminalen Domäne..... | 60 |
| 4.5. | Evolutionäre Aspekte..... | 62 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG..... | 65 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 66 |

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| Å | Ångström – Längeneinheit (1 Å = 100 pm = 10 ⁻¹⁰ m) |
| bp | „base pairs“ – Basenpaare |
| BSA | „bovine serum albumin“ – Rinderserumalbumin |
| C | Kohlenstoffatom |
| cDNA | „complementary DNA“ – zur mRNA komplementäre DNA |
| CP-HPLC | „chiral phase-HPLC“ – Chiralphasen-HPLC |
| DNA | „desoxiribonucleic acid“ – Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphat-Set |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | „ethylenediaminetetraacetic acid“ – Ethylendiamintetraessigsäure |
| EKRM | EDTA High Salt stripped Rough Microsomes |
| FPLC | „fast protein liquid chromatography“ – Proteinflüssigkeitschromatographie |
| 5-HETE | 5-Hydroxy-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 8-HETE | 8-Hydroxy-5 <i>Z</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 12-HETE | 12-Hydroxy-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 15-HETE | 15-Hydroxy-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -eicosatetraensäure |
| 5-HPETE | 5-Hydroperoxy-6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 8-HPETE | 8-Hydroperoxy-5 <i>Z</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 12-HPETE | 12-Hydroperoxy-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraensäure |
| 15-HPETE | 15-Hydroperoxy-5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,13 <i>E</i> -eicosatetraensäure |
| HDL | „high density lipoprotein“ – Lipoprotein hoher Dichte |
| HPLC | „high performance liquid chromatography“ – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| 13-HPODE | 13-Hydroperoxy-9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> -octadecadiensäure |
| IPTG | Isopropyl-β-thiogalactopyranosid |
| kDa | Kilodalton – atomare Masseneinheit (1 kDa = 1000 Da) |
| LB _{Amp} | Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin |
| LDL | „low density lipoprotein“ – Lipoprotein niedriger Dichte |
| LOX | Lipoxygenase |
| LT | Leukotrien |
| LX | Lipoxin |

| | |
|--------------------|--|
| <i>M. mulatta</i> | <i>Macaca mulatta</i> |
| MG | Molekulargewicht |
| mRNA | „messenger RNA“ – Boten-RNA |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | „phosphate buffered saline“ – Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | „polymerase chain reaction“ – Polymerasekettenreaktion |
| RNA | „ribonucleic acid“ – Ribonukleinsäure |
| <i>P. pygmaeus</i> | <i>Pongo pygmaeus</i> |
| RP-HPLC | „reverse phase-HPLC“ – Umkehrphasen-HPLC |
| rpm | „rounds per minute“ – Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SMP | submitochondriale Partikel |
| SP-HPLC | „straight phase-HPLC“ – Normalphasen-HPLC |
| TAE | Tris/Acetat/EDTA |
| TED | Triscarboxymethylethylendiamin |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Darstellung der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind Enzyme, die in der Lage sind, ungesättigte Fettsäuren unter Einbau molekularen Sauerstoffs zu oxygenieren. Sie sind in vielen verschiedenen Organismen verbreitet, so in Pflanzen (Liavonchanka und Feussner 2006; Andreou und Feussner 2009), Säugetieren (Brash 1999), einigen Meeresorganismen (Bundy 1985; Hawkins und Brash 1987) oder auch in Bakterien (Porta und Rocha-Sosa 2001). In Hefegenomen wurden bisher keine LOX-Sequenzen nachgewiesen. Viele verschiedene biologische Prozesse werden durch LOXn reguliert. So nehmen sie zum Beispiel Einfluss auf Progression und Wachstum von Karzinomen (Ding *et al.* 2003a), sind aber auch in der Lage, die Tumorgenese zu unterdrücken (Bhattacharya *et al.* 2009). 5-LOXn bilden Produkte, die als „slow-reacting substances of anaphylaxis“ bezeichnet werden und durch ihre spasmogene Wirkung maßgeblich an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind (McMillan 2001). Des Weiteren werden sie mit der Entstehung der Atherosklerose in Verbindung gebracht (Mehrabian und Allayee 2003). Es gibt aber auch Berichte über atheroprotektive Wirkungen von LOXn (Wittwer und Hersberger 2007). Ähnliche gegenteilige Effekte wurden auch für die Pathogenese der Entzündungsreaktion beschrieben, wo LOXn sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen haben (Kühn und O'Donnell 2006). In den letzten Jahren gab es diverse Überlegungen, wie durch Synthesehemmung der durch Lipoxygenasen gebildeten Leukotriene verschiedene Krankheitsbilder beeinflusst werden können (Haeggstrom *et al.* 2010). Auch konnten Medikamente entwickelt werden, die beispielsweise die 5-LOX spezifisch hemmen und somit die Symptomatik bei Patienten mit Asthma bronchiale verbessern (Berger *et al.* 2007).

Trotz der medizinischen Bedeutung verschiedener LOX-Isoformen ist die genaue Funktionsweise der Enzyme noch nicht völlig aufgeklärt. Ein Grund dafür ist das Fehlen von Daten zur Raumstruktur verschiedener LOX-Isoformen, wodurch man Rückschlüsse auf die Enzym-Substrat-Interaktion schließen kann. Dies wäre auch unter phylogenetischen Gesichtspunkten interessant, da dadurch evolutionäre Zusammenhänge geschlossen werden können. Für dieses Verständnis ist es daher wichtig, Modelle zu entwickeln, welche die Reaktionsspezifität der Lipoxygenasen beschreibbar machen. Einer dieser Erklärungsansätze ist das „Triadenkonzept“ (Borngräber *et al.* 1999).

1.1.1. Funktionsweise der Lipoxygenasen

1.1.1.1. Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind Dioxygenasen, die die stereospezifische Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Für diese Reaktion tragen sie ein nicht Häm-gebundenes Eisen im aktiven Zentrum (Brash 1999; Ivanov *et al.* 2010). Die Oxygenierung durch Lipoxygenasen besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: der Wasserstoffabstraktion, der Radikalumlagerung, der Sauerstoffinsertion und der Reduktion des Peroxyradikals (Abb. 1.1.). Bevor diese Schritte ablaufen können, muss das Enzym durch die Oxidation des Eisens in die Form eines Fe(III) aktiviert werden. Dies geschieht u. a. durch Hydroperoxyfettsäuren, was als Autokatalyse bezeichnet wird (Yamamoto 1989).

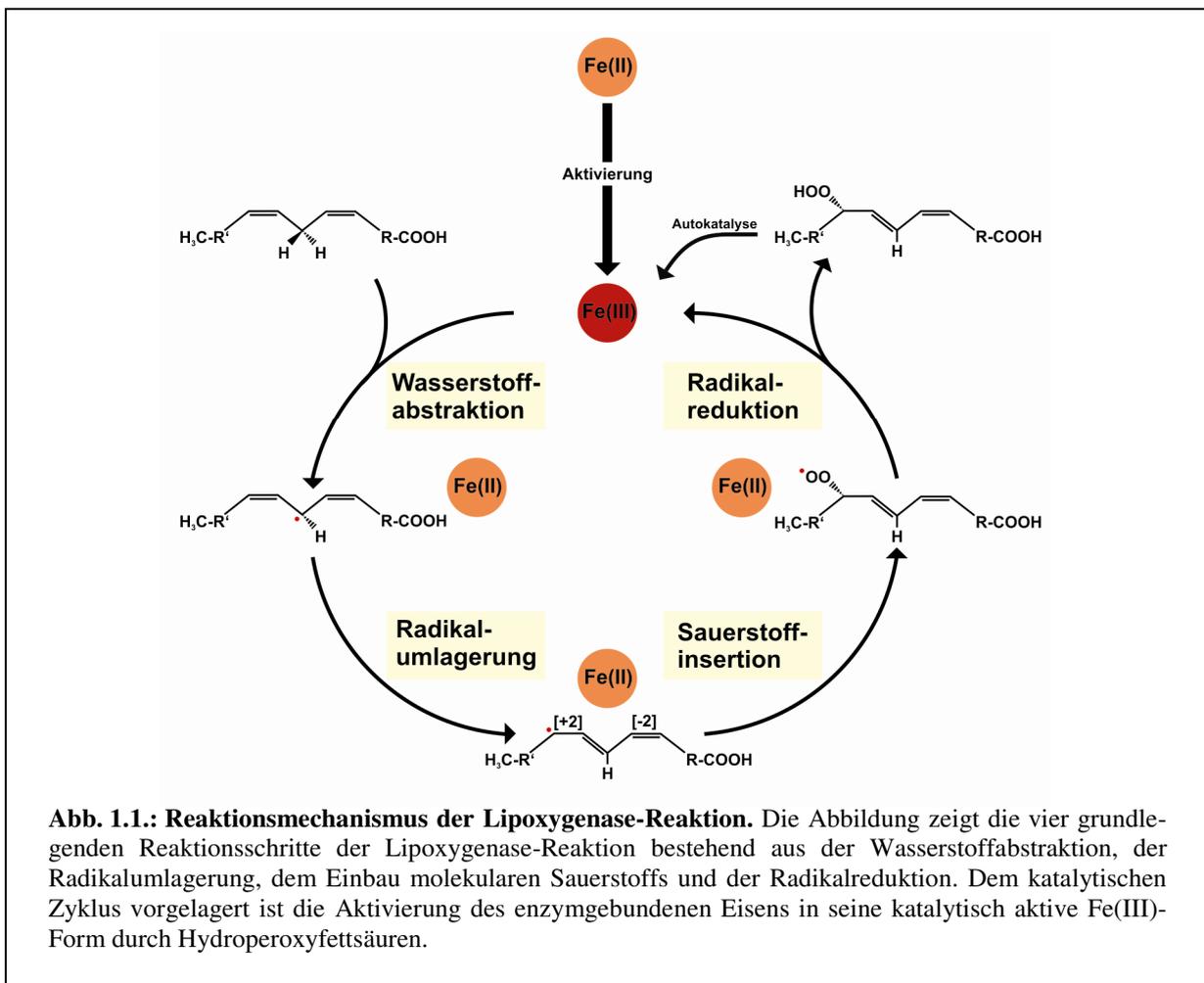


Abb. 1.1.: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenase-Reaktion. Die Abbildung zeigt die vier grundlegenden Reaktionsschritte der Lipoxygenase-Reaktion bestehend aus der Wasserstoffabstraktion, der Radikalumlagerung, dem Einbau molekularen Sauerstoffs und der Radikalreduktion. Dem katalytischen Zyklus vorgelagert ist die Aktivierung des enzymgebundenen Eisens in seine katalytisch aktive Fe(III)-Form durch Hydroperoxyfettsäuren.

Wasserstoffabstraktion

Die Wasserstoffabstraktion erfolgt von einer doppelallylständigen Methylengruppe des Substrats. Ist dies Arachidonsäure, so stehen dafür drei pro-chirale Kohlenstoffatome zur Verfügung (am C7, C10 und C13). Das Wasserstoffatom wird dabei regio- und stereospezifisch abstrahiert. Die Lage des Substrats in der Bindungstasche des Enzyms bestimmt dabei die Struktur des gebildeten Produktes. Die Wasserstoffabstraktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Lipoxygenasekatalyse, was sowohl für die Sojabohnen-LOX-1 (Glickman und Klinman 1995), als auch für die humane 12/15-LOX (Wecksler *et al.* 2009) gezeigt werden konnte. Das Wasserstoffatom wird als Proton und als Elektron abstrahiert, wobei das frei werdende Elektron das Enzymeisen in seine Fe(II)-Form reduziert.

Radikalumlagerung

Im zweiten Schritt des Reaktionszyklus erfolgt die Umlagerung des radikalischen Elektrons. Dies geschieht entweder in Richtung der Methylgruppe [+2], oder in Richtung der Carboxylgruppe [-2] des Substrats, d. h. der Gipfel der Elektronendichte wandert jeweils 2 C-Atome von der doppelallylständigen Methylengruppe weiter (Ivanov *et al.* 2010). Diese Verschiebung erfolgt bei den meisten LOXn nur in eine Richtung. Es ist aber bisher noch ungeklärt, wodurch die Verschiebung kontrolliert wird. Nach der Umlagerung entsteht, unabhängig von der Richtung der Verschiebung, ein konjugiertes Dien mit einem Lichtabsorptionsmaximum bei 235 nm.

Sauerstoffinsertion

Die Insertion von molekularem Sauerstoff erfolgt ebenfalls stereospezifisch. Dies geschieht antarafacial, d. h. von jener Seite der Doppelbindungsebene, die der Wasserstoffabstraktion gegenüberliegt. Wie der Sauerstoff in die Nähe des aktiven Zentrums gelangt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Dafür werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben: i) separater Sauerstofftunnel, ii) Sauerstoffbindungstasche, iii) Stabilisierung des Fettsäureradikals in einer bestimmten Konformation. Eine Kombination der unterschiedlichen Möglichkeiten kann dabei nicht ausgeschlossen werden (Schneider *et al.* 2007).

Reduktion des Peroxyradikals

Das durch die Sauerstoffinsertion entstandene Peroxyradikal wird im letzten Schritt der Katalyse durch ein Elektron vom Eisen reduziert. Das Eisen selbst wird dabei in seine Fe(III)-Form oxidiert und steht somit einem neuen Katalysezyklus zur Verfügung. Durch die Aufnahme

eines Protons entsteht aus dem zwischenzeitlich gebildeten Peroxydanion eine Hydroperoxyfettsäure, welche das Endprodukt der Lipoxygenasereaktion darstellt.

1.1.2. Vorkommen und Nomenklatur

Die Verbreitung der Lipoxygenase erstreckt sich über eine große Anzahl von Spezies. Die erste LOX wurden in den 1930er Jahren in Sojabohnen entdeckt (Andre und Hou 1932). Einige Jahre später konnte dieses Enzym isoliert und charakterisiert werden (Theorell *et al.* 1947). Knapp 30 Jahre später konnten die ersten tierischen Lipoxygenasen in menschlichen Thrombozyten und Kaninchenretikulozyten nachgewiesen werden (Hamberg und Samuelsson 1974; Schewe *et al.* 1975). Über die nächsten Jahrzehnte wurden in vielen weiteren Pflanzenarten Lipoxygenasen entdeckt (Liavonchanka und Feussner 2006; Andreou und Feussner 2009). Aber auch in verschiedenen Tierarten und Geweben konnten Lipoxygenasen nachgewiesen werden. So wurde beispielsweise die Expression im Lungen- und Trachealgewebe von Mensch und Rind beschrieben (Hansbrough *et al.* 1990; Shannon *et al.* 1991), aber auch der Nachweis in polymorphkernigen und eosinophilen Leukozyten erbracht (Soberman *et al.* 1985; Sigal *et al.* 1988). Auch in Bakterien (Porta und Rocha-Sosa 2001) und Pilzen (Oliw 2002) konnten Enzyme als Lipoxygenase identifiziert werden. Allerdings besteht ein generelles Problem bei der Benennung der Lipoxygenasen. Tierische Lipoxygenasen werden bezüglich ihrer Positionsspezifität der Arachidonsäureoxidation als 5-LOX, 8-LOX, 11-LOX, 12-LOX oder 15-LOX eingeteilt. Dies ist allerdings bei nicht tierischen Lipoxygenasen ungünstig, da diese oft ein anderes Substrat, z. B. Linolsäure, verwenden, wodurch Veränderungen in der Positionsspezifität entstehen. Pflanzliche Lipoxygenasen werden hingegen nach der Pflanze ihrer Entdeckung benannt und die Sojabohnen-Lipoxygenasen L-1, L-2 und L-3 wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert. Des Weiteren findet man oft mehr als eine Lipoxygenase in derselben Spezies. Somit werden Lipoxygenasen, welche die gleiche Positionsspezifität besitzen, zusätzlich bezüglich des Gewebes, in welchem sie entdeckt wurden, benannt (z. B. Plättchen-Typ 12-LOX, Leukozyten-Typ 12-LOX, Epidermis-Typ 12-LOX, etc.) (Yamamoto *et al.* 1997). Weiterhin ist eine Klassifizierung nach der Stereospezifität der Oxygenierungsprodukte sinnvoll (z. B. 12S-LOX oder 12R-LOX). Die steigende Anzahl an neu sequenzierten Genomen hilft dabei, weitere Lipoxygenasen zu identifizieren. Allerdings wird die Benennung dadurch behindert, dass Sequenzen mit hohem Homologiegrad nicht zwangsläufig dieselbe Positionsspezifität besitzen und eine funktionsbasierte Nomenklatur aus der Primärstruktur schwer ableitbar ist. Daher ist es wichtig, durch die Expression von LOX-Genen die Positionsspezifität zu klären, um daraus

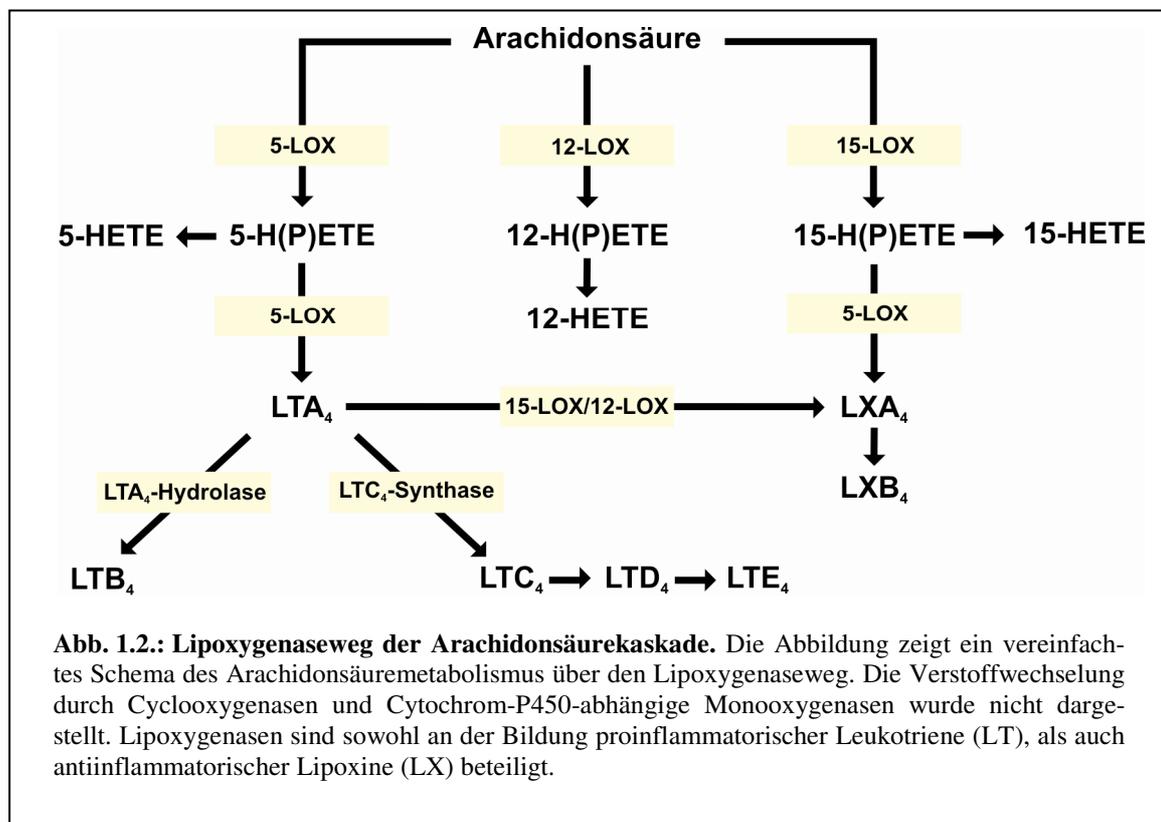
Rückschlüsse auf Determinanten der Primärsequenz schließen zu können. Dies könnte zur Entwicklung einer sequenzbasierten Nomenklatur beitragen.

1.1.3. Biologische Bedeutung der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen greifen in den Organismen, in denen sie vorkommen, in viele verschiedene biologische Prozesse ein. Im Folgenden soll speziell die Bedeutung der tierischen Lipoxygenasen betrachtet und die wichtigsten physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgänge beleuchtet werden. Für die biologische Bedeutung der pflanzlichen Lipoxygenasen wird auf einige Übersichtsartikel verwiesen (Feussner und Wasternack 2002; Porta und Rocha-Sosa 2002; Hu *et al.* 2009).

1.1.3.1. Entzündung und Asthma bronchiale

Lipoxygenasen sind entscheidend in das Gleichgewicht zwischen Entstehung und Heilung entzündlicher Prozesse eingebunden. Um zu verstehen, auf welche Art und Weise Lipoxygenasen wirken, muss man die aus ihnen entstehenden Metaboliten und die von ihnen ausgelösten Signalkaskaden betrachten (Abb. 1.2.).



5-Lipoxygenasen bilden aus Arachidonsäure 5-H(P)ETE, welches über die Leukotrien-A₄-Synthaseaktivität des Enzyms in das Intermediat Leukotrien A₄ umgewandelt wird (Rouzer *et al.* 1986). LTA₄ ist Vorstufe für eine Reihe weiterer Leukotriene (Funk 2001). Die Umwandlung der Arachidonsäure durch 12-LOXn und 15-LOXn führt zur Bildung von 12-H(P)ETE bzw. 15-H(P)ETE. Glutathionperoxidasen reduzieren anschließend die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren in ihre Hydroxyverbindungen (Kühn und Borchert 2002), die ebenfalls biologische Wirkungen entfalten können. Durch die Katalyse der 12/15-LOX kann das Zwischenprodukt 14,15-LTA₄ in das antiinflammatorisch wirkende Lipoxin A₄ umgewandelt werden (Levy *et al.* 2001), was auch durch die Thrombozyten-12-LOX möglich ist (Serhan 2005; Ryan und Godson 2010). Die über den 5-LOX-Signalweg entstandenen Leukotriene bilden eine Gruppe von proinflammatorischen Stoffen, die auch als „slow-reacting substances of anaphylaxis“ bezeichnet werden (Samuelsson 1983). Cysteinylleukotriene spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Asthmas (Duroudier *et al.* 2009). Sie bewirken eine Konstriktion der glatten Muskulatur (Drazen 1988) und erhöhen die Gefäßpermeabilität durch Relaxation vaskulärer Muskelzellen (Walch *et al.* 2000). Weiterhin kommt es zu einem Umbau der Atemwege, was sich in einer Vermehrung der Becherzellen mit konsekutiv erhöhter Schleimproduktion, Neoangiogene und fibrotischem Umbau äußert (Holgate *et al.* 2003). Auch für 15-HETE werden ähnliche Wirkungen beschrieben, in dem es zur Bronchokonstriktion führt und die Ausbildung eines Gewebeödems induziert (Nasser und Lee 2002). Die proinflammatorischen Effekte der Leukotriene werden auch durch ihre Wirkung auf Abwehrzellen erklärt. So bewirkt LTB₄ die Adhäsion von polymorphnukleären Granulozyten am Endothel (Gimbrone *et al.* 1984) und fördert deren Transmigration durch die Gefäßwand (Nohgawa *et al.* 1997). Den proinflammatorischen Metaboliten aus dem 5-LOX-Signalweg stehen die antiinflammatorischen Lipoxine gegenüber. Sie entstehen durch eine interzelluläre Wechselwirkung und ihre Bildung wird mit dem Beginn der Entzündung initiiert (Serhan und Savill 2005; Maderna und Godson 2009). Sie induzieren eine Hemmung der neutrophilen Chemotaxis und Transmigration (Lee *et al.* 1989; Serhan *et al.* 1995) und bewirken eine Verminderung der Gefäßpermeabilität (Takano *et al.* 1998). Des Weiteren stimulieren sie die Migration von Monozyten (Maddox und Serhan 1996) und fördern somit den Abbau apoptotischer Granulozyten durch Makrophagen, die als Monozyten eingewandert sind (Godson *et al.* 2000). Auch ein fibrotischer Umbau des Gewebes wird durch Lipoxine gehemmt (Rodgers *et al.* 2005). Durch ihre antiinflammatorische Wirkung sind sie daran beteiligt, die Anlockung von Granulozyten zu stoppen und somit eine Förderung der Wundheilung einzuleiten (Fierro und Serhan 2001).

1.1.3.2. Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Erkrankung, die entscheidend zur Pathogenese von Myokardinfarkten, cerebralen Insulten und zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) beiträgt. Die frühen Läsionen der Atherosklerose beruhen auf einer subendothelialen Akkumulation von Makrophagen, die exzessiv Cholesterolester angereichert haben (Schaumzellen). Diese entstehen durch eine unkontrollierte Aufnahme von modifiziertem Low Density Lipoprotein (LDL) über Scavenger-Rezeptoren (Henriksen *et al.* 1981). Im weiteren Verlauf kommt es zur Ansammlung von fettreichen nekrotischen Ablagerungen und glatten Muskelzellen und einer fortschreitenden Kalzifizierung (Lusis 2000). Diverse Untersuchungen haben ergeben, dass in diesen atherosklerotischen Läsionen Lipoxygenaseprodukte und 15-LOX-1-Protein nachweisbar waren, die zeitlich mit der Lipidablagerung zusammenhängen (Kühn *et al.* 1994). Ausgehend von der Hypothese der oxidativen Veränderung ist die Oxidation von LDL ein entscheidender Punkt bei der Entwicklung der Atherosklerose (Chisolm und Steinberg 2000). 12/15-LOXn könnten bei diesem Prozess eine Rolle spielen. Sie sind in der Lage, Lipoproteine zu oxidieren. Für Knock-Out-Mäuse wurde gezeigt, dass die Menge an atherosklerotischen Plaques abnimmt, wenn man das Gen für die 12/15-LOX ausschaltet (Cyrus *et al.* 2001; George *et al.* 2001). Bei einer endothelspezifischen Überexpression der 12/15-Lipoxygenase stieg der Anteil atherosklerotischer Plaques signifikant an (Harats *et al.* 2000). Die Atherosklerose wird auch als ein entzündlicher Prozess beschrieben (Libby 2002). In diesem Zusammenhang ließ sich die Expression von 5-LOXn in atherosklerotischen Läsionen nachweisen (Funk 2001; Spanbroek *et al.* 2003). Die Initiierung der Atherosklerose beginnt mit dem Einwandern von Monozyten und der 5-LOX-Signalweg scheint in diesen Vorgang entscheidend mit einzugreifen, indem er die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert und über die Bildung von Leukotrienen die monozytäre Chemotaxis und Transmigration stimuliert (Mehrabian und Allayee 2003). High Density Lipoprotein (HDL) besitzt anti-atherogene Eigenschaften, da es für den reversen Cholesteroltransport verantwortlich ist (Assmann und Nofer 2003). Durch 12/15-LOX-katalysierte Oxidation von HDL verändern sich die HDL-Eigenschaften, so dass sie pro-atherogen wirken (Pirillo *et al.* 2008). Andererseits muss erwähnt werden, dass bei Untersuchungen von transgenen und Knock-Out-Mäusen die 12/15-LOX-Expression einen anti-atherogenen Effekt zeigte (Merched *et al.* 2008). Diese Daten bestätigen früheren Untersuchungen an Kaninchen, in denen ebenfalls ein protektiver Einfluss der 12/15-LOX gezeigt werden konnte (Trebue *et al.* 2002). Lipoxygenasen zeigen demnach sowohl Effekte, die eine Atherosklerose induzieren und vorantreiben, können aber gleichzeitig deren Progression eindämmen.

1.1.3.3. Kanzerogenese

LOXn sind an der Pathogenese von Tumorerkrankungen beteiligt. Auch hier haben die Enzyme sowohl die Fähigkeit, das Wachstum von Tumoren zu fördern, aber auch dieses zu unterdrücken. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass man bestimmten LOX-Isoformen eher einen karzinogenen Einfluss und anderen Isoformen einen protektiven Einfluss zuordnen kann (Pidgeon *et al.* 2007). Andererseits ist die Wirkung der LOX-Isoformen oft auch gewebeabhängig. Eine Überexpression der 12-LOX und 12/15-LOX-1 in Prostatakrebszellen stimulierte die Angiogenese und das Tumorwachstum, was auf eine pro-kanzerogene Rolle beider Isoformen bei Prostatakarzinomen hindeutet (Nie *et al.* 1998; Kelavkar *et al.* 2001). Daneben kommt es zu einem Verlust der 15-LOX-2-Expression während der Initiierung des Tumorwachstums, was auf eine anti-kanzerogene Wirkung dieses Enzyms hindeutet (Shappell *et al.* 1999). Die Expression der 15-LOX-2 korreliert signifikant mit dem Grad der Differenzierung der Tumorzellen (Jack *et al.* 2000) und 15S-HETE scheint die Proliferation von Prostatakrebs-Zellen zu hemmen (Shappell *et al.* 2001). Des Weiteren wird durch die 15-LOX-2 die Angiogenese und das Tumorwachstum gehemmt (Tang *et al.* 2009). Bei Karzinomen des Kolons wird der 12/15-LOX-1 hingegen ein tendenziell anti-karzinogener Effekt zugeschrieben (Bhattacharya *et al.* 2009). Die Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit dem 15-LOX-1-Metaboliten 13S-Hydroxyoctadecadiensäure (13S-HODE) und auch die Überexpression der 12/15-LOX-1 in Mäusen, unterdrückte das Tumorwachstum (Nixon *et al.* 2004). 5-Lipoxygenasen scheinen dagegen das Wachstum von Kolonkarzinomen zu fördern. Bei immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine erhöhte Expression dieses Enzyms in adenomatösen Polypen und Karzinomen. Diese Erhöhung war in gesundem Mukosagewebe nicht nachweisbar. Durch Blockade der 5-LOX ließ sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tumorzellproliferation zeigen (Melstrom *et al.* 2008). Dabei konnte auch eine Korrelation zwischen 5-LOX-Expression und Differenzierungsgrad bzw. Größe des Tumors nachgewiesen werden (Wasilewicz *et al.* 2010). In Pankreaskarzinomen zeigt die 5-LOX ebenfalls eine stärkere Expression verglichen mit gesundem Pankreasgewebe (Hennig *et al.* 2005). Des Weiteren scheint sie das Wachstum von Pankreastumoren durch Aktivierung verschiedener Signalwege, welche die Zellproliferation aktivieren, zu fördern (Ding *et al.* 2003b). Auch die 12-LOX greift über die Aktivierung von Tyrosinkinase proliferativ in das Wachstum von Pankreaskarzinomen ein (Ding *et al.* 2001). Eine allgemein gültige Einteilung in pro-karzinogene und anti-karzinogene Lipoxygenasen ist derzeit jedoch nicht möglich. 5-HETE, 12-HETE und 13-HODE finden sich vermehrt in karzinomatösem Gewebe. 8-HETE und 15-HETE scheinen hingegen Zelldifferenzierung und Zellwachstums zu regulieren (Pidgeon *et al.* 2007; Moreno 2009).

1.1.3.4. Weitere Funktionen

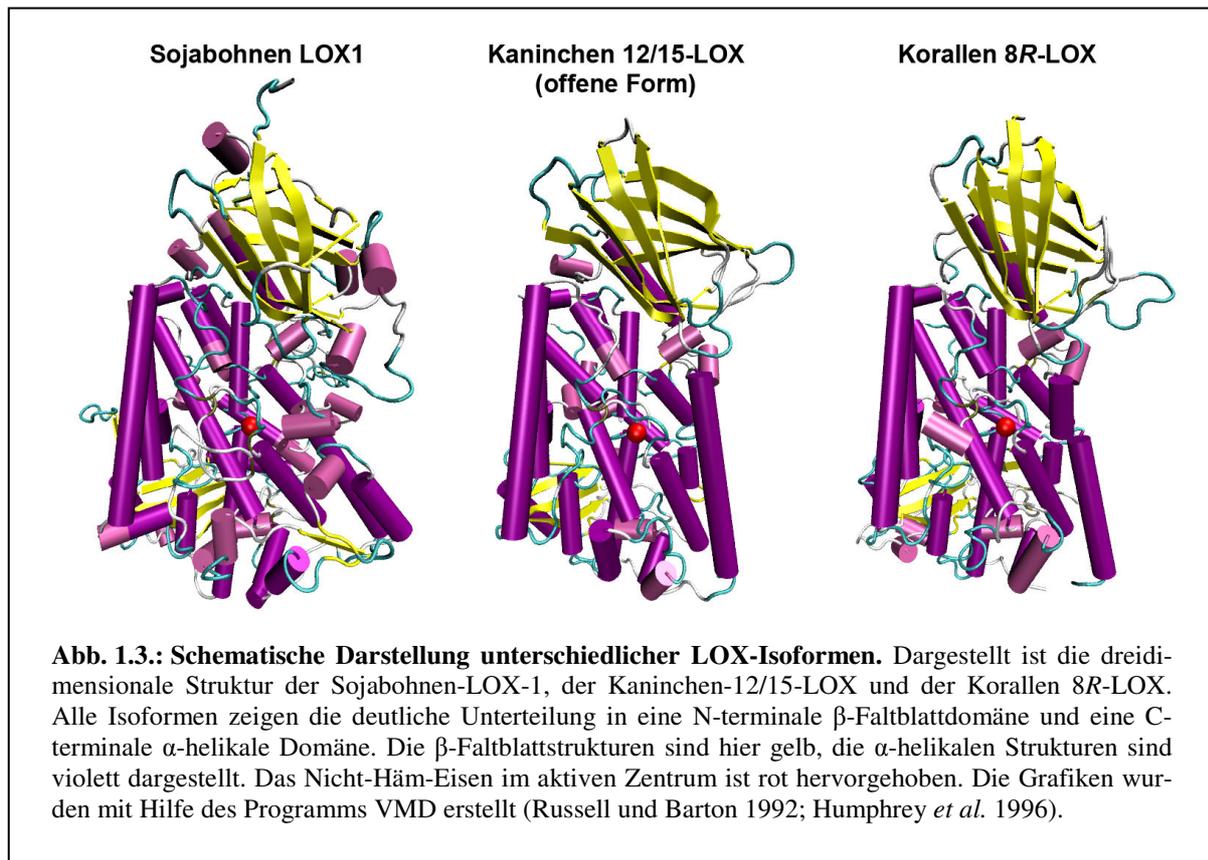
Neben der oben genannten Bedeutung von LOXn in Inflammation, Atherogenese und Kanzerogenese, besitzen sie noch eine Reihe weiterer Funktionen. Die 12/15-LOX scheint bei der Spermatogenese eine Rolle zu spielen. So zeigten Mäuse, denen das *Alox15*-Gen ausgeschaltet wurde, eine fehlerhafte Spermatogenese mit veränderter Struktur und morphologischen Abnormalitäten in den Spermatozoen (Moore *et al.* 2010). Im Auge tragen Lipoxygenasen auf vielfältige Weise zur Wundheilung bei. Die 12/15-LOX ist dabei entscheidend an der Reepithelisierung der Cornea beteiligt, unter anderem durch die Produktion von LXA₄ (Gronert *et al.* 2005). Die mukoziliäre Differenzierung von humanen Nasenepithelien scheint durch die Expression der 12/15-LOX beeinflusst zu sein (Kim *et al.* 2005). In der Haut tragen die 12R-LOX und die Epidermistyp-LOX (eLOX-3) zu Differenzierung der Keratinozyten und Adipozyten bei und sind somit auch entscheidend in der Ausbildung der epidermalen Barriere involviert (Fürstenberger *et al.* 2007). Mäusen, bei denen das 12R-LOX-Gen (*Alox12b*) ausgeschaltet wurde, starben kurze Zeit nach der Geburt aufgrund schwerer Dehydratation (Epp *et al.* 2007). Der 12-LOX/eLOX-3-Signalweg scheint des Weiteren mit der Entstehung der kongenitalen Ichthyosis zusammen zu hängen (Jobard *et al.* 2002; Eckl *et al.* 2005).

1.2. Struktur der Lipoxygenasen

1.2.1. Kristall- und Primärstruktur von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich N-terminal in eine β -Faltblatt-Domäne und C-terminal in eine α -helikale Domäne aufteilt. Dabei zeigen die Lipoxygenasen unterschiedliche Längen in ihrer Aminosäuresequenz. Die Sojabohnen-LOX-1 beispielsweise besteht aus insgesamt 839 Aminosäuren. Diese Lipoxygenase war auch die erste, die kristallisiert und deren Raumstruktur aufgeklärt werden konnte (Boyington *et al.* 1993). Wenige Jahre später konnte die ursprüngliche Auflösung von 2,6 Å auf 1,4 Å verbessert werden (Minor *et al.* 1996). Ihre β -Faltblatt-domäne setzt sich dabei aus 146 Aminosäuren zusammen, während die C-terminale katalytische Domäne aus 693 Aminosäuren besteht. Im Jahr 1997 konnte die erste und bisher auch einzige tierische Lipoxygenase strukturell aufgelöst werden. Im Komplex mit dem Lipoxygenase-Inhibitor RS7, wurde die 12/15-LOX des Kaninchens dargestellt (Gillmor *et al.* 1997). Die Sequenz dieser Lipoxygenase besteht allerdings nur aus 663 Aminosäuren, d. h. das Enzym der Sojabohne ist wesentlich größer, als das des Kaninchens. Generell variieren die Primärstrukturen tierischer Lipoxygenasen zwischen 662 und 711 Aminosäuren, womit sie etwa um ca. 200 Aminosäuren kürzer sind als pflanzliche Enzyme.

Kürzlich konnte, neben der Struktur der Sojabohnen- und Kaninchen-LOX, die Struktur einer 8*R*-Korallen-LOX (*Plexaura homomalla*) vollständig aufgeklärt werden (Oldham *et al.* 2005; Neau *et al.* 2009). Diese zeigt zu etwa 40 % eine Sequenzhomologie mit der tierischen 5-LOX und ist in ihrer zylindrischen Form vergleichbar mit der 12/15-LOX des Kaninchens. Die Sojabohnen-LOX-1 zeigt hingegen eine breitere, ellipsoide Form und wirkt dadurch auch voluminöser als die anderen beiden LOX-Isoformen (Abb. 1.3.).



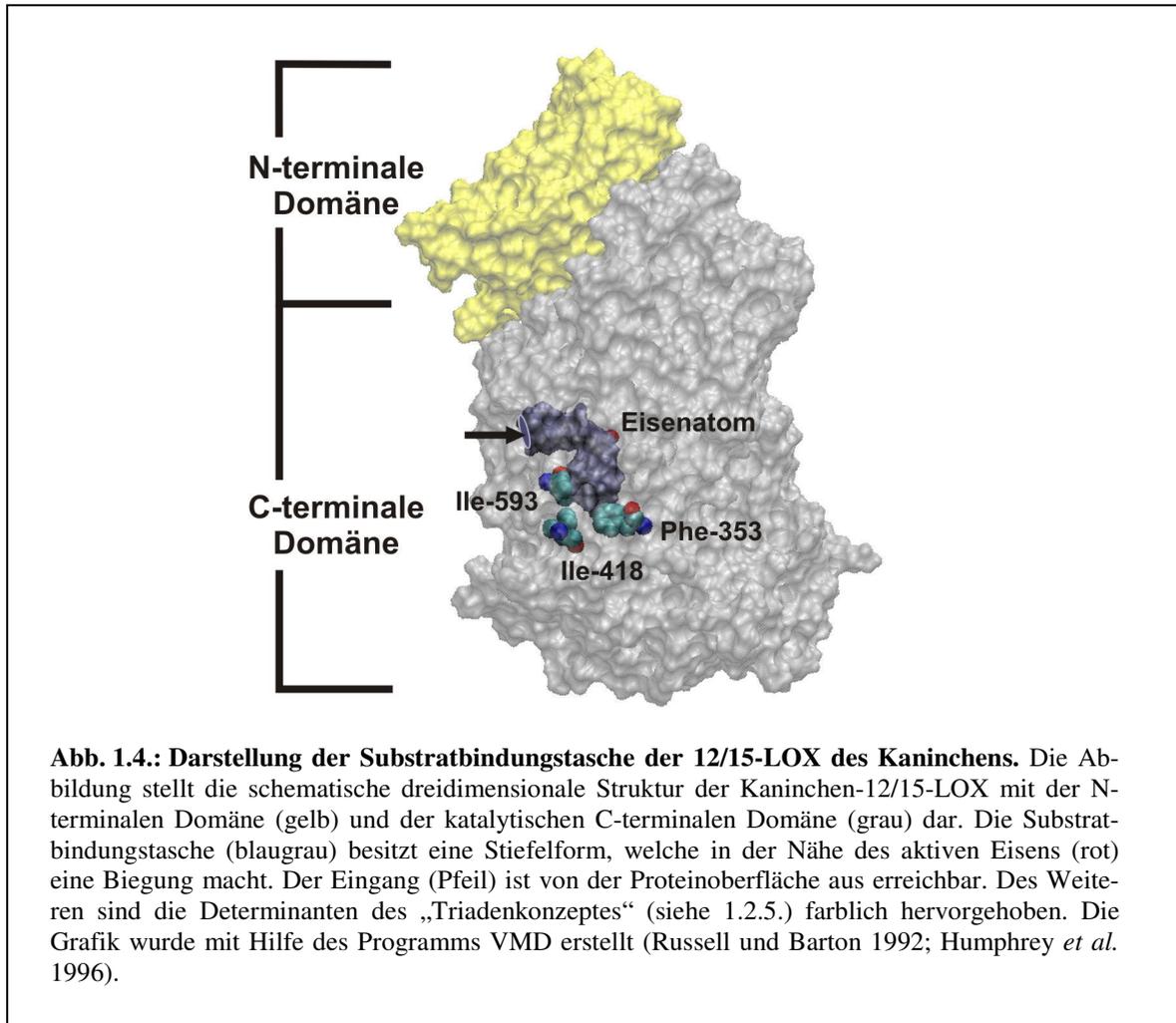
1.2.2. Die N-terminale Domäne von Lipoxygenasen

Derzeitig verfügbare Röntgenstrukturanalysen von LOX-Isoformen zeigen eine vorwiegende β -Faltblattstruktur in der N-terminalen Domäne. Bei der 12/15-LOX des Kaninchens besteht diese Domäne etwa aus den ersten 115 Aminosäuren und zeigt zu 23 % eine Sequenzhomologie zur C-terminalen β -Faltblattstruktur tierischer Lipasen (Winkler *et al.* 1990). Sie scheint in diesem Zusammenhang für die Bindung an Lipoproteinen und Biomembranen eine Rolle zu spielen (Gillmor *et al.* 1997). Obwohl die N-terminale Domäne der Sojabohnen-LOX-1 größer ist (146 Aminosäuren) und mit 11 % eine geringere Sequenzhomologie zur Kaninchen-LOX besitzt, ist ihre Gesamtstruktur sehr ähnlich (Abb. 1.3.). C-terminale und N-terminale Domäne der Kaninchen-LOX sind über eine etwa 1600 \AA^2 große Kontaktfläche mit einander verbunden. Diese Kontaktfläche beträgt bei der Sojabohnen-LOX-1 2600 \AA^2 und lässt eine stär-

kere Bindung zwischen den beiden Domänen vermuten (Gillmor *et al.* 1997). Die Entfernung der N-terminalen Domäne durch ortsgerichtete Mutagenese bei der Kaninchen-12/15-LOX führte zu einem Enzym mit reduzierter katalytischer Aktivität (Walther *et al.* 2002). Sie zeigte auch verringerte Bindung an Biomembranen. Dies konnte auch für andere pflanzliche und tierische Lipoxygenasen gezeigt werden (Tatulian *et al.* 1998; May *et al.* 2000). Für die 5-LOX scheint die N-terminale Domäne essentiell bei der Translokation in die Kernmembran zu sein (Chen und Funk 2001). Eine Ca^{2+} -bindende Region in der β -Faltblattdomäne beeinflusst dabei die Membranbindung und auch die Enzymaktivität (Hammarberg *et al.* 2000). Mutationen an oberflächenexponierten Tryptophanen in dieser Ca^{2+} -bindenden Region führten zu einer veränderten Membranbindung (Kulkarni *et al.* 2002), was ebenfalls durch Experimente an der 8R-Korallen-LOX gezeigt werden konnte (Oldham *et al.* 2005). Bei der 12/15-LOX des Kaninchens bewirkt Calcium eine verbesserte Bindung und auch die Oxidaseaktivität wird verstärkt (Brinckmann *et al.* 1998). Allerdings scheinen keine spezifischen Ca^{2+} -bindenden Aminosäuren in diesen Prozess involviert zu sein (Walther *et al.* 2004).

1.2.3. Die C-terminale Domäne von Lipoxygenasen

Die C-terminale Domäne enthält das katalytisch aktive Nicht-Häm-Eisen und die hydrophobe Substratbindungstasche (Abb. 1.4.). Sie besteht vorwiegend aus α -Helices, welche parallel bzw. antiparallel zueinander angeordnet sind (Abb. 1.3.). Die katalytische Domäne der Kaninchen-12/15-LOX besteht aus 21 Helices, die durch eine kleine β -Faltblattunterdomäne unterbrochen werden (Gillmor *et al.* 1997). Das entsprechende Strukturmotiv der Sojabohnen-LOX-1 besteht aus 20 Helices, von denen sich die längeren um die zentrale Helix 9 anordnen (Boyington *et al.* 1993). Dagegen besitzt die katalytische Domäne der 8R-Korallen-LOX 23 Helices (Neau *et al.* 2009). Das katalytische Nicht-Häm-Eisen von LOX-Isoformen ist 6fach ligandiert. Bei der Kaninchen-12/15-LOX fungieren die Histidine His-361, His-366, His-541 und His-545 als direkte Eisenliganden. Das C-terminale Isoleucin, welches in den meisten Lipoxygenasen konserviert ist, bildet den fünften Proteineisenliganden. Als sechster Eisenligand wurde ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxylion identifiziert (Minor *et al.* 1996; Kuban *et al.* 1998). Die katalytische Domäne der Kaninchen-12/15-LOX verändert ihre Struktur in Abhängigkeit von der Ligandenbindung am aktiven Zentrum. Ist ein Ligand gebunden, so führt dies zu einer kondensierten (geschlossenen) Form, bei der die Helix 2 sich um etwa 12 Å verschiebt und den Eingang in die Substratbindungstasche versperrt. Dieser ist im nicht-ligandierten Zustand offen (entspannte Form) (Choi *et al.* 2008). Gleichzeitig verschiebt sich eine Helix am aktiven Zentrum, um Raum für den bindenden Liganden zu schaffen.



1.2.4. Substratbindungstasche

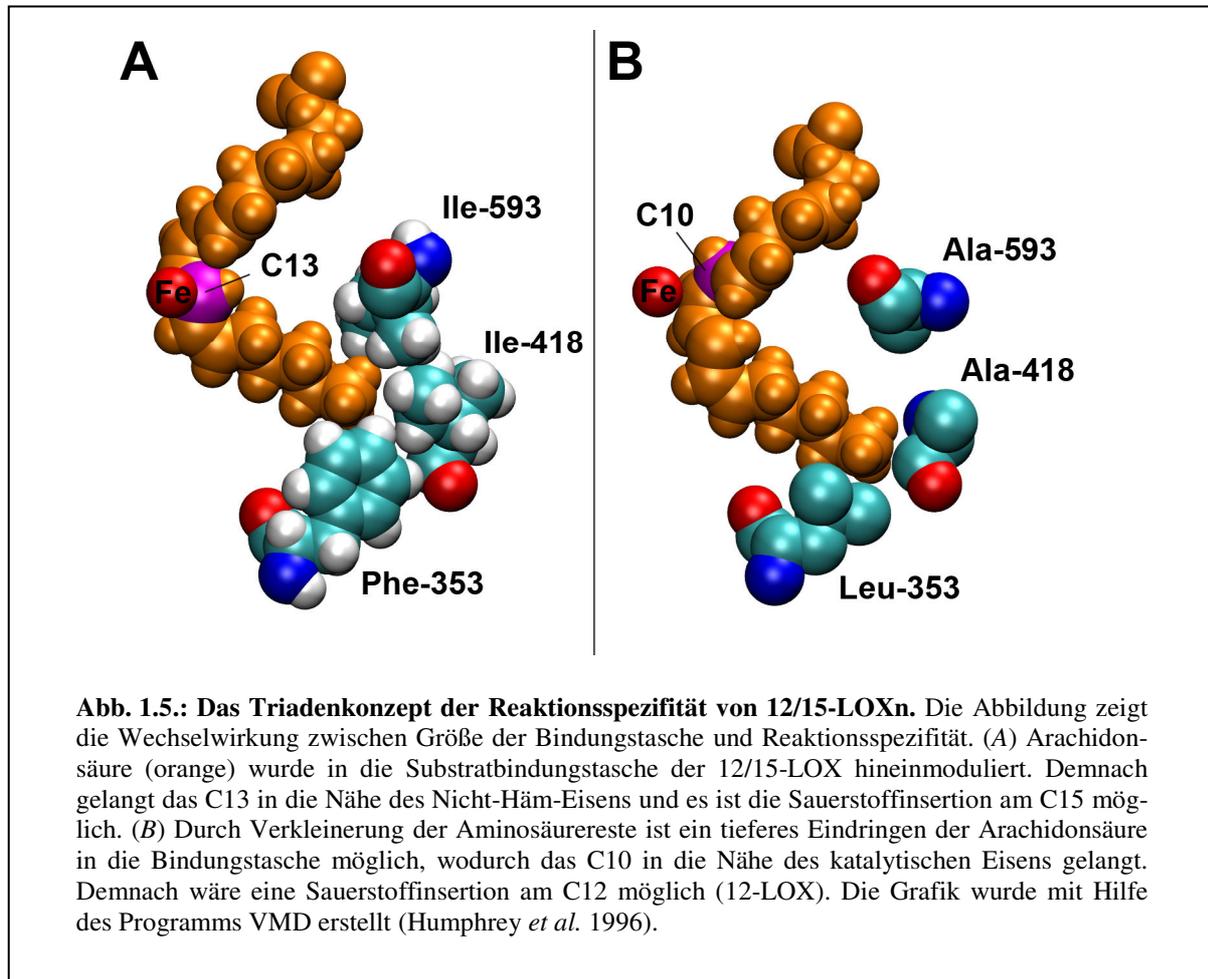
Innerhalb der C-terminalen Domäne liegt die Substratbindungstasche, welche von der Proteinoberfläche aus erreichbar ist (Abb. 1.4.). Sie wird vorrangig aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten gebildet. Für die Kaninchen-12/15-LOX wird der Boden der Bindungstasche durch die Aminosäuren Phe-353, Ile-418, Met-419 und Ile-593 gebildet. In der Nähe des Nicht-Häm-Eisens macht die Substratbindungstasche eine Biegung, wodurch sie eine Stiefelform annimmt. Sie erstreckt sich bis zur Proteinoberfläche, wo sich das Arginin 403 befindet. Es wird angenommen, dass die Guanidinogruppe des Arg-403 mit der Carboxylgruppe der Arachidonsäure interagiert (Gillmor *et al.* 1997). Die Kristallstruktur der 8R-Korallen-LOX zeigt zwei miteinander verbundene Hohlräume, die einen U-förmigen Kanal bilden (Neau *et al.* 2009). Dieser könnte es ermöglichen, dass das Substrat von zwei verschiedenen Seiten in die Nähe des aktiven Zentrums gelangt. An beiden Eingängen dieses Kanals befindet sich ein Argi-

nin (Arg-183 und Arg-429), deren funktionelle Rolle bei der Substratbindung bisher jedoch noch nicht untersucht wurde.

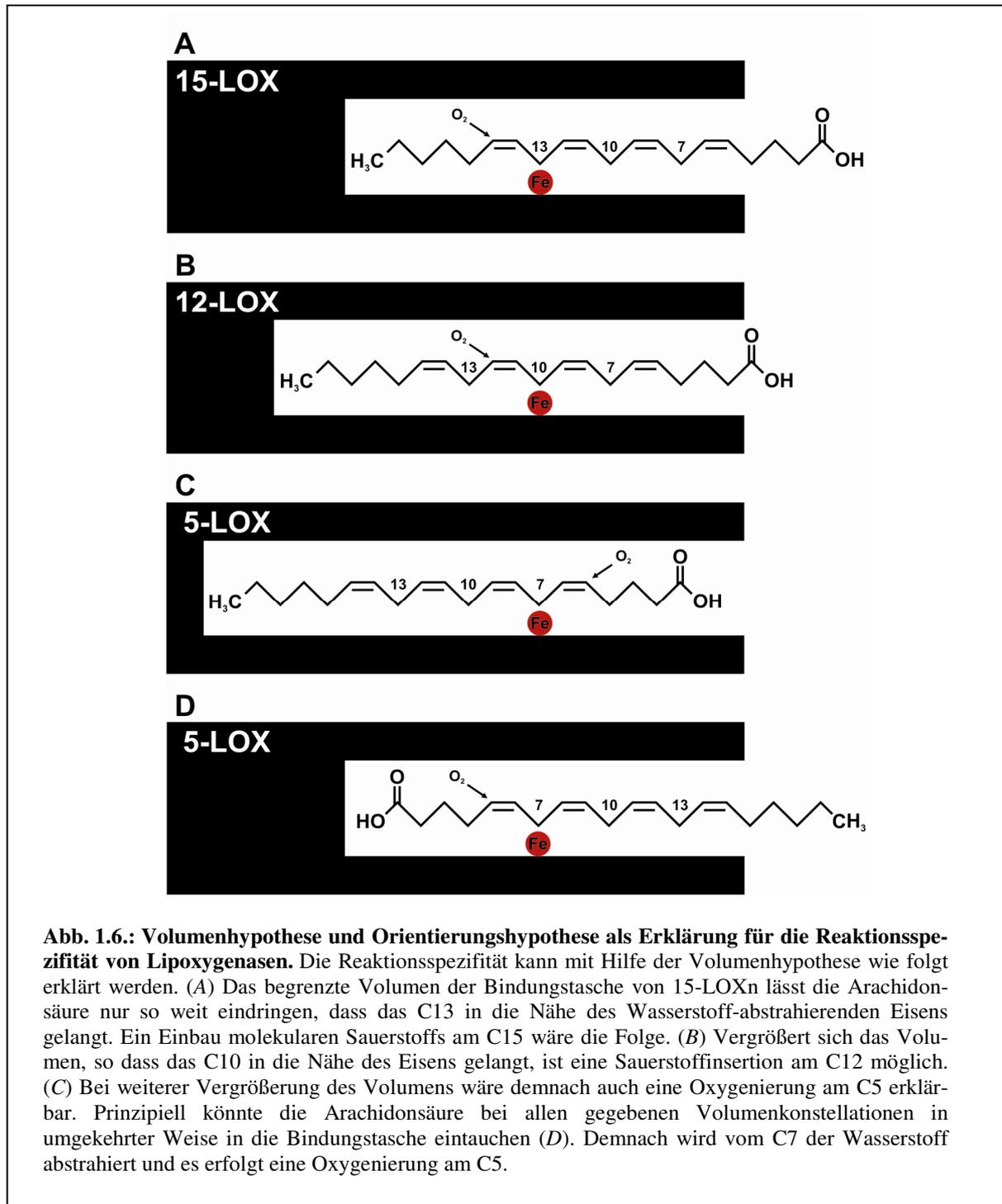
1.2.5. Strukturelle Grundlagen der Reaktionsspezifität

Es liegen unterschiedliche Überlegungen dazu vor, wie Fettsäuren in der Substratbindungstasche von LOXn gebunden werden. Ein Modell, welches eine einfache Erklärung für die Reaktionsspezifität der 12/15-LOX bietet, ist das erstmals am Kaninchenenzym beschriebene „Triadenkonzept“ (Borngräber *et al.* 1999). Bei diesem bilden drei kritische Aminosäuren (Phe-353, Ile-418 und Ile-593) den Boden der Bindungstasche und sollten damit über die Reaktionsspezifität entscheiden (Abb. 1.5.). Das Konzept geht davon aus, dass eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit dem Methylende voran in die Bindungstasche eindringt und deren Carboxylgruppe mit dem Arg-403 auf der Proteinoberfläche interagiert. Durch ortsgerichtete Mutagenese an diesen Determinanten konnte ein Zusammenhang zwischen dem Volumen der Bindungstasche und dem Ort des Sauerstoffeinbaus in der Fettsäurekette hergestellt werden. Wurden die kritischen Determinanten mit Aminosäuren besetzt, die kleine Seitenketten besitzen, wurde das Volumen der Bindungstasche vergrößert, was zur Folge hatte, dass das Substrat tiefer eindringen konnte. Dadurch rückte das C13 weiter vom Eisen weg, während das C10 dichter an das Eisen heran gelangte. Diese sterische Konstellation bevorzugte eine Fettsäureoxidation am C12. Umgekehrt führte eine Vergrößerung der Seitenketten und einer dadurch bedingten Verkleinerung der Bindungstasche zu einer vorrangigen Oxygenierung am C15. Bereits Anfang der 90er Jahre konnte gezeigt werden, dass die Einführung einer kleinen Aminosäure bei Ile-417 der humanen 12/15-LOX die 12-Lipoxygenierung bevorzugte (Sloane *et al.* 1991; Sloane *et al.* 1995). Weitere Mutagenesestudien an der humanen 12/15-LOX (Vogel *et al.* 2010), der Kaninchen-12/15-LOX (Borngräber *et al.* 1996; 1999) und der 12/15-LOX des Schweins (Suzuki *et al.* 1994) bestätigen dieses Konzept. Es folgt dabei einer Volumenhypothese (Abb. 1.6.), nach der die Größe der Substratbindungstasche für die Reaktionsspezifität der Lipoxygenase bedeutsam ist (Gillmor *et al.* 1997; Browner *et al.* 1998). Modellrechnungen haben gezeigt, dass die Bindungstasche der 5-LOX um etwa 20 % größer ist als die der 12/15-LOX (Gillmor *et al.* 1997). Mutageneseuntersuchungen an der humanen 5-LOX, bei denen die kritischen Aminosäuren des Triadenmodells durch Aminosäuren mit größeren Seitenresten ersetzt wurden, führten zu einem Enzym, welches hauptsächlich 15-HETE bildete (Schwarz *et al.* 2001). Dieses Ergebnis war mit der Annahme einer Verkleinerung des Bindungstaschenvolumens vereinbar, wodurch das C13 in die Nähe des aktiven Eisens gedrängt wurde. Ein Problem stellt die Tatsache dar, dass bei 5-LOXn die Wasserstoffabstraktion und der Einbau des molekularen Sauerstoffs von der gegenü-

berliegenden Seite erfolgen, also in $[-2]$ -Richtung. Demnach müsste das Produkt der 5-LOX eine *R*-Konfiguration aufweisen. Die Erklärung, dass es als *S*-konfiguriert benannt wird, geht aus der Prioritätenregel nach Cahn-Ingold-Prelog hervor (Cahn *et al.* 1966).



Aus diesem Grund wurde eine weitere Hypothese aufgestellt, nach der das Substrat in umgekehrter Orientierung (Orientierungshypothese), also mit der Carboxylgruppe voran in die Bindungstasche eindringt (Prigge *et al.* 1998). Diese Substratbindung würde die Stereochemie der Produktbildung erklären, ist jedoch aus thermodynamischen Gründen problematisch (Browner *et al.* 1998). Die Einführung einer polaren Carboxylgruppe in die hydrophobe Umgebung der Substratbindungstasche müsste eine hohe Energiebarriere aufweisen.



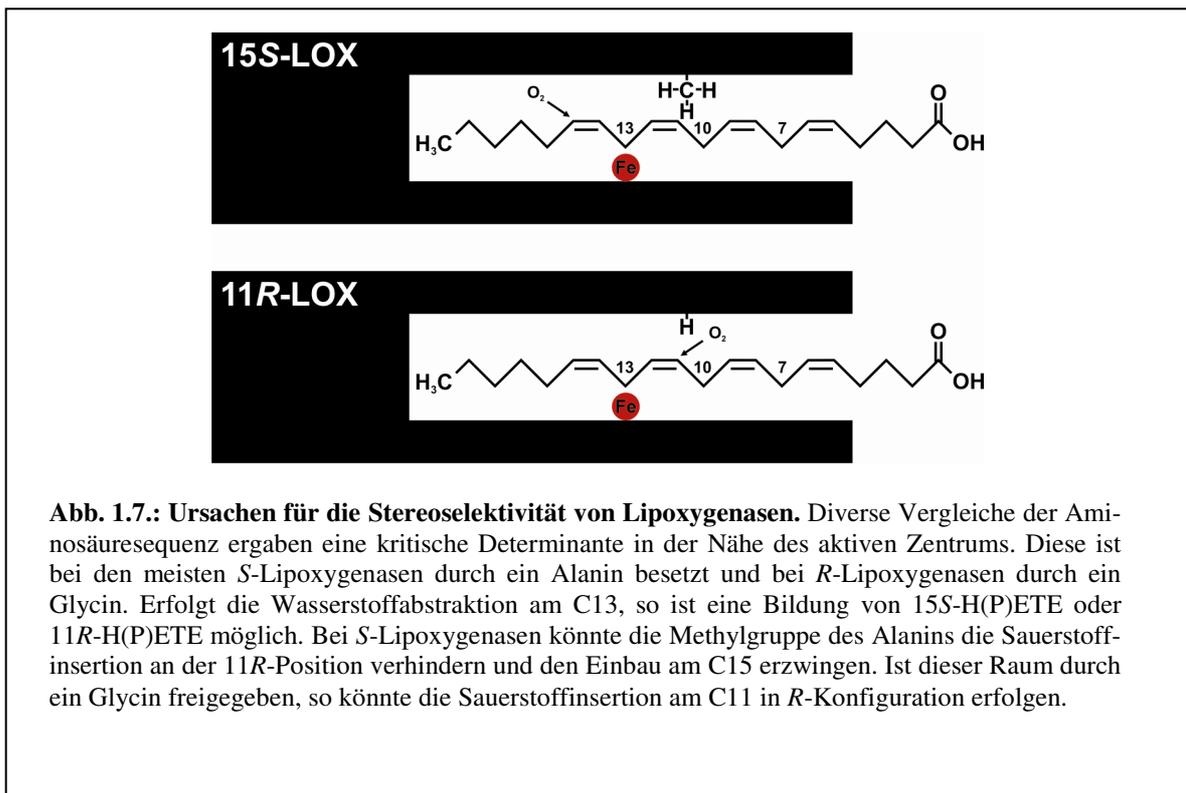
Dass eine solche inverse Substratbindung prinzipiell möglich ist, zeigen Untersuchungen mit artifiziellen Fettsäurederivaten (Walther *et al.* 2001). Dabei verringerten sich jedoch sowohl die Substrataffinität als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden aus Mutageneseuntersuchungen an der Gurken-13-LOX gezogen. Dieses Enzym wurde durch Mutation einer einzelnen Aminosäure in eine 9-LOX umgewandelt (Hornung *et al.* 1999). Die Veränderung der Positionsspezifität wurde durch Demaskierung des positiv gelade-

nen Arg-758 im Inneren der Bindungstasche erklärt, wodurch eine inverse Orientierung der Linsäure ermöglicht wurde. Man muss demnach davon ausgehen, dass sowohl Volumenhypothese, als auch Orientierungshypothese zutreffend sind.

1.2.6. Ursachen für die Stereoselektivität

Wasserstoffabstraktion und Einbau molekularen Sauerstoffs sind grundlegende Schritte der Lipoxygenasereaktion (siehe 1.1.1.1.). Allerdings ist bisher noch nicht vollständig geklärt, auf welcher molekularen Grundlage die Sauerstoffinsertion basiert. Nach der Wasserstoffabstraktion ist das freie Radikal-Elektron gleichmäßig über das Pentadiensystem delokalisiert. Im Falle der Abstraktion vom C13 der Arachidonsäure wäre also eine Insertion des Sauerstoffs in der 11*R*- oder 15*S*-Konfiguration möglich, da diese immer antarafacial abläuft. Analog dazu wäre bei der Abstraktion am C10 eine 8*R*- oder 12*S*-Konfiguration möglich. Aus diversen Vergleichen der Aminosäuresequenz verschiedener LOX-Isoformen konnte eine kritische Position ermittelt werden, welche bei den meisten *S*-Lipoxygenasen durch ein Alanin besetzt ist, während *R*-Lipoxygenasen ein Glycin an dieser Stelle besitzen (Coffa und Brash 2004; Schneider *et al.* 2007). Diese Determinante ist in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert und könnte somit einen Einfluss auf die Sauerstoffinsertion nehmen. Experimentelle Untersuchungen, bei denen die Stereoselektivität durch Mutation an dieser Determinante verändert wurde, bestätigen den Einfluss dieser kritischen Aminosäure. So konnte die 8*R*-Korallen-LOX durch die Gly428Ala-Mutation in eine vorrangig 12*S*-H(P)ETE-produzierende Lipoxygenase umgewandelt werden. Die umgekehrte Strategie an der humanen 15*S*-LOX2, bei der eine Ala416Gly-Mutation vorgenommen wurde, führte zur Bildung von 11*R*-H(P)ETE als Hauptprodukt (Coffa und Brash 2004). Die Ursache für diese Stereospezifität wird in der zusätzlichen Methylgruppe des Alanins vermutet, wodurch der Raum an der *R*-Position des Pentadiens versperrt wäre und der Sauerstoff zwangsläufig in *S*-Position eingebaut werden müsste. Da dem Glycin diese Methylgruppe fehlt, könnte dadurch ein gewisser Raum entstehen, wodurch der Sauerstoff in der *R*-Position eingebaut werden kann (Abb. 1.7.). Untersuchungen an der Korallen-8*R*-LOX lassen vermuten, dass der Austausch von Glycin zu Alanin vielmehr die Seitenkette eines kritischen Leucins (Leu-432) verdrängt und im Falle des Wildtyps (Gly-428) die C12-Position blockiert. Bei der Gly428Ala-Mutante könnte wiederum die C8-Position besetzt sein (Neau *et al.* 2009). Allerdings sind diese Daten kritisch zu betrachten, da die Mutanten nur eine eingeschränkte Aktivität aufwiesen. Unveröffentlichte Daten zur Ala404Gly-Mutation an der Kaninchen-12/15-LOX ergaben wie der Wildtyp als Hauptprodukt 15*S*-H(P)ETE. Der Anteil an 11*R*-H(P)ETE betrug nur etwa 20 %. Nach welchem genauen Mechanismus der Einbau des molekularen Sauerstoffs geregelt ist, steht

demnach weiter zur Diskussion. Kürzlich wurde in der Sequenz der Zebrafisch-12/15-LOX ein Glycin an dieser kritischen Position identifiziert, was entsprechend dem Gly-Ala-Konzept auf eine *R*-LOX hindeuten würde (Jansen *et al.*, 2011). Gleichzeitig wurde jedoch 12*S*-H(P)ETE als dominierendes Produkt der Arachidonsäureoxygenierung identifiziert. Damit scheint das Gly-Ala-Konzept für diese spezielle LOX-Isoform nicht anwendbar zu sein.



1.3. Ziel der Arbeit

Die Reaktionsspezifität von LOXn bestimmt das Muster ihrer Reaktionsprodukte. Damit ist diese Enzymeigenschaft für die biologische Rolle der Enzyme von entscheidender Bedeutung. Leider sind die strukturellen Grundlagen für die Reaktionsspezifität von LOXn noch nicht ausreichend untersucht, so dass noch keine einheitliche Theorie zu diesem Problem existiert. Diverse Mutageneseuntersuchungen konnten für tierische LOXn verschiedene Positionsdeterminanten identifizieren, die durch die Größe ihrer Aminosäureseitenketten das Volumen der Substratbindungstasche beeinflussen und dadurch die Positionsspezifität modifizieren. Veränderungen der Geometrie und des Ladungszustandes der Aminosäureseitenketten haben somit Einfluss auf die Lage des Substrats in der Bindungstasche. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, welche Bedeutung diese Determinanten für die Reaktionsspezifität ausgewählter Primaten-12/15-LOXn (*Pongo pygmaeus*, *Macaca mulatta*) haben. Die dabei erhaltenen Daten sollten ins Triadenkonzept der Positionsspezifität von 12/15-LOXn eingefügt werden, um dieses auf eine breitere experimentelle Basis zu stellen.

Neben der Positionsspezifität beeinflusst auch die Enantioselektivität der Substratoxygierung das durch LOXn gebildete Produktmuster. Dabei unterscheidet man *S*-LOXn von *R*-LOXn. Der Vergleich diverser Aminosäuresequenzen identifizierte eine kritische Aminosäure in der Nähe des aktiven Zentrums, die bei *S*-LOXn durch ein Alanin besetzt ist. *R*-LOXn tragen ein Glycin an dieser Stelle. Ein Ala-zu-Gly-Austausch sollte demnach zu einer *R*-Lipoxygierung führen und umgekehrt. Die Frage, inwiefern dieser Austausch die Enantioselektivität der 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* verändert, stellte daher ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

Die Raumstruktur von LOXn lässt sich in eine N-terminale β -Faltblatt-Domäne und eine C-terminale α -helikale Domäne unterteilen. Der C-terminalen Domäne wird dabei die katalytische Aktivität zugeschrieben, da sie die Substratbindungstasche und das katalytische Eisen besitzt. Die N-terminale Domäne soll die Bindung von LOXn an Biomembranen vermitteln und über noch unbekannte Mechanismen die katalytische Aktivität der Enzyme regulieren. Durch die Expression von Trunkationsmutanten, welche nur noch den C-terminalen, katalytischen Anteil der ausgewählten Primaten-12/15-LOXn besaßen, sollte die Bedeutung der N-terminalen Domäne für die Membranbindung und für die katalytische Aktivität überprüft werden. Diese Ergebnisse sollten zu einem besseren Verständnis der biologischen Rolle der N-terminalen β -Faltblatt-domäne von LOXn beitragen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

| | |
|--|---|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Roth, Karlsruhe |
| Agarose | Promega, Mannheim |
| Ampicillin-Natrium | Roth, Karlsruhe |
| Antikörper: RGS-His (Maus) | Quiagen, Hilden |
| Antikörper: anti-Maus-IgG | Sigma, Deisenhofen |
| Arachidonsäure | Serva, Heidelberg |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| BSA, Fraktion V | Serva, Heidelberg |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| dNTP-Lösung | Roth, Karlsruhe |
| HPLC-Standards 5-, 12-, 15-HETE, 9-, 13-HODE, jeweils <i>R</i> - und <i>S</i> -Isomer | Cayman Chem., Vertrieb: Alexis Deutschland GmbH, Grünberg |
| Imidazol | Serva, Heidelberg |
| IPTG, Dioxanfrei | Roth, Karlsruhe |
| Linolsäure | Serva, Heidelberg |
| Nickelagarose (Ni-TED) | Quiagen, Hilden |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |

2.1.2. Nährmedien, Puffer und Lösungen

| | |
|---------------|---------------------|
| Bacto-Agar | Difco, Detroit, USA |
| Bacto-Trypton | Difco, Detroit, USA |
| Hefe-Extrakt | Difco, Detroit, USA |

LB-Medium:

Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), NaCl (0,5 %), NaOH (1 mM),
Ampicillin (100 mg/l)

LB-Agar:

Bacto-Agar (1,5 %), Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), NaCl (0,5 %), NaOH (1 mM), Ampicillin (100 mg/l)

PBS:

NaCl (150 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KCl (3 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), pH = 7,0

TBE-Puffer (für Sequenzier-Gele):

Tris (90 mM), Borsäure (90 mM), EDTA (2 mM), pH = 8,3

TAE-Puffer (für Agarose-Gele):

Tris (40 mM), CH₃COONa (20 mM), CH₃COOH (29,6 mM), EDTA (2 mM), pH = 7,8

2.1.3. Enzyme und Kits

| | |
|--|----------------------------|
| DNA Ligase, Bacteriophage | Roche, Mannheim |
| Miniprep-Kit | Quiagen, Hilden |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Fermentas, St- Leon-Rot |
| QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, La Jolla (USA) |
| Quiaquick Gelextraktionskit | Quiagen, Hilden |
| Western Lightning Chemilumineszenz plus | Perkin Elmer, Boston (USA) |

2.1.4. Plasmide und Oligonukleotide

| | |
|---|----------------------------------|
| TOPO | Invitrogen, Darmstadt |
| 12/15-LOX in pFastBacHTb (<i>P. pygmaeus</i>) | (Johannesson <i>et al.</i> 2010) |
| 12/15-LOX in pFastBacH1 (<i>M. mulatta</i>) | (Johannesson <i>et al.</i> 2010) |
| 12/15-LOX in pQE-9 (Kaninchen) | (Walther <i>et al.</i> 2001) |

Folgende Primer wurden für die Mutationen an den Sequenzdeterminanten bzw. der Trunkationsexperimente von der Firma BioTez, Berlin hergestellt und verwendet:

Deletion der internen Hind III-Schnittstelle:

P. pygmaeus: CAT CCT ATC TTC AAA CTG ATA ATT CCC CAC
M. mulatta: CAT CCT ATC TTC AAA CTG ATC ATT CCT CAC

Einfügen der Sal I-Schnittstelle:

P. pygmaeus: TTT CAG GGC GCC GTC GAC TCT ATG GGT CTC TAC

M. mulatta: CGT CCC ACC ATC **GGT CGA** CGA TCT ATG GGT CTC

Mutation der Sequenzdeterminanten der 12/15-LOX des *Pongo pygmaeus* in 5'-3'-Richtung:

F352L GCG CAG CTC TGA **CCT GCA** GCT CCA TGA GC
 F352V GTG CGC AGC TCT GAC **GTT** CAG CTC CAT GAG CTG
 F352A GTG CGC AGC TCT GAC **GCG** CAG CTC CAT GAG CTG
 I417F GGA ATT TTC GAC CAG **TTC** ATG AGC ACT GGT GGG
 I417A GGA ATT TTC GAC CAG **GCG** ATG AGC ACT GGT GGG
 I417W GGA ATT TTC GAC CAG **TGG** ATG AGC ACT GGT GGG
 M418F ATT TTC GAC CAG ATA **TTC** AGC ACT GGT GGG GGA
 M418V ATT TTC GAC CAG ATA **GTT** AGC ACT GGT GGG GGA
 I417F+M418F GGA ATT TTC GAC CAG **TTC TTC** AGC ACT GGT GGG
 I592F CTC CAG ATG TCC **ACT** TGG CAG CTG GGC
 I592A TCT CTC CAG ATG TCC **GCG** ACT TGG CAG CTG GGC

Mutation der Sequenzdeterminanten der 12/15-LOX des *Macaca mulatta* in 5'-3'-Richtung:

F352L CGC AGC TCT GAC **CTG** CAG CTC CAT GAG
 F352A CGC AGC TCT GAC **GCG** CAG CTC CAT GAG
 F352W CGC AGC TCT GAC **TGG** CAG CTC CAT GAG
 V417F GTT TTT GAC CAG **TTC** GTG AGC ACT GGT
 V417I GTT TTT GAC CAG **ATA** GTG AGC ACT GGT
 V417M GTT TTT GAC CAG **ATG** GTG AGC ACT GGT
 V417W GTT TTT GAC CAG **TGG** GTG AGC ACT GGT
 I592F CTG CAG ATG TCC **TTC** ACT TGG CAG CTG
 I592W CTG CAG ATG TCC **TGG** ACT TGG CAG CTG

Trunkationsexperimente (Einführung einer Sal I-Schnittstelle am N-Terminus):

P. pygmaeus **GTC GAC** CGT ACT GTG GGC GAC GAC CC
M. mulatta **GTC GAC** CGC ACT GTG GGC GAA GAC CC

Als zweiter Primer bei Mutagenesen diene jeweils die komplementäre Sequenz.

2.1.5. Bakterienstämme

| | |
|-----------|----------------------------|
| Top10 | Invitrogen, Karlsruhe |
| XL-1 Blue | Stratagene, La Jolla (USA) |

2.2. Molekularbiologische Methoden

Die Arbeitstechniken der molekularbiologischen Methoden erfolgten nach Standardprotokollen, wie sie in der Literatur zu finden sind (Sambrook *et al.* 1989), bzw. nach Vorgabe der Hersteller. Dazu gehörten:

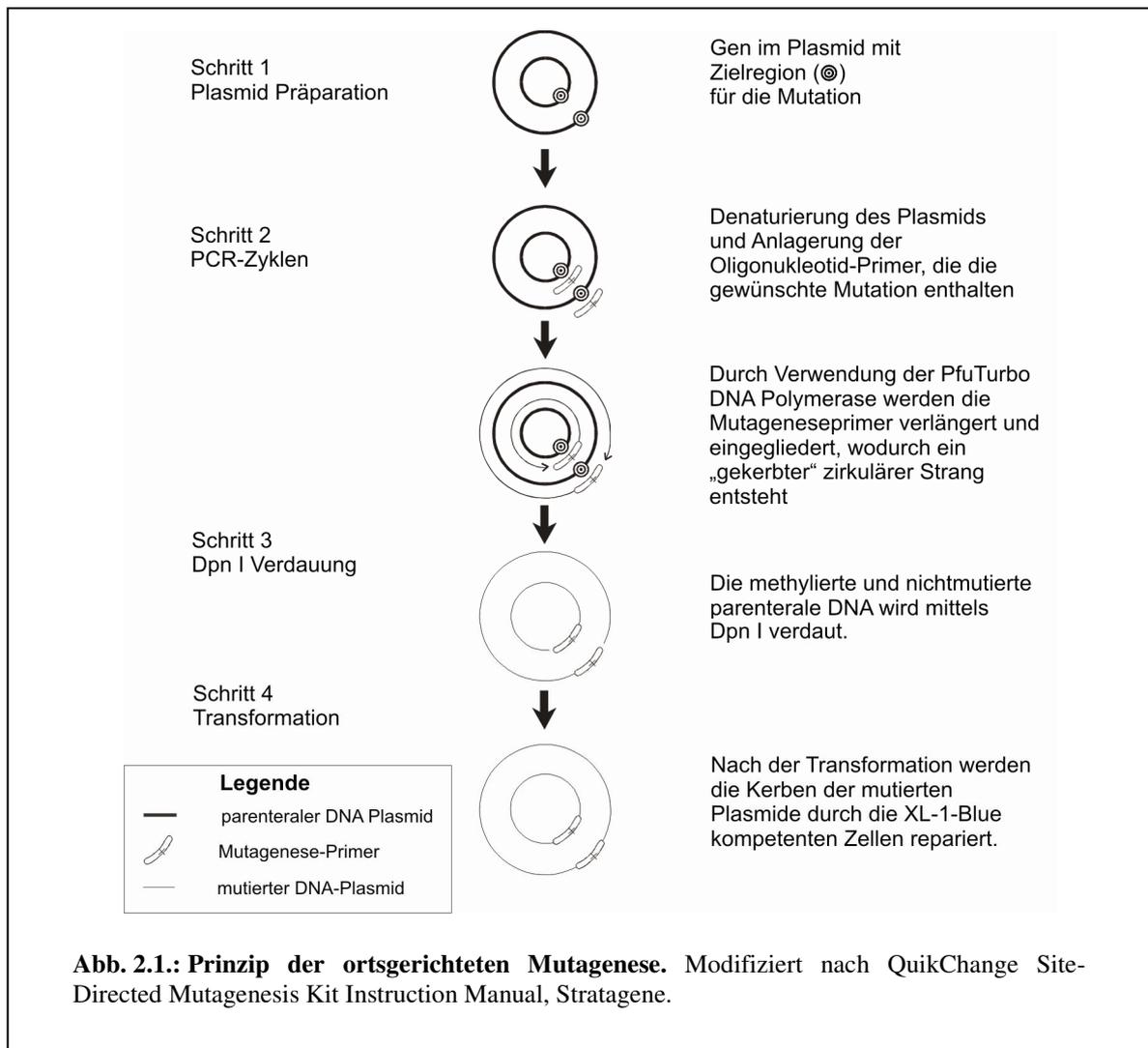
- Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen
- Polymerasekettenreaktionen (PCR)
- Agarosegelelektrophorese
- Reinigung von DNA-Fragmenten
- Ligationen
- Transformation von *E. coli*
- analytische und präparative Plasmidpräparationen

2.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Erzeugung von Punktmutationen und ortsgerechter Mutagenese wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Dabei wurde nach dem Standardprotokoll des Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene vorgegangen. Diese Technik beruht darauf, dass ein methyliertes Plasmid als Mutationsmatrize genutzt wird. Die Primer mit den entsprechenden „mismatch“-Basen setzen an den zu mutierenden Orten an und es wird mittels PfuTurbo DNA Polymerase ein neues mutiertes Plasmid gebildet, das im Unterschied zum ursprünglichen Plasmid nicht methyliert ist. Durch Zugabe der Restriktionsendonuklease Dpn I werden nur die methylierten Stränge des ursprünglichen Plasmids gespalten. Dadurch bleiben nur die mutierten, nicht methylierten Plasmidstränge zurück (Abb. 2.1.).

2.3. Expression der rekombinanten Lipoxygenase

Die Lipoxygenasen wurden zur besseren und schnelleren Reinigung als (His)₆-Tag-Fusionsproteine exprimiert (Abb. 2.2.). Dabei handelt es sich um das Einfügen von 6 zusätzlichen Histidinen an der N-terminalen Aminosäure des Proteins. Diese ermöglichen zum einen die praktische Aufreinigung (2.3.4.) und zum anderen die Identifizierung und Quantifizierung der Enzymexpression mittels Western Blot (2.4.5.). Der Vektor pQE-9 diente hierbei als Expressionsplasmid, da er über einen N-terminalen His-Tag im geeigneten Leserahmen verfügt.



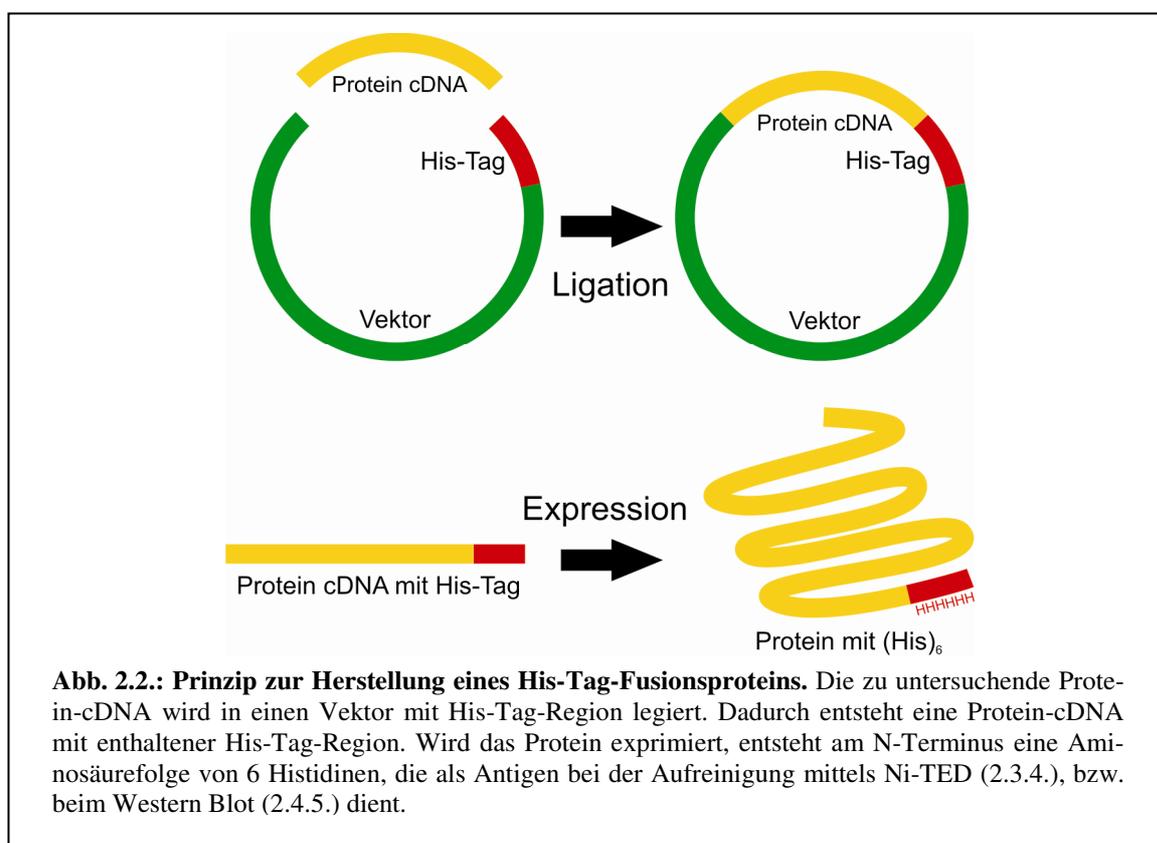
2.3.1. Ligation der Primaten-12/15-Lipoxygenase-cDNA in pQE-9

Die zu verwendende cDNA der beiden Primaten-LOXn lag zunächst im Expressionsvektor pFastBacHTb (*P. pygmaeus*) bzw. pFastBac1 (*M. mulatta*) zwischen den Restriktionsstellen BamHI und XhoI vor. Für beide 12/15-LOXn wurden zunächst zwei Mutationen vorgenommen. Eine interne Hind III-Schnittstelle wurde durch eine stumme Mutation deletiert und eine Sal I-Schnittstelle in den pFastBacHTb-Vektor bzw. pFastBac1-Vektor eingefügt. Anschließend erfolgte eine präparative Restriktionsspaltung, um die 12/15-LOX zwischen Sal I und Hind III aus dem pFastBacHTb-Vektor bzw. pFastBac1-Vektor herauszuschneiden. Im Folgenden wurde die Kaninchen-12/15-LOX in pQE-9 ebenfalls zwischen Sal I und Hind III gespalten, um den Vektor zu präparieren. Mit einer präparativen Agarosegelelektrophorese konnten nun die 12/15-LOXn als Insert und der pQE-9 als Vektor getrennt werden. Die Mengenbestimmung des Inserts

erfolgte mit Hilfe des GIBCO Low DNA Mass Ladder, die des Vektors mit Hilfe des GIBCO High DNA Mass Ladder. Anschließend wurden Insert und Vektor mittels T4 DNA Ligase ligiert.

2.3.2. Transformation des Primaten-12/15-LOX-pQE9-Plasmids

Die Transformation des jeweiligen 12/15-LOX-Plasmids erfolgte in XL-1 Blue kompetenten Zellen. Diese wurden auf LB_{Amp}-Platten (LB-Medium mit Zusatz von 0,1 mg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 5-10 Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und ihre Aktivitäten gemessen (s. 2.4.1). Der Klon mit der höchsten Aktivität wurde zur Kontrolle vollständig sequenziert.



2.3.3. Expression des Enzyms

Die Expression eines aktiven Klons erfolgte je nach weiterem Vorgehen entweder in einem Ansatz von 5 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 0,1 mg/l Ampicillin (LB_{Amp}) oder einem Ansatz vom 18 l LB_{Amp} für die Aufreinigung von Wildtypenzymen oder ausgewählten Mutanten. Die 5 ml-Ansätze dienten vorrangig Aktivitätsbestimmungen der unterschiedlichen Mutanten. Des Weiteren wurden sie für die Bestimmung des Expressionsverhaltens und der sich daraus ergebenden spezifischen Aktivität verwendet. Dabei wurde ein ausgewählter Klon erneut ausplat-

tiert, mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5 ml LB_{Amp} über Nacht bei $37^{\circ}C$ und 180 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Im Anschluss an eine Inkubation von 2 h bei $30^{\circ}C$ wurden die Zellen bei $4^{\circ}C$ für 10 min mit 2.000 rpm abzentrifugiert, anschließend mit PBS gewaschen und die Pellets mit einer Ultraschallsonde (Labsonic, Braun Melsungen) aufgeschlossen. Danach wurden die Proben erneut bei $4^{\circ}C$ für 10 min mit 4.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und von diesem 50 μ l als Aliquot für spätere Western Blot-Untersuchungen abgenommen. Der restliche Überstand wurde entweder bei $-80^{\circ}C$ tiefgefroren oder für Aktivitätsassays (2.4.1.2.) aufgearbeitet. Für kinetische Untersuchungen und Membranbindungsstudien wurden Ansätze von 18 l LB_{Amp} hergestellt. Dafür wurden ausgewählte Klone erneut ausplattiert, gepickt und anschließend Vorkulturen à 100 ml LB_{Amp} inokuliert. Nach 16 h wurden je 5 ml abgenommen, die Enzyminduktion mit IPTG gestartet und nach 2 h bei $30^{\circ}C$ für Aktivitätsassays aufgearbeitet (2.4.1.2.). Aktive Klone wurden nun in 18 l LB_{Amp} bei $37^{\circ}C$ bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,5 inkubiert und die Induktion der Enzymexpression mit IPTG (1 mM) begonnen. Nach 2 h bei $30^{\circ}C$ wurden die Kulturen für 20 min bei $7^{\circ}C$ mit 4.500 rpm abzentrifugiert.

2.3.4. Reinigung der $(His)_6$ -LOX über Nickel-TED

Die Zellpellets wurden in 20 ml PBS resuspendiert und mit zusätzlichen 20 – 25 ml PBS versetzt. Die Proben wurden anschließend durch einen Zellhomogenisator (Emulsiflex C5, Avestin) aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden für 30 min bei $7^{\circ}C$ mit 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 2 ml Ni-TED-Suspension bei $4^{\circ}C$ für 1 h im Überkopf-Schüttler inkubiert. Das für 2 min mit 2.000 rpm abzentrifugierte Ni-TED wurde nun in eine Leersäule überführt, viermal mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend sechsmal mit 700 μ l Elutionspuffer eluiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden daraufhin photometrisch (2.4.1.) auf ihre Aktivität überprüft. Die Enzymreinigung ist auf das Vorliegen einer His-Tag-Region zurückzuführen. Proteine mit einer His-Tag-Region werden spezifisch an Ni-TED gebunden, andere Proteine jedoch nicht. Beim Waschvorgang werden die ungebundenen Fremdproteine herausgewaschen, die Ni-TED-gebundenen Proteine bleiben zurück, bis sie durch den Elutionspuffer aus der Bindung herausgelöst werden. Das Ni-TED interagiert dabei mit dem Imidazol des Elutionspuffers so dass die His-Tag-Fusionsproteine vom Ni-TED verdrängt werden.

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH = 8,0

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH = 8,0

2.3.5. Weitere Reinigung der (His)₆-LOX über Resource Q-Säule

Für die weitere Reinigung der durch Ni-TED vorgereinigten Enzyme wurde eine Resource Q-Säule (Pharmacia Biotech, jetzt GE Healthcare) mittels FPLC (fast protein liquid chromatography) verwendet. Das Prinzip dieser Methode ist die Aufreinigung mittels Anionenaustausch, welche auf der Wechselwirkung zwischen gelösten geladenen Proteinmolekülen und fest gebundenen Matrixbestandteilen beruht, die eine entgegengesetzte Ladung aufweisen. Die chromatographische Matrix liegt in Form eines Gels in einer Säule vor und wird als stationäre Phase bezeichnet. Der erste Schritt ist die Equilibrierung der stationären Phase, bei der die Ladungen der stationären Teilchen durch Ionen mit Gegenladung (z.B. Chlorid oder Natrium) aufgehoben werden. Nun folgt die Auftragung der Probe, bei der sich Proteinmoleküle, die eine entgegengesetzte Ladung tragen, an der stationären Phase binden, während ungeladene oder gleichgeladene Proteine herausgewaschen werden. Im dritten Schritt, der Eluierung, wird die Ladung des Laufmittels kontinuierlich durch die Erhöhung des Salzgehaltes im Laufmittel (z.B. NaCl-Konzentration) erhöht. Dadurch werden die gebundenen Proteine, entsprechend ihrer Anzahl geladener Gruppen, nach und nach aus der stationären Phase herausgewaschen und dadurch separiert. Somit ist eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Ladungszustand möglich.

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. Messung der Lipoxygenaseaktivität

2.4.1.1. Photometrischer Aktivitätsassay

Die photometrischen Messungen wurden am Spektralphotometer UV-160 A (Shimadzu) durchgeführt. Die Aktivität wurde über die zeitabhängige Absorptionzunahme des Reaktionsproduktes (für konjugierte Diene bei 235 nm) bei einer Temperatur von 20°C bestimmt. Der Ansatz bestand aus PBS pH = 7,4, dem Enzym und unterschiedlichen Mengen Substrat (5 – 10 µl von 100 µM Linolsäure bzw. 100 µM Arachidonsäure). Nach Zugabe des Substrats und kurzem Rühren wurde der Absorptionsverlauf gemessen.

2.4.1.2. HPLC-Aktivitätsassay

Die nach Ultraschallaufschluss und Zentrifugation gewonnenen Proben (2.3.3.) wurden nun mit Arachidonsäure als Substrat versetzt (Endkonzentration 125 μM) und für 15 min bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Hydroperoxyverbindungen durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Nach Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure auf etwa $\text{pH} = 3$ wurden 0,5 ml Methanol hinzugefügt, der Ansatz gevortext und bei 12.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die klaren proteinfreien Überstände konnten direkt für die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) verwendet werden.

2.4.2. Produktanalyse

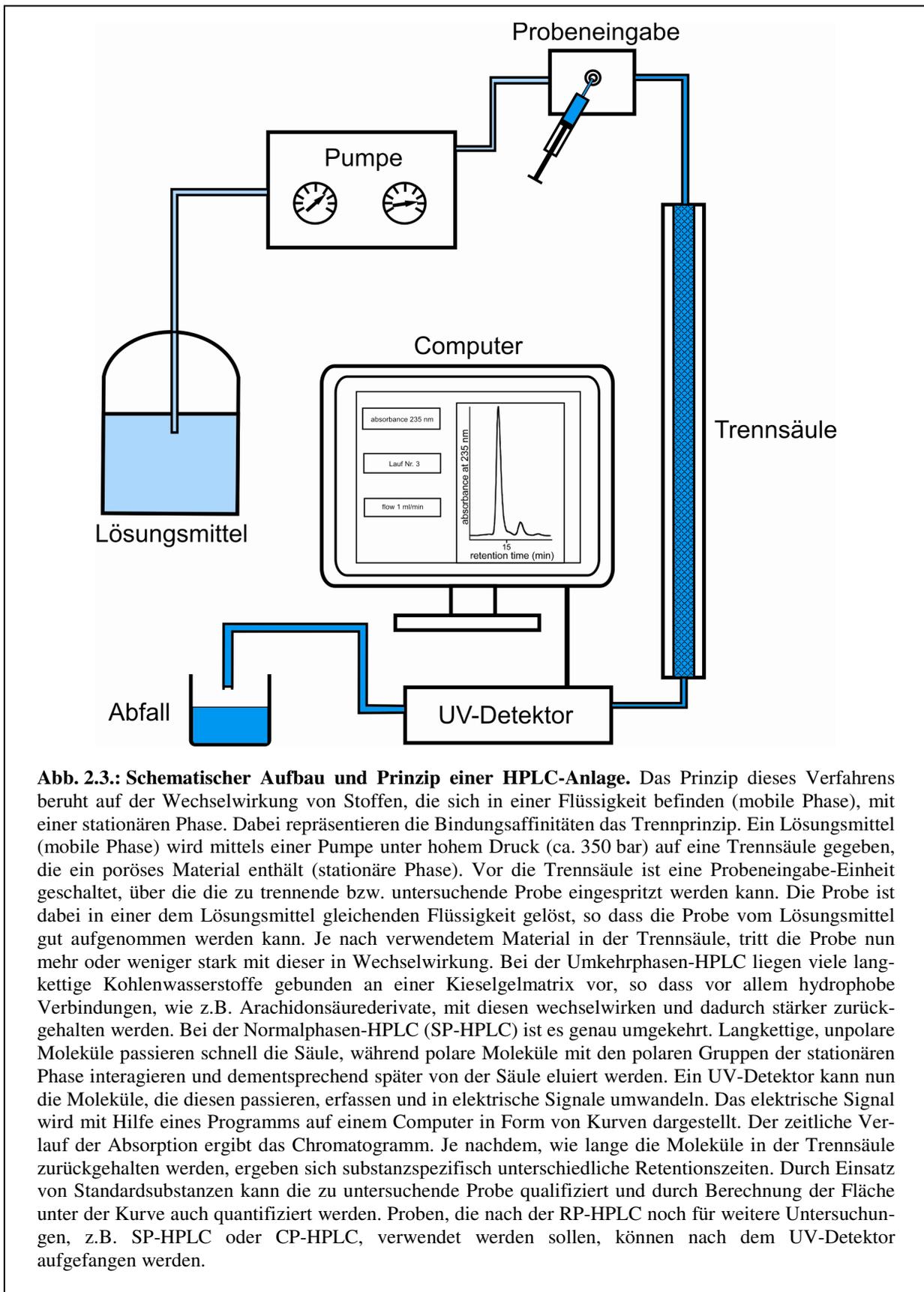
Die nach Umwandlung des Substrats entstandenen LOX-Produkte wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Verfahren (HPLC) untersucht (Abb. 2.3.).

2.4.2.1. Umkehrphasen-HPLC

Die RP-HPLC wurde an einer HP-Chemstation mit einem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Eine Nucleosil C-18 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) diente als Trennsäule mit einer entsprechenden Vorsäule (30 x 4 mm). Das Laufmittel (Lösungsmittel) bestand aus Methanol/Wasser/Essigsäure in einem Verhältnis von 80/20/0,1 bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte beim Extinktionsmaximum der zu untersuchenden Produkte, in den meisten Fällen bei 235 nm für konjugierte Diene (Hydro[peroxy]fettsäuren).

2.4.2.2. Normalphasen-HPLC

Zur weiteren Identifizierung der Reaktionsprodukte, die über Retentionszeit und UV-Spektrum in der RP-HPLC nicht ausreicht, wurden die aufgefangenen Produkte aus der RP-HPLC mittels Vakuumverdampfer getrocknet und anschließend in n-Hexan/0,1 % Essigsäure aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mittels SP-HPLC analysiert. Dabei wurde eine Nucleosil 100-7 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einem SPD-M6A-Detektor (Shimadzu) verwendet. Die Detektion erfolgte ebenfalls bei 235 nm. Das Laufmittel bestand in der Regel aus einem Gemisch von n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure in einem Verhältnis von 100/2/0,1.



2.4.2.3. Chiralphasen-HPLC

Da LOX-Reaktionen stereospezifisch ablaufen – je nach LOX unter Bildung von Produkten in *R*- bzw. *S*-Konfiguration – wurde für die Enantiomeren-Analytik die CP-HPLC verwendet. Dadurch konnte u. a. auch festgestellt werden, ob die Produkte durch Autoxidation oder enzymatische Umwandlung gebildet wurden. Das zur Trockne eingeeengte Produkt aus RP- oder SP-HPLC wurde in *n*-Hexan/0,1 % Essigsäure aufgenommen und der CP-HPLC zugeführt. Die Trennung erfolgte an einer chiralen stationären Phase (Chiralcel OD bzw. OB, 250 x 4,6 mm, Diacel. Chem. Industries, USA) bei einer Flussrate von 2 ml/min in einem Laufmittel unterschiedlicher Zusammensetzung (*n*-Hexan/Isopropanol/Essigsäure 100/2/0,1 oder 100/5/0,1). Die Detektion erfolgte bei 235 nm mit dem SPD-M6A Detektor (Shimadzu). Da beide Enantiomere gleiche Absorptionseigenschaften besitzen, konnte deren Verhältnis direkt aus den Peakflächen berechnet werden.

2.4.3. Proteinbestimmung

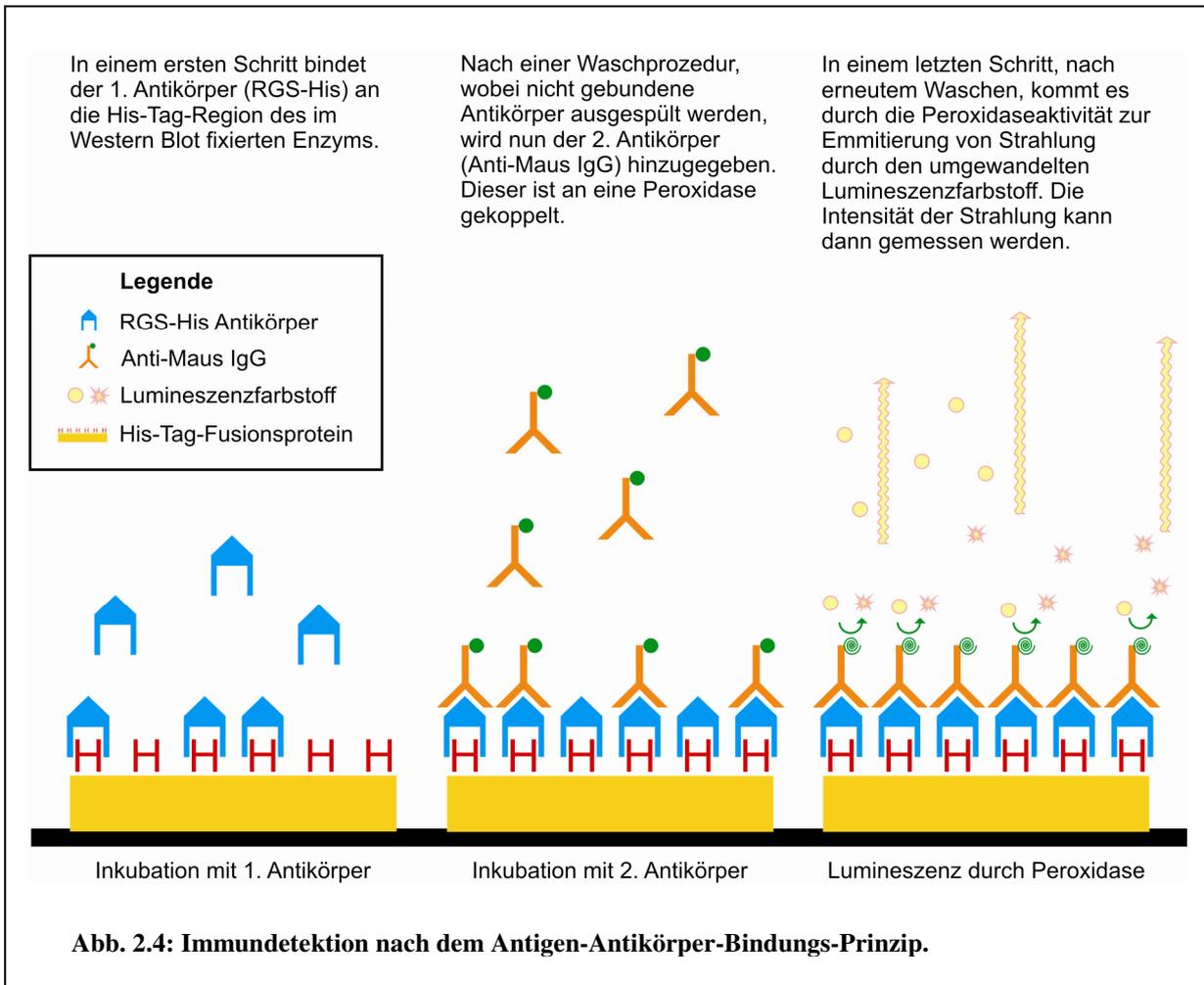
Die Proteinkonzentration wurde mittels Roti-Quant System (Roth, Karlsruhe), basierend auf der Grundlage von Bradford (Bradford 1976), bestimmt. Die Eichung wurde mit verschiedenen BSA-Konzentrationen von 2 mg/ml bis 14 mg/ml vorgenommen.

2.4.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Methode nach Laemmli wurde für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli 1970). Dafür wurden 10 %ige Gele (für MG 16 – 70 kDa) verwendet und die Elektrophorese bei 25 – 30 mA durchgeführt. Das Gel wurde anschließend entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder weiter für einen Immunoblot verwendet.

2.4.5. Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (1 h bei 10 V) geblottet. Anschließend wurde der Blot mit 5 % Magermilch in PBS mit einem Zusatz von 0,1 % TWEEN 20 (PBS_{TWEEN}) blockiert und 1 h mit dem ersten Antikörper (RGS-His [Maus]) blockiert. Nach Waschen mit PBS_{TWEEN} wurde der Blot 1 h mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus IgG) inkubiert. Nach Waschung mit PBS_{TWEEN} und PBS konnte der Blot gefärbt werden (Abb. 2.4.). Hierfür wurde das Western Lightning Chemilumineszenz plus System der Firma Perkin Elmer verwendet.



2.4.6. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Proteinexpression wurde anhand der Bandenintensität aus den Western Blots quantifiziert. Zur Auswertung diente die Software TotalLab TL 100. Durch Auftragung einer definierten Proteinmenge gereinigter His-Tag-LOX konnte die Intensität dieser Bande als Referenzwert genutzt werden. Die Bandenintensität der Wildtypenzyme, bzw. der einzelnen Mutanten wurde anschließend in die Proteinmenge umgerechnet und die Proteinexpression quantifiziert.

2.5. Untersuchungen der Membranbindungseigenschaften von LOXn

2.5.1. Trunkation der N-terminalen Domäne der LOX

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die N-terminale Domäne der Lipoxygenasen auf die Membranbindung besitzt, wurde für jede Primaten-LOX eine Trunktionsmutante hergestellt. Die Mutation erfolgte mittels PCR unter Anwendung der *Taq*-Polymerase, wodurch am 3'-Ende eine Folge überstehender A entsteht. Das PCR-Produkt konnte somit leicht in den TOPO-Vektor

einkloniert und in Top-10 kompetente Zellen transformiert werden. Nach DNA-Präparation erfolgte die präparative Spaltung zwischen Sal I und Hind III und die Gelextraktion der trunkierten LOX-cDNA. Diese wurde nun mit dem pQE-9-Vektor ligiert und konnte als His-Tag-Fusionsprotein exprimiert werden. Die dadurch neu entstandenen Trunkationsenzyme waren N-terminal um 113 Aminosäuren verkürzt.

2.5.2. Membranbindungsassay

Zur Abtrennung von Präzipitationen wurden die gereinigten Enzyme für 10 min bei 4°C mit 20.000 rpm zentrifugiert und anschließend Proben von 1 µg (bzw. 2,5 µg) LOX mit 200 µg submitochondrialen Membranen (Bruchstücke der Mitochondrieninnenmembran) in 50 mM HEPES Puffer pH = 7,4 mit 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT für 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 25 µl). Die Proben wurden nun vorsichtig auf 100 µl Saccharoselösung geschichtet und in einer Beckmann-Tabletop-Zentrifuge für 15 min bei 4°C mit 65.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet enthielt den membrangebundenen Teil der LOX. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und mit 1 µl Ovalbumin-Lösung (Endkonzentration 60 µg/ml), versetzt (bessere Fällbarkeit). Die Zugabe von 20 %iger Trichloressigsäure führte zur Fällung der Proteine und der Ansatz wurde nach 20 min Inkubation auf Eis für 20 min bei 4°C mit 14.000 rpm abzentrifugiert. Beide Pellets (65.000 rpm und 14.000 rpm) wurden nun in 25 µl doppelt konzentriertem Ladungspuffer (Roti-Load) aufgenommen und Aliquots (10 µl) der jeweiligen Pellets wurden für die Elektrophorese in 10 %igem Polyacrylamidgel verwendet. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung mit dem anti-RGS-His Antikörper (2.4.5.). Dadurch konnte der relative Anteil von membrangebundener bzw. nicht gebundener LOX quantifiziert werden.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel 2003 für Windows. In den Ergebnissen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben. Für jede HPLC-Untersuchung von Mutanten wurden mindestens 4 Proben verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Zweistichproben-t-Test für unterschiedliche Varianz. Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$ wurden bei allen Untersuchungen als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression und Charakterisierung von Primaten-12/15-LOXn

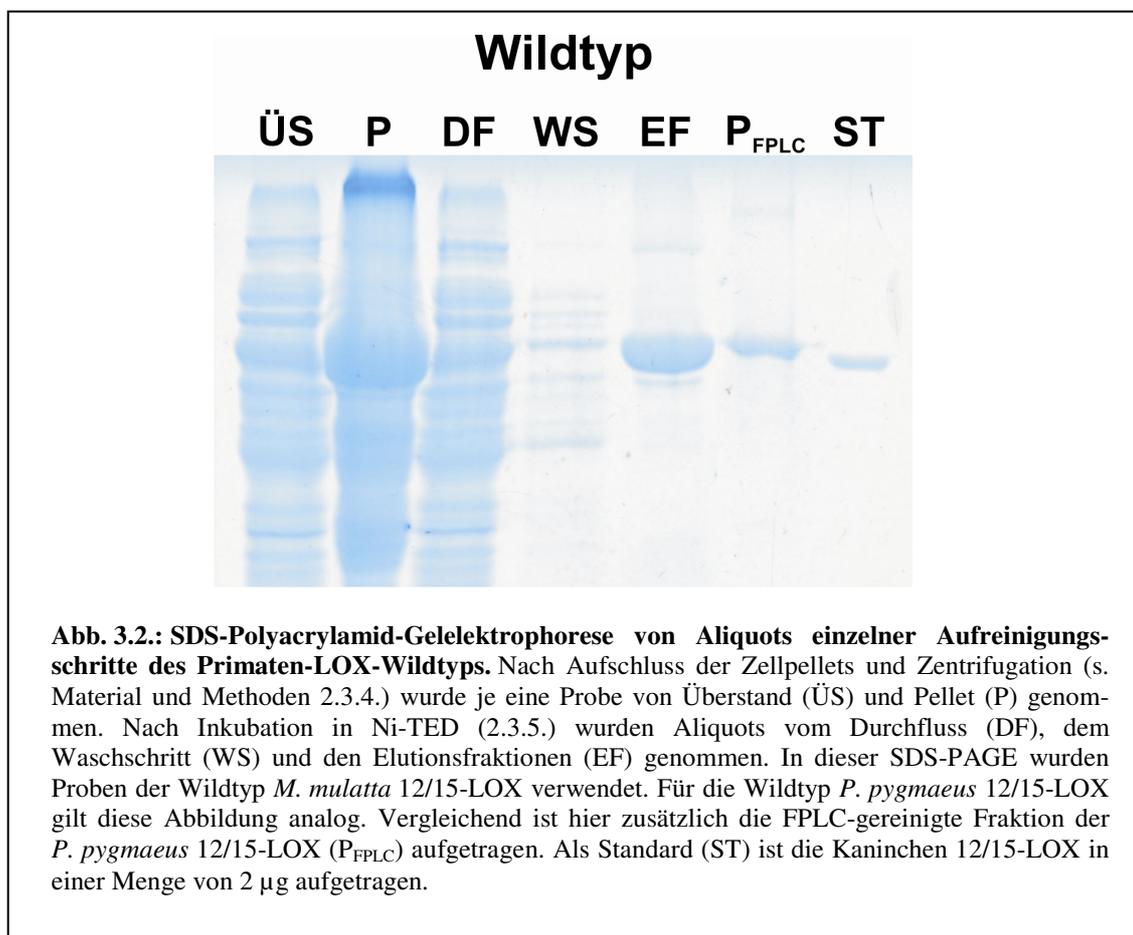
Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Expressionsversuche und der ortsgerichteten Mutagenese der beiden 12/15-LOXn von *Pongo pygmaeus* und *Macaca mulatta* dargestellt werden. Auf Grundlage der Primärstruktur der Kaninchen-12/15-LOX und der humanen 12/15-LOX, welche nach Untersuchungen von Borngräber (Borngräber *et al.* 1996; Borngräber *et al.* 1999) und Sloane (Sloane *et al.* 1991) drei Sequenzdeterminanten für die Reaktionsspezifität beschrieben haben, erfolgte ein partieller Abgleich der Aminosäuresequenz für die Bereiche dieser Determinanten (Abb. 3.1.). Dabei konnte man erkennen, dass die beiden beschriebenen Lipoxygenasen an den kritischen Positionen Aminosäuren mit großen bzw. mittleren Resten besitzen (Phe-353, Ile-418 und Ile-593; Aminosäurenummerierung bezüglich Kaninchen-12/15-LOX). Dadurch wird das Volumen der Substratbindungstasche verkleinert und das C13 der gebundenen Arachidonsäure gelangt in die Nähe des Wasserstoff-abstrahierenden Eisens, was zu einer Oxygenierung am C15 der Arachidonsäure führt. Sowohl die Kaninchen-12/15-LOX, als auch die humane 12/15-LOX wandelten folglich Arachidonsäure vorrangig in 15-H(P)ETE um. Dies ließ erwarten, dass das Verhältnis von 15-H(P)ETE zu 12-H(P)ETE bei der *P. pygmaeus* 12/15-LOX ebenfalls zu Gunsten des 15-H(P)ETE ausfallen würde, da die Aminosäuresequenz der Determinanten für alle drei LOX-Isoformen übereinstimmte (Abb. 3.1.). Im Gegensatz dazu besitzt die 12/15-LOX von *M. mulatta* ein kleineres Valin an Position 417, wohingegen die humane und Kaninchen-12/15-LOX ein Isoleucin besitzen. Daher war auf Grundlage des Triadenkonzeptes (Borngräber *et al.* 1999) anzunehmen, dass diese LOX-Isoform die Bildung von 12-H(P)ETE aus Arachidonsäure favorisiert.

| LOX-Isoform | Borngräber I | Sloane | Borngräber II |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Kaninchen 12/15-LOX | VRSSDFQVHEL 358 | GIFDQIMSTGG 423 | SLQMSIVWQLG 598 |
| Humane 12/15-LOX | VRSSDFQVHEL 357 | GIFDQIMSTGG 422 | SLQMSITWQLG 597 |
| <i>P. pygmaeus</i> 12/15-LOX | VRSSDFQVHEL 357 | GIFDQIMSTGG 422 | SLQMSITWQLG 597 |
| <i>M. mulatta</i> 12/15-LOX | VRSSDFQVHEL 357 | GVFDQVVSTGG 422 | SLQMSITWQLG 597 |

Abb. 3.1.: Auszug aus dem Aminosäureabgleich zwischen unterschiedlichen Säugetierlipoxygenase-Isoformen. Die gezeigten Sequenzabschnitte enthalten die Determinanten, die für die Reaktionsspezifität verantwortlich sind. Lipoxygenasen, die vorrangig am C15 oxidieren (Kaninchen-12/15-LOX, humane 12/15-LOX), tragen größere Aminosäuren an diesen Positionen (Ile und Phe), wohingegen die C12-oxidierende *M. mulatta* 12/15-LOX ein kleineres Valin an einer der Determinanten trägt, was nach dem Triadenkonzept zu einer größeren Bindungstasche führt.

3.1.1. Expression der 12/15-LOX von *Pongo pygmaeus*

Die Expression der 12/15-LOX von *P. pygmaeus* erfolgte als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli*. Das Enzym konnte mittels Affinitätschromatographie über Ni-TED zu einem fast vollständig reinen Protein aufgearbeitet werden (Abb. 3.2.). Das gebildete Enzym oxidierte Arachidonsäure zu 86,0 % in 15-H(P)ETE und zu 14 % in 12-H(P)ETE (Abb. 3.3.). Dieses Ergebnis korreliert mit der Annahme aus dem Aminosäureabgleich, in welchem die Determinanten der humanen und Kaninchen-LOX mit der 12/15-LOX von *P. pygmaeus* übereinstimmen. Die Untersuchung der Reaktionsprodukte mittels Chiralphasen-HPLC nach erfolgter RP-HPLC ergab fast ausschließlich eine *S*-Konfiguration des Hauptprodukts 15*S*-H(P)ETE (Abb. 3.3.).



3.1.2. Expression der 12/15-LOX von *Macaca mulatta*

Der Aminosäureabgleich der Sequenz dieser 12/15-LOX mit der Sequenz der humanen und Kaninchen-LOX zeigte einen Unterschied im Bereich der Sloane-Determinanten (Abb. 3.1.). Dadurch war anzunehmen, dass sich das Verhältnis der Reaktionsprodukte ändern würde. Das in

E. coli exprimierte His-Tag-Fusionsprotein der *M. mulatta* 12/15-LOX konnte nach Affinitätschromatographie über Ni-TED hochgradig aufgereinigt werden (Abb. 3.2.). Die so gebildete Lipoxygenase katalysierte die Oxidation von Arachidonsäure fast ausschließlich zu 12-H(P)ETE (Verhältnis 15-H(P)ETE zu 12-H(P)ETE 0,9 % : 99,1 %). Das Hauptprodukt war nach Quantifizierung mittels Chiralphasen-HPLC ebenfalls hauptsächlich *S*-konfiguriert (Abb. 3.3.).

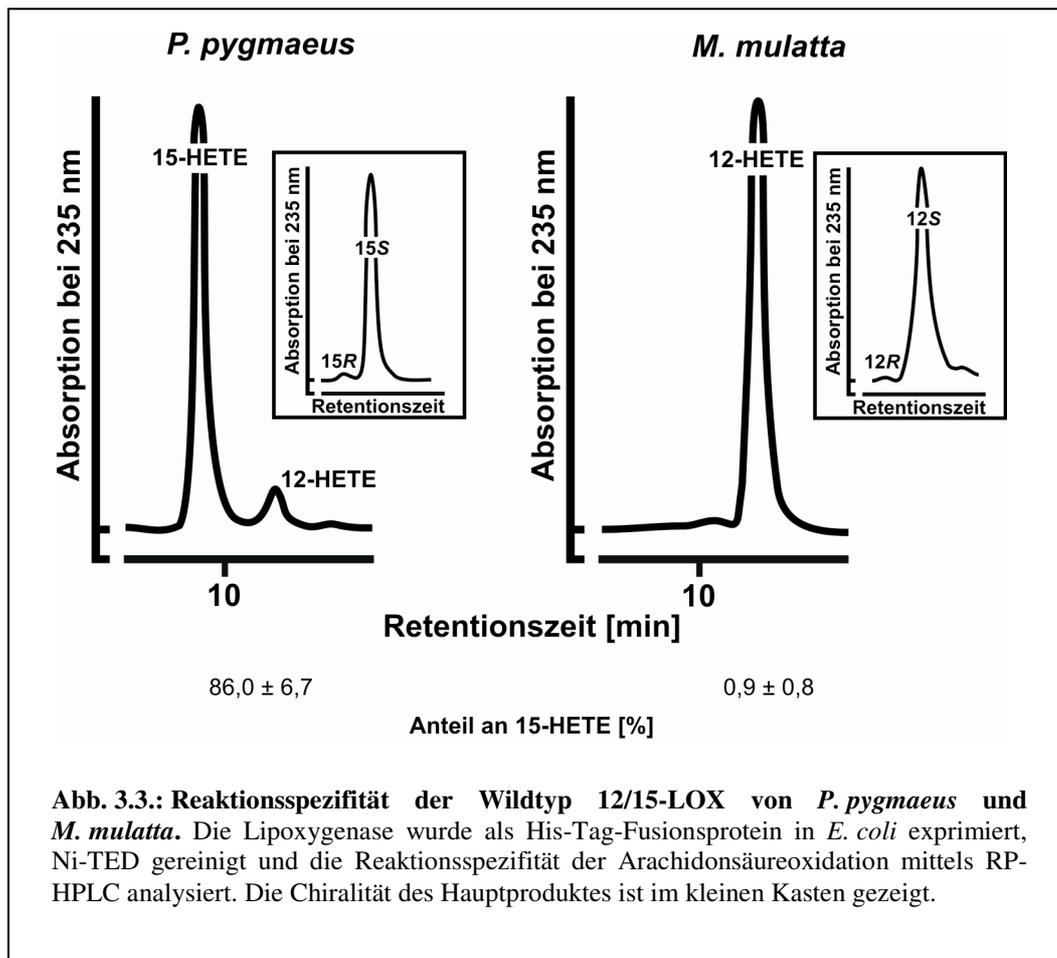


Abb. 3.3.: Reaktionsspezifität der Wildtyp 12/15-LOX von *P. pygmaeus* und *M. mulatta*. Die Lipoxygenase wurde als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, Ni-TED gereinigt und die Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxidation mittels RP-HPLC analysiert. Die Chiralität des Hauptproduktes ist im kleinen Kasten gezeigt.

3.2. Ortsgerichtete Mutagenese und Einfluss auf die Reaktionsspezifität

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Triadendeterminanten auf die Reaktionsspezifität der beiden 12/15-LOXn haben, wurden Mutationen an diesen Stellen durchgeführt. Die jeweiligen Aminosäuren wurden unterschiedlich ausgetauscht, wodurch der Aminosäurerest ein verändertes Volumen erhielt. Unter Annahme des Triadenkonzeptes, nach welchem die Positionen Phe-352, Ile-417 und Ile-592 (Aminosäurenummerierung bezüglich Primaten-12/15-LOXn) den Boden der Bindungstasche bilden und damit deren Größe bestimmen, waren sie auch die Angriffspunkte der ortsgerechten Mutagenese. Zunächst wurden nur einzelne Aminosäuren mutiert und die Reaktionsprodukte der entstandenen Mutanten untersucht. Anschließend erfolgte

die Kombination verschiedener Einzelmutationen zu Doppel- und auch Trippelmutanten. Für beide Primatenlipoxygenasen konnte gezeigt werden, dass die Determinanten, die bei der Kaninchen-12/15-LOX, bzw. der humanen 12/15-LOX die Reaktionsspezifität beeinflussen, auch die Spezifität der Arachidonsäureoxidation dieser beiden 12/15-LOXn verändern.

3.2.1. Mutagenese der 12/15-LOX von *Pongo pygmaeus*

In Anlehnung an das Triadenkonzept führt eine große Bindungstasche vorrangig zur Bildung von Produkten mit C12-Oxidation, wohingegen eine Verkleinerung der Bindungstasche durch Aminosäuren mit großen, sperrigen Seitenketten eher zur Bildung von 15-H(P)ETE führt. Verändert man die Seitenketten der Determinanten nach diesem Prinzip, lässt sich auch die Reaktionsspezifität ändern. Dies konnte für die 12/15-LOX von *P. pygmaeus* gezeigt werden.

3.2.1.1. Untersuchungen von Einzelmutationen

Borngräber I-Determinante

Der Austausch des Phenylalanins in Position 352 (Phe-352) durch ein kleineres Leucin (F352L) veränderte das Verhältnis der Reaktionsprodukte zu Gunsten des 12-H(P)ETE. Der jeweilige Anteil konnte im Vergleich zum Wildtyp annähernd komplett umgekehrt werden und die Produktion an 12-H(P)ETE stieg auf 86,8 % an. Wurde stattdessen ein Valin (F352V), welches noch kleiner als das Leucin ist, eingefügt, so stieg der Anteil an 12-H(P)ETE noch weiter auf 93,7 % (Tabelle 3.1.). Dieser Anstieg war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der Versuch, die Produktion an 12-H(P)ETE durch Einsatz eines kleineren Alanins (F352A) noch weiter zu steigern, führte zu einem fast inaktiven Enzym.

Sloane-Determinanten

Auch Mutationen der Sloane Determinante zeigten erwartungsgemäß eine Veränderung der Reaktionsspezifität. Die Verkleinerung der Seitenkette an Position 417 (Ile-417), durch Austausch des Isoleucins durch ein Alanin (I417A), führte zu einem Enzym, welches vorrangig 12-H(P)ETE produziert (12-H(P)ETE-Anteil: 82,3 %). Als nächstes wurde das benachbarte Met-418 durch ein Valin ersetzt (M418V). Auch hier konnte eine partielle Umkehr der Reaktionsspezifität zu Gunsten der C12-Oxidation gezeigt werden (Tabelle 3.1.).

Borngräber II-Determinante

Mutationen an der Borngräber II-Determinante (Ile-592) ergaben zwar ebenfalls Veränderungen im Oxidationsverhalten des Enzyms, jedoch waren diese weniger stark ausgeprägt als Veränderungen an den anderen beiden Determinanten. Die Substitution durch ein Alanin (I592A) führte zu einer partiellen Konversion der Reaktionsspezifität. Allerdings lag der Hauptanteil der Reaktionsprodukte nach wie vor auf Seiten des 15-H(P)ETE (Tabelle 3.1.). Das Einfügen eines größeren Aminosäurerestes durch ein Phenylalanin (I592F) ergab ein inaktives Enzym. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Borngräber II-Determinante nur eine untergeordnete Rolle für die Reaktionsspezifität der *P. pygmaeus* 12/15-LOX spielt und die Borngräber I- und Sloane-Determinanten eine höhere Priorität besitzen.

Tabelle 3.1.: Reaktionsspezifität der *P. pygmaeus* 12/15-LOX-Einzelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels RP-HPLC analysiert.

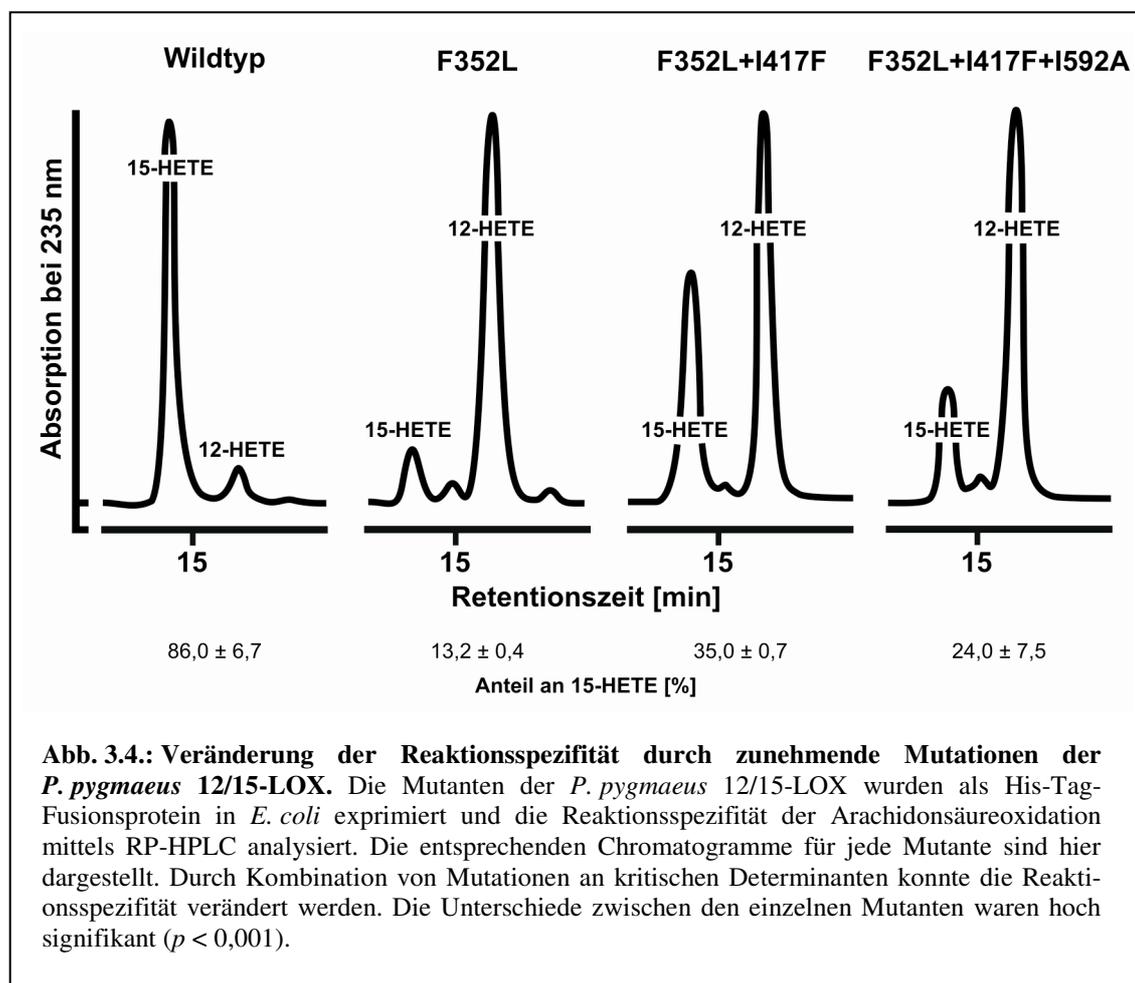
| Determinante | 15-HETE [%] | 12-HETE [%] |
|----------------------|-------------|-------------|
| Wildtyp | 86,0 ± 6,7 | 14,0 ± 6,7 |
| Borngräber I | | |
| F352L | 13,2 ± 0,4* | 86,8 ± 0,4 |
| F352V | 6,3 ± 0,6* | 93,7 ± 0,6 |
| Sloane | | |
| I417A | 17,8 ± 5,7* | 82,3 ± 5,7 |
| M418V | 60,3 ± 3,1* | 39,7 ± 3,1 |
| Borngräber II | | |
| I592A | 59,9 ± 2,9* | 40,1 ± 2,9 |

* $p < 0,001$ verglichen mit dem Wildtyp

3.2.1.2. Untersuchungen von Doppelmutationen

Nachdem die Veränderung der Reaktionsspezifität für Mutationen an einzelnen Sequenzdeterminanten gezeigt werden konnte, wurde nun untersucht, ob diese Effekte durch zusätzliche Mutationen an einer anderen Determinante wieder aufgehoben werden können. Dafür wurden verschiedene Einzelmutanten miteinander kombiniert. Die Mutante F352L führte zu einer kompletten Umkehr der Reaktionsspezifität unter Erhalt eines C12-oxidierenden Enzyms. Fügt man allerdings zusätzlich in die F352L-Mutante ein mehr Platz einnehmendes Phenylalanin an Positi-

on Ile-417 ein (F352L+I417F), so konnte man wieder einen Anstieg des 15-H(P)ETE beobachten. Während der Anteil des 15-H(P)ETE bei der F352L-Mutante bei 13 % lag, stieg er bei der F352L+I417F-Doppelmutante signifikant auf 35 % an ($p < 0,001$) (Abb. 3.4.). Diese Umkehr konnte sogar noch gesteigert werden, wenn statt des Phenylalanins ein größeres Tryptophan eingesetzt wurde (F352L+I417W). Der Anteil des 15-H(P)ETE lag bei dieser Doppelmutante bei $48,4 \pm 1,4 \%$ und war statistisch signifikant ($p < 0,01$). Mutierte man Position Met-418 in der F352L-Mutante, konnte man ebenfalls eine partielle Umkehr in Richtung 15-H(P)ETE-Produktion erkennen, jedoch lag die Restaktivität des entstandenen Enzyms nur noch bei knapp 37 %.



3.2.1.3. Untersuchungen von Trippelmutationen

Nachdem die Umkehr der Reaktionsspezifität in Richtung C12-Oxidation durch die F352L-Mutation durch eine weitere Mutation an Position Ile-417 (F352L+I417F) partiell wieder aufgehoben werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob diesem zweiten Effekt ebenfalls wieder entgegengewirkt werden kann. Dazu wurde die Borngräber II-Determinante (Ile-592) in der

Doppelmutante durch ein kleineres Alanin ausgetauscht, was zur Bildung der Trippelmutante F352L+I417F+I592A führte. Dies verringerte den Anteil an 15-H(P)ETE wieder auf etwa 24 % (Abb. 3.4.). Der Effekt konnte zwar dadurch nicht wieder komplett aufgehoben werden, das Ergebnis zeigt aber, dass die drei Sequenzdeterminanten Phe-352, Ile-417 und Ile-592 in ihrer dreidimensionalen Struktur räumlich miteinander interagieren und Einfluss auf die Reaktionsspezifität dieser Lipoxygenase nehmen.

Damit bestätigen diese Mutageneseuntersuchungen, die Anwendbarkeit des Triadenmodells auf die Reaktionsspezifität der *P. pygmaeus* 12/15-LOX.

3.2.2. Mutagenese der 12/15-LOX von *Macaca mulatta*

Die Expression der *M. mulatta* 12/15-LOX ergab ein Enzym, welches fast ausschließlich 12-H(P)ETE bildet. Dies war aus dem Aminosäureabgleich und dem Valin an Position 417 und 418 zu erwarten, wenn man das Triadenmodell als Grundlage für die Reaktionsspezifität betrachtet. Aus den Erfahrungen, die aus Mutageneseuntersuchungen der Kaninchen-12/15-LOX und, wie oben beschrieben, aus denen der *P. pygmaeus* 12/15-LOX hervorgingen, sollte nun überprüft werden, ob die Reaktionsspezifität der *M. mulatta* 12/15-LOX durch Mutagenese der Sequenzdeterminanten ebenfalls veränderbar ist. Da der Wildtyp zu etwa 99 % 12-H(P)ETE bildet, bestand das Ziel vorrangig darin, das Enzym zur Bildung von 15-H(P)ETE zu bringen. Dies wurde durch Einsatz größerer Seitenketten an den Sequenzdeterminanten versucht.

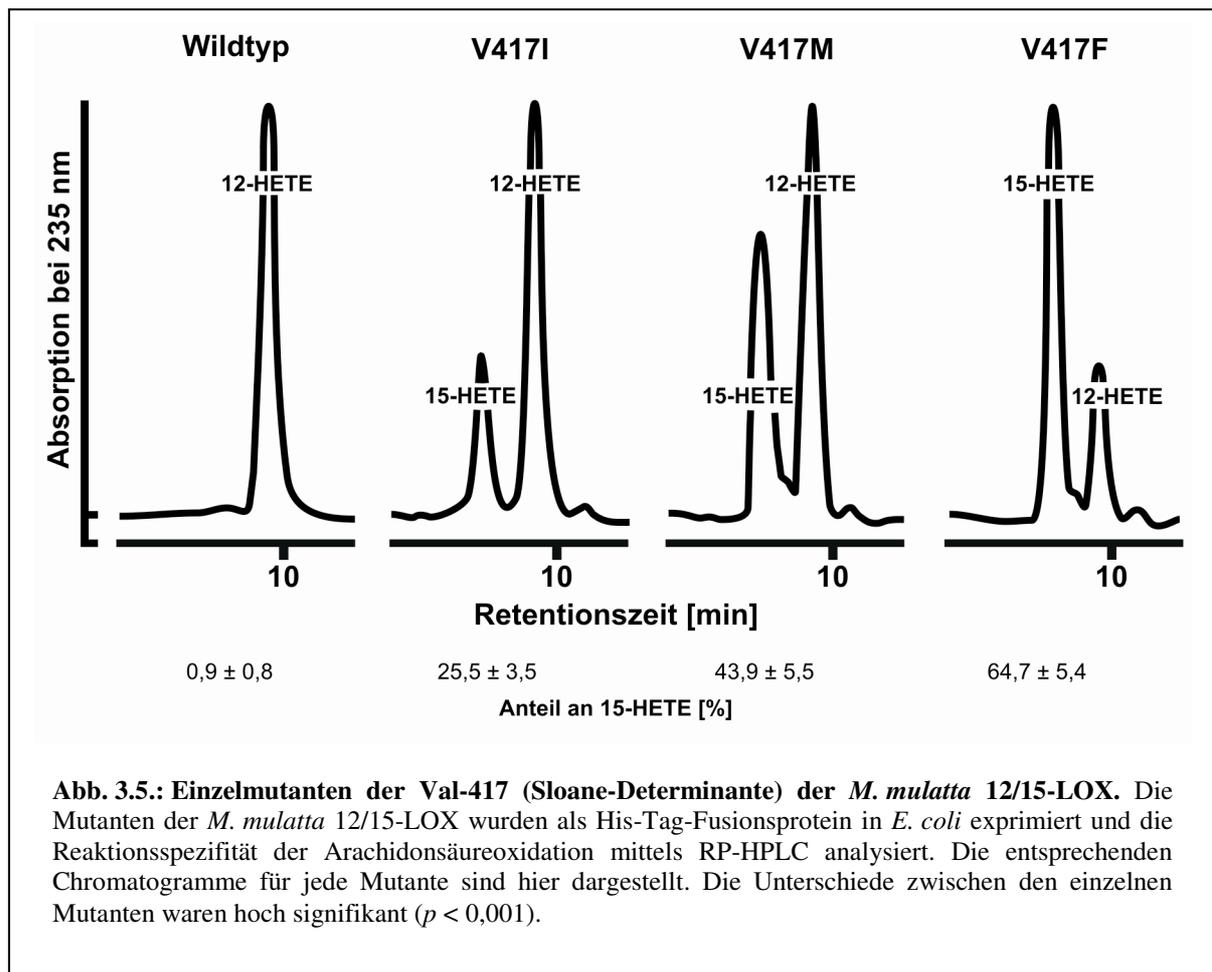
Borngräber I-Determinante

Um das Volumen der Bindungstasche weiter zu verkleinern und die Oxidation am C15 zu provozieren, wurde Phe-352 durch ein größeres Tryptophan ersetzt. Dies führte jedoch nur zu einer geringen Veränderung der Reaktionsprodukte. Der Anteil an 15-H(P)ETE stieg lediglich gering an ($1,8 \pm 0,7$ %), war jedoch im Vergleich zum Wildtyp ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,12$).

Sloane-Determinante

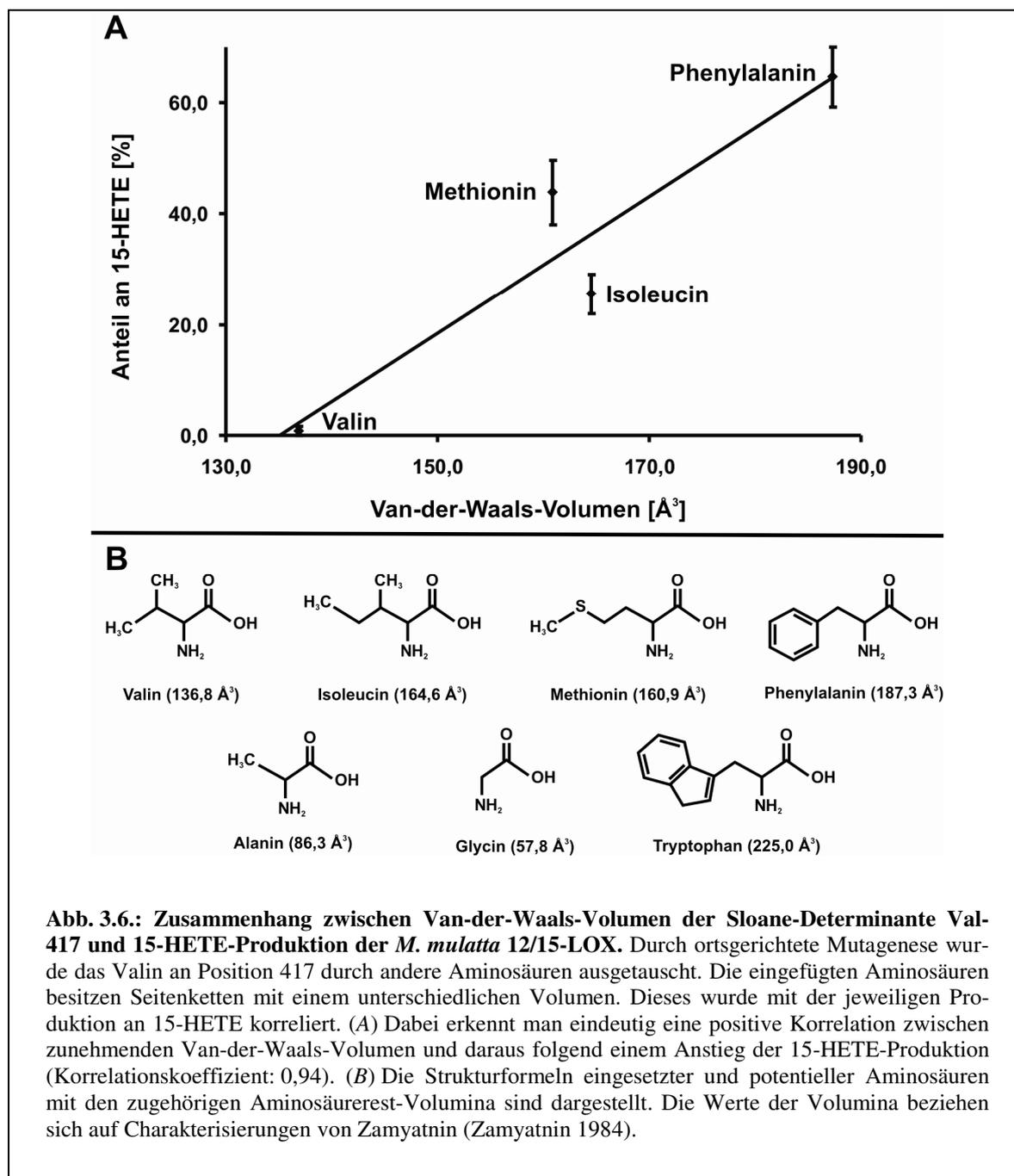
Betrachtet man die drei Sequenzdeterminanten Phe-353, Ile-418 und Ile-593 der Kaninchen-12/15-LOX und vergleicht sie mit der Aminosäuresequenz der *M. mulatta* 12/15-LOX, so fällt auf, dass sich anstelle des Ile-417 ein Valin in der *M. mulatta* 12/15-LOX befindet (Abb. 3.1.). Dieses hat eine kleinere Seitenkette als das bei den anderen bisher untersuchten Lipoxygenasen vorkommende Isoleucin. Daher war zu vermuten, dass diese Position für die Reaktionsspezifität der *M. mulatta* 12/15-LOX verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass die Substi-

tution durch ein Isoleucin den Anteil an 15-H(P)ETE auf 25 % steigert. Diese Veränderung konnte noch weiter verstärkt werden, je größer die Aminosäure an Position 417 wurde (Abb. 3.5.). Durch den Einsatz eines Methionins (V417M) stieg der Anteil an 15-H(P)ETE auf 44 %. Die Mutante V417F erbrachte sogar zu 65 % 15-H(P)ETE als Reaktionsprodukt, wodurch die Reaktionsspezifität von einem vorrangig C12-oxidierenden zu einem C15-oxidierenden Enzym umgekehrt werden konnte. Diese Veränderungen, die zu einem stetigen Anstieg der 15-H(P)ETE-Produktion führten, waren verglichen mit den einzelnen Mutanten hoch signifikant ($p < 0,001$).



Da anzunehmen ist, dass die vermehrte Bildung an 15-H(P)ETE auf die Verkleinerung der Substratbindungstasche zurückzuführen ist, wurden die spezifischen Volumina der Aminosäurereste mit der 15-H(P)ETE-Produktion korreliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass je größer das Aminosäurerest-Volumen der entsprechenden Aminosäure war, desto größer war auch der Anteil an 15-H(P)ETE. Der Korrelationskoeffizient von 0,94 wies dabei einen starken Zusammenhang nach (Abb. 3.6.). Verfolgte man das Vorgehen, die 15-H(P)ETE-Produktion zu steigern, indem man die Bindungstasche durch Einfügen größerer Aminosäuren verkleinert, so war zu erwarten,

dass ein Tryptophan (Seitenketten-Volumen: 225 \AA^3) an Position 417 den größten Effekt erzielen würde. Interessanterweise führte diese Mutante (V417W) nur zu einer geringen Steigerung der 15-H(P)ETE-Produktion. Der Anteil an 15-H(P)ETE stieg nur auf $7,1 \pm 4,1 \%$ an. Dies war im Vergleich zum Wildtyp zwar signifikant ($p < 0,01$), allerdings war diese Mutante ebenfalls ein hauptsächlich C12-oxidierendes Enzym.



Dennoch kann damit eine Korrelation zwischen zunehmendem Aminosäurerest-Volumen und steigender 15-H(P)ETE-Produktion nicht unbedingt widerlegt werden, da ohne genaue Dar-

stellung der Raumstruktur die Orientierung der Seitenkette im Raum nicht bestimmt werden kann. Es ist daher möglich, dass sich die Seitenkette des Tryptophans in der Bindungstasche der Lipoxygenase derart orientiert, dass trotz ihrer Größe genügend Platz vorhanden ist. Die Arachidonsäure könnte dennoch tiefer in die Bindungstasche eindringen und eine vorrangige C12-Oxidation dadurch zu Stande kommen.

Borngräber II-Determinante

Betrachtet man das Triadenmodell als Grundlage für die Reaktionsspezifität, so müsste ein größerer Aminosäurerest an Position Ile-592 die Bildung von 15-H(P)ETE provozieren. Jedoch zeigten sich kaum Veränderungen der Produktverhältnisse nach Mutationen dieser Art. Die I592F-Mutante erbrachte weder große Unterschiede im Verhältnis der Reaktionsprodukte verglichen mit dem Wildtyp (I592F Anteil 12-H(P)ETE $99,7 \pm 0,2 \%$), noch waren diese von statistischer Signifikanz ($p = 0,22$). Die Substitution mit einem Tryptophan ergab zwar einen signifikanten, allerdings auch nur sehr geringen Anstieg des 15-H(P)ETE auf $2,8 \pm 1,4 \%$, $p < 0,01$).

Für die *M. mulatta* 12/15-LOX konnten diese Mutageneseuntersuchungen zeigen, dass das Triadenmodell angewendet werden kann. Allerdings gibt es Unterschiede in der Bedeutung der drei Sequenzdeterminanten für die Reaktionsspezifität der Lipoxygenase. Dabei muss der Sloane-Determinante die größte Bedeutung zugeschrieben werden und die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Mutationen an Position 417 die Reaktionsspezifität der Lipoxygenase verändern können. Es wird allerdings auch deutlich, dass die Borngräber-Determinanten (Phe-352 und Ile-592) eher einen geringen Anteil an der Reaktionsspezifität der *M. mulatta* 12/15-LOX besitzen.

| LOX-Isoform | | Sequenz | |
|-------------|-------------|----------------------------|-----|
| Kaninchen | 15(S)-LOX-1 | I N V R A R N G L V | 409 |
| Humane | 15(S)-LOX-2 | I N T L A R E L L I | 421 |
| Humane | 12(R)-LOX | I N S I G R A V L L | 446 |
| Maus | 12(R)-LOX | I N S I G R A L L L | 446 |
| P. pygmaeus | 12/15-LOX | I N V R A R T G L V | 408 |
| M. mulatta | 12/15-LOX | I N V R A R T Q L I | 408 |

Abb. 3.7.: Aminosäureabgleich ausgewählter Lipoxygenase-Isoformen. Die kritische Aminosäure, auf der das A-zu-G-Konzept beruht, ist hier hervorgehoben. Nach diesem Modell führt ein Alanin an dieser Position zu einer Arachidonsäureoxidation in S-Konfiguration, ein Glycin stattdessen zu einer R-Konfiguration.

3.3. Einfluss von A-zu-G-Mutationen auf die Reaktionsspezifität

Untersuchungen von verschiedenen Lipoxygenase-Isoformen ergaben, dass ein Ala-zu-Gly-Austausch an einer kritischen Position der Primärstruktur zu deutlichen Veränderungen der Positions- und Enantioselektivität von Lipoxygenasen führt. Der Aminosäureabgleich von verschiedenen Lipoxygenasen, die vorrangig Reaktionsprodukte in *S*-Konfiguration bilden, zeigte dabei, dass diese über ein Alanin an dieser Position verfügen, *R*-Lipoxygenasen besitzen stattdessen ein Glycin (Abb. 3.7.). Durch A-zu-G-Mutationen bei *S*-Lipoxygenasen an dieser Stelle ließ sich diese in eine *R*-Lipoxygenase konvertieren. Umgekehrtes funktionierte auch für *R*-Lipoxygenasen, deren Glycin durch ein Alanin substituiert wurde (Coffa und Brash 2004). Für die beiden 12/15-Lipoxygenasen von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* ergab der Aminosäureabgleich, dass das Alanin an Position 403 (Ala-403) diese kritische Determinante ist. Dementsprechend wurde auch eine *S*-Konfiguration für die Reaktionsprodukte erwartet. Dies konnte durch die Expression der Wildtypenzyme (3.1.1 und 3.1.2.) auch bestätigt werden. In Anlehnung an die Ergebnisse von Coffa und Brash erwartete man eine Konvertierung zu einer *R*-Lipoxygenase, wenn man das Alanin an Position 403 durch ein Glycin ersetzt. Überraschenderweise produzierten diese Mutanten dieselben Hauptprodukte wie die jeweiligen Wildtypenzyme, allerdings änderte sich die Reaktionsspezifität unter Bildung der Nebenprodukte 11*R*-HETE bzw. 8*R*-HETE.

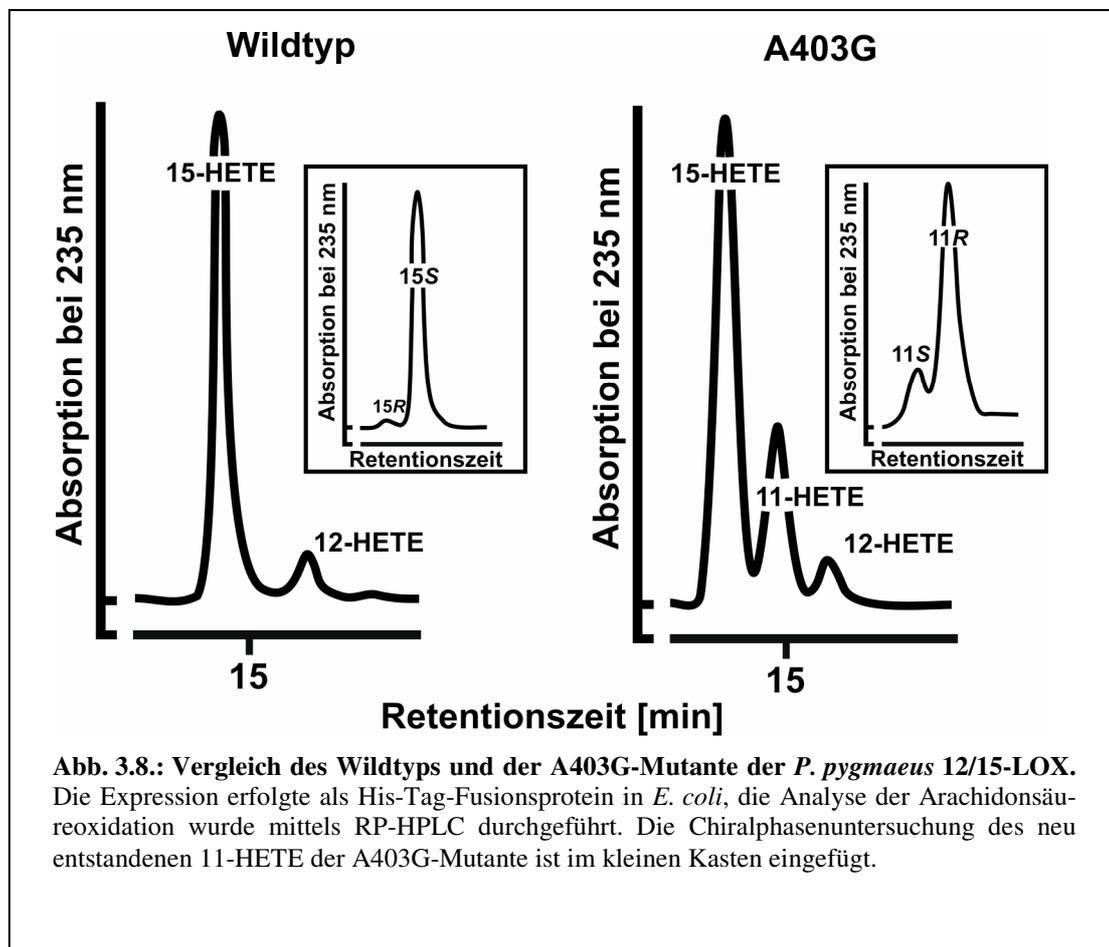
3.3.1. A-zu-G-Mutation der 12/15-LOX von *Pongo pygmaeus*

Der Wildtyp dieser 12/15-LOX produziert hauptsächlich 15-H(P)ETE ($86,0 \pm 0,7 \%$) und als Zweitprodukt 12-H(P)ETE. Durch die Mutation des Ala-403 und Substitution durch ein Glycin war die C15-Oxidation zwar immer noch die vorrangige Reaktion, jedoch stieg der Anteil an 11-H(P)ETE signifikant auf 25 % an. Analysen mittels Chiralphasen-HPLC zeigten dabei eine *R*-Konfiguration für das neu entstandene Produkt. Das Hauptprodukt 15-H(P)ETE war wie beim Wildtyp *S*-konfiguriert (Abb. 3.8.).

3.3.2. A-zu-G-Mutation der 12/15-LOX von *Macaca mulatta*

Wie Voruntersuchungen zeigten, verändern sich die Reaktionsprodukte von 8*R*-Lipoxygenasen dahingehend, dass der Anteil an 12*S*-HETE steigt, wenn das Glycin an der Determinante durch ein Alanin substituiert wird (Coffa und Brash 2004). Umgekehrt müsste demnach eine A-zu-G-Mutation einer 12*S*-Lipoxygenase den Anteil an 8*R*-HETE steigern. Da die *M. mulatta* 12/15-LOX vorrangig 12*S*-HETE bildet, dürfte sich für diese Lipoxygenase ebenfalls der Anteil an 8*R*-HETE erhöhen. Tatsächlich stieg die 8*R*-HETE-Produktion der A403G-

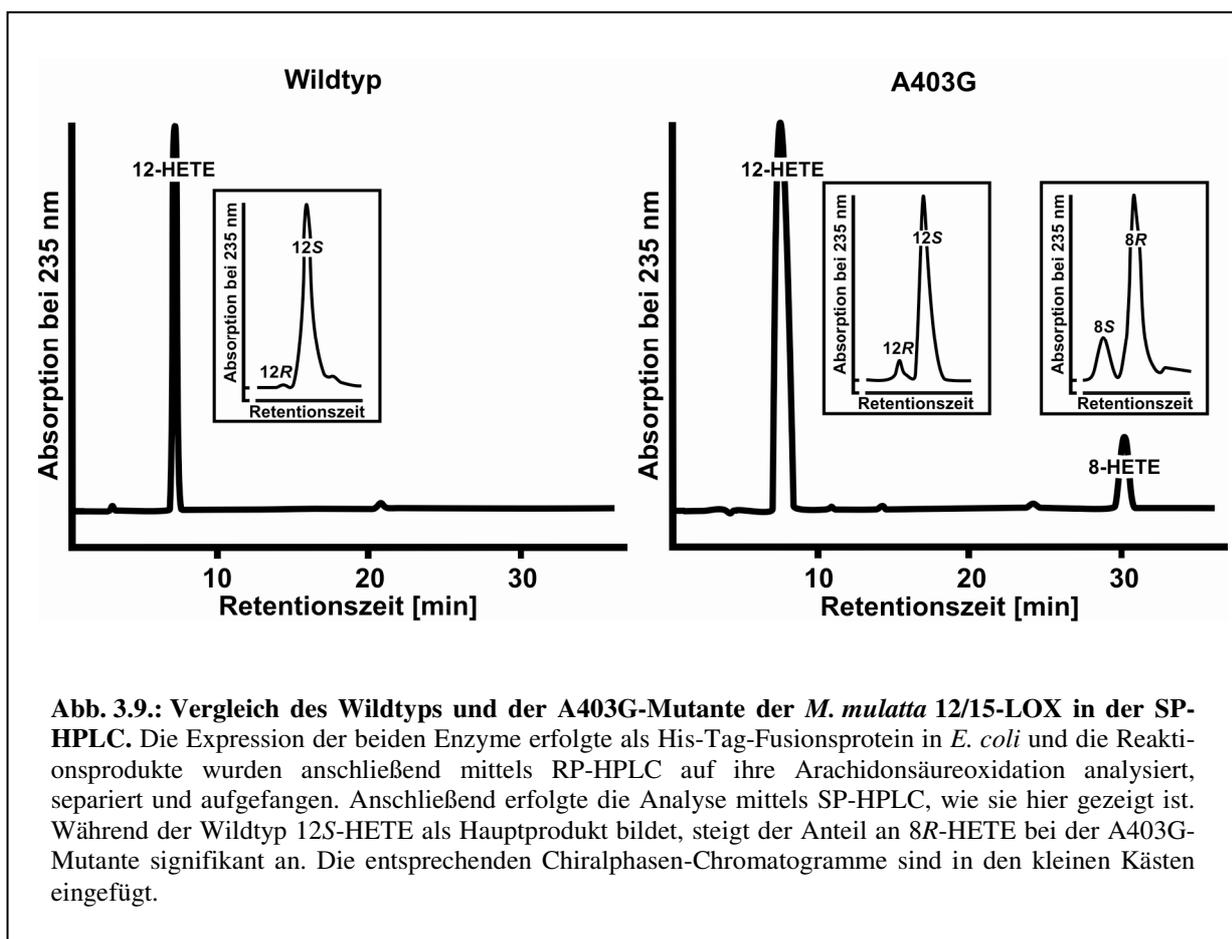
Mutante an, allerdings nur sehr gering auf 14 %. Das Hauptreaktionsprodukt war weiterhin 12S-HETE (Abb. 3.9).



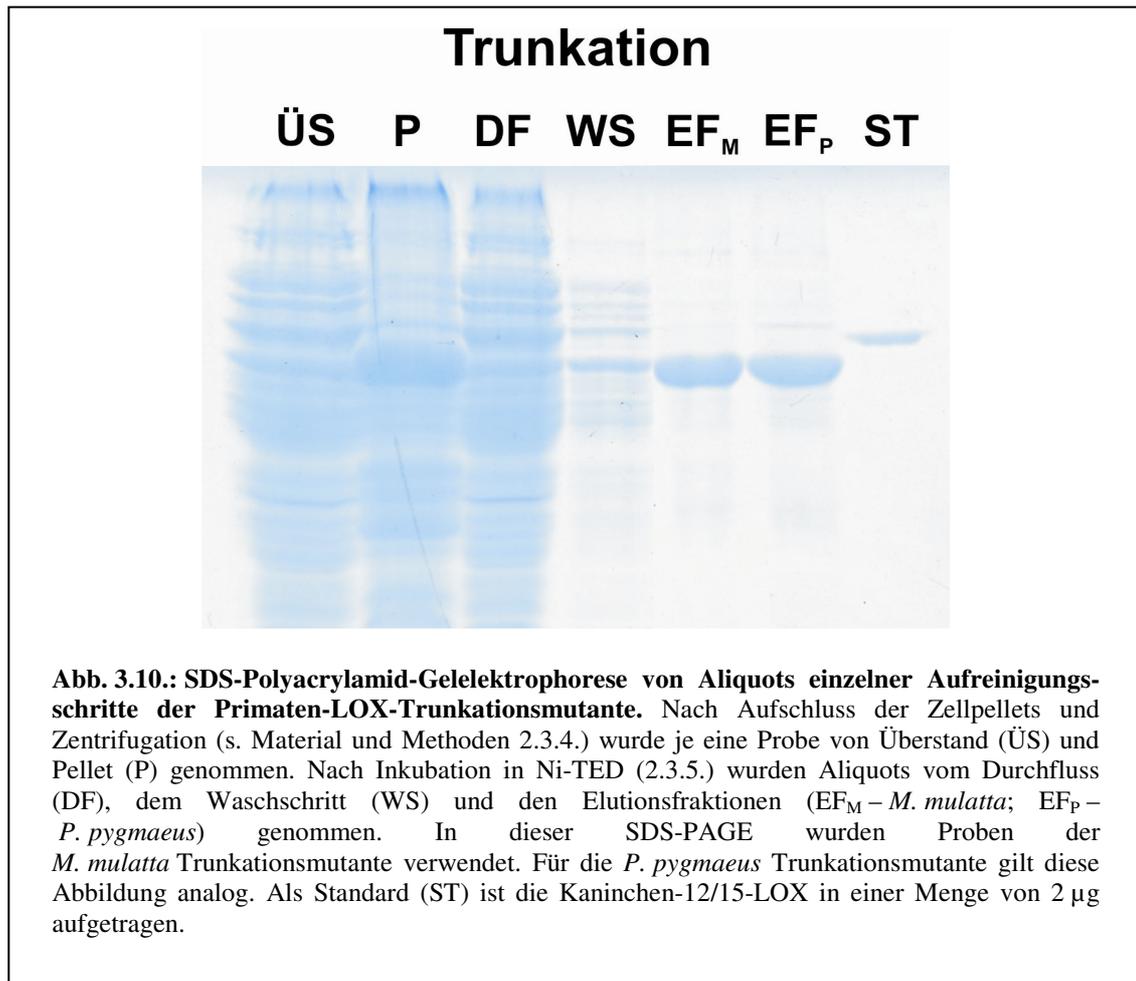
3.4. Trunkationsexperimente und Membranbindungsstudien

Röntgenstrukturanalysen der Kaninchen-12/15-LOX ergaben, dass dieses Enzym aus einer etwa 12 kDa großen N-terminalen β -Faltblattdomäne und einer etwa 63 kDa großen C-terminalen Domäne besteht. Der C-terminalen Domäne wird dabei die katalytische Aktivität zugeschrieben, da sie das katalytisch aktive Nicht-Häm-Eisen und die Substratbindungstasche besitzt (Gillmor *et al.* 1997). Untersuchungen über den Einfluss einer Deletion der NH₂-terminalen Domäne auf die katalytische Aktivität dieses Enzyms zeigten, dass die Trunktionsmutante ebenfalls katalytisch aktiv ist und die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte mit denen des Wildtyps annähernd identisch waren (Walther *et al.* 2002). Für die 5-Lipoxygenasen scheint dies nicht zuzutreffen. Entfernte man bei dieser Lipoxygenase die N-terminale Domäne, so verlor das Enzym seine katalytische Aktivität (Chen und Funk 2001). Dies kann unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die N-Terminale eine Ca²⁺-bindende Region besitzt und

Calcium für die Aktivität der 5-Lipoxygenase essentiell ist (Hammarberg *et al.* 2000). Außerdem beeinflusst die Membranfluidität die katalytische Aktivität dieser Lipoxygenase, wobei die Aktivität mit steigendem Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der Membran ansteigt (Pande *et al.* 2005). Des Weiteren scheint die N-terminale Domäne teilweise für die Bindung an Biomembranen verantwortlich zu sein, da Untersuchungen zur Kaninchen-12/15-LOX, bei denen die N-Terminale entfernt wurde, eine geringere Membranbindung aufwiesen verglichen mit dem Wildtypenzym (Walther *et al.* 2002). Für die 5-LOX scheint die N-terminale Domäne essentiell für die Membranbindung zu sein, was aus Untersuchungen zur Kernmembrantranslokation hervorgeht (Chen und Funk 2001).



Auf Grundlage dieser Ergebnisse zu Trunktationsversuchen einer Säugetierlipoxygenase sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss eine Deletion der N-terminalen Domäne bei den beiden 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* besitzt. Mittels PCR wurden die beiden Enzyme mutiert und N-terminal jeweils um 113 Aminosäuren verkürzt. Die dadurch nur noch den C-Terminus enthaltene Trunktationsmutante wurde als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und konnte nach Affinitätschromatographie über Ni-TED hochgradig aufgereinigt werden (Abb. 3.10.).



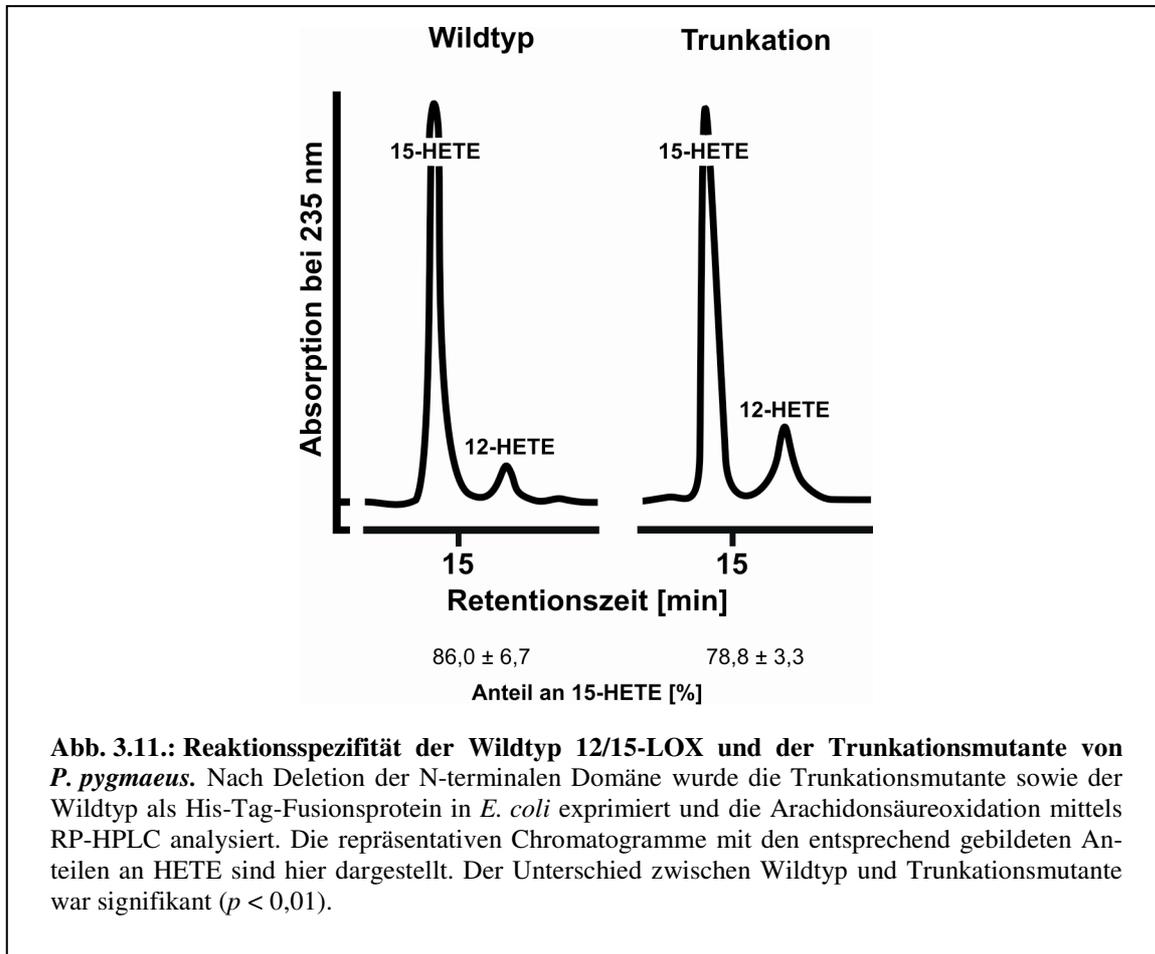
3.4.1. Einfluss der Deletion der N-terminalen Domäne auf die katalytische Aktivität

Aus den Ergebnissen zu Trunkationsexperimenten der Kaninchen-12/15-LOX konnte man erwarten, dass sich die Reaktionsspezifität des trunkierten Enzyms für die 12/15-LOX von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* kaum verändert, da die katalytische Aktivität vor allem dem C-Terminus zugeschrieben wird. Beide Trunkationsmutanten sind katalytisch aktiv und favorisierten die Oxidierung desselben C-Atoms wie der jeweilige Wildtyp, d. h. der C-Terminus der *P. pygmaeus* 12/15-LOX produzierte hauptsächlich 15-H(P)ETE, der C-Terminus der *M. mulatta* 12/15-LOX vorrangig 12-H(P)ETE. Allerdings zeigte sich eine Veränderung im Verhältnis der Reaktionsprodukte.

Katalytische Aktivität der *P. pygmaeus* Trunkationsmutante

Die Trunkationsmutante von *P. pygmaeus* favorisierte wie die Wildtyp 12/15-LOX die Oxidierung des C15-Atoms. Interessanterweise stieg aber der Anteil des Nebenproduktes 12-

H(P)ETE bei dieser Mutante signifikant an, was zu einer Verringerung des 15-H(P)ETE auf 78,8 % führte (Abb. 3.11.). Die Chiralität des Hauptproduktes änderte sich erwartungsgemäß nicht und war wie beim Wildtyp *S*-konfiguriert.



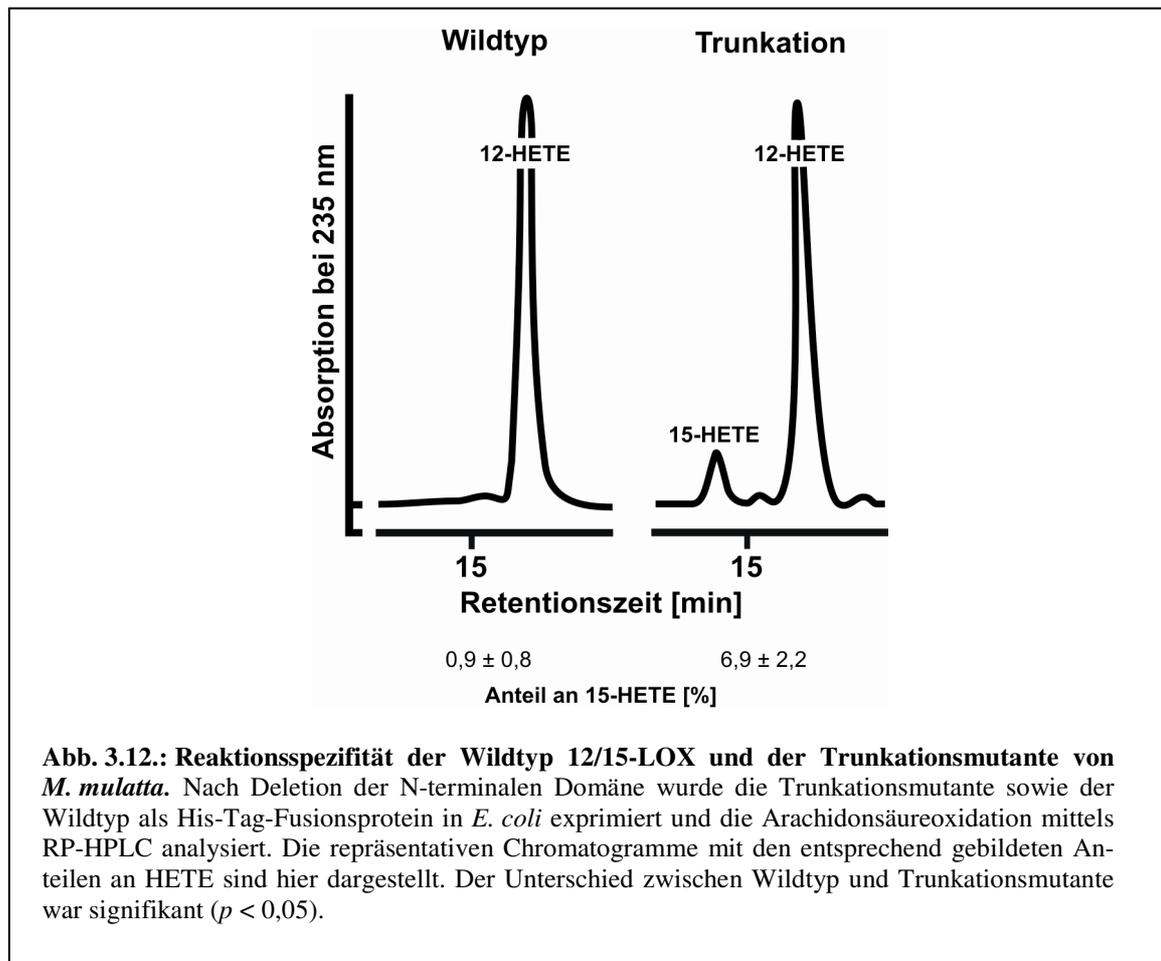
Katalytische Aktivität der *M. mulatta* Trunktionsmutante

Wie der Wildtyp dieser 12/15-LOX favorisierte auch die Trunktionsmutante von *M. mulatta* die Arachidonsäureoxidierung zu 12-H(P)ETE. Dieses Reaktionsprodukt war in seiner Chiralität ebenfalls *S*-konfiguriert. Allerdings stieg auch bei dieser Mutante die Produktion des Nebenproduktes 15-H(P)ETE an, wodurch der Anteil an 12-H(P)ETE nur noch 93,1 % betrug. Diese, wenn auch geringe, Veränderung in der Reaktionsspezifität war statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 3.12.).

3.4.2. Einfluss der Deletion der N-terminalen Domäne auf die Membranbindung

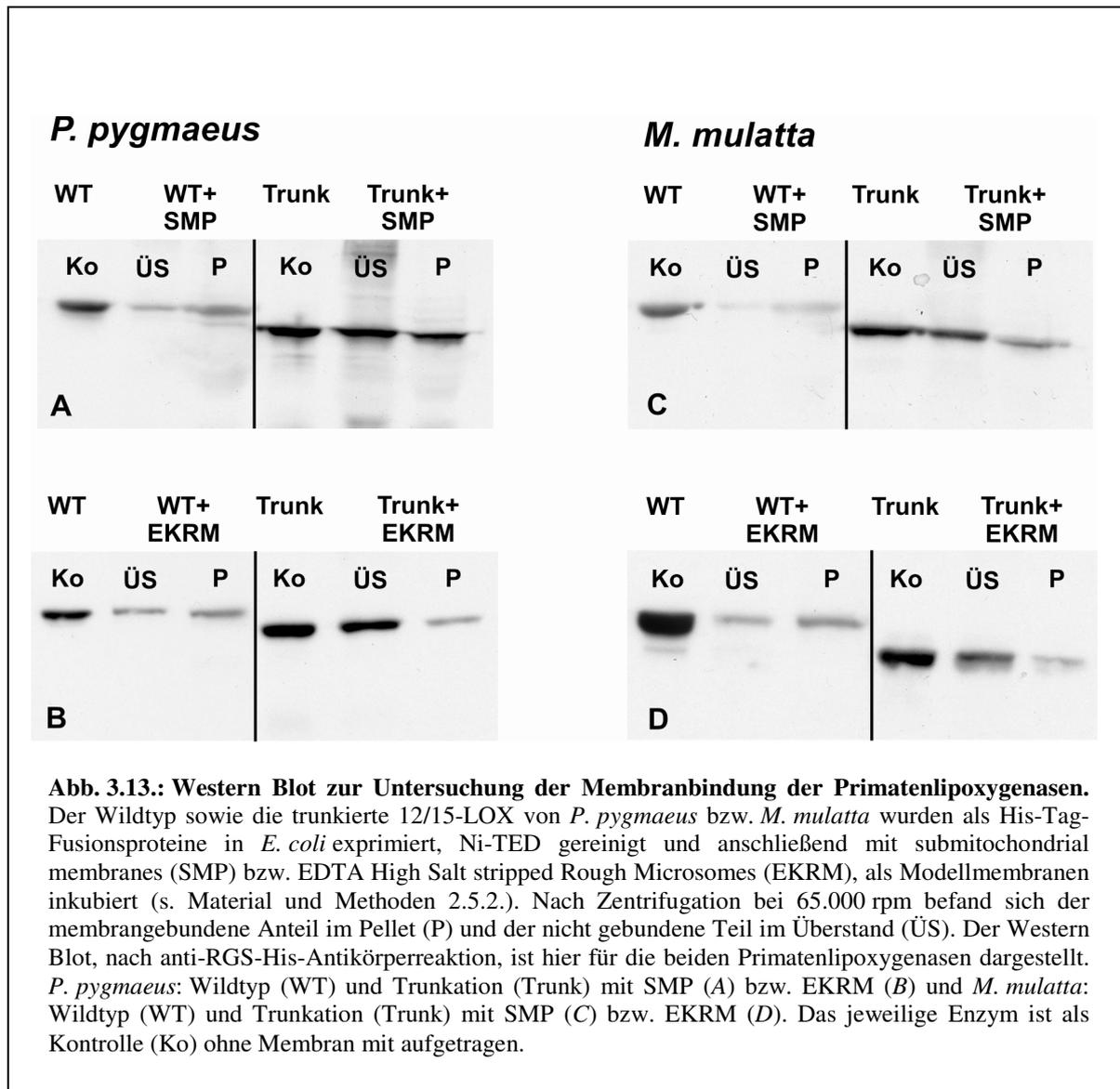
Wie Untersuchungen von Walther zeigten, verringert sich die Bindung der Kaninchen-12/15-LOX an Biomembranen, wenn man die N-Terminale entfernt (Walther *et al.* 2002). Dieses Verhalten konnte für die beiden Primatenlipoxygenasen ebenfalls bestätigt werden. Für diese

Untersuchungen wurden die Enzyme mit submitochondrial membranes (SMP) bzw. EDTA High Salt stripped Rough Microsomes (EKRM) als Modellmembranen inkubiert. Beide Lipoxygenasen binden größtenteils an Membranen, wenn sie als Wildtyp vorliegen. Die Membranbindungskapazität des Enzyms verringert sich bei beiden Lipoxygenasen, wenn man die N-terminale Domäne entfernt, jedoch ist diese Eigenschaft nicht vollkommen aufgehoben.



Membranbindung der 12/15-Lipoxygenase von *P. pygmaeus*

Es zeigte sich, dass etwa zwei Drittel der Wildtyp 12/15-LOX von *P. pygmaeus* an SMP bzw. EKRM binden. Das restliche Drittel befand sich nach der Inkubation mit den Modellmembranen im Überstand und war somit nicht an Membranen gebunden. Dieses Verhältnis kehrt sich nahezu um, wenn man die N-Terminale entfernt. Hierbei fanden sich nur noch etwa 33 % des Enzyms an SMP und 20 % an EKRM gebunden, d. h. der membrangebundene Anteil nimmt deutlich ab. Anscheinend ist dabei die Affinität der Trunktionsmutante zu SMP etwas besser als zu EKRM (Abb. 3.13. bzw. Tabelle 3.2.). Durch die Deletion der N-terminalen Domäne verliert die 12/15-LOX von *P. pygmaeus* zwar nicht komplett ihre Membranbindungseigenschaft, allerdings wird diese eindeutig eingeschränkt.



Membranbindung der 12/15-Lipoxygenase von *M. mulatta*

Wie die 12/15-LOX von *P. pygmaeus* bindet auch der Wildtyp der *M. mulatta* 12/15-LOX hauptsächlich an Membranen. Dabei bestand ein Unterschied in der Affinität zu den unterschiedlichen Modellmembranen. Der Wildtyp war zu etwa 80 % an SMP gebunden, bei Inkubation mit ECRM nur zu etwa 64 %. Auch bei dieser Lipoxygenase wurde die Membranbindung durch Deletion der N-Terminalen eingeschränkt. Der C-Terminus der *M. mulatta* 12/15-LOX wurde nur noch zu etwa 31 % an SMP und zu 25 % an ECRM gebunden. Auch bei dieser Trunktionsmutante zeigte sich eine etwas höhere Affinität zu den SMP. Für die *M. mulatta* 12/15-LOX konnte gezeigt werden, dass die Deletion der N-terminalen Domäne die Membranbindung deutlich einschränkt, sie aber nicht komplett aufhebt (Abb. 3.13. bzw. Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2.: Membranbindung der Primatenlipoxygenasen. Der Wildtyp sowie die trunkierte 12/15-LOX von *P. pygmaeus* bzw. *M. mulatta* wurden als His-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, Ni-TED gereinigt und anschließend mit submitochondrial membranes (SMP) bzw. EDTA High Salt stripped Rough Microsomes (EKRM), als Modellmembranen inkubiert (s. Material und Methoden 2.5.2.). Nach Zentrifugation bei 65.000 rpm befand sich der membrangebundene Anteil im Pellet und der nicht gebundene Teil im Überstand. Gezeigt ist die prozentuale Verteilung von membrangebundenem und nicht gebundenem Enzym.

| | Wildtyp | | Trunktionsmutante | |
|--------------------|---------------|------------|-------------------|-------------|
| | Überstand [%] | Pellet [%] | Überstand [%] | Pellet [%] |
| <i>P. pygmaeus</i> | | | | |
| SMP | 32,7 ± 7,7 | 67,3 ± 7,7 | 67,5 ± 10,8 | 32,5 ± 10,8 |
| EKRM | 37,7 ± 0,1 | 62,3 ± 0,1 | 79,9 ± 3,3 | 20,1 ± 3,3 |
| <i>M. mulatta</i> | | | | |
| SMP | 19,8 ± 3,1 | 80,2 ± 3,1 | 69,5 ± 9,3 | 30,5 ± 9,3 |
| EKRM | 36,5 ± 0,7 | 63,5 ± 0,7 | 74,9 ± 2,4 | 25,1 ± 2,4 |

4. Diskussion

Für die Untersuchung von Proteinen und Enzymen ist es oft nötig, diese aus Blut oder Gewebe zu extrahieren und anschließend aufzureinigen. Dabei besteht die Gefahr, dass man nur geringe Mengen der zu untersuchenden Proteine gewinnt, Proben durch Fremdprotein verunreinigt sind und dadurch die Ergebnisse verfälscht werden können. Durch rekombinante Expression hat man die Möglichkeit, Protein gezielt herzustellen und anschließend aufzureinigen. Die Verunreinigung durch andere Proteine bleibt dabei verhältnismäßig gering und durch das Einschleusen mutierter DNA-Sequenzen lassen sich auch leicht Proteine mit veränderter Aminosäuresequenz herstellen. Die Fusion mit einer Tag-Region bietet darüber hinaus die Möglichkeit, das Protein in hohem Grade aufzureinigen. Es gibt verschiedene Tags, die für die Fusion mit Proteinen zur Verfügung stehen. Grün fluoreszierende Proteine (GFP) haben den Vorteil, dass man die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins direkt in lebenden Zellen oder Geweben nachweisen kann. Allerdings kann es aufgrund seiner Größe (238 Aminosäuren, 26,9 kDa) zu fehlgefalteten Proteinen kommen. Ein weiterer Tag ist das Calmodulin-Binde-Peptid, welches in der Anwesenheit von Calciumchlorid an Calmodulin bindet. Dieses hat eine hohe Affinität und sorgt für eine sehr gute Aufreinigung. Der große Anteil an Calmodulin-bindenden Proteinen in Säugetierzellen schränkt seine dortige Verwendung jedoch ein. Ein sehr häufig verwendeter Tag ist der Poly-His-Tag, der aus 2 – 10 (meistens 6) Histidinen besteht. Mit knapp 1 kDa ist dieser Tag einer der kleinsten und kann sowohl am N-Terminus, als auch am C-Terminus fusioniert werden. Der technische Aufwand ist gering und unter denaturierenden Bedingungen erreicht man sehr reine Proteine. Unter physiologischen Bedingungen ist allerdings die Gefahr gegeben, dass die biologische Aktivität und die Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst werden. Für die beiden 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* führte die Verwendung einer His-Tag-Region zur Gewinnung hochgradig gereinigter Enzyme, welche als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert wurden. Durch ortsgerichtete Mutation an Determinanten des Triadenkonzeptes konnten Rückschlüsse auf die Reaktionsspezifität der beiden Lipoxygenasen geschlossen werden. Die Stereospezifität der beiden 12/15-LOXn wurde durch Mutation an einer kritischen Aminosäure, die sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, verändert. Des Weiteren konnte durch Trunktationsversuche die Bedeutung der N-terminalen Domäne für die katalytische Aktivität und die Bindung an Biomembranen näher beleuchtet werden. Welche Konsequenzen diese Ergebnisse für die weitere Untersuchung von Lipoxygenasen haben und welche Ausblicke sie bilden, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.1. Raumstruktur von Lipoxygenasen

Ein großer Anteil, der zum Verständnis von Reaktions- und Stereospezifität von LOXn beigetragen hat, geht auf Mutageneseuntersuchungen an kritischen Aminosäuren der Primärstruktur zurück. Dadurch konnten Modelle wie das Triadenkonzept (Borngräber *et al.* 1999) etabliert werden. Allerdings ist auf Grundlage von Mutationen nur eine indirekte Aussage auf die Raumstruktur von LOXn möglich. Einen großen Fortschritt zum Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehung von LOXn erbrachte die Aufklärung der 3D-Struktur der Sojabohnen-LOX-1, wodurch zum ersten Mal die Struktur einer LOX dargestellt werden konnte (Boyington *et al.* 1993). Mit der Aufklärung der Röntgenstruktur der Kaninchen-12/15-LOX konnte erstmals eine tierische LOX in ihrer Struktur beschrieben werden (Gillmor *et al.* 1997). Diese Daten deuteten an, dass LOXn im Allgemeinen in eine N-terminale β -Faltblattdomäne und eine C-terminale α -helikale Domäne untergliedert werden können. Des Weiteren waren die Darstellung der stiefelförmigen Substratbindungstasche und die enge Beziehung der Triaden am Boden der Bindungstasche möglich. Leider liegen derzeit erst wenige Raumstrukturen von LOXn vor. Neben den bereits erwähnten konnte die Struktur der Korallen-8-LOX (Neau *et al.* 2009) und einiger anderer Sojabohnen-LOXn dargestellt werden (Skrzypczak-Jankun *et al.* 2006; Youn *et al.* 2006). Des Weiteren gibt es zurzeit auch keine Strukturmodelle von trunkierten LOXn, wodurch eventuelle Änderungen in der Konformation der katalytischen Domäne erkennbar wären. Die dünne Datenlage zu Kristallstrukturen von LOXn ist auf die aufwendige und schwierige Herstellung von Proteinkristallen zurückzuführen. Dafür benötigt man große Mengen reines Protein (2 – 20 mg/ml), das aus natürlichen Quellen in geeigneter Qualität nicht zu präparieren ist. Eine gute Grundlage zur hochgradigen Aufreinigung von rekombinantem Protein ist die Fusion mit einer His-Tag-Region. Dadurch kann mittels Affinitätschromatographie ein hoher Reinheitsgrad erreicht werden. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* war die Expression als His-Tag-Fusionsprotein erfolgreich. Dadurch konnten die Enzyme hochgradig aufgereinigt werden, was auch für die trunkierten Enzyme zutrifft. Dabei war besonders die Trunkation der *M. mulatta* 12/15-LOX allein durch die Inkubation mit Ni-TED sehr gut aufzureinigen (Abb. 3.10.). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die trunkierte *M. mulatta* 12/15-LOX für Kristallisationsansätze zu verwenden. Die Ergebnisse der beiden Trunkationsmutanten der 12/15-LOX von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* (siehe 3.4.) sprechen für einen direkten Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Struktur der katalytischen Domäne, die durch direkte Kristalldaten näher charakterisiert werden könnten. Auf Grundlage der ursprünglichen Röntgenstrukturdaten zur Kaninchen-12/15-LOX wurde eine

Reinterpretation vorgenommen, die LOXn als dynamische Strukturen darstellt (Choi *et al.* 2008). Durch Bindung eines Liganden am aktiven Zentrum wird eine Konformationsänderung induziert, die sowohl die Proteinoberfläche (12 Å Verschiebung der Helix 2) als auch die Struktur der Substratbindungstasche (6 Å Verschiebung von Leu-597) betrifft. Gerade die Verschiebung des Leu-597 hat einen direkten Einfluss auf die Triadendeterminanten am Boden der Bindungstasche. Diese sind in der entspannten (Liganden-freien) Form des Enzyms nicht Teil der Bindungstasche, da diese von der Seitenkette des Leu-597 eingeengt wird. In der kondensierten (Liganden-gebundenen) Form ist die Seitenkette des Leu-597 umorientiert und ermöglicht die Öffnung der Bindungstasche, so dass das Substrat in der Lage ist, mit den Triaden zu interagieren. Diese Daten belegen, dass die beobachteten strukturellen Veränderungen auch von funktioneller Bedeutung sind. Daher wäre es wichtig, Fortschritte bei der Kristallisation trunkierter LOXn zu erzielen, um strukturelle Veränderungen an diesen genauer untersuchen zu können. Sowohl die „Mini-LOX“, welche durch proteolytische Digestion aus der Sojabohnen-LOX-1 entstanden ist, als auch die trunkierte 12/15-LOX von *M. mulatta* könnten dafür in Betracht gezogen werden.

4.2. Stärken und Schwächen des Triadenkonzeptes

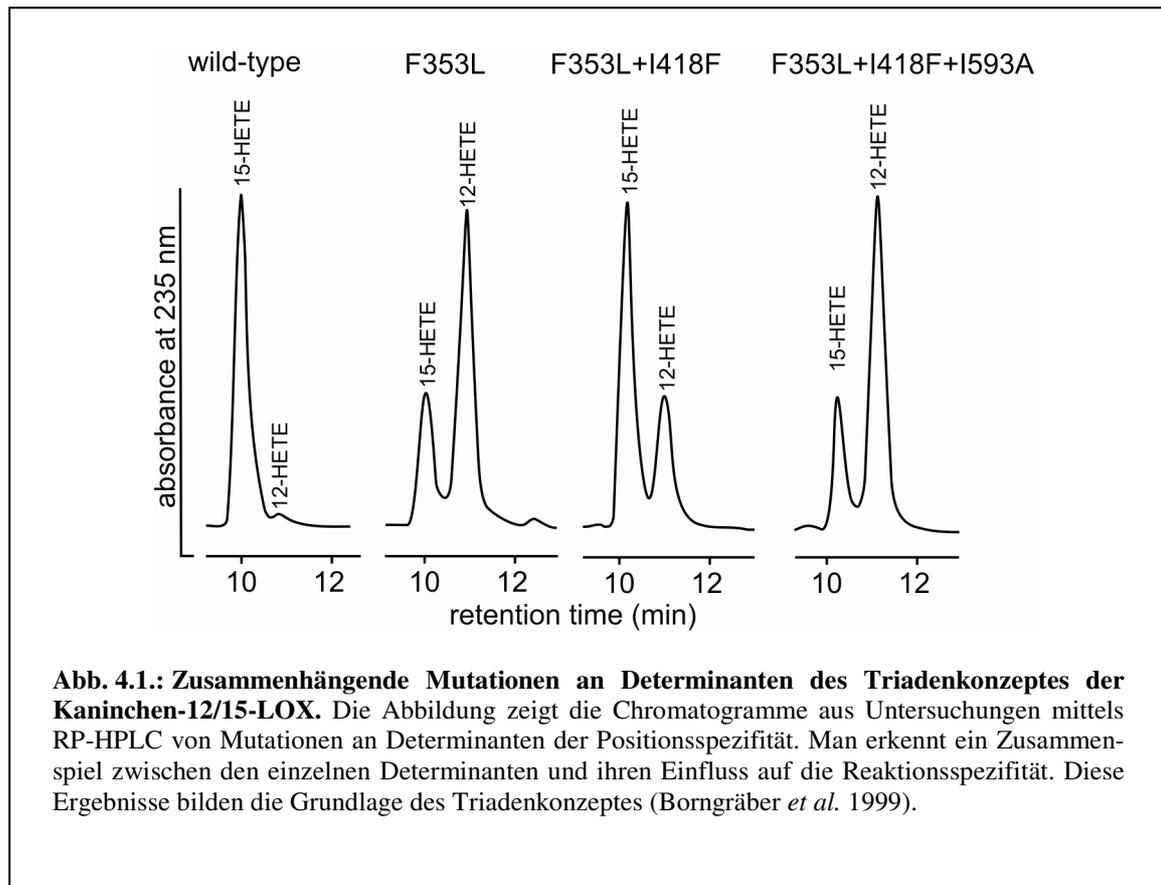
Vor knapp 20 Jahren wurde bei Untersuchungen an der humanen 12/15-LOX eine Aminosäure an Position 417 (Ile-417) beschrieben, die eine entscheidende Determinante für die Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen darstellt (Sloane *et al.* 1991). Einige Zeit später konnte eine weitere Determinante, Phe-353, der Kaninchen-12/15-LOX ermittelt werden (Borngräber *et al.* 1996). Die dritte Determinante, Ile-593, vervollständigte schließlich das Triadenkonzept (Borngräber *et al.* 1999). Dieses Modell bietet einen relativ einfachen Erklärungsansatz, um die Reaktionsspezifität tierischer Lipoxygenasen zu erklären. Es basiert darauf, dass das Volumen der hydrophoben Bindungstasche die Eindringtiefe des Substrates bestimmt. Die drei Determinanten Phe-353, Ile-418 und Ile-593 (Aminosäurenummerierung bezüglich der Kaninchen-12/15-LOX) bilden dabei den Boden der Substratbindungstasche und in Abhängigkeit von der Größe ihrer Seitenketten erhält die Bindungstasche ein unterschiedliches Volumen. Die Arachidonsäure taucht danach mit dem Methylende voran in die Bindungstasche ein und abhängig von der Eindringtiefe gelangen unterschiedliche C-Atome der Fettsäure in die Nähe des Wasserstoff-abstrahierenden Eisens. Diverse Mutageneseuntersuchungen konnten dieses Konzept bestätigen. So konnte die humane 12/15-LOX durch die I417V+M418V-Doppelmutation in ein C12-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (Sloane *et al.* 1995). Diese Doppelmutante zeigte eine übereinstimmende Aminosäuresequenz mit 12-lipoxygenierenden Enzymen und somit auch

der *M. mulatta* 12/15-LOX für diesen kritischen Sequenzabschnitt (Abb. 3.1.). Folglich war für die *M. mulatta* 12/15-LOX eine C12-Lipoxygenierung anzunehmen, was im Rahmen dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte (Abb. 3.3.). Der Ort der Oxygenierung lässt sich dadurch erklären, dass Valin eine wesentlich kleinere Seitenkette als das Isoleucin bzw. Methionin besitzt (Abb. 3.6. B). Daher wird das Volumen der Bindungstasche vergrößert, die Arachidonsäure kann tiefer eindringen und das C10 der Arachidonsäure gelangt in die Nähe des katalytischen Eisens. Die durch Sloane *et al.* verfolgte Strategie, die Bindungstasche durch Einbau kleinerer Aminosäuren zu vergrößern, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und auf umgekehrte Art an der *M. mulatta* 12/15-LOX angewandt. Durch den stetigen Einbau von Aminosäuren mit größeren Seitenketten konnte diese 12-LOX in ein vorrangig C15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (Abb. 3.5.). Dabei konnte eine direkte Korrelation zwischen dem van-der-Waals-Volumen der Aminosäureseitenketten und der Produktion von 15-H(P)ETE gezeigt werden (Abb. 3.6.). Das bedeutet, die Sloane-Determinante hat einen entscheidenden Einfluss auf das Reaktionsverhalten der *M. mulatta* 12/15-LOX. Allerdings muss erwähnt werden, dass durch den Einbau eines Tryptophans (Val417Trp), einer Aminosäure, die größer als das Phenylalanin ist, die Bildung an 15-H(P)ETE nicht weiter gesteigert werden konnte, sondern diese Mutante ein ähnliches Produktverhältnis wie der Wildtyp aufweist. Man könnte in diesem Fall davon ausgehen, dass die große Seitenkette des Tryptophans sich anders in der Bindungstasche orientiert, so dass die Arachidonsäure trotz Einführung eines großen Restes tief in die Bindungstasche eindringen kann. Da im Bereich der Borngräber-Determinanten der *M. mulatta* 12/15-LOX die Aminosäuresequenz mit der Sequenz der humanen 12/15-LOX und Kaninchen-12/15-LOX übereinstimmen (Abb. 3.1.), wurde auch an diesen Positionen versucht durch Einbau größerer Aminosäuren die Produktion von 15-H(P)ETE zu forcieren. Allerdings führte dieses Vorgehen nicht zu einer signifikanten Veränderung der Produktverhältnisse im Vergleich zum Wildtypenzym. Lediglich der Einbau eines Tryptophans anstelle des Isoleucins an Position 592 (Ile592Trp) erbrachte einen signifikanten, jedoch nur geringen Anstieg an 15-H(P)ETE auf $2,8 \pm 1,4 \%$ ($p < 0,01$). Dies lässt vermuten, dass für die *M. mulatta* 12/15-LOX vor allem die Sloane-Determinante eine wichtige Rolle in der dreidimensionalen Wechselwirkung der Triaden spielt. Denkt man dieses Konzept konsequent weiter, sollte der Anteil von 9-H(P)ETE am Produktmuster ansteigen, wenn man das Volumen der Bindungstasche noch weiter vergrößert. So könnte durch den Einbau eines Alanins (Val417Ala) das C7 der Arachidonsäure in die Nähe des Wasserstoff-abstrahierenden Eisens gelangen, was eine C9-Lipoxygenierung zur Folge hätte. Diese Strategie bietet eine plausible Möglichkeit, das Triadenkonzept zu erweitern. Sollte diese Strategie aufgehen, würde das Triadenkonzept nicht nur die Veränderung von 12-

Lipoxygenierung in 15-Lipoxygenierung, bzw. umgekehrt, erklären, sondern auch die potentielle Umwandlung in eine 9-LOX. Aus der Korrelation der 15-H(P)ETE-Produktion und dem van-der-Waals-Volumen der Aminosäurereste lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen feststellen (Abb. 3.6.). Wenn diese Korrelation in Richtung kleinerer Aminosäurereste weiter besteht, ist die Bildung eines C9-lipoxygenierenden Enzyms denkbar. Diese Theorie würde auch dahingehend nachvollziehbar sein, wenn man das Triadenkonzept auf die humane 5-LOX bezieht. Bei dieser LOX bilden Phe-359, Ala-424 und Ala-603 die korrespondierenden Triadendeterminanten, wenn man die Aminosäuresequenz von 12/15-LOXn und der humanen 5-LOX miteinander vergleicht. Demnach würden die Sloane-Determinante und auch die Borngräber II-Determinante der Arachidonsäure ein tieferes Eindringen in die Bindungstasche ermöglichen, welche durch die beiden Alanine ein größeres Volumen bekäme. Molekulare Modellierungen haben gezeigt, dass die 5-LOX eine bis zu 20 % größere Bindungstasche als die Kaninchen-12/15-LOX besitzt (Gillmor *et al.* 1997). Demnach könnte die Arachidonsäure tiefer eindringen und der Wasserstoff könnte vom C7 abstrahiert werden. Durch eine Quadrupelmutation (F359W+A424I+N425M+A603I) an den Determinanten des Triadenkonzeptes konnte das Weiteren eine 5-LOX in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (Schwarz *et al.* 2001). Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Änderung der Reaktionsspezifität durch eine Verkleinerung der Substratbindungstasche möglich ist.

Für die *P. pygmaeus* 12/15-LOX ergaben die durchgeführten Mutageneseuntersuchungen ein deutliches Zusammenspiel der drei Determinanten in ihrem Einfluss auf die Reaktionsspezifität. Da der Wildtyp vor allem 15-H(P)ETE bildet, wurden Veränderungen an den Aminosäuren vorgenommen, die die Bildung von 12-H(P)ETE fördern sollten. Dabei konnte für jede einzelne Determinante ein Einfluss mit jedoch unterschiedlicher Bedeutung festgestellt werden. Die größte Wirkung zeigten die Borngräber I- und Sloane-Determinante (Phe-352 und Ile-417). Durch Einbau kleinerer Aminosäuren an diesen Positionen konnte das Produktverhältnis nahezu umgekehrt werden (Tabelle 3.1.). Auch die der Sloane-Determinante angrenzende Position Met-418 scheint einen gewissen Einfluss auf die Reaktionsspezifität zu besitzen. Durch die M418V-Mutation konnte der Anteil an 12-H(P)ETE signifikant gesteigert werden, was durch eine Volumenzunahme der Bindungstasche erklärbar wäre. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Untersuchungen zur humanen 12/15-LOX, nach denen dem Met-418 ebenfalls ein Einfluss auf die Positionsspezifität zugeschrieben wird (Sloane *et al.* 1995). Allerdings war das Hauptprodukt bei der Mutante der *P. pygmaeus* 12/15-LOX weiterhin mit etwa 60 % 15-H(P)ETE, ebenso wie bei der Mutation an der Borngräber II-Determinante (I592A). Demnach scheint die Borngräber II-Determinante nur einen geringeren Einfluss auf die Reaktionsspezifität der *P. pygmaeus*

12/15-LOX zu besitzen. Allerdings ist sie auch im dreidimensionalen Wechselspiel der Triaden involviert, was aus Doppel- und Trippelmutationen hervorgeht. Der Effekt durch die Verkleinerung der Aminosäure an einer Determinante konnte durch Vergrößerung an einer anderen Determinante wieder aufgehoben werden (Abb. 3.4.). Dabei zeigen die Mutageneseuntersuchungen der *P. pygmaeus* 12/15-LOX ein vergleichbares Ergebnis wie die durch Borngräber *et al.* durchgeführten Versuche zur Kaninchen-12/15-LOX (Abb. 4.1.) (Borngräber *et al.* 1999).



Bei ihren Untersuchungen wurde zum ersten Mal das Zusammenspiel dieser drei kritischen Aminosäuren bestätigt. Alle drei Determinanten beeinflussen sich gegenseitig und führen somit je nach Größe ihrer Seitenkette zu unterschiedlichen Produktverhältnissen. Im Falle der *P. pygmaeus* 12/15-LOX konnte nun dieses Konzept definitiv bestätigt werden. Auch Mutageneseuntersuchungen an der humanen 12/15-LOX konnten das Zusammenspiel der Triaden nachweisen (Vogel *et al.* 2010). Dabei waren die Produktverhältnisse zwischen den Mutanten der humanen 12/15-LOX mit denen der *P. pygmaeus* 12/15-LOX annähernd identisch, was auch auf die hohe Sequenzhomologie von fast 99 % zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist das Triadenkonzept folglich auf die humane 12/15-LOX und die *P. pygmaeus* 12/15-LOX übertragbar. Alle drei Determinanten stehen in direktem Wechselspiel

miteinander. Für die *M. mulatta* 12/15-LOX lässt sich die Sloane-Determinante als die entscheidende Position beschreiben, wohingegen die Borngräber-Determinanten untergeordnete Rollen spielen.

Allerdings lässt sich das Triadenkonzept nicht auf alle Lipoxygenasen übertragen. Trotz ihres hohen Grades an Sequenzhomologie von etwa 78 % weisen die humane 15-LOX-2 und die 8S-LOX der Maus eine unterschiedliche Positionsspezifität auf. Für diese beiden Isoformen konnten zwei Aminosäuren als Determinanten für die Reaktionsspezifität identifiziert werden. Asp-602 und Val-603 in der humanen 15-LOX-2 und korrespondierend dazu Tyr-603 und His-604 in der 8S-LOX der Maus (Jisaka *et al.* 2000). Dahingegen scheinen die Determinanten des Triadenkonzeptes keinen Einfluss auf die Reaktionsspezifität zu haben. Mutageneseuntersuchungen an diesen Determinanten der humanen 15-LOX-2 und der murinen 12R-LOX veränderten kaum die Produktverhältnisse verglichen mit den Wildtypenzymen (Vogel *et al.* 2010). Der Reaktionsmechanismus für diese beiden Isoformen wird mit einer gegensätzlichen Orientierung des Fettsäuresubstrates in der Bindungstasche erklärt. Bei der humanen 15-LOX-2 dringt demnach die Arachidonsäure mit dem Methylende voran ein unter Abstraktion des Wasserstoffs am C13 und Sauerstoffinsertion in [+2]-Richtung, während bei der 8S-LOX der Maus die Arachidonsäure mit dem Carboxylende voran eintaucht. Dadurch wird vom C10 der Wasserstoff abstrahiert und der Einbau molekularen Sauerstoffs erfolgt in [-2]-Richtung am C8 (Jisaka *et al.* 2000). Diese Theorie wird ebenfalls durch Mutationen an den durch Jisaka *et al.* beschriebenen Determinanten und dem Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsspezifität erklärt (Walther *et al.* 2009). Demnach ist das His-604 die kritische Determinante für die inverse Orientierung der Arachidonsäure und ihrer möglichen Interaktion mit der Carboxylgruppe. Für die 8R-LOX der Koralle wird hingegen postuliert, dass das Substrat von zwei verschiedenen Eingängen in die Bindungstasche eindringen kann (Neau *et al.* 2009). Allerdings liegen derzeit noch keine experimentellen Daten vor, die diese Theorie direkt bestätigen.

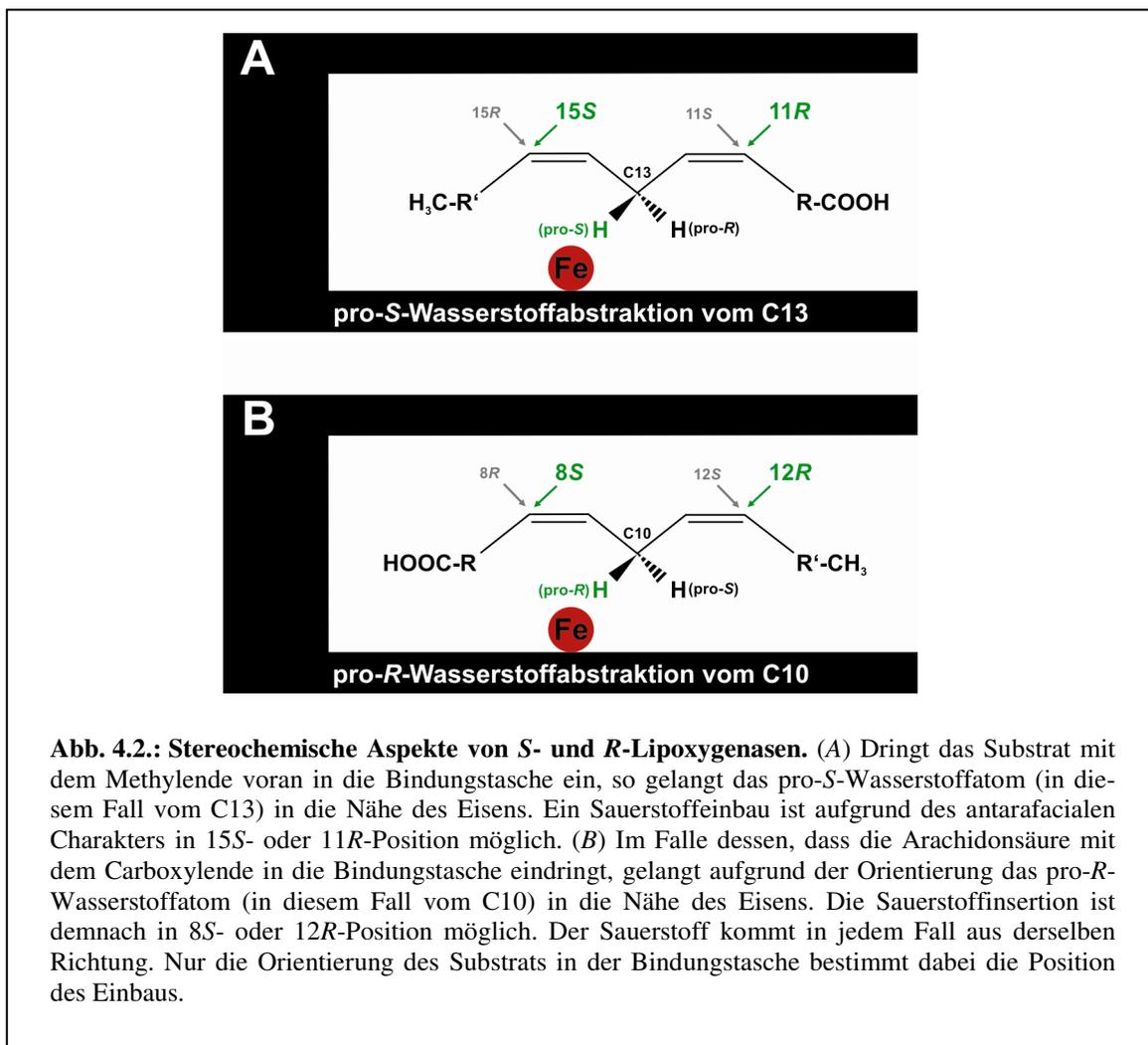
Generell scheint das Triadenkonzept vor allem für Lipoxygenasen mit dualer Positionsspezifität, wie den 12/15-LOXn, anwendbar zu sein. Jedoch sind weitere Mutagenesestudien bzw. Röntgenstrukturanalysen nötig, um die genauen strukturellen Ursachen der Positionsspezifität von Lipoxygenasen zu klären. Ein ganzheitliches Konzept für alle Lipoxygenaseisoformen scheint derzeit nicht möglich zu sein, aber vielleicht lassen sich für bestimmte Isoformen identische Prinzipien ihrer Reaktionsspezifität finden.

4.3. Ursachen der Stereoselektivität

Wasserstoffabstraktion und Sauerstoffeinbau sind entscheidende Schritte der Lipoxygenasereaktion. Beide Prozesse erfolgen dabei von entgegengesetzten Seiten der durch das Doppelbindungssystem gebildeten Ebene. Dieser antarafaciale Charakter scheint darauf hinzuweisen, dass Wasserstoffabstraktion und Sauerstoffinsertion mechanistisch miteinander gekoppelt sind (Rickert und Klinman 1999). Allerdings ist die molekulare Grundlage, wodurch die Sauerstoffinsertion geregelt ist, noch immer Bestandteil intensiver Diskussionen. Der Vergleich von Aminosäuresequenzen verschiedener LOX-Isoformen konnte nachweisen, dass *S*-Lipoxygenasen an einer kritischen Position ein konserviertes Alanin tragen, wohingegen *R*-Lipoxygenasen ein Glycin an dieser Stelle besitzen (Coffa und Brash 2004; Schneider *et al.* 2007). Wurde Gly-428 der Korallen *8R*-LOX durch ein Alanin ersetzt, war *12S*-H(P)ETE das Hauptprodukt dieser Mutante. Vergleichbare Ergebnisse wurden sowohl für die humane als auch die murine *12R*-LOX gefunden (Coffa und Brash 2004; Meruvu *et al.* 2005). Allerdings betrug bei der *12R*-LOX der Maus der Anteil an spezifischem *8S*-H(P)ETE nur etwa 40 %. Die G441A-Mutation erbrachte demnach nur eine partielle Umkehr der Reaktionsprodukte, allerdings mit deutlicher Änderung der Stereoselektivität des *8*-HETE, welches beim Wildtyp *R*-konfiguriert, bei der G441A-Mutante jedoch *S*-konfiguriert war (Meruvu *et al.* 2005). Ebenfalls war die umgekehrte Strategie an der humanen *15S*-LOX-2 durch die A416G-Mutation erfolgreich, die Bildung von *11R*-H(P)ETE zu forcieren. Dieses war mit etwa 70 % das Hauptprodukt dieser Mutante. Partielle Veränderungen in der Stereoselektivität konnten auch bei der *8S*-LOX der Maus (Coffa und Brash 2004) und bei der Sojabohnen-LOX-1 beobachtet werden (Coffa *et al.* 2005). Diese Daten lassen vermuten, dass diese Determinante einen starken Einfluss auf die Enantioselektivität von Lipoxygenasen ausübt.

Für die beiden Primatenlipoxygenasen von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* wies der Aminosäurevergleich an der kritischen Position ein Alanin mit einer vermuteten *S*-Konfiguration des Hauptproduktes nach (Abb. 3.7.). Für den Wildtyp der *P. pygmaeus* *12/15*-LOX war das Hauptprodukt *15S*-H(P)ETE. Unter der Vermutung, die Stereoselektivität durch die A403G-Mutation zu beeinflussen, wurde die Bildung von *11R*-H(P)ETE erwartet. Tatsächlich stieg dessen Anteil auch an, allerdings nur auf etwa 25 % der Gesamtproduktbildung. Der Hauptanteil an gebildeten Produkten lag mit knapp 64 % weiterhin beim *15S*-H(P)ETE. Demnach konnte durch diese Mutation keine komplette Umkehr der Stereoselektivität erreicht werden. Auch bei der *M. mulatta* *12/15*-LOX konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Der Austausch des Ala-403 durch ein Glycin ließ zwar den Anteil an *8R*-H(P)ETE ansteigen, jedoch nur auf ca. 14 %. Auch hier war

12*S*-H(P)ETE wie beim Wildtyp das Hauptprodukt. Wodurch kann die Stereoselektivität nun erklärt werden? Coffa und Brash postulierten die Hypothese, dass zum einen die Orientierung der Arachidonsäure in der Bindungstasche (Methylende voran oder Carboxylgruppe voran) und zum anderen die Besetzung der kritischen Position durch ein Glycin oder ein Alanin die Insertion des molekularen Sauerstoffs bestimmen (Coffa und Brash 2004). Diese ist abhängig vom abstrahierten Wasserstoffatom. Wird das pro-*S*-Wasserstoffatom abstrahiert, so wird Sauerstoff auf der gegenüberliegenden Seite des Pentadiensystems eingebaut. Erfolgt die Abstraktion vom C13, so wird nach Radikalumlagerung in [+2]-Richtung 15*S*-H(P)ETE gebildet, nach Umlagerung in [-2]-Richtung 11*R*-H(P)ETE (Abb. 4.2. A). Der Hauptunterschied ist in diesem Falle die Richtung der Radikalumlagerung, das abstrahierte Wasserstoffatom bleibt dasselbe. Im Gegensatz dazu erfolgt die Abstraktion des pro-*R*-Wasserstoffatoms bei der 8*S*-LOX und 12*R*-LOX der Maus vom C10 der Arachidonsäure. Dieser Unterschied im abstrahierten Wasserstoff kann möglicherweise durch eine umgekehrte Orientierung der Arachidonsäure in der Bindungstasche erklärt werden (Abb. 4.2. B).



Dringt diese mit der Carboxylgruppe voran ein, so nähert sich das pro-*R*-Wasserstoffatom dem abstrahierenden Eisen. Der Sauerstoff gelangt immer aus der gleichen Richtung zum Substrat, nur eine umgekehrte Orientierung der Arachidonsäure führt zu unterschiedlichen Chiralitäten. Wird das pro-*S*-Wasserstoffatom vom C13 abstrahiert, so wäre eine Sauerstoffinsertion in 15*S*-Position oder 11*R*-Position möglich. *S*-Lipoxygenasen besitzen an der durch Coffa und Brash beschriebenen Determinante ein Alanin (Coffa und Brash 2004). Dieses könnte die 11*R*-Position blockieren und somit ist der Einbau in 15*S*-Position die einzige Möglichkeit (Abb. 1.7.). Wird diese Position durch ein Glycin besetzt, wird die 11*R*-Position frei und der Einbau des molekularen Sauerstoffs kann dort erfolgen. Im Falle der Primatenlipoxygenasen ist der Anteil an 11*R*- bzw. 8*R*-H(P)ETE signifikant angestiegen, jedoch waren die Hauptprodukte weiterhin 15*S*-H(P)ETE bzw. 12*S*-H(P)ETE. Durch den Einbau des Glycins wären beide Positionen (bei der *P. pygmaeus* 12/15-LOX 15*S*/11*R*) frei, was erklären könnte, dass nicht nur 11*R*-H(P)ETE, sondern auch weiterhin 15*S*-H(P)ETE gebildet wird. Allerdings ist damit nicht erklärt, warum sich der Anteil an 15*S*-H(P)ETE verringert oder wie beispielsweise bei der 8*S*-LOX der Maus die Reaktions- und Stereospezifität durch die A417G-Mutation in Richtung 12*R*-Lipoxygenierung gedrängt wird (Coffa und Brash 2004). Ein prinzipielles Problem der Ala-zu-Gly-Austausch-Theorie ist, dass das van-der-Waals-Volumen einer Methylgruppe, die den Unterschied zwischen Glycin und Alanin ausmacht, nur etwa 20 Å³ beträgt. Das van-der-Waals-Volumen eines Sauerstoffmoleküls beträgt hingegen etwa 50 Å³. Dies bedeutet, dass der gewonnene Raum, der durch den Ala-Gly-Austausch entstehen würde, nicht zwangsläufig genügend Raum für ein zusätzliches Sauerstoffmolekül bieten würde. Es sei denn, dass an dieser Stelle bereits vorher Freiraum (minimal 30 Å³) zur Verfügung stand. Deshalb könnte man annehmen, dass durch den Austausch eine Art vorgeformte Sauerstofftasche freigegeben wird, welche sonst durch das Alanin versperrt ist. Leider gibt es derzeit keine experimentellen Daten, die das Vorhandensein einer solchen Sauerstofftasche bestätigen. Des Weiteren scheint es nicht nur eine Determinante zu geben, die über die Stereospezifität entscheidet. Für die 12*R*-LOX der Maus zeigte sich nämlich nicht nur bei der G441A-Mutation ein Anstieg des 8*S*-H(P)ETE, sondern auch der Austausch des Val-631 durch ein Alanin, ließ den Anteil an 8*S*-H(P)ETE signifikant ansteigen (Meruvu *et al.* 2005). Vergleicht man verschiedene Aminosäuresequenzen, so entspricht das Val-631 der durch Borngräber beschriebenen dritten Determinante Ile-593 im Triadenkonzept (Borngräber *et al.* 1999). Durch die V631A-Mutation ist demnach ebenfalls eine Änderung der Enantioselektivität möglich. Dies lässt annehmen, dass bei dieser Mutante das Substrat anders im aktiven Zentrum orientiert ist, als beim Wildtyp (Meruvu *et al.* 2005). Kürzlich konnte aus dem Zebrafisch eine 12/15-LOX isoliert werden, die an der kritischen Stelle ein

Glycin trägt und damit als *R*-LOX wirken sollte. Die Analyse der Reaktionsprodukte der Arachidonsäureoxygenierung zeigte jedoch 12*S*-H(P)ETE als dominierendes Reaktionsprodukt (Jansen *et al.*, 2011). Umfangreiche Mutageneseuntersuchungen des Glycins und angrenzender Aminosäuren führten zu inaktiven Enzymvarianten. Damit widerspricht dieses LOX-Isoenzym der Ala-Gly-Regel der Stereoselektivität von LOXn.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass es derzeit noch kein einheitliches Konzept gibt, welches die Ursachen für die Stereoselektivität aller LOXn eindeutig erklärt. Man muss davon ausgehen, dass nicht nur eine kritische Aminosäure in der Primärstruktur dafür entscheidend ist, sondern auch Substratorientierung, Reaktionsbedingungen wie z. B. pH-Wert, oder das Zusammenspiel mehrerer Determinanten die Enantioselektivität von Lipoxygenasen bestimmen.

4.4. Die Bedeutung der N-terminalen Domäne

In allen zur Zeit vorliegenden Kristallstrukturen, sei sie von der Sojabohnen-LOX-1 (Boyington *et al.* 1993), der Kaninchen-12/15-LOX (Gillmor *et al.* 1997), oder der Korallen-8-LOX (Neau *et al.* 2009), ist für alle drei Spezies die Unterteilung des Enzyms in eine C-terminale und eine N-terminale Domäne erkennbar. Auch für die Sojabohnen-LOX-3 (Skrzypczak-Jankun *et al.* 2006) und die Sojabohnen-LOXn VLX-B und VLX-D (Youn *et al.* 2006) konnte dieser Aufbau nachgewiesen werden. Der C-terminalen Domäne wird dabei vor allem die katalytische Aktivität zugeschrieben, da sie die Substratbindungstasche und das für die LOX-Reaktion entscheidende Nicht-Häm-Eisen besitzt. Die genaue Bedeutung der N-terminalen Domäne ist hingegen noch immer nicht ganz geklärt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur β -Faltblattstruktur der C-terminalen Domäne tierischer Lipasen, wurde eine Funktion in der Bindung an Lipoproteinen und Biomembranen vermutet (Gillmor *et al.* 1997). Mutageneseuntersuchungen, bei denen die N-terminale Domäne der Kaninchen-12/15-LOX entfernt wurde, bestätigen diese Vermutung, da die Bindung an Biomembranen verringert war (Walther *et al.* 2002). Allerdings war das trunkierte Enzym weiterhin in der Lage, an Biomembranen zu binden. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne nicht essentiell für die Membranbindung von LOXn ist, sondern dass auch die katalytische Domäne allein Membranbindungsaktivität aufweist. Diese konnte auf Wechselwirkungen zwischen den Membranlipiden und hydrophoben Aminosäuren auf der Oberfläche der katalytischen Domäne zurückgeführt werden (Walther *et al.* 2004). Weiterhin ergaben diese Untersuchungen, dass die trunkierte 12/15-LOX des Kaninchens katalytisch aktiv war, obwohl die katalytische Aktivität nur ca. 20 % der Aktivität des Wildtypenzym entsprach (Walther *et al.* 2002). Die N-terminale Domäne scheint demnach nicht essentiell für die Aktivität von Lipoxygenasen zu sein.

Untersuchungen zur 5-LOX ließen lange Zeit vermuten, dass die β -Faltblattdomäne aufgrund der Existenz Ca^{2+} -bindender Aminosäuren essentiell für die Enzymaktivität sei (Kulkarni *et al.* 2002). Bei dieser LOX-Isoform scheint die N-terminale Domäne besonders bei der Translokation in die Kernmembran von Bedeutung zu sein (Chen und Funk 2001). Durch die Trunkation der beiden Primatenlipoxygenasen ließ sich eine deutlich eingeschränkte Bindung an Biomembranen nachweisen (Abb. 3.13.). Kürzlich durchgeführte Trunkationsuntersuchungen an der murinen 5-LOX konnten jedoch eindeutig nachweisen, dass zwei unterschiedliche N-terminale Trunkationsmutanten sowohl katalytische Aktivität, als auch Membranbindungsaktivität besaßen. Damit sollte das Konzept der Essentialität der N-terminalen β -Faltblattdomäne für die katalytische Aktivität und Membranbindung überdacht werden. Aufgrund der neuen Erkenntnisse scheint die N-terminale Domäne an der Regulation der katalytischen Aktivität und der Membranbindung beteiligt zu sein, ist aber nicht, wie früher vermutet, essentiell für diese Prozesse. Diese Arbeitshypothese konnte durch die in dieser Arbeit beschriebenen Trunkationsuntersuchungen an den 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* bestätigt werden. Beide trunkierten 12/15-LOXn zeigten durchschnittlich noch ein Viertel der Membranbindungsaktivität des Wildtypenzym. Allerdings scheint die N-terminale Domäne die Membranbindung deutlich zu verbessern, was die Daten der Kaninchen-12/15-LOX bestätigt (Walther *et al.* 2002). Auch die katalytische Aktivität ging bei der Trunkation der beiden Primatenenzyme nicht vollständig verloren und die Reaktionsspezifität veränderte sich nur wenig, aber statistisch signifikant. Der Mechanismus, dem diese Änderung zu Grunde liegt, ist allerdings unklar. Anzunehmen wäre, dass sich durch den Verlust der N-terminalen Domäne die Konformation der katalytischen Domäne ändert. Eine generelle Konformationsänderung durch die Bindung eines Liganden konnte für die Kaninchen-12/15-LOX gezeigt werden (Choi *et al.* 2008). Möglicherweise wird durch das Fehlen der N-terminalen Domäne die Struktur der katalytischen Untereinheit derart verändert, dass die Größe der Bindungstasche variiert wird und die Arachidonsäure sich anders in dieser orientiert. Dass das Entfernen der N-terminalen Domäne Einfluss auf die katalytische Aktivität nimmt, konnte auch an der Sojabohnen-LOX-1 gezeigt werden. Proteolytische Verkürzung dieser LOX führte hier jedoch zu einem aktiveren Enzym. Die Affinität zum Substrat Linolsäure war bei dieser „Mini-LOX“ zwar vermindert, allerdings war die Reaktionsgeschwindigkeit verglichen mit dem Wildtypenzym stark erhöht. Diese Trunkationsmutante besitzt demnach eine bessere katalytische Effektivität, wodurch die N-terminale Domäne als eine Art Katalyseinhibitor fungieren könnte (Maccarrone *et al.* 2001).

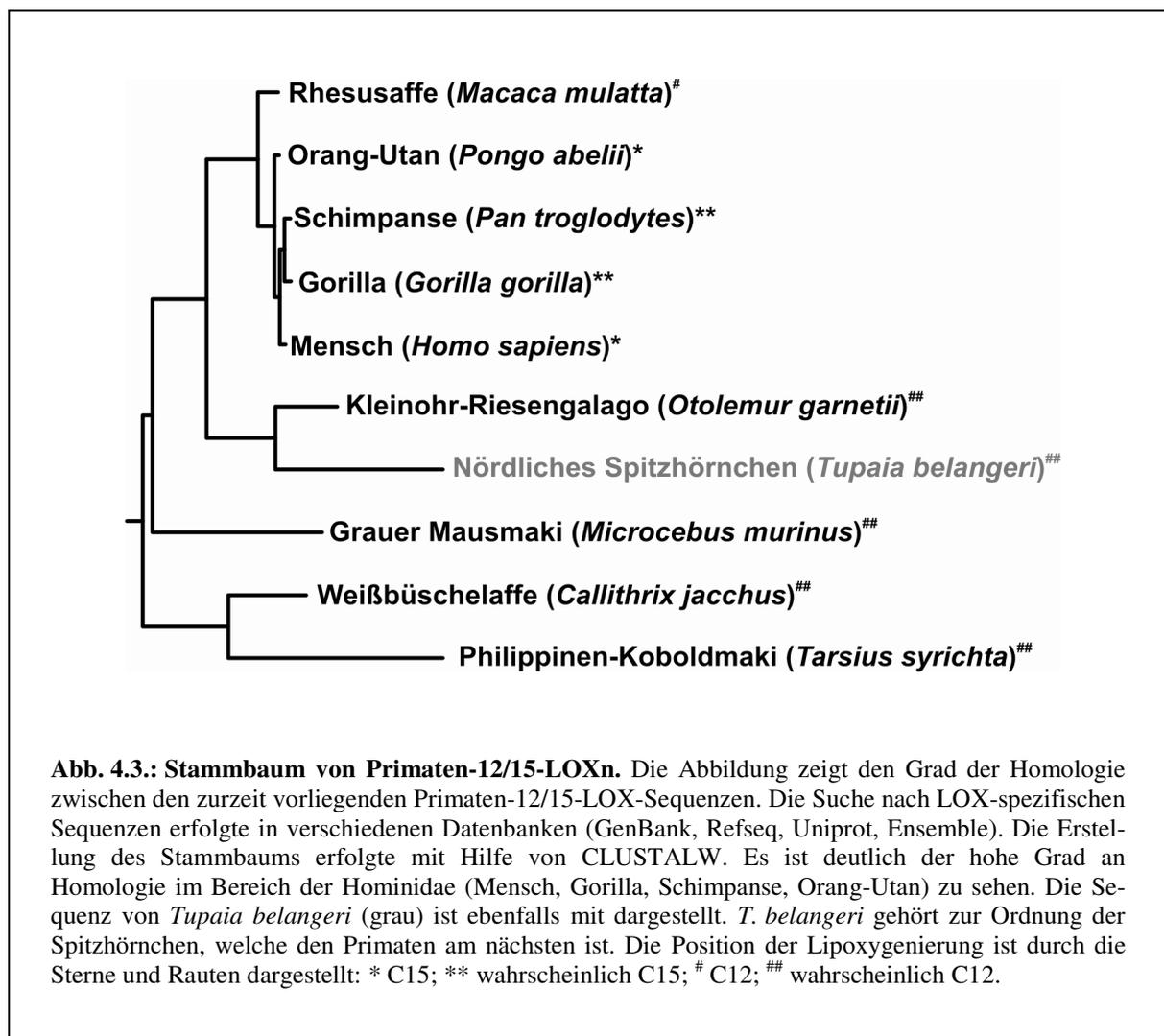
Versuche an der humanen 5-LOX, deren N-Terminus entfernt wurde, führten zu einem inaktiven Enzym, wodurch eine essentielle Bedeutung der N-terminalen Domäne für die

katalytische Aktivität anzunehmen wäre (Chen und Funk 2001). Allerdings ist die Interpretation der fehlenden katalytischen Aktivität prinzipiell schwierig. Da es außer aufwendiger Rückmutationsstudien keine wirklichen Kontrolluntersuchungen für derartige Mutagenesestudien gibt, könnten methodologische Artefakte die Ergebnisse beeinflussen. Die Daten, die zur Kaninchen-12/15-LOX, den beiden 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* und der murinen 5-LOX dazu vorliegen, deuten auf solche Fehlinterpretationen hin.

4.5. Evolutionäre Aspekte

LOX-Isoformen konnten in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. So findet man Lipoxygenasen in Pflanzen und Pilzen (Oliw 2002; Andreou und Feussner 2009), in Säugetieren (Brash 1999) und niedrigen Meeresorganismen (Bundy 1985; Hawkins und Brash 1987). Auch in Bakterien konnten LOX-Isoformen nachgewiesen werden (Porta und Rocha-Sosa 2001). Im Hefegenom fehlen jedoch charakteristische LOX-Sequenzen. Betrachtet man die drei Domänen der Lebewesen, so besitzen Eukaryoten und Prokaryoten LOX-Sequenzen. In Archaeen konnte bisher jedoch noch keine LOX-Isoform gefunden werden. Dies kann mit den extremen Lebensräumen von Archaeen zusammenhängen, die in vulkanischen Gebieten, wie z. B. Geysiren vorkommen (Hyperthermophile). Andere Vertreter überleben nur unter Bedingung mit sehr hohem oder niedrigem pH-Wert (Alkaliphile bzw. Acidophile). Man bezeichnet sie daher auch als Extremophile, weil sie, verglichen mit anderen Lebewesen, unter unphysiologischen Bedingungen leben. Aufgrund ihres anaeroben Stoffwechsels ist der für die LOX-Reaktion essentielle Sauerstoff für die Mehrzahl der Archaeen toxisch. Dies würde auch das Fehlen von LOXn in dieser Domäne der Lebewesen erklären. Ein kürzlich veröffentlichter Artikel von Ivanov *et al.* gibt eine gute Übersicht über Organismen, in denen LOXn gefunden wurden (Ivanov *et al.* 2010). Allerdings kann sich ihr Nachweis oft nur auf Sequenzvergleiche und Homologien beziehen, besonders auf den relativ gut konservierten Bereich des aktiven Zentrums. Ob es sich bei den gefundenen Sequenzen wirklich um aktive Enzyme handelt und welche Reaktionsspezifität diese besitzen, bleibt weiterhin unklar. Innerhalb des Tierreiches findet man LOXn in vielen verschiedenen Spezies unterschiedlichen Entwicklungsstandes, beginnend bei einem der strukturell einfachsten vielzelligen Tiere, Placozoa, *Trichoplax adhaerens* bis hin zu den evolutionär am weitesten entwickelten Primaten. Dazwischen findet man LOX-Isoformen in Korallen, Zecken, Fischen, Fröschen, Hühnern, Mäusen, Delfinen, Schweinen, Affen bis hin zum Menschen. Cyanobakterien gehören zu den am längsten existierenden Organismen der Erde. LOXn wurden in verschiedenen Ordnungen dieser Bakterien gefunden (Koeduka *et al.* 2007; Andreou *et al.* 2008; Zheng *et al.* 2008), was annehmen lässt, dass LOXn schon sehr früh in der evolutionären Ent-

wicklung entstanden sind und dass die erste LOX womöglich in Cyanobakterien exprimiert wurde. In Anlehnung an die Endosymbiosetheorie (Sagan 1967) könnten Cyanobakterien der Ursprung von Chloroplasten sein und es erfolgte ein Transfer von plastidischen Genen in die nuklearen Genome hinein, wie es schon in einigen Fällen gezeigt werden konnte (Martin *et al.* 1998; Huang *et al.* 2003; Maliga 2003). Es ist also anzunehmen, dass sich LOXn in Pflanzen entwickelt haben und in der Tat konnte kürzlich eine LOX-Sequenz im plastidischen Genom von reifen Tomaten gefunden werden (Barsan *et al.* 2010).



Ein weiterer interessanter Aspekt in der evolutionären Entwicklung der LOXn ist die Hypothese, dass nur die 12/15-LOXn der Hominidae, d. h. von Mensch, Schimpanse, Orang-Utan und Gorilla, 15-lipoxygenierende Enzyme sind. Dagegen exprimieren andere Säugetiere wie Maus, Schwein, oder *M. mulatta* 12/15-LOX-Enzyme, die eine Oxygenierung am C12 vornehmen (Yoshimoto *et al.* 1990; Chen *et al.* 1994; Johannesson *et al.* 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene 15-Lipoxygenierung der *P. pygmaeus* 12/15-LOX bestätigt diese

Theorie zusammen mit den Ergebnissen zur humanen 12/15-LOX (Vogel *et al.* 2010). Leider wurde bislang keine 12/15-LOX von Schimpanse und Gorilla exprimiert und hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität charakterisiert. Jedoch lassen Sequenzvergleiche darauf schließen, dass sie sich in das oben beschriebene Konzept (12/15-LOXn von Hominiden besitzen dominante 15-LOX-Aktivität) einordnen lassen, da sie an den kritischen Determinanten identisch mit den Enzymen von Mensch und *P. pygmaeus* sind. Darüber hinaus zeigen die Sequenzen der 12/15-LOX von Schimpanse und Gorilla gegenüber der Sequenz der humanen 12/15-LOX eine Homologie von 99 %. Die Aminosäuresequenz von *M. mulatta* kommt mit 94 % den Hominidae am nächsten, jedoch lassen deren Sequenzdeterminanten auf eine 12-Lipoxygenierung schließen, was experimentell in dieser Arbeit bestätigt wurde. Es liegen zwar zurzeit keine weiteren Daten zum Expressionsverhalten der anderen Primaten-12/15-LOXn vor, allerdings ist auf Grundlage ihrer Sequenz von einer 12-Lipoxygenierung auszugehen (Abb. 4.3.). Alle bisher sequenzierten LOX-Isoformen besitzen im Bereich der Sloane-Determinanten ein Valin, welches wie für die *M. mulatta* 12/15-LOX auf ein C12-lipoxygenierendes Enzym schließen lässt. Die einzige bisherige Ausnahme in dieser Hypothese bildet das Kaninchen, welches zwei unterschiedliche 12/15-LOX-Gene besitzt. Eines davon kodiert für eine 12-lipoxygenierende 12/15-LOX, das andere für ein 15-lipoxygenierendes Enzym (Berger *et al.* 1998). Ob während der Evolution der tierischen Lipoxygenasen ein Übergang zu 15-lipoxygenierenden Enzymen von funktioneller Bedeutung ist, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

5. Zusammenfassung

Lipoxygenasen gehören zur heterogenen Enzymfamilie der Dioxygenasen und sind in der Lage, durch den Einbau von molekularem Sauerstoff, Hydroperoxide aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu bilden. Diese Reaktion erfolgt unter hoher Regio- und Stereospezifität. Tierische Lipoxygenasen werden dabei entsprechend der Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung in verschiedene Isoformen (z.B. 12-LOX, 5-LOX) eingeteilt. Die strukturelle Ursache für die Positionsspezifität verschiedener Isoformen ist noch nicht völlig geklärt, doch gibt es Modelle, die Erklärungsmöglichkeiten anbieten. Nach dem Triadenkonzept bilden drei kritische Aminosäuren am Boden der Bindungstasche die entscheidenden Determinanten der Positionsspezifität ausgewählter LOX-Isoformen.

Für die 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* konnte das Triadenkonzept bestätigt werden. Die Enzyme wurden als rekombinante His-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und die potentiellen Sequenzdeterminanten wurden durch ortsgerichtete Mutagenese verändert. Der Einbau von Aminosäuren mit großen Seitenketten ließ die Arachidonsäure weniger tief in die Substratbindungstasche eindringen und bewirkte damit eine 15-Lipoxygenierung. Der Einbau kleinerer Aminosäuren an diesen Stellen induzierte hingegen eine 12-Lipoxygenierung. Obwohl die Triadendeterminanten in der Primärstruktur von einander getrennt sind, beeinflussen sie sich gegenseitig, wodurch ihr funktionelles Zusammenspiel in der 3D-Struktur nachgewiesen wurde.

Aminosäuresequenzvergleiche von diversen LOX-Isoformen und Mutageneseuntersuchungen lassen vermuten, dass *S*-LOXn ein konserviertes Alanin und *R*-LOXn ein Glycin an einer kritischen Position besitzen. Folglich sollte ein Ala-zu-Gly-Austausch die Stereoselektivität verändern. Für die 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta* konnte dieses Konzept nur zum Teil bestätigt werden. Zwar konnte ein geringer Anstieg an *R*-konfigurierten Reaktionsprodukten nachgewiesen werden, die Hauptprodukte der Arachidonsäureoxygenierung waren aber weiterhin *S*-konfiguriert.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die N-terminale Domäne auf die Membranbindung hat, wurden Trunktationsmutanten, die nur aus der C-terminalen katalytischen Domäne bestanden, exprimiert. Diese Enzyme waren katalytisch aktiv und zeigten eine verringerte Bindung an Biomembranen. Die N-terminale Domäne ist folglich nicht essentiell für die enzymatische Aktivität der 12/15-LOXn von *P. pygmaeus* und *M. mulatta*, scheint jedoch die Membranbindung zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Andre, D. und K. W. Hou (1932). "The presence of a lipoid oxidase in soybean, *Glycine soya*." *C. R. Acad. Sci.* 194: 645-647.
- Andreou, A. und I. Feussner (2009). "Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism." *Phytochemistry* 70(13-14): 1504-1510.
- Andreou, A. Z., M. Vanko, L. Bezakova, et al. (2008). "Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms." *Phytochemistry* 69(9): 1832-1837.
- Assmann, G. und J. R. Nofer (2003). "Atheroprotective effects of high-density lipoproteins." *Annu Rev Med* 54: 321-341.
- Barsan, C., P. Sanchez-Bel, C. Rombaldi, et al. (2010). "Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis." *J Exp Bot* 61(9): 2413-2431.
- Berger, M., K. Schwarz, H. Thiele, et al. (1998). "Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits." *J Mol Biol* 278(5): 935-948.
- Berger, W., M. T. De Chandt und C. B. Cairns (2007). "Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease." *Int J Clin Pract* 61(4): 663-676.
- Bhattacharya, S., G. Mathew, D. G. Jayne, et al. (2009). "15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review." *Tumour Biol* 30(4): 185-199.
- Borngräber, S., M. Browner, S. Gillmor, et al. (1999). "Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity." *J Biol Chem* 274(52): 37345-37350.
- Borngräber, S., R. J. Kuban, M. Anton, et al. (1996). "Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases." *J Mol Biol* 264(5): 1145-1153.
- Boyington, J. C., B. J. Gaffney und L. M. Amzel (1993). "The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase." *Science* 260(5113): 1482-1486.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brash, A. R. (1999). "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate." *J Biol Chem* 274(34): 23679-23682.

- Brinckmann, R., K. Schnurr, D. Heydeck, et al. (1998). "Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme." *Blood* 91(1): 64-74.
- Browner, M. F., S. A. Gillmor und R. Fletterick (1998). "Burying a charge." *Nature Structural Biology* 5(3): 179-179.
- Bundy, G. L. (1985). "Nonmammalian sources of eicosanoids." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 14: 229-262.
- Cahn, R. S., C. Ingold und V. Prelog (1966). "Spezifikation der molekularen Chiralität." *Angewandte Chemie* 78(8): 413-447.
- Chen, X. S. und C. D. Funk (2001). "The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation." *J Biol Chem* 276(1): 811-818.
- Chen, X. S., U. Kurre, N. A. Jenkins, et al. (1994). "cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases." *J Biol Chem* 269(19): 13979-13987.
- Chisolm, G. M. und D. Steinberg (2000). "The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview." *Free Radic Biol Med* 28(12): 1815-1826.
- Choi, J., J. K. Chon, S. Kim, et al. (2008). "Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data." *Proteins* 70(3): 1023-1032.
- Coffa, G. und A. R. Brash (2004). "A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15579-15584.
- Coffa, G., A. N. Imber, B. C. Maguire, et al. (2005). "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): 38756-38766.
- Cyrus, T., D. Pratico, L. Zhao, et al. (2001). "Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice." *Circulation* 103(18): 2277-2282.
- Ding, X. Z., R. Hennig und T. E. Adrian (2003a). "Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer." *Mol Cancer* 2: 10.
- Ding, X. Z., W. G. Tong und T. E. Adrian (2001). "12-lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation." *Int J Cancer* 94(5): 630-636.

- Ding, X. Z., W. G. Tong und T. E. Adrian (2003b). "Multiple signal pathways are involved in the mitogenic effect of 5(S)-HETE in human pancreatic cancer." *Oncology* 65(4): 285-294.
- Drazen, J. M. (1988). "Comparative contractile responses to sulfidopeptide leukotrienes in normal and asthmatic human subjects." *Ann N Y Acad Sci* 524: 289-297.
- Duroudier, N. P., A. S. Tulah und I. Sayers (2009). "Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy." *Allergy* 64(6): 823-839.
- Eckl, K. M., P. Krieg, W. Kuster, et al. (2005). "Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis." *Hum Mutat* 26(4): 351-361.
- Epp, N., G. Fürstenberger, K. Müller, et al. (2007). "12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function." *J Cell Biol* 177(1): 173-182.
- Feussner, I. und C. Wasternack (2002). "The lipoxygenase pathway." *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-297.
- Fierro, I. M. und C. N. Serhan (2001). "Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins." *Braz J Med Biol Res* 34(5): 555-566.
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *Science* 294(5548): 1871-1875.
- Fürstenberger, G., N. Epp, K. M. Eckl, et al. (2007). "Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4): 128-134.
- George, J., A. Afek, A. Shaish, et al. (2001). "12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice." *Circulation* 104(14): 1646-1650.
- Gillmor, S. A., A. Villasenor, R. Fletterick, et al. (1997). "The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity." *Nat Struct Biol* 4(12): 1003-1009.
- Gimbrone, M. A., Jr., A. F. Brock und A. I. Schafer (1984). "Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells." *J Clin Invest* 74(4): 1552-1555.
- Glickman, M. H. und J. P. Klinman (1995). "Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction." *Biochemistry* 34(43): 14077-14092.
- Godson, C., S. Mitchell, K. Harvey, et al. (2000). "Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages." *J Immunol* 164(4): 1663-1667.

- Gronert, K., N. Maheshwari, N. Khan, et al. (2005). "A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense." *J Biol Chem* 280(15): 15267-15278.
- Haeggstrom, J. Z., A. Rinaldo-Matthis, C. E. Wheelock, et al. (2010). "Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications." *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 135-139.
- Hamberg, M. und B. Samuelsson (1974). "Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(9): 3400-3404.
- Hammarberg, T., P. Provost, B. Persson, et al. (2000). "The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity." *J Biol Chem* 275(49): 38787-38793.
- Hansbrough, J. R., Y. Takahashi, N. Ueda, et al. (1990). "Identification of a novel arachidonate 12-lipoxygenase in bovine tracheal epithelial cells distinct from leukocyte and platelet forms of the enzyme." *J Biol Chem* 265(3): 1771-1776.
- Harats, D., A. Shaish, J. George, et al. (2000). "Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(9): 2100-2105.
- Hawkins, D. J. und A. R. Brash (1987). "Eggs of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity." *J Biol Chem* 262(16): 7629-7634.
- Hennig, R., P. Grippo, X. Z. Ding, et al. (2005). "5-Lipoxygenase, a marker for early pancreatic intraepithelial neoplastic lesions." *Cancer Res* 65(14): 6011-6016.
- Henriksen, T., E. M. Mahoney und D. Steinberg (1981). "Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10): 6499-6503.
- Holgate, S. T., M. Peters-Golden, R. A. Panettieri, et al. (2003). "Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling." *J Allergy Clin Immunol* 111(1 Suppl): S18-34; discussion S34-16.
- Hornung, E., M. Walther, H. Kühn, et al. (1999). "Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 4192-4197.
- Hu, T., Z. Hu, X. Qu, et al. (2009). "[Advances in plant lipoxygenases research]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 25(1): 1-9.

- Huang, C. Y., M. A. Ayliffe und J. N. Timmis (2003). "Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus." *Nature* 422(6927): 72-76.
- Humphrey, W., A. Dalke und K. Schulten (1996). "VMD: visual molecular dynamics." *J Mol Graph* 14(1): 33-38, 27-38.
- Ivanov, I., D. Heydeck, K. Hofheinz, et al. (2010). "Molecular enzymology of lipoxygenases." *Arch Biochem Biophys* 503(2): 161-174.
- Jack, G. S., A. R. Brash, S. J. Olson, et al. (2000). "Reduced 15-lipoxygenase-2 immunostaining in prostate adenocarcinoma: correlation with grade and expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Hum Pathol* 31(9): 1146-1154.
- Jansen, C., K. Hofheinz, R. Vogel, et al. (2011). "Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept." *J Biol Chem* 286(43): 37804-37812.
- Jisaka, M., R. B. Kim, W. E. Boeglin, et al. (2000). "Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2." *J Biol Chem* 275(2): 1287-1293.
- Jobard, F., C. Lefevre, A. Karaduman, et al. (2002). "Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1." *Hum Mol Genet* 11(1): 107-113.
- Johannesson, M., L. Backman, H. E. Claesson, et al. (2010). "Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82(2-3): 121-129.
- Kelavkar, U. P., J. B. Nixon, C. Cohen, et al. (2001). "Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis." *Carcinogenesis* 22(11): 1765-1773.
- Kim, K. S., H. S. Chun, J. H. Yoon, et al. (2005). "Expression of 15-lipoxygenase-1 in human nasal epithelium: its implication in mucociliary differentiation." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(2): 77-83.
- Koeduka, T., T. Kajiwara und K. Matsui (2007). "Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*." *Curr Microbiol* 54(4): 315-319.
- Kuban, R. J., R. Wiesner, J. Rathman, et al. (1998). "The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases." *Biochem J* 332 (Pt 1): 237-242.
- Kühn, H., J. Belkner, S. Zaiss, et al. (1994). "Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis." *J Exp Med* 179(6): 1903-1911.

- Kühn, H. und A. Borchert (2002). "Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes." *Free Radic Biol Med* 33(2): 154-172.
- Kühn, H. und V. B. O'Donnell (2006). "Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases." *Prog Lipid Res* 45(4): 334-356.
- Kulkarni, S., S. Das, C. D. Funk, et al. (2002). "Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase." *J Biol Chem* 277(15): 13167-13174.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lee, T. H., C. E. Horton, U. Kyan-Aung, et al. (1989). "Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine." *Clin Sci (Lond)* 77(2): 195-203.
- Levy, B. D., C. B. Clish, B. Schmidt, et al. (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." *Nat Immunol* 2(7): 612-619.
- Liavonchanka, A. und I. Feussner (2006). "Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis." *J Plant Physiol* 163(3): 348-357.
- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* 420(6917): 868-874.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* 407(6801): 233-241.
- Maccarrone, M., M. L. Salucci, G. van Zadelhoff, et al. (2001). "Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability." *Biochemistry* 40(23): 6819-6827.
- Maddox, J. F. und C. N. Serhan (1996). "Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction." *J Exp Med* 183(1): 137-146.
- Maderna, P. und C. Godson (2009). "Lipoxins: revolutionary road." *Br J Pharmacol* 158(4): 947-959.
- Maliga, P. (2003). "Plant biology: Mobile plastid genes." *Nature* 422(6927): 31-32.
- Martin, W., B. Stoebe, V. Goremykin, et al. (1998). "Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts." *Nature* 393(6681): 162-165.
- May, C., M. Hohne, P. Gnau, et al. (2000). "The N-terminal beta-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies." *Eur J Biochem* 267(4): 1100-1109.
- McMillan, R. M. (2001). "Leukotrienes in respiratory disease." *Paediatr Respir Rev* 2(3): 238-244.

- Mehrabian, M. und H. Allayee (2003). "5-lipoxygenase and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* 14(5): 447-457.
- Melstrom, L. G., D. J. Bentrem, M. R. Salabat, et al. (2008). "Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model." *Clin Cancer Res* 14(20): 6525-6530.
- Merched, A. J., K. Ko, K. H. Gotlinger, et al. (2008). "Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators." *FASEB J* 22(10): 3595-3606.
- Meruvu, S., M. Walther, I. Ivanov, et al. (2005). "Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 280(44): 36633-36641.
- Minor, W., J. Steczko, B. Stec, et al. (1996). "Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution." *Biochemistry* 35(33): 10687-10701.
- Moore, K., K. Lovercamp, D. Feng, et al. (2010). "Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice." *Cell Tissue Res* 340(3): 569-581.
- Moreno, J. J. (2009). "New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development." *Biochem Pharmacol* 77(1): 1-10.
- Nasser, S. M. und T. H. Lee (2002). "Products of 15-lipoxygenase: are they important in asthma?" *Clin Exp Allergy* 32(11): 1540-1542.
- Neau, D. B., N. C. Gilbert, S. G. Bartlett, et al. (2009). "The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity." *Biochemistry* 48(33): 7906-7915.
- Nie, D., G. G. Hillman, T. Geddes, et al. (1998). "Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth." *Cancer Res* 58(18): 4047-4051.
- Nixon, J. B., K. S. Kim, P. W. Lamb, et al. (2004). "15-Lipoxygenase-1 has anti-tumorigenic effects in colorectal cancer." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(1): 7-15.
- Nohgawa, M., M. Sasada, A. Maeda, et al. (1997). "Leukotriene B4-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration." *J Leukoc Biol* 62(2): 203-209.
- Oldham, M. L., A. R. Brash und M. E. Newcomer (2005). "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): 39545-39552.

- Oliw, E. H. (2002). "Plant and fungal lipoxygenases." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 313-323.
- Pande, A. H., S. Qin und S. A. Tatulian (2005). "Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase." *Biophys J* 88(6): 4084-4094.
- Pidgeon, G. P., J. Lysaght, S. Krishnamoorthy, et al. (2007). "Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival." *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4): 503-524.
- Pirillo, A., P. Uboldi, C. Bolego, et al. (2008). "The 15-lipoxygenase-modified high density lipoproteins 3 fail to inhibit the TNF-alpha-induced inflammatory response in human endothelial cells." *J Immunol* 181(4): 2821-2830.
- Porta, H. und M. Rocha-Sosa (2001). "Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?" *Microbiology* 147(Pt 12): 3199-3200.
- Porta, H. und M. Rocha-Sosa (2002). "Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features." *Plant Physiol* 130(1): 15-21.
- Prigge, S. T., B. J. Gaffney und L. M. Amzel (1998). "Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases." *Nat Struct Biol* 5(3): 178-179.
- Rickert, K. W. und J. P. Klinman (1999). "Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects." *Biochemistry* 38(38): 12218-12228.
- Rodgers, K., B. McMahon, D. Mitchell, et al. (2005). "Lipoxin A4 modifies platelet-derived growth factor-induced pro-fibrotic gene expression in human renal mesangial cells." *Am J Pathol* 167(3): 683-694.
- Rouzer, C. A., T. Matsumoto und B. Samuelsson (1986). "Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(4): 857-861.
- Russell, R. B. und G. J. Barton (1992). "Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels." *Proteins* 14(2): 309-323.
- Ryan, A. und C. Godson (2010). "Lipoxins: regulators of resolution." *Curr Opin Pharmacol* 10(2): 166-172.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." *J Theor Biol* 14(3): 255-274.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samuelsson, B. (1983). "Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation." *Science* 220(4597): 568-575.
- Schewe, T., W. Halangk, C. Hiebsch, et al. (1975). "A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria." *FEBS Lett* 60(1): 149-152.
- Schneider, C., D. A. Pratt, N. A. Porter, et al. (2007). "Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis." *Chem Biol* 14(5): 473-488.
- Schwarz, K., M. Walther, M. Anton, et al. (2001). "Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 276(1): 773-779.
- Serhan, C. N. (2005). "Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(3-4): 141-162.
- Serhan, C. N., J. F. Maddox, N. A. Petasis, et al. (1995). "Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils." *Biochemistry* 34(44): 14609-14615.
- Serhan, C. N. und J. Savill (2005). "Resolution of inflammation: the beginning programs the end." *Nat Immunol* 6(12): 1191-1197.
- Shannon, V. R., E. C. Crouch, Y. Takahashi, et al. (1991). "Related expression of arachidonate 12- and 15-lipoxygenases in animal and human lung tissue." *Am J Physiol* 261(6 Pt 1): L399-405.
- Shappell, S. B., W. E. Boeglin, S. J. Olson, et al. (1999). "15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma." *Am J Pathol* 155(1): 235-245.
- Shappell, S. B., R. A. Gupta, S. Manning, et al. (2001). "15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells." *Cancer Res* 61(2): 497-503.
- Sigal, E., D. Grunberger, J. R. Cashman, et al. (1988). "Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial purification and properties." *Biochem Biophys Res Commun* 150(1): 376-383.
- Skrzypczak-Jankun, E., O. Y. Borbulevych, M. I. Zavodszky, et al. (2006). "Effect of crystal freezing and small-molecule binding on internal cavity size in a large protein: X-ray and docking studies of lipoxygenase at ambient and low temperature at 2.0 Å resolution." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(Pt 7): 766-775.

- Sloane, D. L., R. Leung, J. Barnett, et al. (1995). "Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity." *Protein Eng* 8(3): 275-282.
- Sloane, D. L., R. Leung, C. S. Craik, et al. (1991). "A primary determinant for lipoxygenase positional specificity." *Nature* 354(6349): 149-152.
- Soberman, R. J., T. W. Harper, D. Betteridge, et al. (1985). "Characterization and separation of the arachidonic acid 5-lipoxygenase and linoleic acid omega-6 lipoxygenase (arachidonic acid 15-lipoxygenase) of human polymorphonuclear leukocytes." *J Biol Chem* 260(7): 4508-4515.
- Spanbroek, R., R. Grabner, K. Lotzer, et al. (2003). "Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3): 1238-1243.
- Suzuki, H., K. Kishimoto, T. Yoshimoto, et al. (1994). "Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase." *Biochim Biophys Acta* 1210(3): 308-316.
- Takano, T., C. B. Clish, K. Gronert, et al. (1998). "Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues." *J Clin Invest* 101(4): 819-826.
- Tang, Y., M. T. Wang, Y. Chen, et al. (2009). "Downregulation of vascular endothelial growth factor and induction of tumor dormancy by 15-lipoxygenase-2 in prostate cancer." *Int J Cancer* 124(7): 1545-1551.
- Tatulian, S. A., J. Steczko und W. Minor (1998). "Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1." *Biochemistry* 37(44): 15481-15490.
- Theorell, H., R. T. Holman und A. Akeson (1947). "Crystalline lipoxidase." *Acta Chem Scand* 1(6): 571-576.
- Trebus, F., D. Heydeck, I. Schimke, et al. (2002). "Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67(6): 419-428.
- Vogel, R., C. Jansen, J. Roffeis, et al. (2010). "Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases." *J Biol Chem* 285(8): 5369-5376.
- Walch, L., X. Norel, J. P. Gascard, et al. (2000). "Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues." *Am J Respir Crit Care Med* 161(2 Pt 2): S107-111.

- Walther, M., M. Anton, M. Wiedmann, et al. (2002). "The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding." *J Biol Chem* 277(30): 27360-27366.
- Walther, M., I. Ivanov, G. Myagkova, et al. (2001). "Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis." *Chem Biol* 8(8): 779-790.
- Walther, M., J. Roffeis, C. Jansen, et al. (2009). "Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms." *Biochim Biophys Acta* 1791(8): 827-835.
- Walther, M., R. Wiesner und H. Kühn (2004). "Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium." *J Biol Chem* 279(5): 3717-3725.
- Wasilewicz, M. P., B. Kolodziej, T. Bojulko, et al. (2010). "Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis." *Int J Colorectal Dis* 25(9): 1079-1085.
- Weckler, A. T., C. Jacquot, W. A. van der Donk, et al. (2009). "Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid." *Biochemistry* 48(26): 6259-6267.
- Winkler, F. K., A. D'Arcy und W. Hunziker (1990). "Structure of human pancreatic lipase." *Nature* 343(6260): 771-774.
- Wittwer, J. und M. Hersberger (2007). "The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77(2): 67-77.
- Yamamoto, S. (1989). "Mammalian lipoxygenases: molecular and catalytic properties." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 35(4): 219-229.
- Yamamoto, S., H. Suzuki und N. Ueda (1997). "Arachidonate 12-lipoxygenases." *Prog Lipid Res* 36(1): 23-41.
- Yoshimoto, T., H. Suzuki, S. Yamamoto, et al. (1990). "Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6): 2142-2146.
- Youn, B., G. E. Sellhorn, R. J. Mirchel, et al. (2006). "Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3." *Proteins* 65(4): 1008-1020.
- Zamyatnin, A. A. (1984). "Amino acid, peptide, and protein volume in solution." *Annu Rev Biophys Bioeng* 13: 145-165.

Zheng, Y., W. E. Boeglin, C. Schneider, et al. (2008). "A 49-kDa mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality." *J Biol Chem* 283(8): 5138-5147.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Vogel, R., C. Jansen, J. Roffeis, et al. (2010). "Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases." *J Biol Chem* 285(8): 5369-5376.

Jansen, C., K. Hofheinz, R. Vogel, et al. (2011). "Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept." *J Biol Chem* 286(43): 37804-37812.

Walther, M., K. Hofheinz, R. Vogel, et al. (2011). "The N-terminal beta-barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions." *Arch Biochem Biophys* 516(1): 1-9.

Erklärung

„Ich, Robert Vogel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Rekombinante Expression von Säugetierlipoxygenasen und ortsgerichtete Mutagenese der Sequenzdeterminante für die Reaktionsspezifität“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

10.01.2011

Robert Vogel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die sehr gute Betreuung in allen Abschnitten der Arbeit. Sein Engagement und ständige Diskussionsbereitschaft trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Kühn für die allgegenwärtige Hilfe bei Problemen und gute Atmosphäre, sei sie bei Arbeiten im Labor, oder auch privat. Im Speziellen bedanke ich mich bei:

Frau Monika Anton, die mich in alle nötigen Laborarbeiten eingewiesen und mir somit ein selbstständiges Arbeiten ermöglicht hat, sowie für ihre tatkräftige Unterstützung bei vielen Experimenten.

Herrn Dr. Matthias Walther, der mich besonders bei den Trunkationsexperimenten und der Suche nach Aminosäuresequenzen unterstützt hat.

Frau Sabine Stehling und Herrn Dr. Igor Ivanov für die Unterstützung bei der Aufreinigung der Proteine und bei HPLC-Untersuchungen.

Frau Heike Schiebel für wertvolle Tipps zu einem effektiveren Arbeiten und viele unterhaltsame Diskussionen, welche die Arbeit im Labor verkürzten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei:

Frau Dr. Laura Pieper für zahlreiche spannende und anregende Diskussionen über wissenschaftliches Arbeiten und wertvolle Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Reinhard Weise und Herrn Uwe Schlecht für das Korrekturlesen und Anmerkungen zu Textformatierungen und Formulierungen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung meiner gesamten bisherigen Ausbildungszeit und während der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner Familie und allen Freunden, die mich unterstützt und immer wieder aufgebaut haben, wenn es einmal nicht so gut lief.