

1. EINLEITUNG

1.1. Die Entzündung ist Teil der Immunantwort

1.1.1. Definition und chronologischer Ablauf der Entzündung

Als Entzündung wird die Reaktion eines komplexen Organismus auf einen entzündungsauslösenden Reiz definiert. Damit stellt die Entzündungsreaktion einen aktiven Abwehrprozess dar, der das Ziel verfolgt, den entzündungsauslösenden Reiz zu beseitigen. Die Entzündungsreaktion wird nach CORNELIUS CELSUS (um 30 v. Chr.) durch vier Kardinalsymptome, nämlich Rötung (*Rubor*), Schwellung (*Tumor*), Erwärmung (*Calor*) und Schmerz (*Dolor*) gekennzeichnet. GALENUS VON PERGAMON (um 150 n. Chr.) fügte noch ein fünftes klinisches Symptom hinzu die Funktionseinschränkung (*Functio laesa*). Die Entzündungsreaktion kann je nach ihrem zeitlichen Verlauf in mehrere Formen eingeteilt werden [RIEDE *et al.*, 2004; TILL, 1999]:

- A) Perakute Entzündung (Stunden)
- B) Akute Entzündung (Tage)
- C) Subakute Entzündung (Wochen)
- D) Chronische Entzündung (Monate, Jahre)

In den meisten Fällen heilen akute Entzündungen innerhalb weniger Tage ab und hinterlassen keinerlei funktionelle Defizite. Sie können aber auch andauern und als Begleitsymptom bei chronischen Erkrankungen über viele Jahre bzw. für den Rest des Lebens nachweisbar bleiben. Prinzipiell sollte die Entzündungsreaktion als Bestandteil der Immunantwort angesehen werden, von der ein Organismus profitiert. Obwohl sie in ihrer akuten Phase lokal destruktiv wirkt, ist sie für das Individuum insgesamt protektiv und damit sinnvoll. Erst wenn sich während des Entzündungsverlaufes Probleme einstellen, die zu einem Verlust der Kontrollmechanismen führen, wird die Entzündungsreaktion zum gesundheitlichen Problem. Deshalb sollte nicht jede Bagatellentzündung sofort medikamentös behandelt werden. Pharmakologische Interventionen sind nur bei lang andauernden generalisierten Entzündungen erforderlich, bei denen die Entzündungssymptome das metabolische Gleichgewicht des Gesamtorganismus stören.

Die Natur der entzündungsauslösenden Reize ist äußerst vielfältig. So können mechanische (Verletzungen), thermische (Verbrennungen), aktinische (Strahlen), chemische (Verätzungen), immunlogische (Allergene) und mikrobielle (Viren, Bakterien und Parasiten) Ursachen zu Entzündungen führen. Obwohl sich die aus diesen Reizen ableitenden Mechanismen un-

terscheiden, läuft jede Entzündungsreaktion nach einem ähnlichen Muster ab. Nach dem Auftreten des Reizes kommt es zunächst zu einer Vasodilatation, die zu einer lokalen Hyperämie im entzündeten Gewebe führt. Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion erhöht sich die Permeabilität der Blutgefäße, was zu einer Absonderung von intravasaler Flüssigkeit und zum gerichteten Austritt von Entzündungszellen, zunächst vor allem von neutrophilen Granulozyten, führt. Dieser Prozess (Chemokinese) wird durch ein komplexes Muster von Botenstoffen reguliert, die von Zellen in der unmittelbaren Umgebung des entzündungsauslösenden Reizes bzw. von den Abwehrzellen selbst abgegeben werden [LUSTER *et al.*, 2005]. Durch die eingewanderten Immunzellen kommt es zur aktiven Bekämpfung des entzündungsauslösenden Reizes, wobei die Phagozytose eine zentrale Rolle spielt [RIEDE *et al.*, 2004; TILL, 1999]. Nachdem der Reiz beseitigt worden ist, werden lokale Reparaturmechanismen eingeleitet, die entweder die ursprüngliche Gewebestruktur vollständig wiederherstellen (*restitutio ad intergrum*) oder Narbengewebe bilden. Die Narbenbildung ist vor allem auf die Neubildung von Fibroblasten zurückzuführen, die aktiv Kollagen und andere Bindegewebsproteine synthetisieren, so dass funktionsfähiges Gewebsparenchym durch funktionsloses Narbengewebe ersetzt wird [RIEDE *et al.*, 2004; TILL, 1999].

1.1.2. Mechanismen der akuten und chronischen Entzündungsreaktion

Als schnelle und direkte Antwort des Organismus auf einen entzündungsauslösenden Reiz entsteht zunächst eine lokal begrenzte akute Entzündung. Wie bereits beschrieben, ist dieser Vorgang durch eine veränderte Hämodynamik, durch Austritt von Plasmabestandteilen aus den Blutgefäßen und das Einwandern (Diapedese) von neutrophile Granulozyten ins Entzündungsgebiet geprägt. Die Diapedese beginnt intravasal mit einer Anheftung der Abwehrzellen an das Gefäßendothel und wird durch Adhäsionsmoleküle [KVIETYS und SANDIG, 2001] vermittelt. Diese Oberflächenproteine (z.B. Integrine, Selektine) werden auf Endothelzellen, aber auch auf den Entzündungszellen exprimiert und vermitteln den Zell-Zell-Kontakt zwischen Gefäßwand und Zellen des strömenden Blutes. Nach der Adhäsion wandern die Blutzellen zwischen den Endothelzellen hindurch und gelangen zunächst in tiefere Schichten der Gefäße und schließlich ins umgebende Gewebe. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird über Signalmoleküle, die im entzündeten Gewebe produziert werden, angeschaltet, so dass immer mehr Entzündungszellen rekrutiert werden. Diese Zellen produzieren ein komplexes Muster pro-inflammatorischer Mediatoren, die den Stoffwechsel der Zellen in der Umgebung des entzündungsauslösenden Reizes regulieren und weitere Entzündungszellen (Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten) anlocken. Alle lokalen Mechanismen der akuten

Entzündungsreaktion sind darauf ausgerichtet, den entzündungsauslösenden Reiz so schnell wie möglich zu eliminieren und damit systemische Veränderungen des Gesamtorganismus so gering wie möglich zu halten.

In den meisten Fällen ist eine lokale Begrenzung der Entzündungsreaktion allerdings nicht zu erreichen. So werden lokal produzierte pro-inflammatorische Zytokine mit dem Blut in andere Regionen des Körpers transportiert und bewirken dort funktionelle Veränderungen. Diese Veränderungen sind vielfältig und müssen als systemische Abwehrreaktionen bewertet werden, die zur Beseitigung der Entzündungsursachen beitragen. So führt z.B. das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1), dessen Synthese bei fast jeder Entzündung hochreguliert wird, zu vielfältigen Veränderungen in einer Reihe von Zellen (Abbildung 1).

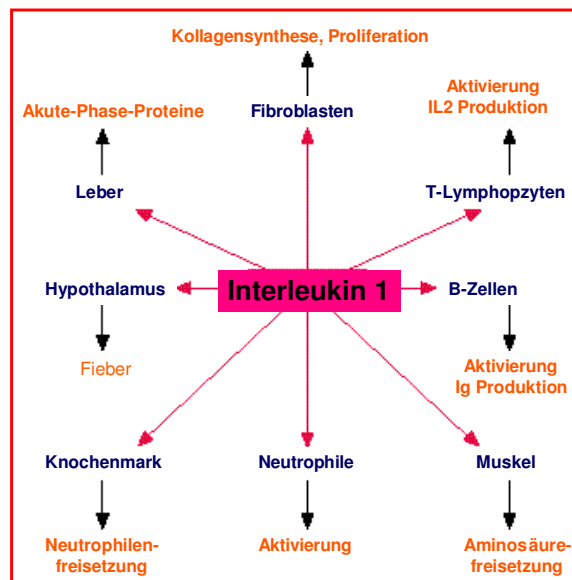


Abbildung 1: Biologische Wirkung des Interleukin-1 im Rahmen der systemischen Reaktion auf einen entzündungsauslösenden Reiz

So wirkt IL-1 für Immunzellen meist als Stimulator. In T-Lymphozyten z.B. wird die Expression von Interleukin-2 (IL-2) hochreguliert, welches für das Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem von großer Bedeutung ist [GRANUCCI *et al.*, 2003]. In B-Lymphozyten kommt es zu einer Aktivierung der Produktion von Immunglobulinen und auch neutrophile Granulozyten werden stimuliert. Neben seiner Wirkung auf immunkompetente Zellen wirkt IL-1 aber auch auf andere Gewebe. So wurde im Knochenmark eine verstärkte Freisetzung von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen und im Muskel kommt es zum erhöhten Proteinabbau, der durch eine verstärkte Freisetzung von Aminosäuren gekennzeichnet ist. Im Bindegewebe wird die Kollagensynthese erhöht und im Gehirn verstellt sich der Sollwert für die Körpertemperatur (Fieber). Eine der am besten untersuchten systemischen Wirkungen von IL-1 ist die hepatische Synthese von Akutphasenproteinen [BAUMANN

et al., 1988]. Diese bilden eine Klasse von sekretorischen Proteinen, die während der akuten Entzündungsreaktion in der Leber synthetisiert und dann ins strömende Blut abgegeben werden, wo sie als diagnostische Marker nachgewiesen werden können. In diese Klasse sind das C-reaktive Protein [VERMEIRE *et al.*, 2004], das Haptoglobin [WANG, Y. *et al.*, 2001], das Fibrinogen [ANDREOTTI *et al.*, 1999], die C3-Komponente des Komplementsystems [SAHU und LAMBRIS, 2001] sowie das mannosebindende Lektin [KILPATRICK, 2002] einzuordnen. Die spezifische biologische Funktion der meisten Akutphasenproteine bei der Entzündungsreaktion ist in vielen Fällen noch nicht geklärt. Für das C-reaktive Protein und das mannosebindende Lektin wurden jedoch Oponierungseigenschaften beschrieben.

In den meisten Fällen heilt die Entzündung nach einer gewissen Zeit ab, sobald der entzündungserregende Reiz beseitigt ist. In einigen Fällen verschwindet jedoch der entzündungserregende Reiz nicht vollständig, was eine Chronifizierung der Entzündung zur Folge hat. Die Pathomechanismen der chronischen Entzündung unterscheiden sich deutlich von denen der akuten Phase. Dies kann u.a. auch daraus abgeleitet werden, dass die Zellzusammensetzung unterschiedlich ist. Während im akut entzündeten Gewebe vor allem neutrophile Granulozyten nachzuweisen sind, kommt es bei chronischen Entzündungen zum verstärkten Einstrom von Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Dadurch lässt sich bei der chronischen Entzündung ein komplexeres Muster von Boten- und Signalstoffen nachweisen, in das sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Substanzen einbezogen sind. In diesem Sinne kann die chronische Entzündung als unvollständige Genesung angesehen werden, bei der pro- und anti-inflammatorische Prozesse über eine lange Zeitspanne hinweg miteinander konkurrieren.

1.1.3. Heilung der Entzündung (inflammatory resolution)

Lange Zeit wurde vermutet, dass die Heilung einer Entzündung ausschließlich darauf zurückzuführen ist, dass es zu einer Erschöpfung der Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren kommt und damit auch die Entzündungssymptome nachlassen. Heute weiß man allerdings, dass der Heilungsprozess eine aktive Stoffwechsellumstellung im entzündeten Gewebe ist und mit Veränderungen in der Zusammensetzung der Entzündungszellen und im Muster der Entzündungsmediatoren einhergeht [SERHAN, 1991]. Als Konsequenz dieser Veränderungen kommt es u.a. zu einer Verringerung der Biosynthese pro-inflammatorischer Signalmoleküle und zum Anschalten der Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren. So wurde beim zeitlichen Verlauf der Entzündungsheilung in experimentellen Entzündungsmodellen eine Verringerung der Synthese pro-inflammatorischer Prostaglandine über den COX-2 Weg beschrieben [SERHAN, 1991]. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Bildung anti-inflammatori-

scher Eikosanoide (Lipoxine, Resolvine) beobachtet. Die Heilungsphase der Entzündung geht u.a. mit einer verstärkten Produktion von eosinophilen Granulozyten einher, die sich in einer Eosinophilie im Blut widerspiegelt. Prinzipiell ist die Heilungsphase dadurch gekennzeichnet, dass Phagozyten das entzündliche Gewebe vom „Entzündungsmüll“ (Gewebetrümmer, apoptotische Zellen) säubern und die ursprüngliche Gewebestruktur wieder aufgebaut wird [RIEDE *et al.*, 2004; TILL, 1999].

Beim Übergang von der akuten Entzündungs-Phase zur -Heilung verändern die im entzündeten Gewebe vorhandenen Zellen ihren Phänotyp. So konnte für neutrophile Granulozyten gezeigt werden, dass sie in dieser Entzündungsphase einem Phänotyp-*Switch* unterliegen, der zunächst pro-inflammatorischen Zellen einen anti-inflammatorischen Charakter verleiht. Diese Phänotypveränderung wird u.a. dadurch deutlich, dass diese neutrophilen Granulozyten dann anti-inflammatorische Mediatoren synthetisieren [SERHAN, 1991].

1.1.4. Pharmakologische Beeinflussung der Entzündungsreaktion

Da die Entzündung ein Begleitsymptom sehr vieler Erkrankungen ist, kommt ihrer pharmakologischen Beeinflussung große Bedeutung zu. Unter den derzeit verschriebenen Medikamenten nehmen Entzündungshemmer (Antiphlogistika) eine Spitzenstellung ein. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass für viele entzündliche Erkrankungen noch keine kausalen Therapiekonzepte zur Verfügung stehen und deshalb häufig eine symptomatische antiphlogistische Therapie gewählt werden muss. Diese Therapie muss vor allem bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen über viele Jahre oder sogar lebenslang fortgesetzt werden. Da Eikosanoide zu den wichtigsten Entzündungsmediatoren zählen [FUNK, 2001], wurden vor allem Medikamente entwickelt, die die Synthese von pro-inflammatorischen Eikosanoide hemmen. Grundsätzlich stehen zwei Arten von Antiphlogistika zur Verfügung, die in die Eikosanoidsynthese eingreifen:

- steroidale Antiphlogistika und
- nichtsteroidale Antiphlogistika.

Eine wesentliche Wirkung der steroidal Antiphlogistika ist, dass die Freisetzung von Arachidonsäure (5Z,8Z,11Z,14Z-Eikosatetraensäure) aus den zellulären Phospholipiden gehemmt und damit die Eikosanoidsynthese herunterreguliert wird. Leider besitzen therapeutisch angewendete Steroide eine Reihe gravierender Nebenwirkungen, die eine Langzeittherapie nur für bestimmte Erkrankungen sinnvoll erscheinen lassen. Im Gegensatz dazu sind die nichtsteroidalen Antiphlogistika in der Regel besser verträglich und können auch über längere Zeiträume eingenommen werden. Die meisten nichtsteroidalen Antiphlogistika, die der-

zeit verschrieben werden, sind Hemmstoffe der initialen Reaktion der Prostaglandinsynthese. Die Zyklooxygenase (COX), auch bekannt als Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase, ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostanoiden (Prostaglandine und Thromboxane). Aufgrund der Tatsache, dass es zwei Isoformen der COX gibt (COX-1 und COX-2), kann man die COX-Inhibitoren in unspezifische und isoform-spezifische Hemmstoffe einteilen [SMITH *et al.*, 2000]. Die unspezifischen COX-Inhibitoren beeinflussen die Aktivität beider Isoformen, während die COX-2-spezifischen Hemmstoffe nur die COX-2 hemmen. Wegen ihrer höheren Selektivität verursachen spezifische COX-2 Inhibitoren (*Coxibs*) geringere Nebenwirkungen und sind in den meisten Fällen besser verträglich. In jüngster Zeit wurden allerdings bei einer Reihe von Patienten, die über längere Zeit mit *Coxibs* behandelt wurden, gravierende Herz-Kreislauf-Probleme diagnostiziert, was zwischenzeitlich zur Rücknahme der Medikamente mit dem Wirkstoff *Rofecoxib* (*Vioxx*[®], *Vioxx Dolor*[®], *Ceox*[®]) führte. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass diese Nebenwirkungen klassenspezifisch sind, d.h. dass sie in mehr oder weniger schwerer Form für alle *Coxibs* beobachtet wurden. Deshalb ist bei der Anwendung der *Coxibs* bei Patienten mit erhöhtem Risiko für kardio-vaskuläre Erkrankungen besondere Vorsicht geboten.

1.2. Eikosanoide sind effektive Entzündungsmediatoren

Eikosanoide bilden eine Familie von bioaktiven Lipiden, die als Hormone wirken [FUNK, 2001]. Sie werden von allen Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) gebildet, sind aber auch in somatischen Körperzellen (Niere, Magen, Geschlechtsorgane usw.) nachweisbar. Nach ihrer Synthese werden Eikosanoide entweder ins Blut abgegeben und zu den entsprechenden Zielzellen transportiert, oder sie wirken als Gewebshormone in unmittelbarer Nähe ihres Syntheseortes.

Die biologische Bedeutung der Eikosanoide ist äußerst vielfältig [FUNK, 2001]. Eine der ersten beschriebenen Wirkungen war die Induktion der Uteruskontraktion beim Geburtsvorgang. Auch heute noch werden Prostaglandine, besonders das $\text{PGF}_{2\alpha}$, noch zur Geburtseinleitung in der klinischen Praxis eingesetzt. In späteren Phasen der Eikosanoidforschung wurden gastroprotektive Wirkungen von Prostaglandinen (vor allem PGE_2) beschrieben [SMITH *et al.*, 2000]. Eine Prostaglandinsynthese-Hemmung durch z.B. Azetylsalizylsäure (Aspirin[®]) führt häufig zu einer Minderdurchblutung der Magenschleimhaut und damit zur Gastritis bzw. zum Magen-Ulkus. In der Niere regulieren Prostaglandine die Wasserausscheidung, und auch hier spielt das PGE_2 eine entscheidende Rolle. Der Vasotonus und die Fähigkeit

bestimmter Blutzellen (besonders von Thrombozyten und Leukozyten) zur Adhäsion an die Gefäßwand wird durch das Wechselspiel zweier antagonistisch wirkender Prostaglandine, dem Prostazyklin (PGI_2) und dem Thromboxan A_2 (TXA_2), reguliert. Dabei induziert das Thromboxan eine Kontraktion der Gefäße und eine Erhöhung der Zelladhäsion, während das Prostazyklin eine gegenregulatorische Funktion ausübt [ULLRICH *et al.*, 2001]. Leukotriene, insbesondere die Zysteinyl-Leukotriene LTC_4 und LTD_4 wirken als starke Konstriktoren der Bronchialmuskulatur und spielen damit eine bedeutsame Rolle bei der Pathogenese des Bronchialasthmas [NAGATA und SAITO, 2003]. Leukotriensynthese-Hemmer und Leukotrienantagonisten stellen deshalb Antiasthmatica dar [GARCIA-MARCOS und SCHUSTER, 1999].

Eine besondere Rolle spielen Eikosanoide als Mediatoren bei der Pathogenese der Entzündung. So ist seit Jahren bekannt, dass der anti-entzündliche Effekt von Aspirin[®] und anderer nichtsteroidaler Antiphlogistika auf eine Hemmung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen ist [SMITH *et al.*, 2000]. Eikosanoide beeinflussen den Stoffwechsel (Aktivierung und Mediatorsynthese) und die Bewegungseigenschaften (Chemotaxis und Chemokinese) von Entzündungszellen, die Permeabilität von Blutkapillaren sowie den Blutfluss und die Flüssigkeitsverteilung im peripheren Gewebe. Das Leukotrien B_4 (LTB_4) ist einer der am stärksten chemotaktisch wirkenden Mediatoren im tierischen Organismus und erhöht darüber hinaus den Aktivitätszustand fast aller Abwehrzellen [YOKOMIZO *et al.*, 2001]. Bis vor wenigen Jahren war man überwiegend der Meinung, dass Eikosanoide vorwiegend pro-inflammatorische Wirkungen ausüben würden. Heute weiß man jedoch, dass bestimmte Eikosanoide (z.B. Lipoxine, Resolvine) aktiv die Heilungsphase der Entzündung einleiten [SERHAN, 1991]. Im Zusammenspiel mit anderen Mediatoren induzieren diese Eikosanoide Phänotypveränderungen von Entzündungszellen (Granulozyten, Monozyten), so dass diese anti-inflammatorische Eigenschaften annehmen. Durch diese experimentellen Befunde ergab sich ein völlig verändertes Bild die Rolle von Eikosanoiden bei der Entzündungsreaktion. Danach sind Eikosanoide nicht nur an der Einleitung der Entzündungsreaktion beteiligt, sondern ihnen kommt auch eine wichtige Rolle bei der Entzündungsheilung zu.

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Veränderungen der Eikosanoidsynthese während des zeitlichen Ablaufs der Entzündungsreaktion liefert die Aspirin[®]-Behandlung. Azetylsalizylsäure (Aspirin[®]) führt zu einer irreversiblen Inaktivierung der COX-1 durch Azetylierung eines essentiellen Serinrestes am aktiven Zentrum des Enzyms. Die für die Pathogenese der Entzündung wichtigere COX-2 wird durch Aspirin[®] nicht nur gehemmt sondern in eine 15R-LOX umgewandelt [SMITH *et al.*, 2000]. Ihr primäres Oxygenierungsprodukt der Arachidonsäure ist dann nicht mehr PGG_2 , sondern 15R-HpETE, das weiter zu anti-inflammatorischen

Lipoxinen umgewandelt werden kann. Damit wird die primär pro-inflammatorisch wirkende COX-2 durch Aspirin[®]-Behandlung zu einer anti-inflammatorisch wirkenden Lipoxygenase (LOX) umfunktioniert.

1.2.1. Die Biosynthese von Eikosanoiden erfolgt über die Arachidonsäure-Kaskade

Eikosanoide werden wie oben bereits erwähnt vorwiegend aus Arachidonsäure gebildet. Der zelluläre Spiegel an freien Fettsäuren ist allerdings sehr gering, so dass die Substrate der Eikosanoidsynthese erst aus zellulären Phospholipiden freigesetzt werden müssen. Diese initiale Reaktion der Arachidonsäure-Kaskade wird durch Phospholipasen A₂ katalysiert. Im Zytosol ruhender Entzündungszellen liegen verschiedene Isoformen von Phospholipasen A₂ vor. Nach Stimulierung der Zellen durch entzündungserregende Reize kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zu einer Aktivierung von Phospholipasen A₂ [KUDO und MURAKAMI, 2002]. Bei diesem Vorgang wandern die Enzyme aus dem Zytosol zur zytosolischen Seite intrazellulärer Membranen und setzen durch ihre katalytische Aktivität Arachidonsäure frei, die dann von den nachfolgenden Enzymen der Arachidonsäure-Kaskade in verschiedene Produkte umgewandelt werden kann. Abbildung 2 gibt einen vereinfachten Überblick über die Arachidonsäure-Kaskade.

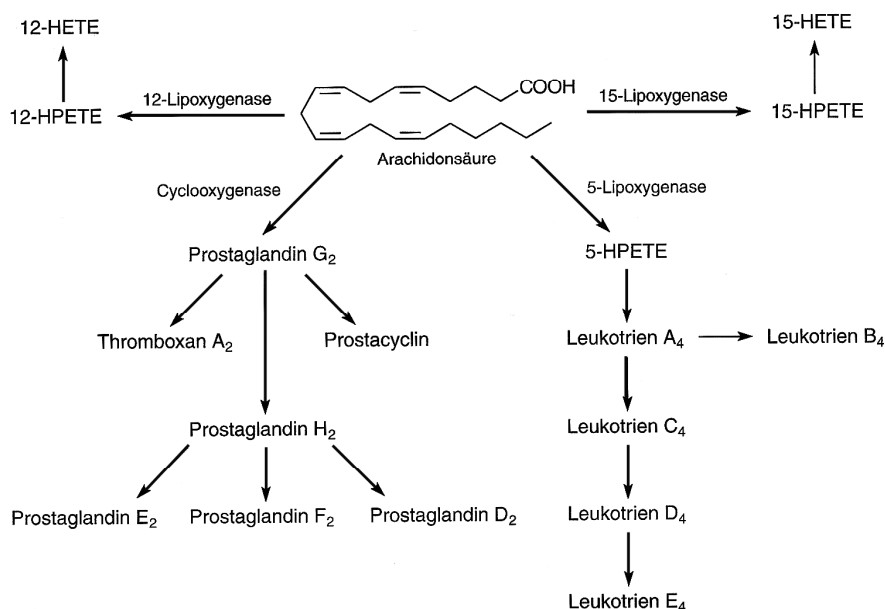


Abbildung 2: Vereinfachter Überblick über die Arachidonsäure-Kaskade in humanen Zellen. Der Cyt-P450-Weg, der in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wird, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

Generell besteht die Arachidonsäure-Kaskade aus drei voneinander unabhängigen Stoffwechselwegen: 1.) Dem **Zyklooxygenaseweg** (COX), 2.) dem **Lipoxygenaseweg** (LOX) und 3.) dem **Zytochrom-P450-Weg** (Cyt-P450). Alle drei Stoffwechselwege sind abhängig von

der Anwesenheit molekularen Sauerstoffs, der während der Eikosanoidsynthese in die Fettsäuresubstrate eingebaut wird. Über den COX-Weg werden die klassischen Prostaglandine (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) sowie die antagonistisch wirkenden Mediatoren Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) synthetisiert. Der LOX-Weg führt zur Synthese von Leukotrienen (LTB₄, LTC₄, LTD₄), Hydroxyfettsäuren, Lipoxinen und Hepoxilinen, die u.a. für die Regulation der Entzündungsreaktion bedeutsam sind. Über den Cyt-P450-Weg werden ungesättigte Fettsäuren vor allem zu Epoxyderivaten oxygeniert [MCGIFF, 1991]. Die Epoxy-Eikosanoide sind in wässrigen Lösungen teilweise instabil und werden *in vivo* sehr leicht zu Dihydroxyderivaten hydrolysiert. Sowohl für die primären Oxygenierungsprodukte des Cyt-P450-Weges (Epoxy-Eikosanoide) als auch für deren Hydrolyseprodukte (vicinale Diole) ist eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten beschrieben worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Cyt-P450-Weg jedoch nicht näher behandelt.

1.2.2. Der Zykllooxygenaseweg der Arachidonsäure-Kaskade

Freie Arachidonsäure wird über den COX-Weg zu zyklischen Oxygenierungsprodukten, den sogenannten Prostaglandinen, umgewandelt. Der initiale Schritt dieses Stoffwechselweges ist die COX-Reaktion. Dabei werden zwei Moleküle Sauerstoff in ein Fettsäuremolekül eingebaut, wobei das zyklische Endoperoxid PGG₂ entsteht.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass zwei COX-Isoformen, COX-1 und COX-2, existieren. Beide Enzyme werden durch unabhängige Gene kodiert, katalysieren aber die gleiche Reaktion. Die COX-1 wird in meisten tierischen Zellen konstitutiv exprimiert und ist für die Synthese der „physiologisch wirkenden“ Prostaglandine verantwortlich. Die COX-2 wird u.a. in Entzündungszellen exprimiert. Dabei ist die Expressionshöhe sehr stark an den Aktivierungszustand der Zellen gekoppelt. In ruhenden Zellen ist lediglich eine basale Expression des Enzyms nachweisbar, während es nach Stimulierung mit pro-inflammatorischen Mediatoren zu einer starken Hochregulation der COX-2-Expression kommt. Die meisten Enzyme des COX-Weges wurden kloniert und für einige, einschließlich den beiden COX-Isoformen [GARAVITO *et al.*, 2002], liegen Kristallstrukturen vor.

1.2.3. Der Lipooxygenaseweg der Arachidonsäure-Kaskade

Im Gegensatz zum Zykllooxygenase-Weg liefert der LOX-Weg lineare Lipidperoxidationsprodukte. Wegen der größeren Isoformvielfalt von LOXn ist der LOX-Weg weiter gefächert als der COX-Weg. Aufgrund unterschiedlicher Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung werden in Säugetiersystemen vier verschiedene LOX-Aktivitäten (5-LOX, 8-LOX,

12-LOX, 15-LOX) gefunden. In humanen Zellen kommt jedoch keine 8-LOX vor. Die Initialreaktion des LOX-Weges ist die Oxygenierung (Einführung molekularen Sauerstoffs) mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu linearen Peroxidationsprodukten (HpETEs), wobei das Sauerstoffmolekül entsprechend der Positionsspezifität des Enzyms an unterschiedliche Kohlenstoffatome der Fettsäurekette gebunden wird. Dabei entstehen in menschlichen Zellen 5-, 12- oder 15-HpETE. Diese Fettsäurehydroperoxide werden intrazellulär schnell zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen reduziert [SCHNURR *et al.*, 1996] oder über Sekundärreaktionen zu Folgeprodukten umgelagert, von denen Leukotriene [BRYANT *et al.*, 1985], Lipoxine [SERHAN *et al.*, 1984; SERHAN, 1991; FITZSIMMONS *et al.*, 1985] bzw. Hepoxiline [PACE-ASCIAK *et al.*, 1999] wichtige Vertreter sind. Der bisher am besten untersuchte Arm des LOX-Weges ist der 5-LOX-Weg. Über diesen Weg werden die pro-inflammatorischen Zysteinylleukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sowie das Aminosäure-freie LTB₄ gebildet. Die Schlüsselreaktion der Leukotrienbildung ist die Leukotriensynthase-Reaktion, die ebenfalls von der 5-LOX katalysiert wird. In dieser Reaktion wird das lineare Fettsäurehydroperoxid 5S-HpETE zum 5,6-Epoxyderivat (LTA₄) dehydratisiert. Das LTA₄ reagiert anschließend mit Glutathion zum LTC₄ oder wird durch enzymatische Hydrolyse zum LTB₄ umgewandelt. Die Leukotrien A₄-Hydrolase hat eine bemerkenswerte Stereochemie, da trotz Verschiebung des kompletten konjugierten Triensystems eine der Doppelbindungen in der *cis*-Konfiguration verbleibt.

1.2.3.1. Pro-inflammatorische Lipxygenaseprodukte

Die in Abbildung 2 aufgeführten LOX-Produkte wirken überwiegend pro-inflammatorisch. Dies trifft insbesondere auf die Leukotriene zu [SAMUELSSON *et al.*, 1987; FUNK, 2001], die bei einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen in verstärktem Maße gebildet werden. Die Zysteinylleukotriene wirken vor allem als Konstriktoren von glatten Muskelzellen und beeinflussen den Stoffwechsel von Entzündungszellen. LTB₄ ist eine der am stärksten wirkenden chemotaktischen Substanzen des tierischen Organismus und erhöht die Migrationseigenschaften von Leukozyten. Für mehrere Hydro(pero)xyfettsäuren wurden ebenfalls pro-inflammatorische Effekte beschrieben [KÜHN, 1996], wobei die Spezifität dieser Wirkungen in vielen Fällen nicht sorgfältig untersucht wurde.

1.2.3.2. Anti-inflammatorische Lipxygenaseprodukte

Die Lipoxine-A₄ und -B₄ (LXA₄, LXB₄) stellen mehrfach hydroxylierte Arachidonsäureoxygenierungsprodukte dar, die sich durch anti-inflammatorische Wirkungen auszeichnen

[LEVY *et al.*, 2001; GODSON und BRADY, 2000; LAWRENCE *et al.*, 2002]. So konnte gezeigt werden, dass die Synthese verschiedener Lipoxinderivate am Heilungsprozess der Entzündungsreaktion beteiligt sind [LEVY *et al.*, 2001; GODSON und BRADY, 2000; LAWRENCE *et al.*, 2002]. Lipoxine werden über transzelluläre Mechanismen aus Arachidonsäure hergestellt, wobei mehrere LOX-Isoformen (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) beteiligt zu sein scheinen. Zellen, die sowohl 5- als auch 15-LOXn enthalten, können diese Produkte auch ohne transzellulären Transport synthetisieren. Der Mechanismus der Lipoxin-Wirkung ist heute noch nicht vollständig geklärt. Fest steht jedoch, dass diese Mediatoren an spezifische Oberflächenrezeptoren binden und damit in Entzündungszellen einen Phänotyp-Wechsel induzieren. Die dabei ablaufenden Veränderungen im zellulären Metabolismus wurden für Granulozyten detailliert untersucht. In jüngster Zeit konnten noch andere anti-inflammatorische LOX-Produkte (Resolvine und Protektine) identifiziert werden, die sich von anderen Fettsäuren (Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure) ableiten [LEVY *et al.*, 2001].

1.3. Lipoxygenasen sind lipidperoxidierende Enzyme

Lipoxygenasen (LOXn) bilden eine heterogene Enzymfamilie von nichthämeisen-haltigen Dioxygenasen. Sie katalysieren die stereospezifische Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einem *cis,cis*-1,4-Pentadien-Motiv zu ihren Hydroperoxyderivaten [BRASH, 1999]. Lipoxygenasen kommen weit verbreitet im Tier- und Pflanzenreich vor [BRASH, 1999; MACK *et al.*, 1987; GRECHKIN, 1998; OLIW, 2002]. In Bakterien allerdings wurden bisher nur vereinzelt echte LOX-Gene gefunden [PORTA und ROCHA-SOSA, 2001]. Da diese Gene einen hohen Verwandtschaftsgrad zu Säugetier-LOXn aufweisen, wurde ein horizontaler Gentransfer als Ursache für deren Existenz postuliert. In Hefe wurden bislang keine echten LOX-Sequenzen identifiziert. Der derzeit am besten untersuchte Vertreter der LOX-Familie ist die Sojabohnen-LOX-1.

Dieses Enzym wurde bereits in den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts als Lipoxidase entdeckt [ANDRE und HOU, 1932] und in den folgenden Jahren umfassend hinsichtlich seiner protein-chemischen bzw. enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. So gelang 1947 dessen Isolierung und Kristallisation [THEORELL *et al.*, 1947] und erst 1993 wurden dann die ersten Röntgenstrukturdaten erhalten [BOYINGTON *et al.*, 1993]. In vielerlei Hinsicht ist die Sojabohnen-LOX-1 ein gutes Model für Säugetier-LOXn, obwohl sie sich in einer Reihe von Eigenschaften von diesen unterscheidet.

1.3.1. Die Enzymfamilie der Säugetier-Lipoxygenasen

Bis Anfang der 70er Jahre ging man davon aus, dass LOXn im Tierreich nicht vorkommen. Alle bis zu diesem Zeitpunkt beobachteten Lipidperoxidationen wurden zunächst als Hämatinkatalyse gedeutet [TAPPEL, 1953; BOYD und ADAMS, 1955]. Erst mit der Entdeckung der ersten tierischen LOX in humanen Thrombozyten im Jahre 1974 konnte die Existenz tierischer LOXn zweifelsfrei nachgewiesen werden [HAMBERG und SAMUELSSON, 1974; NUGTEREN, 1975].

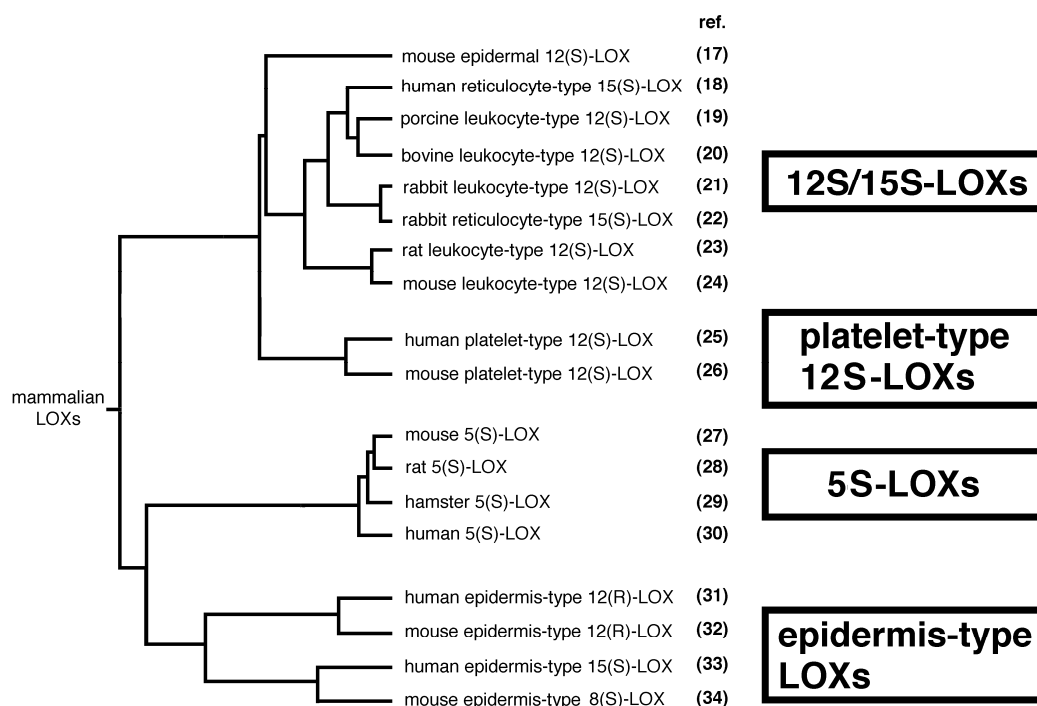


Abbildung 3: Einteilung der Säugetier-LOXn entsprechend ihres Verwandtschaftsgrades im Hinblick auf die Aminosäuresequenz [KÜHN und THIELE, 1999].

Bereits ein Jahr später wurde die zweite tierische LOX in Kaninchenretikulozyten entdeckt [SCHEWE *et al.*, 1975], die sich hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften deutlich vom Thrombozyten-Enzym unterschied. Die strukturelle Identifizierung der „*slow reacting substance of anaphylaxis*“ als ein Gemisch der LOX-Produkte Leukotrien C₄ und Leukotrien D₄ im Jahre 1979 kann als eigentlicher Startpunkt der tierischen LOX-Forschung angesehen werden [MURPHY *et al.*, 1979]. Seitdem stieg die Anzahl der identifizierten LOX-Isoenzyme kontinuierlich an. So wurden sie u.a. in menschlichen eosinophilen Granulozyten [TURK *et al.*, 1982; SIGAL *et al.*, 1988], Bronchialepithelzellen [HUNTER *et al.*, 1985; SIGAL und NADEL, 1988] und in der Uteruszervix [FLATMAN *et al.*, 1986] beschrieben.

Nach Abschluss des humanen Genomprojektes konnte festgestellt werden, dass im menschlichen Genom sechs funktionelle LOX-Gene und mehrere funktionslose Pseudogene vor-

kommen. Mit Ausnahme des 5-LOX-Gens, das auf dem Chromosom 10 lokalisiert ist, wurden alle anderen menschlichen LOX-Gene auf dem Chromosom 17 gefunden. Im Mausgenom wurden hingegen sieben funktionelle LOX-Gene identifiziert. Das überzählige Mausgen *Alox12e* (epidermale 12S-LOX) entspricht dabei dem funktionslosen Pseudogen *ALOX12P2* beim Menschen.

Historisch bedingt werden LOXn auch heute noch entsprechend ihrer Reaktionsspezifität gegenüber Arachidonsäure eingeteilt. Da diese Nomenklatur jedoch wegen der großen Vielfalt der LOX-Familie keine eindeutige Zuordnung der verschiedenen Isoformen mehr erlaubt, wurden in den letzten Jahren alternative Klassifizierungsvorschläge gemacht, bei denen der Verwandtschaftsgrad der verschiedenen Isoenzyme untereinander ausschlaggebend war. Entsprechend der Einteilung in Abbildung 3 können grundsätzlich vier LOX-Subfamilien unterschieden werden.

1.3.2. 12/15-Lipoxygenasen bilden eine Subfamilie der Säugetier-Lipoxygenasen

Die Klasse der 12/15-LOX enthält derzeit die meisten charakterisierten Isoenzyme. Diese LOXn zeichnen sich dadurch aus, dass sie Arachidonsäure entweder am C₁₂ oder am C₁₅ der Kohlenwasserstoffkette oxygenieren und damit entweder 12S-HpETE, 15S-HpETE oder eine Mischung aus beiden Produkten bilden. 12/15-LOX wurden in verschiedenen tierischen Spezies beschrieben und weisen untereinander große Ähnlichkeit auf.

1.3.2.1. Proteinchemische Eigenschaften der 12/15-Lipoxygenasen

Die am besten untersuchte tierische 12/15-LOX ist das Enzym aus Kaninchenretikulozyten [RAPOPORT *et al.*, 1979]. Sie besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa, die in zwei Domänen gefaltet ist [GILLMOR *et al.*, 1997]. Die kleine N-terminale Domäne besteht aus ca. 110 Aminosäuren, die in mehreren antiparallelen β -Faltblattstrukturen angeordnet sind. Die große katalytische Domäne setzt sich überwiegend aus α -Helizes zusammen und enthält das katalytisch wirksame Nichthäm-Eisen, das während der Reaktion einem Wertigkeitswechsel unterliegt. Für die katalytische Aktivität der Kaninchen-12/15-LOX ist die N-terminale β -Domäne verzichtbar [WALTHER *et al.*, 2002].

Die Aminosäuresequenz der Kaninchen-12/15-LOX wurde bereits 1989 durch Klonierung der entsprechenden cDNA ermittelt [FLEMING *et al.*, 1989]. Das Enzym enthält zahlreiche hydrophobe Aminosäuren und besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,5 [RAPOPORT *et al.*, 1979]. Bisher konnte keine post-translationale Modifizierung des Enzyms nachgewiesen

werden. Auch fehlen bisher Anhaltspunkte für regulatorische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Prozesse.

Wie andere LOXn enthält auch die Kaninchen-12/15-LOX ein Grammatom Nichthäm-Eisen pro Mol Enzym [RAPOPORT *et al.*, 1979]. Die Eisenligandensphäre ist ein verzerrter Oktaeder [KUBAN *et al.*, 1998], wobei die Stickstoffatome von vier Histidinresten und ein Sauerstoff des C-terminalen Isoleuzins die fünf Proteinliganden bilden [GILLMOR *et al.*, 1997]. Bei der Sojabohnen-LOX-1 ist die sechste Ligandenposition im substrat-freien Enzym durch ein Wassermolekül (bzw. ein Hydroxid-Ion) besetzt [MINOR *et al.*, 1996], das wahrscheinlich bei der Bindung des Fettsäuresubstrates verdrängt wird.

1.3.2.2. Enzymatische Eigenschaften der 12/15-Lipoxygenasen

12/15-LOXn sind durch eine breite Substratspezifität charakterisiert. Alle natürlich vorkommenden Polyenfettsäuren, wie Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure, Eikosa-pentaensäure, Dokosahexaensäure usw. werden als Substrate umgesetzt. Daneben werden auch Polyenfettsäure enthaltende Phospholipide [SCHEWE *et al.*, 1975] und Cholesterolester [BELKNER *et al.*, 1991] angegriffen, auch wenn diese in Biomembranen [KÜHN *et al.*, 1990] oder Lipoproteinen [BELKNER *et al.*, 1993] integriert sind. Die meisten 12/15-LOX besitzen eine duale Positionsspezifität, d.h. die Substratfettsäuren werden in zwei unterschiedliche Oxygenierungsprodukte umgewandelt. In Falle der Umsetzung von Arachidonsäure durch die Kaninchen-12/15-LOX wurden 15S-HpETE und 12S-HpETE in einem Verhältnis von ca. 9:1 nachgewiesen [BRYANT und BAILEY, 1981].

Die LOX-Katalyse ist eine bimolekulare Reaktion, kinetische Untersuchungen haben ergeben, dass LOXn im Allgemeinen und 12/15-LOX im Besonderen hohe Affinitäten zu beiden Substraten aufweisen. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Werte) für Fettsäuren [LUDWIG *et al.*, 1987] und Sauerstoff [JURANEK *et al.*, 1999] liegen im unteren mikromolaren Bereich. Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) der Oxygenierung verschiedener Substrate ist unterschiedlich und hängt stark vom Aufbau der Testsysteme ab. Für die freie Linolsäure wurde unter V_{max} -Bedingungen in Gegenwart von 0,1% Natriumcholat eine Wechselzahl (*Turnover*) von 20-30 s^{-1} gemessen. Für die Oxygenierung von Phospholipid-Präparationen ist die Reaktionsrate jedoch 5- bis 10-fach geringer, wobei die Art und Weise der Substratpräparation einen großen Einfluss hat. Neben diesen kinetischen Konstanten ist die LOX-Reaktion durch zwei weitere Besonderheiten charakterisiert.

A) Die Fettsäureoxygenierung beginnt mit einer kinetischen *lag*-Phase, in der die Reaktionsgeschwindigkeit stetig ansteigt, bis ein Maximalwert erreicht ist. Diese kinetische *lag*-

Phase ist darauf zurückzuführen, dass das Enzym Hydroperoxyfettsäuren benötigt, um seine volle Aktivität zu erreichen [JONES *et al.*, 1996; LUDWIG *et al.*, 1987].

B) Bei längerer Inkubation des Enzyms mit dem Fettsäuresubstrat sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, da das Enzym einer Selbstinaktivierung unterliegt. Obwohl der Mechanismus der suizidalen Inaktivierung noch nicht vollständig geklärt ist, scheint dieser Prozess mit einer kovalenten Modifizierung des Enzyms einherzugehen [WIESNER *et al.*, 2003].

12/15-LOXn sind multifunktionelle Enzyme, die neben der Fettsäureoxygenierung noch andere Reaktionen katalysieren. So werden unter bestimmten Reaktionsbedingungen Hydroperoxyfettsäuren mittels homolytischer Spaltung der Peroxygruppe in Sekundärprodukte umgewandelt. Diese Hydroperoxidase-Aktivität von LOXn wird vor allem dann bedeutsam, wenn eines der beiden Oxygenierungssubstrate (Fettsäure und/oder Sauerstoff) begrenzend wird. Weiterhin besitzen 12/15-LOXn eine Leukotriensynthase-Aktivität, d.h. sie sind in der Lage, Hydroperoxyfettsäuren in Epoxy leukotriene umzuwandeln. So konnte für die Kaninchen-12/15-LOX gezeigt werden, dass 15-HpETE in 14,15-Epoxy leukotrien A₄ überführt werden kann [BRYANT *et al.*, 1985].

1.3.2.3. Expressionsregulation der 12/15-Lipoxygenase

Die Expression der 12/15-LOX ist auf verschiedenen Ebenen der Genexpressionskaskade reguliert. Auf transkriptioneller Ebene ist die Induktion des Enzyms in humanen Monozyten durch die Th2-Zytokine Interleukin-4 und -13 besonders gut charakterisiert. Humane Blutmonozyten exprimieren keine 12/15-LOX. Nach *In vitro*-Kultur der Zellen in Gegenwart von IL-4 [CONRAD *et al.*, 1992] bzw. IL-13 [NASSAR *et al.*, 1994] konnten große Mengen an 12/15-LOX detektiert werden. Dieser Nachweis gelang durch die Quantifizierung der entsprechenden mRNA und des Enzymproteins sowie durch Aktivitätsassays. Untersuchungen zum Mechanismus der Enzyminduktion haben ergeben, dass neben einem funktionstüchtigen Zytokinrezeptor mehrere Proteinkinasen [ROY und CATHCART, 1998; XU *et al.*, 2004] und verschiedene Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) [HEYDECK *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2003] an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Weiterhin konnte eine Rolle von Histon-Azetylasen bzw. -Desazetylasen nachgewiesen werden [SHANKARANARAYANAN *et al.*, 2001]. In Abbildung 4 sind die Elemente der IL-4-induzierten Signalübertragung zusammengefasst.

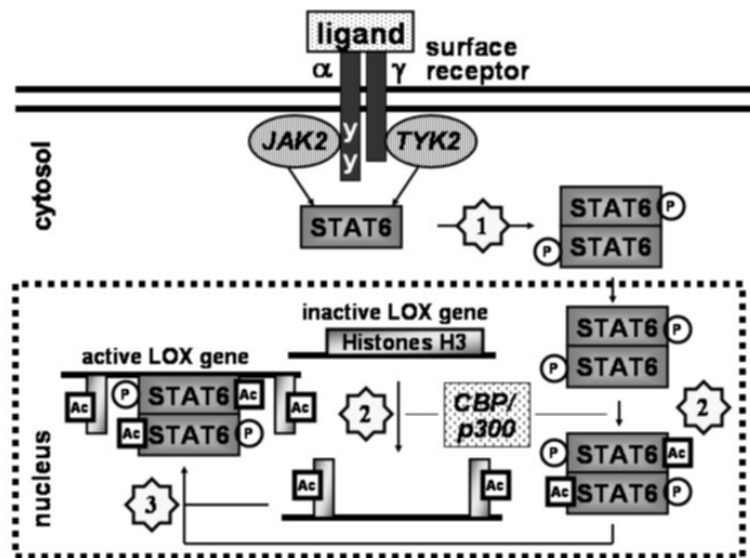


Abbildung 4: Mechanismus der durch IL-4 induzierten Expression der 12/15-LOX in humanen Monozyten. Durch Bindung von IL-4 am Zelloberflächenrezeptor werden verschiedene Proteinkinasen (Tyk2, Jak2) aktiviert, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor STAT6 phosphorylieren. Das phosphorylierte STAT6-Monomer dimerisiert und wandert in den Zellkern. Im Zellkern kommt es bei IL-4-Stimulierung zur Aktivierung der Histon-Azetyltransferase CBP/p300 die sowohl das nukleäre Histon H3 als auch das phosphorylierte STAT6-Dimer azetyliert. Durch die H3-Azetylierung wird eine Konformationsänderung der Nukleosomenstruktur induziert, die dazu führt, dass STAT6-empfindliche Sequenzen im Promotor des 12/15-LOX-Gens freigelegt werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass das phosphorylierte und azetylierte STAT6-Dimer an den Promotor des 12/15-LOX-Gens bindet und dessen Transkription ermöglicht.

Im Verlauf einer experimentellen Anämie können in reifen Kaninchen-retikulozyten große Mengen an 12/15-LOX nachgewiesen werden. In unreifen Retikulozyten ist hingegen nur die 12/15-LOX-mRNA nachweisbar. Aktives LOX-Protein wird in diesem Differenzierungsstadium kaum gefunden. Diese Konstellation deutet darauf hin, dass die Translation der vorhandenen 12/15-LOX-mRNA unterdrückt wird. Der Mechanismus dieser Translationsregulation in unreifen Erythrozyten wurde näher untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in unreifen Kaninchenretikulozyten mRNA-bindende Proteine (heterogenes nukleares Ribonukleoprotein-E1 und -K, hnRNP E1 und hnRNP K) vorkommen, die an ein repetitives Sequenzmotiv in der 3'-untranslatierten Region der 12/15-LOX-mRNA binden und damit die Translation des Transkripts verhindern [OSTARECK *et al.*, 1997; Abbildung 5]. Detaillierte mechanistische Untersuchungen haben ergeben, dass die Bindung von Hemmproteinen die Ausbildung des Translationsinitiationskomplexes verhindern, wobei es vor allem zur Hemmung der Assoziation der beiden Ribosomenuntereinheiten kommt [OSTARECK *et al.*, 2001]. Im weiteren Verlauf der Retikulozytenreifung kommt es zum proteolytischen Abbau dieser Hemmproteine, wodurch die Translationshemmung aufgehoben wird.

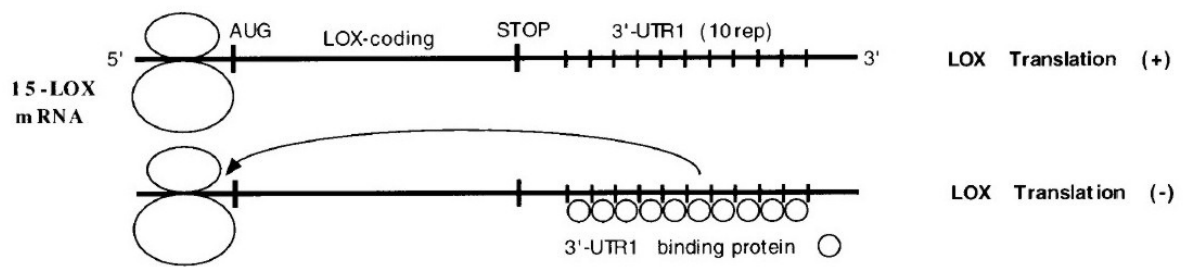


Abbildung 5: Modell der Translationsregulation der Kaninchen-12/15-LOX

Die Translation der 15 LOX-mRNA wird dadurch reguliert, dass spezifische Repressorproteine (hnRNP K und hnRNP E1) an ein repetitives Motiv in der 3'-untranslatierten Region der mRNA binden und somit die Assemblierung des translationalen Initiationskomplexes (Bindung der 60S-Ribosomen-Untereinheit) verhindern. Das regulatorische Sequenzmotiv, welches eine 10 fache Wiederholung der Sequenz $[C_4(A/G)C_3UCUUC_4AAG]$ darstellt, beginnt bereits 50 Basen nach dem Stop-Kodon [THIELE *et al.*, 1999].

Obwohl es bei der 12/15-LOX nicht zu post-translationalen Veränderungen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung kommt, gibt es einige Elemente, die die spezifische Aktivität des Enzyms beeinflussen. So erfordert die Aktivierung des Enzyms eine Oxidation des Nicht-Häm-Eisens, was u.a. durch Hydroperoxide oder Hydroperoxyfettsäuren [LUDWIG *et al.*, 1987] initiiert werden kann und geht mit einem Wertigkeitswechsel des Nicht-Häm-Eisens von der zweiwertigen $[Fe^{3+}]$ zur dreiwertigen $[Fe^{2+}]$ Form einher. Wenn diese Aktivierung unterdrückt wird, z.B. durch eine Senkung des intrazellulären Hydroperoxidtonus hervorgerufen durch eine Überexpression peroxid-reduzierender Enzyme [SCHNURR *et al.*, 1996], können zwar große Mengen an LOX-Protein nachgewiesen werden, jedoch Aktivitätsassays negativ ausfallen. Ein weiteres Element der post-translationalen Regulation ist die kalzium-abhängige Membranbindung [BRINCKMANN *et al.*, 1998]. 12/15-LOXn sind zytosolische Enzyme, die kalzium-abhängig an Biomembranen binden. Diese Membranbindung, erfordert keine speziellen Bindungsrezeptoren und kann daher auch an proteinfreien Phospholipid-vesikeln nachgewiesen werden. Die kalzium-abhängig Membranbindung geht mit einer bis zu 10-fachen Erhöhung der Fettsäureoxygenierungsrate einher. Die molekularen Ursachen für diese Aktivierung sind derzeit noch weitgehend unklar.

1.4. Monoaminoxidasen sind amin-oxidierende Enzyme, die im Stoffwechsel von Neurotransmittern bedeutsam sind

Monoaminoxidasen (MAOn, EC 1.4.3.4.) sind Flavinenzyme, die biogene und xenobiotische Monoamine durch oxidative Desaminierung zu den entsprechenden Aldehyden umwandeln (Abbildung 6). Dabei entstehen aus den Aminen zunächst Aldehyde, die in einer anschließenden Reaktion entweder zu Alkoholen reduziert oder zu entsprechenden Karbon-

säuren oxidiert werden. Weiterhin sind Ammoniak (NH_3) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) Primärprodukte der MAO-Reaktion [EDMONDSON *et al.*, 2004].

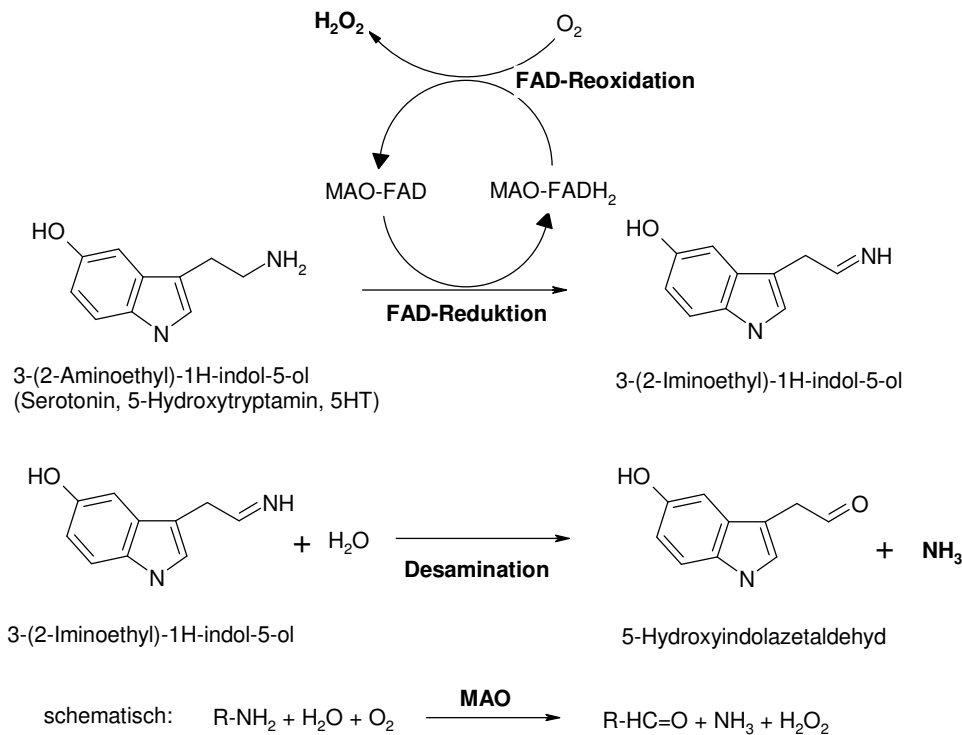


Abbildung 6: Reaktionsgleichung der MAO-Reaktion

Oxidative Desaminierung durch die Monoaminoxidase am Beispiel des biogenen Amins Serotonin. Serotonin [3-(2-Aminoethyl)-1H-indol-5-ol]; Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)

MAOn sind in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert und können daher zytosolische Substrate umwandeln. Durch ihre Fähigkeit zur Oxidation von Neurotransmittern spielen Monoaminoxidasen bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. bei Morbus Parkinson, eine wichtige Rolle [YODIM, 1980]. In der Tat werden Hemmstoffe von Monoaminoxidasen (z.B. Deprenyl) zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt [LEES *et al.*, 1977]. Weiterhin scheinen Beziehungen zwischen einer veränderten Expression von Monoaminoxidasen zum Altern, zum Suchtverhalten (Rauchen und Alkoholismus), zu stressbedingten Erkrankungen (post-traumatischer Stress und Panikattacken) sowie zu bestimmten Verhaltensstörungen (Aggressivität) zu bestehen [SHIH *et al.*, 1999]. So leiden männliche Mitglieder einer holländischen Familie, bei denen wegen einer Punktmutation im *MAOA*-Gen ein funktioneller Defekt dieses Enzyms festgestellt werden konnte, an besonders aggressiven Verhaltensstörungen [BRUNNER *et al.*, 1993].

1.4.1. Es existieren zwei Isoformen von Monoaminoxidasen (MAO-A und MAO-B)

Auf der Basis ihrer Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Hemmstoffen und entsprechend ihrer Substratspezifität wurden seit vielen Jahren zwei verschiedene Isoformen der Monoaminoxidase unterschieden:

- MAO-A: bevorzugter Abbau von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), Adrenalin und Noradrenalin in der Körperperipherie. Dieses Isoenzym wird durch Clorgylin irreversibel in mikromolaren Bereich gehemmt [HOUSLAY, 1977] und wirkt vor allem im peripheren Nervensystem und anderen peripheren Geweben.
- MAO-B: bevorzugter Abbau von Dopamin, β -Phenylethylamin und N-tele-Methylhistamin. Wird von Pargylin und Selegilin (Deprenyl, Phenyl-isopropyl-methyl-propargylamin) irreversibel gehemmt [KNOLL und MAGYAR, 1972; WALDMEIER *et al.*, 1977]. Diese Isoform wirkt vor allem im Zentralnervensystem (ZNS).

Die MAO-Isoformen sind im Tierreich weit verbreitet und die zellspezifische Expression der Enzyme in verschiedenen tierischen Spezies zeigt kaum spezies-spezifische Unterschiede [SHIH *et al.*, 1999]. Im Gehirn, dem dominanten Expressionsort der Enzyme, kommt die MAO-A vor allem in katecholaminergen Neuronen vor, während die MAO-B vorwiegend von histaminergen Neuronen und Gliazellen gebildet wird. In der Peripherie wurde die MAO-B vor allem in Thrombozyten, in der Leber und in der Niere nachgewiesen, während die MAO-A besonders in der Plazenta und in der Schilddrüse vorkommt [SHIH *et al.*, 1999].

1.4.2. Die Monoaminoxidase-Gene und deren funktionale Inaktivierung

Ein Vergleich der MAO-Sequenzen zeigt, dass beide Isoformen ein ähnliches Molekulargewicht (ca. 60 kDa) aufweisen und eine Aminosäure-Identität von 70% besitzen. Vergleicht man die Sequenzhomologien der beiden Isoformen in unterschiedlichen tierischen Spezies miteinander, so kann man feststellen, dass ein hoher Grad an Sequenzhomologie vorhanden ist. Dieser Befund kann dahingehend interpretiert werden, dass ein großer evolutionärer Druck auf den beiden Isoformen lastet, um deren spezifische Funktion während der Evolution zu erhalten.

MAO-A und MAO-B werden durch zwei unabhängige Gene kodiert. Das *MAOA*-Gen befindet sich in einem 90.660 Basen langen Genabschnitt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms im Bereich der Banden 11.23-11.4 (Abbildung 7). Etwa 20.000 Basen davon entfernt ist das *MAOB*-Gen lokalisiert. Beide MAO-Gene besitzen einen fast identischen Aufbau. Die Exon/Intron Organisation ist nahezu identisch, was auf eine hohe evolutionäre Verwandtschaft der beiden Gene hinweist [GRIMSBY *et al.*, 1991].

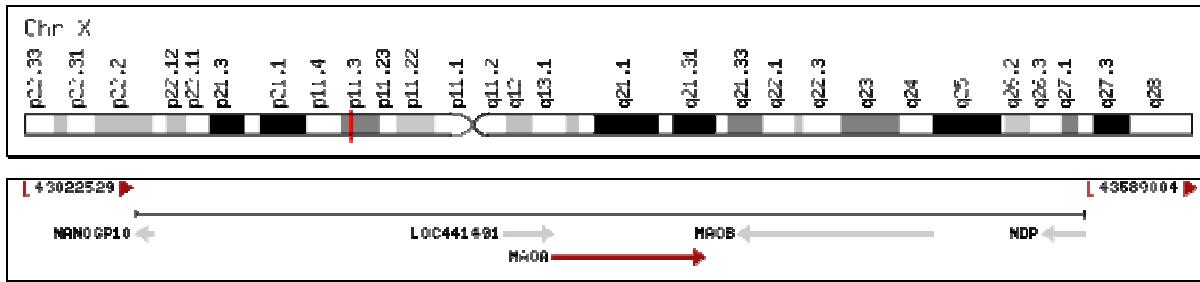


Abbildung 7: Lokalisation der MAO-Gene auf dem X-Chromosom

Die basale Promotoraktivität für beide MAO-Isoformen wurde in einem aus 150 Basen bestehenden Fragment innerhalb der 5'-flankierenden Region gefunden. Diese GC-reiche Region zeigte eine 60%-ige Sequenz-Identität zwischen den beiden Isoformen und enthält mehrere Transkriptionsfaktor-Sp1-Bindungssequenzen. Trotz dieser Ähnlichkeiten zeigten nachfolgende Untersuchungen, dass die Expression beider Isoformen unter der Kontrolle unterschiedlicher regulatorischer Sequenzen steht [ZHU *et al.*, 1992]. Der MAO-A Promotor enthält keine TATA-Box, besitzt jedoch drei nacheinander angeordnete Transkriptionsfaktor-Sp1-Elemente, die bidirektional wirksam sind. Der basale MAO-B Promotor hingegen besteht aus zwei Gruppen überlappender Transkriptionsfaktor-Sp1-Sequenzen, die durch ein CACCC-Element voneinander getrennt sind. Trotz dieser Kenntnis zu den strukturellen Eigenschaften der MAO-Gene bleibt auch heute noch weitgehend ungeklärt, welche Mechanismen für die Gewebe-spezifische Expressionsregulation der beiden Isoformen zuständig sind. [DENNEY *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1994].

Knockout-Mäuse sind sowohl für die MAO-A [CASES *et al.*, 1995] als auch für die MAO-B [GRIMSBY *et al.*, 1997] verfügbar. Die Tiere sind lebensfähig und vermehren sich normal. Drastische neurologische Ausfallserscheinungen wurden zunächst nicht beobachtet. Das könnte damit zusammenhängen, dass sich die beiden Isoformen funktionell ergänzen. So könnte ein MAO-A-Defizienz durch eine Überexpression der MAO-B kompensiert werden. Im Gehirn neugeborener MAO-A-defizienter Mäuse wurden 5-fach höhere Konzentrationen an Serotonin gefunden als in vergleichbaren Kontrolltieren. Während der Individualentwicklung gehen diese Unterschiede langsam zurück, so dass im Erwachsenenalter nur noch 2-fach erhöhte Werte nachweisbar sind. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die sich entwickelnde MAO-B einen Teil der MAO-A-Funktionen übernimmt [CASES *et al.*, 1995]. In MAO-B-defizienten Mäusen sind dagegen die zerebralen Konzentrationen an Phenylethylamin deutlich (8- bis 9-fach) höher als bei entsprechenden Kontrollen [GRIMSBY *et al.*, 1997]. Doppel-*Knockout*-Mäuse sind ebenfalls lebensfähig, weisen jedoch starke Verhaltensstörungen auf [SHIH und CHEN, 1999; CHEN *et al.*, 2004].

1.4.3. Struktur und enzymatische Eigenschaften der MAO-Isoformen

Die Gesamtstruktur der MAOn kann in vier funktionelle Domänen untergliedert werden:

- Adenosindiphosphat (ADP)-Bindungsdomäne (Aminosäuren 6-43^{*})
- Substratbindungsdomäne (Aminosäuren 178-221^{*})
- Flavinbindungsdomäne (Aminosäuren 380-458^{*})
- C-terminale Membranbindungsdomäne (Aminosäuren 491-511^{*}), mit der sich das Enzym in der Membran verankert.

Die Kristallstrukturen der MAO-Isoformen wurden aufgeklärt [DE COLIBUS *et al.*, 2005; BINDA *et al.*, 2002] und sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

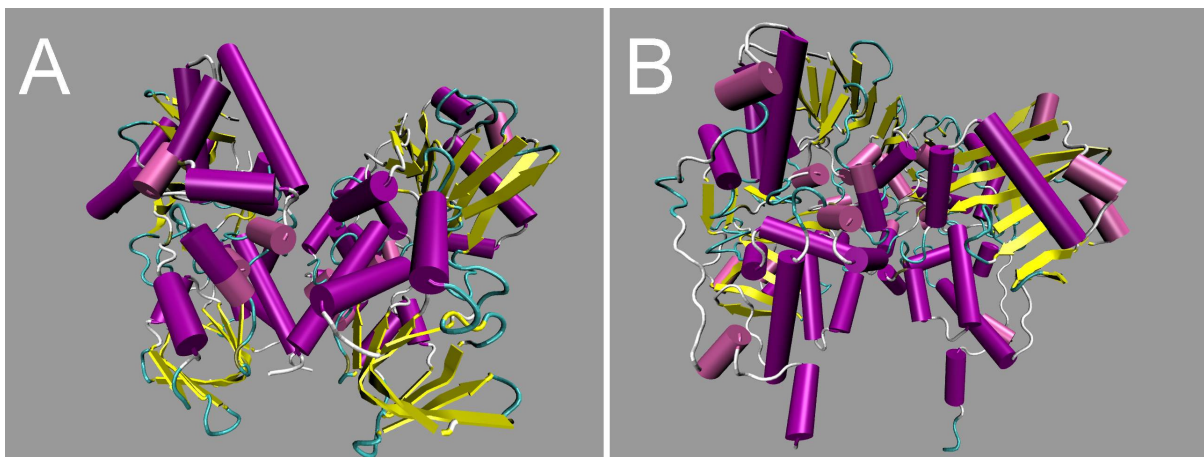


Abbildung 8: Kristallstruktur der beiden MAO-Isoformen

A) Ribbon-Diagramm des MAO-A-Dimers (Protein Data Bank: 2BXR) und B) Ribbon-Diagramm des MAO B-Dimers (Protein Data Bank: 1GOS) erzeugt aus den Kristallstruktur-Daten mit dem VMD-Programm Version 1.8.2 (*Visual Molecular Dynamics*) [HUMPHREY *et al.*, 1996].

Durch ortsgerichtete Mutagenese und Chimerbildung konnten einige der strukturellen Grundlagen für die isoform-spezifischen Unterschiede aufgeklärt werden. Ein Austausch der ADP-Bindungsregionen zwischen MAO-A und MAO-B hatte keinen Einfluss auf die Substrat- und Inhibitorspezifität des Enzyms [CHEN *et al.*, 1996; GOTTOWIK *et al.*, 1995]. Dagegen konnte durch Mutagenese der hochkonservierten Aminosäuren Glu34 und Tyr44, die beide in der ADP-Bindungsdomäne lokalisiert sind, eine drastische Senkung der katalytischen Aktivität nachgewiesen werden [KWAN *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1995]. Die Substitution eines zentralen Teils (Aminosäure 161-375) der humanen MAO-A mit dem entsprechenden Segment der MAO-B veränderte das Substrat- und Hemmstoffverhalten des Enzyms, so dass es dem der MAO-B entsprach. Eine weitergehende Mutationsstrategie ergab, dass Substitution des Phe208 der MAO-A durch das entsprechende Isoleuzin der MAO-B ausreichend

* Alle Positionsangaben beziehen sich auf die MAO-B-Sequenz [SHIH *et al.*, 1999].

war, um die Substratspezifität der MAO-A in die der MAO-B umzuwandeln. Durch zusätzliche Mutationsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein aromatischer Rest an dieser Position ein A-Typ-Enzym erzeugt, während ein aliphatischer Rest ein B-Typ-Enzym bildet [TSUGENO und ITO, 1997].

In beiden humanen MAO-Isoformen gibt es neun Zysteinreste, wobei zwei davon für die katalytische Aktivität der MAO-A (Cys374, Cys406) und drei (Cys156, Cys365, Cys397) für die der MAO-B essentiell zu sein scheinen [WU *et al.*, 1993]. Ein Cys406Ser Austausch in der MAO-A und eine Cys397Ser Mutation in der MAO-B beeinflussen die kovalente Bindung des Flavins, da offenbar die 8 α -Methyl-S-Zysteiny-Bindung zum Koenzym nicht ausgebildet werden kann. Interessanterweise wurde die katalytische Aktivität der Ratten-MAO-A kaum durch eine entsprechende Mutation beeinflusst, wenn die flavin-bindende Aminosäure in ein Alanin umgewandelt wurde. Da Alanin keine kovalente Bindung zum Koenzym herstellen kann, sprechen diese Daten dafür, dass eine solche Bindung des Koenzyms nicht unbedingt nötig ist, sondern dass eine intakte Gesamtstruktur dieser Region ausreicht, um das Flavin zu binden und für den katalytischen Zyklus verfügbar zu machen [HIRO *et al.*, 1996].

Die Substratbindungsdomäne der MAO-Isoformen wurde durch Affinitätsmarkierung und ortsgerichtete Mutagenese näher charakterisiert. Markierte proteolytische Spaltpeptide wurde isoliert und dabei konnte das Cys397 in kovalent modifizierter Form identifiziert werden [CESURA *et al.*, 1996]. Ferner wurden durch ortsgerichtete Mutagenese das His382 und das Thr158 der MAO-B als katalytisch wichtige Aminosäuren gezeigt [CESURA *et al.*, 1996].

1.4.4. Expressionsregulation der Monoaminoxidase-Isoformen

Obwohl die Monoaminoxidase bereits Ende der 20er Jahre des vorigen Jahrhunderts als Tyraminoxidase entdeckt [HARE, 1928] und in den folgenden Jahren umfassend hinsichtlich ihrer proteinchemischen bzw. enzymatischen Eigenschaften charakterisiert wurde, ist über ihre Expressionsregulation nach heutigem Wissen nur wenig bekannt [SANDLER, 2004]. Eine Expression in Entzündungszellen wurde bisher noch nicht beschrieben. Dies ist vor allem deshalb bemerkenswert, da sich unter den Entzündungsmediatoren auch vasoaktive biogene Amine (Noradrenalin, Serotonin) befinden, die potenzielle Substrate der Monoaminoxidasen sind. Im Rahmen von Mikroarray-Untersuchungen konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass IL-4-behandelte Monozyten große Mengen an MAO-A exprimieren [CHAITIDIS *et al.*, 2004; CHAITIDIS *et al.*, 2005]. Dieser Induktionseffekt ist vor allem deshalb von Bedeutung, da er isoform-spezifisch nur die MAO-A betrifft, während die Expression der MAO-B nicht

beeinflusst wird. Die zerebrale Expression der MAO-A ist während der Ontogenese kaum verändert. Die Expressionshöhe dieses Isoenzym ist bei Geburt ähnlich hoch wie beim Erwachsenen. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Expression der MAO-B mit zunehmendem Alter beträchtlich [SHIH *et al.*, 1999]. Da diese Isoform vor allem in Gliazellen exprimiert wird, könnte man die Erhöhung der MAO-B-Expression während des Alternprozesses der verstärkten Proliferation von Gliazellen zuschreiben.

1.5. Das humane Immundefizienz-Virus (HIV)

1.5.1. HIV ist ein Retrovirus, das die Immunschwäche AIDS verursacht

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein Retrovirus, das an der Entstehung der Immunschwäche-Krankheit AIDS (*Aquired Immune Deficiency Syndrome*) beteiligt ist und wird hauptsächlich durch direkte Übertragung von Körperflüssigkeiten weitergegeben. Es ist weltweit verbreitet, kommt aber besonders häufig in der Subsahara (südliches Afrika) und in Südostasien vor. In einigen Gebieten des südlichen Afrikas sind über 40% der Menschen mit dem HIV infiziert.

Tabelle 1: Aktuelle statistische Daten zur weltweiten HIV-Infektion und zur Immunschwäche AIDS [UNAIDS: <http://www.unaids.org>]

Infektionen /Todesfälle	Personengruppe	Fälle
Todesfälle weltweit	seit Beginn der Epidemie	25.000.000
HIV-Infizierte (in 2005)	insgesamt	40.300.000
	Männer	20.500.000
	Frauen	17.500.000
	Kinder (<15 Jahre)	2.300.000
Neu-Infektionen (in 2005)	insgesamt	4.900.000
	Erwachsene	4.200.000
	Kinder (<15 Jahre)	700.000
Todesfälle (in 2005)	insgesamt	3.200.000
	Erwachsene	2.600.000
	Kinder	600.000

Trotz weltweiter Aufklärung nimmt die Zahl der jährlichen Neuinfektionen kontinuierlich zu, so dass AIDS als eine der gefährlichsten Infektionskrankheit angesehen werden muss. In Tabelle 1 sind die jüngsten statistischen Daten zur HIV-Infektion und zur Immunschwäche AIDS zusammengestellt. Danach sind seit Beginn der Epidemie weltweit mehr als 25 Mio. Personen an AIDS gestorben. Derzeit gibt es mehr als 40 Mio. HIV-Infizierte, wobei es global gesehen kaum geschlechtsspezifische Unterschiede gibt. Im Jahr 2005 sind 3,2 Mio. Menschen an der Immunschwäche AIDS gestorben. Der Anteil von Kindern unter 15 Jahren betrug dabei etwa 17% [UNAIDS: <http://www.unaids.org>].

Betrachtet man die regionale Verbreitung des HIV so muss festgestellt werden, dass, wie oben erwähnt, Südostasien und das südliche Afrika (Subsahara) mit über 30 Mio. HIV-Infizierten den größten Teil der betroffenen Menschen stellen. In diesen Gebieten kam es auch im Jahr 2005 am häufigsten zu Neuinfektionen mit HIV (< 4 Mio.). Die Anzahl der Todesfälle, die auf die durch HIV verursachte Immunschwäche AIDS zurückzuführen sind, war naturgemäß in diesen Regionen besonders hoch (Tabelle 2) [<http://www.unaids.org>].

Tabelle 2: Weltweite regionale Verbreitung von HIV und AIDS
[UNAIDS: <http://www.unaids.org>]

	Infizierte	Neu-Infektionen	Todesfälle
West und Zentraleuropa	720.000	22.000	12.000
Osteuropa und Zentralasien	1.600.000	270.000	62.000
Süd- und Südostasien	7.400.000	990.000	480.000
Ostasien	870.000	140.000	41.000
Nordafrika und mittlere Osten	510.000	67.000	58.000
Subsahara	25.800.000	3.200.000	2.400.000
Ozeanien	74.000	8.200	3.600
Nordamerika	1.200.000	43.000	18.000
Lateinamerika	1.800.000	200.000	66.000
Karibik	300.000	30.000	24.000

Die epidemiologischen Verhältnisse in Deutschland unterscheiden sich von der globalen Situation in wesentlichen Punkten. Die Gesamtzahl der HIV-Infizierten seit Beginn der Epidemie betrug in Deutschland Ende 2005 nahezu 75.000. Dem gegenüber stehen etwa 32.000 Personen, die an der Immunschwäche AIDS erkrankten. Seit Epidemiebeginn starben ca. 26.000 Patienten an dieser Erkrankung. Ende 2005 lebten ca. 50.000 Menschen mit HIV, wobei 80% davon Männer waren. Bei Kindern sind nur etwa 300 Fälle bekannt. Diese ausgeprägte Geschlechtsabhängigkeit der HIV-Infektion in Deutschland ist ein wesentlicher Unterschied zur globalen Situation, deren Ursache vor allem auf die hiesige Verteilung des Infektionsrisikos zurückzuführen sein dürfte. Eine Analyse dieses Risikos ergab, dass von den derzeit lebenden 50.000 Infizierten mehr als 30.000 Männer mit homosexuellen Kontakten sind. Je 5.500 Personen haben sich Befragungen zufolge durch heterosexuelle Kontakte angesteckt oder stammen aus Regionen der Erde, die als Hochprävalenzregionen eingestuft sind. Unter den übrigen Infizierten stellen Drogenabhängige (6.000 Personen) die Hauptgruppe dar, während Bluttransfusionen (600 Fälle) und Mutter-Kind-Transmissionen (300 Fälle) epidemiologisch weniger Bedeutung haben. 2005 wurden in Deutschland 2.620 Neuinfektionen gemeldet, von denen 350 auf Frauen und 20 auf Kinder entfielen [MARCUS und HAMOUDA, 2005; <http://www.rki.de/>].

1.5.2. HIV ist ein einfach aufgebautes RNA-Virus mit einem übersichtlichen Genom

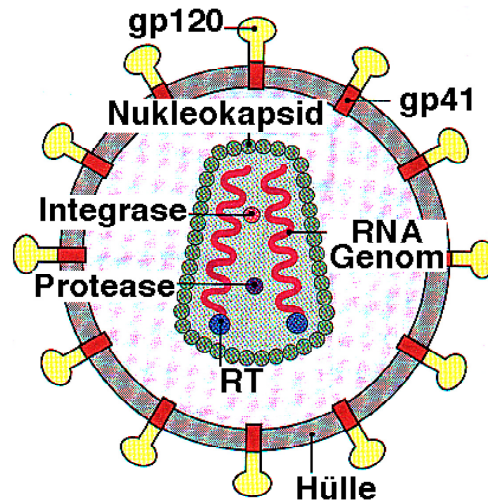


Abbildung 9: Struktur des humanen Immundefizienz-Virus (HIV)

Die unterschiedlichen Gene die durch das RNA-Genom kodiert werden und deren Funktionen sind in Tabelle 3 zusammengefasst [CHARLES *et al.*, 2002]

Das HIV ist ein relativ einfach aufgebautes Retrovirus. Es existieren mehrere HIV-Subtypen, von denen vor allem HIV-1 von epidemiologischer Bedeutung ist. HIV-1 befällt CD4-positive T-Zellen, die zusätzlich einen der beiden HIV-Korezeptoren (CCR5, CXCR4) exprimieren. Aber auch andere Zellen (Monozyten, Makrophagen), die CD4 und entweder CCR5 oder CXCR4 exprimieren, können durch HIV-1 infiziert werden. HIV-1 besitzt ein relativ kurzes RNA-Genom, das nur wenige teilweise überlappende Gene enthält. Die Grundstruktur des HIV ist in Abbildung 9 dargestellt [CHARLES *et al.*, 2002]. Die Hauptproteine, die durch das HIV-Genom kodiert werden, sind die Hüll-Glykoproteine gp120 und gp41, die durch das *env*-Gen verschlüsselt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gene des HIV-Genoms und ihre funktionelle Bedeutung

	Gen	Funktion
Gruppenspezifisches Antigen	<i>gag</i>	Kern- und Matrixproteine
Polymerase	<i>pol</i>	rev. Transkription, Polymerase, Integrase
"Envelope" (Hülle)	<i>env</i>	Korezeptorbindung, Internalisierung
Transaktivator	<i>tat</i>	Transkriptionsverstärker
Expressionsaktivator	<i>rev</i>	Transkriptausschleusung aus dem Nukleus
Virale Infektiosität	<i>vif</i>	Assemblierung der Virionen
Virales Protein R	<i>vpr</i>	Transkriptionsverstärker
Virales Protein U	<i>vpu</i>	Hemmung der CD4-Expression
Negativ-Regulations Faktor	<i>nef</i>	Erhöht HIV-Replikation.

Das *pol*-Gen kodiert für die Polymerase. Dieses Enzym besitzt mehrere katalytische Aktivitäten, es katalysiert sowohl die reverse Transkription des RNA-Genoms (reverse

Transkriptase) als auch die Herstellung der doppelsträngigen DNA (Polymerase) und ihre Integration ins Wirtszellgenom (Integrase). Weiterhin spielen die viralen Proteine U und R eine wesentliche Rolle für den Infektionsprozess. Die Gene des HIV-1-Genoms sowie die Funktionen der entsprechenden Proteine sind in Tabelle 3 zusammengefasst [CHARLES *et al.*, 2002].

1.5.3. CD4 ist der Rezeptor des HIV-1, während CCR5 und CXCR4 als Korezeptoren wirken

HIV-1 infiziert CD4-positive Zellen, da das Hüll-Glykoprotein gp120 mit dem CD4-Rezeptor der Wirtszelle wechselwirkt [MOORE *et al.*, 2004]. Die Expression des CD4-Antigens ist jedoch nicht ausreichend, um eine HIV-1-Infektion der Zielzelle zu initiieren. Dazu bedarf es eines Korezeptors, der simultan mit CD4 auf der Zelloberfläche vorhanden sein muss. Zwei prinzipielle Korezeptoren für HIV-1 Stämme wurden in der Vergangenheit identifiziert, die für die HIV-Infektion CD4-positiver Zellen *in vivo* von Bedeutung sind:

- der Chemokin-(C-C-Motiv)-Oberflächenrezeptor 5 (CCR5) und
- der Chemokin-(C-X-C-Motiv)-Oberflächenrezeptor 4 (CXCR4).

HIV-Stämme, die den CCR5 als Korezeptor für die Infektion nutzen, bezeichnet man als R5-Viren. Im Gegensatz dazu infizieren X4-Viren überwiegend Zellen, die CXCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Es gibt jedoch auch Virusstämme, die sowohl CCR5⁺/CXCR4⁻ als auch CCR5⁻/CXCR4⁺ Zellen infizieren können. Diese werden entsprechend R5/X4-Viren genannt. Obwohl durch *In vitro*-Untersuchungen gezeigt wurde, dass prinzipiell auch andere Oberflächenmoleküle als HIV-1-Korezeptoren wirken können, scheinen nur CCR5 und CXCR4 für die *in vivo* Situation bedeutsam zu sein [MOORE *et al.*, 2004]. So kann eine zelluläre *in vivo* HIV-1-Infektion durch die Anwendung von Hemmstoffen gegen die Wechselwirkung zwischen dem gp120-Hüllprotein und den beiden Korezeptoren nahezu komplett verhindert werden. Weiterhin besteht keine eindeutige Korrelation zwischen dem Fortschreiten der Erkrankung und der Expression anderer Oberflächenrezeptoren [ZHANG und MOORE, 1999]. Dies bedeutet jedoch nicht, dass in Zukunft nicht weitere *in vivo* relevante HIV-1-Korezeptoren entdeckt werden könnten. Bisher gibt es jedoch keine hinreichenden Anhaltspunkte für deren Existenz [MOORE *et al.*, 2004].

In der frühen Phase der HIV-Infektion dominieren *in vivo* eindeutig R5-Viren. Dies ist vor allem deshalb erstaunlich, da im strömenden Blut wesentlich mehr CD4/CXCR4-positive Zellen vorhanden sind als CD4/CCR5-positive Zellen [MOORE *et al.*, 2004]. In peripheren Geweben, die für die primäre HIV-Infektion wahrscheinlich von größerer Bedeutung sind

(Genital- bzw. Rektalschleimhaut, Haut), ist die Situation jedoch völlig anders. Die Mukosa (Schleimhaut) des Genitaltraktes und des Rektums ist dadurch gekennzeichnet, dass in ihr massenhaft Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen vorkommen, die neben CD4 auch große Mengen CCR5 exprimieren [BOMSEL und DAVID, 2002]. In Gegensatz dazu werden an diesen Stellen nur geringe Mengen an CXCR4 gefunden. Die Langerhans-Zellen der Haut exprimieren kein CXCR4, während CCR5 in geringen Mengen nachgewiesen werden kann [KAWAMURA *et al.*, 2003]. Diese quantitativ unterschiedliche Expression der verschiedenen HIV-1-Korezeptoren scheint jedoch nicht die einzige Ursache dafür zu sein, weshalb zu Beginn der HIV-Infektion die R5-Viren eindeutig überwiegen. So ist z.B. die Frage, wo im Organismus die initiale Replikation der Viren (HIV) stattfindet, noch nicht eindeutig beantwortet [MOORE *et al.*, 2004]. Es gibt zunehmend experimentelle Befunde dafür, dass dieser Prozess vor allen im „darm-assoziierten lymphatischen Gewebe“ [VEAZEY *et al.*, 2001], bzw. im Thymus [MCCUNE, 2001] abläuft.

Wie bereits erwähnt dominieren R5-Viren in den frühen Stadien der HIV-1-Infektion, während sich in späteren Stadien die X4-Viren durchsetzen. Die Mechanismen, die zu dieser Veränderung der Viruspopulation führen, sind heute noch nicht völlig geklärt [MOORE *et al.*, 2004]. *In vitro* lassen sich R5-Viren leicht in X4-Viren umwandeln, wenn einige Aminosäuren der V3-Schleife des gp120-Hüllproteins, welches mit den Korezeptoren in Wechselwirkung tritt, mutiert werden [SHIODA *et al.*, 1992]. Bedenkt man die hohe Replikationsrate von HIV-1 *in vivo* und die dabei auftretende normale Mutationsfrequenz, sollte in relative kurzer Zeit ein großer Teil der HIV-1-Population einer infizierten Person aus X4-Viren bestehen [COFFIN, 1995]. Dies wird *in vivo* jedoch nicht beobachtet. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, warum X4-Viren nicht den kompletten Verlauf der HIV-1-Infektion bestimmen und AIDS damit zu einer Erkrankung machen, die schnell fortschreitet und sehr rasch zum Tode führt. Die wahrscheinlichste Antwort auf diese Frage sollte darin bestehen, dass X4-Viren einem evolutionären Druck unterliegen, der ihre schnelle Verbreitung und ihre Dominanz im infizierten Organismus verhindert. Bis heute ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob dieser hemmende Evolutionsdruck auf Eigenschaften der Viren (virale Grundlagen) oder auf das immunologische Abwehrsystem des infizierten Organismus (immunologische Grundlagen) zurückzuführen ist. Es könnte in der Tat der Fall sein, dass ein gehäuftes Auftreten der gefährlichen X4-Viren in späteren Stadien der HIV-1-Infektion, vor allem auf die Wirkungsmechanismen des menschlichen Immunsystems zurückgeführt werden kann [MOORE *et al.*, 2004].

1.5.4. In vivo sind Makrophagen und dendritische Zellen die primären Zielzellen des HIV-1

Im strömenden Blut werden vor allem CD4⁺-T-Lymphozyten von HIV-1 infiziert. Diese Bevorzugung kommt auch diagnostisch dadurch zum Ausdruck, dass es beim Fortschreiten der Infektion zu einem Abfall dieser Zellen im Organismus kommt. Darüber hinaus stellen aber auch andere Zellen, die sowohl CD4 und einen der beiden Korezeptoren exprimieren geeignete Zielobjekte für HIV-1 dar. Als myeloide Zellen exprimieren Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen sowohl CD4 als auch die Korezeptoren, wobei das Expressionsniveau sehr variabel ist und stark von den experimentellen Bedingungen und vom Reifegrad der Zellen abhängt [KEDZIERSKA *et al.*, 2003].

Die initiale Infektion von Menschen mit HIV-1 verläuft vor allem über CD4⁺/CCR5⁺-Zellen, d.h. R5-Viren spielen dabei *in vivo* eine dominierende Rolle [VAN'T WOUT *et al.*, 1994]. Für die HIV-Infektion scheinen Makrophagen und dendritische Zellen besonders wichtig zu sein, da sie die initialen Ziel-Zellen darstellen und auch im weiteren Verlauf der Pathogenese von AIDS eine wichtige Rolle spielen [CROWE, 1995; KEDZIERSKA und CROWE, 2002]. Eine Infektion von Makrophagen kann schon sehr früh während einer HIV-Infektion beobachtet werden [SONZA *et al.*, 1996]. Dagegen sind periphere Blutmonozyten weitaus infektions-resistenter und nur eine geringe Population peripherer Blutmonozyten (0,1-1%) lässt sich während des zeitlichen Ablaufs einer HIV-Infektion als virus-infizierte Zellen identifizieren [LEWIN *et al.*, 1998]. Im Gegensatz dazu stellen Gewebsmakrophagen, die sich aus Blutmonozyten entwickeln, im gesamten Zeitraum des Infektionsverlaufes ein umfangreiches Virusreservoir dar [CROWE und SONZA, 2000]. CCR5 ist der am stärksten exprimierte HIV-Korezeptor in Makrophagen [CHOE *et al.*, 1996]. Für den Infektionsprozess und die sich daran anschließende Virusvermehrung scheint das Verhältnis von CD4- und CCR5-Expression auf der Makrophagenoberfläche bedeutsam zu sein. Wenn CD4 nur in geringem Maße (10⁴ Moleküle pro Zelle können als untere Schwelle angesehen werden) exprimiert wird, kann die Expression von CCR5 limitierend werden. Wenn auf Zellen jedoch hohe CD4-Dichten gemessen werden, ist das Niveau der CCR5-Expression von vergleichsweise geringerer Bedeutung [PLATT *et al.*, 1998].

Frisch isolierte Blutmonozyten exprimieren große Mengen an CCR5-mRNA, aber das entsprechende Rezeptorprotein kann auf der Zelloberfläche kaum nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen *in vitro* lässt sich jedoch auch das CCR5-Protein nachweisen. Die Expression von CXCR4 in peripheren Blutmonozyten ist sowohl auf dem mRNA- als auch auf dem Protein-Niveau deutlich [FEAR *et al.*, 1998]. Wenn periphere Blut-

monozyten sich *in vitro* zu Makrophagen differenzieren, werden sie zugänglich für HIV-1. Solche Zellen produzieren HIV-1 über lange Zeiträume (Tage bis Wochen), ohne dass dabei nennenswerte zyto-pathologische Veränderungen sichtbar werden. Der Differenzierungsprozess ist durch einen Anstieg der Expression von CCR5 und eine inverse Herunterregulation von CXCR4 gekennzeichnet. CD4 wird in den frühen Differenzierungsstadien herunterreguliert, steigt aber später wieder an [KEDZIERSKA *et al.*, 2003]. Wenn periphere Blutmonozyten *in vitro* für mehrere Tage in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF kultiviert werden, entwickeln sie sich zu dendritischen Zellen, die einen ähnlichen Phänotyp wie unreife dendritische Zellen der Haut bzw. der Schleimhaut aufweisen [GRASSI *et al.*, 1998]. Diese Zellen exprimieren sowohl CD4 als auch CCR5 und CXCR4.

1.5.5. HIV-1-Infektion verändert den Eikosanoidstoffwechsel der infizierten Zelle

Zur Regulation des Eikosanoidstoffwechsels in HIV-infizierten Zellen liegen bislang nur vereinzelte Daten vor. Die Prostaglandinsynthese in infizierten Zellen ist herunterreguliert, wobei die Mechanismen dieser Regulation noch nicht vollständig geklärt sind. Der 5-LOX-Weg der Arachidonsäure-Kaskade in Alveolarmakrophagen von HIV-Patienten ist ebenfalls herunterreguliert [COFFEY *et al.*, 1996]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in neutrophilen Granulozyten und in peripheren Blutmonozyten die Kapazität zur Leukotrienbildung um fast 75% reduziert war, wenn Zellen von Normalpersonen mit entsprechenden Zellen von HIV-Infizierten verglichen wurden. Die Expression der 5-LOX und des 5-LOX-aktivierenden Proteins (FLAP) war um fast die Hälfte herunterreguliert [COFFEY *et al.*, 1999]. Als mechanistische Ursache für diesen Effekt wurde vermutet, dass die reduzierte Anzahl der CD4⁺-T-Zellen von HIV-Infizierten zu einer Verringerung der Zytokinproduktion führt, die u.a. auch jene Zytokine betrifft [z.B. GM-CSF (*Granulocyte-Makrophage Colony Stimulating Factor*)], die den 5-LOX-Weg hochregulieren. Deshalb wurden zehn HIV-infizierte Patienten mit GM-CSF über einen Zeitraum von 5 Tagen behandelt, um danach die Expression der 5-LOX und von FLAP nochmals zu quantifizieren. Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass GM-CSF-Behandlung die Expression beider Proteine der Leukotriensynthesekaskade hochreguliert [COFFEY *et al.*, 1999]. Die LTB₄-Synthese von polymorphkernigen Leukozyten (PMNs) HIV-infizierter Patienten kann durch GM-CSF-Behandlung erhöht werden, so dass die Zellen ihre pro-inflammatorischen Funktionen besser ausfüllen können. Trotzdem erreichen die GM-CSF-behandelten Zellen nicht die Synthesekapazitäten von nicht-infizierten PMNs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GM-CSF-Behandlung von HIV-Infizierten zu einer Hochregulation des 5-LOX-Weges in peripheren Blutmonozyten

und in polymorphkernigen Leukozyten führt und damit der HIV-bedingten Herunterregulation der Leukotrienbiosynthese entgegenwirkt [COFFEY *et al.*, 1999]. Die Autoren schlagen GM-CSF-Gabe als unterstützende Therapie bei HIV-Infizierten vor, um die Immunantwort gegen spezifische Erreger zu unterstützen.

1.5.6. Die Expression von CCR5 und CXCR4 wird zellspezifisch durch Zytokine reguliert und durch den Redox-Status der Zellen beeinflusst

Die Expression der HIV-Korezeptoren durch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen wird vor allem durch das Muster der Zytokine bestimmt, denen die myeloiden Zellen ausgesetzt sind. Dabei wirken einzelne Zytokine nicht isoliert von einander. Im Gegenteil, sie bilden ein komplexes Muster von Signalmolekülen, bei dem sich antagonistische und antagonistische Effekte einzelner Vertreter ergeben. Für eine Reihe von Zytokinen konnte gezeigt werden, dass sie die Vermehrung von HIV in myeloiden Zellen hemmen (GM-CSF, IL-10, IL-13), stimulieren (IL-1, IL-6, TNF α) oder duale Effekte auslösen (IL-4), je nachdem in welchem Stadium der Infektion sie zur Wirkung kommen [KEDZIERSKA *et al.*, 2003].

IL-13, ein Th2-Zytokin, das die Expression der 12/15-LOX in kultivierten Monozyten stark hochreguliert [NASSAR *et al.*, 1994], gehört zu den HIV-1-supressorisch wirkenden Zytokinen. Es induziert eine starke Herunterregulation von CCR5, blockt die reverse Transkription der Virus-RNA und hemmt die Virusvermehrung auf post-translationaler Ebene [BAILER *et al.*, 2000]. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der Differenzierungsgrad der Zellen eine wichtige Rolle spielt, und dass bei langsam differenzierenden Monozyten auch inverse Effekte beschrieben wurden [NAIF *et al.*, 1997].

IL-4 ist ein weiteres Th2-Zytokin, das einen starken Einfluss auf den Eikosanoidstoffwechsel von Monozyten ausübt. Es induziert ebenfalls die 12/15-LOX, die in Abwesenheit dieses Zytokins in Monozyten nicht exprimiert wird [CONRAD *et al.*, 1992]. In Bezug auf die HIV-Infektion besitzt IL-4 duale Aktivität in Abhängigkeit davon, ob es vor oder nach einer HIV-1-Infektion den Zellen zugesetzt und mit welchen anderen Zytokinen es kombiniert wird. IL-4 stimuliert die Vermehrung von HIV in kultivierten Monozyten, wenn das Zytokin simultan oder nach der Infektion zugesetzt wird [KAZAZI *et al.*, 1992]. Wenn IL-4 jedoch zu den *in vitro* kultivierten Monozyten zuerst dazugegeben wird, bevor eine HIV-Infektion initiiert wurde, hemmt das Zytokin die Virusvermehrung [NAIF *et al.*, 1997]. Wenn frisch präparierte Blutmonozyten in Kultur genommen werden, kommt es zu einer Hochregulation der Expression von CCR5 [KEDZIERSKA *et al.*, 2003]. Setzt man den Zellen jedoch

sofort IL-4 zu, wird diese Induktion unterdrückt, was eine Hemmung der Infizierbarkeit durch R5-Viren bedeutet [WANG *et al.*, 1998].

Da die Mechanismen der zytokin-abhängigen Expressionsregulation der HIV-1-Korezeptoren noch überwiegend im Dunkeln liegen, wurde versucht herauszufinden, ob und in welchem Maße eine Veränderung des zellulären Redox-Status an dieser Expressionsregulation beteiligt ist. Dazu wurden zunächst humane Blutmonozyten mit dem Antioxidanz Pyrrolidindithiokarbamat (PDTC) inkubiert und die Halbwertszeit der CCR5-mRNA gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass dieser Parameter von 120 min auf 70 min gesenkt wurde, was eine Herunterregulation der Genexpression anzeigt. In Gegensatz dazu induzierte eine Erhöhung des zellulären Redoxstatus (Zugabe von Wasserstoffperoxid oder Glutathiondepletion) die Expression der CCR5-mRNA, und ähnliche Effekte wurden für CXCR4 gemessen. Diese Daten belegen, dass CCR5 und CXCR4 direkt oder indirekt über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren redox-sensitive Gene darstellen, deren Expression durch Veränderungen im zellulären Redoxstatus reguliert werden können [SACCANI *et al.*, 2000]. Die Überexpression oxidierender Enzyme, wie z.B. von LOXn, könnte damit zu einer Veränderung der Expression von HIV-1-Korezeptoren führen, was eine Modulation der Infizierbarkeit von Zielzellen zur Folge hätte.

1.6. Zielstellung

Monozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Entzündungsreaktion. Während der akuten Entzündungsphase synthetisieren sie überwiegend pro-inflammatorische Mediatoren und phagozytieren Pathogene. Dadurch sind sie an der Ausbildung der Entzündungssymptome und an der Beseitigung des entzündungsauslösenden Reizes beteiligt, was mit einer Zerstörung der normalen Gewebestruktur einhergeht. Während der Heilungsphase (*inflammatory resolution phase*) verändern Monozyten jedoch ihren Phänotyp und wirken dann als anti-inflammatorische Zellen. Durch Phagozytose apoptotischer Granulozyten und durch die Synthese anti-inflammatorischer Zytokine tragen sie dazu bei, die akute Entzündungsreaktion aktiv zu beenden und die zerstörte Gewebestruktur wiederherzustellen. In der Literatur gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf, dass Th2-Zytokine unter bestimmten experimentellen Bedingungen naive Monozyten dazu anregen, sich zu anti-inflammatorischen Zellen zu differenzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geprüft werden, welche Auswirkungen die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13, die unter bestimmten experimentellen Bedingungen anti-inflammatorisch wirken, auf die Expression entzündungsrelevanter Gene in peripheren Blutmonozyten haben. Für die Erstellung umfangreicher Expressionsprofile wurde dabei zunächst eine Kombination von Mikroarray-Technologie und quantitativer RT-PCR angewandt, wobei wesentliche Ergebnisse durch immunhistochemische Färbungen und Aktivitätsassays bestätigt werden sollten. Im zweiten Teil der Arbeit sollten grundlegende Mechanismen der zytokin-abhängigen Expressions-Regulation ausgewählter Genprodukte (Monoaminoxidase A, CXCR4 und CCR5) näher untersucht und die Rolle von Veränderungen des zellulären Redoxstatus auf die Expression von HIV-Korezeptoren beschrieben werden.