

**Untersuchungen zum funktionellen Einfluss von
Einzelnukeotidvariationen in humanen Lipoxygenasen und anderen
Genen des LOX-Stoffwechsels**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Thomas Horn

aus Berlin

2014

Diese Arbeit wurde zwischen dem 01.01.2011 und 31.12.2013 am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Kühn

Disputation am 18.03.2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn für die freundliche Überlassung des Arbeitsthemas. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die gute wissenschaftliche Betreuung und die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Er war stets offen für Diskussionen, Fragen und Probleme, was für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit entscheidend war.

Ich danke Herrn Dr. Igor Ivanov und Frau Dr. Almerinda Di Venere für die Durchführung der CD- und Fluoreszenzmessungen. Insbesondere möchte ich mich bei Igor für seine stetige Unterstützung bedanken. Er hat mir alle wichtigen Dinge über die experimentelle Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von Lipoxygenasen beigebracht. Danke auch für das Lesen der Manuskripte sowie der Arbeit.

Daneben bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. Astrid Borchert für die stets interessanten wissenschaftlichen Gespräche, die schönen Mittagspausen und ihre immer fortwährende moralische Unterstützung.

Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Dagmar Heydeck und Herrn Dr. Christoph Ufer für die stets gute wissenschaftliche Beratung und ihre Hilfe bei den wissenschaftlichen Arbeiten.

Ich danke Frau Sabine Stehling und Frau Monika Anton für die hervorragende technische Unterstützung und ihre viele Geduld mit mir.

Ansonsten möchte ich mich noch bei Frau Katharina Hofheinz, Frau Susan Adel und Patrick Scheerer für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke zudem bei Herrn Kumar Reddy Kakularam, Ass. Prof. Dr. Aparoy Polamarasetty und Prof. Dr. Pallu Reddanna aus dem Institut für Lebenswissenschaften der Universität von Hyderabad (Indien) für ihre Unterstützung bei den bioinformatischen Arbeiten. Sie haben mir die wichtigsten Dinge in Sachen Strukturmodellierung und Docking beigebracht. Außerdem möchte ich bei Kumar und Aparoy sowie allen Mitglieder der AG Reddanna für die tolle Zeit in Indien bedanken.

Zudem danke ich Frau Dr. Sophia Wuest und Prof. Dr. Hersberger von Universität Zürich (Schweiz) für die Durchführung der klinischen Studie.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie, vor allem bei meinen lieben Eltern, für die während der Studien- und Promotionszeit immer fortwährende finanzielle und moralische Unterstützung bedanken. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft. Auch meiner Freundin Christiane danke ich für ihre liebevolle Art und ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Vorkommen und Klassifizierung von Lipoxygenasen	1
1.1.1. Reaktionsmechanismus von Lipoxygenasen	2
1.1.2. Vorkommen von LOXn und evolutive Aspekte	4
1.1.3. Nomenklatur von Lipoxygenasen.....	7
1.1.4. Biologische Bedeutung von Lipoxygenasen.....	7
1.1.4.1. Entzündung und Asthma bronchiale.....	7
1.1.4.2. Kanzerogenese.....	9
1.1.4.3. Atherosklerose	12
1.1.4.4. Epidermale Differenzierung.....	14
1.2. Strukturelle Grundlagen der Lipoxygenasereaktion	15
1.2.1. Kristallstruktur der Lipoxygenasen.....	15
1.2.2. N-terminale Domäne	16
1.2.3. C-terminale Domäne	17
1.2.4. Grundlagen der Stereo- und Positionsspezifität von Lipoxygenasen.....	20
1.2.4.1. Positionsspezifität von Lipoxygenasen	20
1.2.4.2. Stereospezifität von Lipoxygenasen	22
1.3. Genetische Variationen (SNPs, Mutationen) in LOXn und ihre Funktion in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen	24
1.4. Ziele der Arbeit	28
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1. Material	30
2.1.1. Chemikalien.....	30
2.1.2. Nährmedien und Pufferlösungen	31
2.1.3. Kits und Enzyme.....	33
2.1.4. Plasmide und Oligonukleotide	33
2.1.5. Bakterienstämme.....	34

2.2. Molekularbiologische und proteinchemische Methoden	34
2.2.1. Klonierung und Ligation.....	35
2.2.2. Plasmid-DNA Transformation in Bakterien.....	35
2.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese	35
2.2.4. Rekombinante Proteinherstellung und Reinigung von verschiedenen LOX-Isoformen	36
2.2.5. Eisenbestimmung der über FPLC gereinigten Enzympräparationen mit Atomabsorptionsspektroskopie.....	37
2.3. Analytische Methoden	37
2.3.1. HPLC basierter LOX-Aktivitätsassay	37
2.3.2. HPLC-Analytik	38
2.3.2.1. <i>Reverse Phase</i> HPLC (RP-HPLC)	38
2.3.2.2. <i>Straight Phase</i> HPLC (SP-HPLC)	38
2.3.2.3. <i>Chiral Phase</i> HPLC (SP-HPLC)	39
2.3.2.4. Methylierung mit Diazomethan.....	39
2.3.3. Photometrischer LOX-Aktivitätsassay	39
2.3.4. Proteinbestimmung.....	40
2.3.5. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
2.3.6. <i>Western Blot</i>	40
2.3.7. Quantifizierung der Proteinexpression	41
2.4. Biophysikalische Methoden	41
2.4.1. Fluoreszenzspektroskopie	41
2.4.2. Circular dichroismus (CD).....	41
2.4.3. <i>Thermal shift Assay</i>	41
2.5. Bioinformatische Methoden	42
2.5.1. <i>In silico</i> Mutagenese.....	42
2.5.2. Homologiemodellierung	43
2.5.3. Visualisierung und Strukturanalyse.....	43
2.5.4. Analyse von LOX-Sequenzen und genetischen Variationen	44
3. ERGEBNISSE	44
3.1. Funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) in verschiedenen humanen Lipoxygenasen	45
3.1.1. Humane Arachidonat 15-Lipoxygenase (hALOX15)	46

3.1.2.	Humane Arachidonat 5-Lipoxygenase (hALOX5)	51
3.1.3.	Humane Arachidonat 12-Lipoxygenase (hALOX12)	54
3.1.4.	Humane Arachidonat 15-Lipoxygenase Typ II (hALOX15B)	57
3.2.	Molekulare Ursachen für die Inaktivität der natürlich vorkommenden hALOX15 Gly422Glu Variation	61
3.2.1.	Die Gly422Glu Mutation ist eine fehlgefaltete Enzymvariante.	61
3.2.2.	Gly422 liegt in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum und bildet eine polare Wechselwirkung mit Asp415.	64
3.2.3.	Verschiedene hALOX15 Gly422 Mutationen bewirken einen Verlust der enzymatischen Aktivität und verursachen eine partielle Fehlfaltung.	66
3.2.4.	Mutationen an Asp415 haben geringere funktionelle Effekte.	68
3.2.5.	Ist der konservierte Glycinrest auch von funktioneller Bedeutung für andere LOX-Isoformen ?	70
4.	DISKUSSION.....	75
4.1.	Einzelnukleotidvariationen (SNPs, Mutationen) in humanen Lipoxygenasen und anderen Proteinen des Lipoxygenasestoffwechsels....	75
4.1.1.	Die funktionellen Effekte von nicht-synonymen SNPs in Proteinen des LOX-Stoffwechsels sind meist gering.	75
4.1.2.	Seltene Mutationen (missense, nonsense) sind die Zukunft der personalisierten Medizin.	83
4.1.3.	Biologische Bedeutung von genetischen Variationen in Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsel während der Evolution von Vertebraten.....	87
4.2.	Molekulare Ursachen für die Inaktivität der natürlich vorkommenden hALOX15 Gly422Glu Variation	90
4.2.1.	Gly422Glu und Gly422Arg sind seltene Mutationen des hALOX15 Gens.	90
4.2.2.	Die Gly422 Position ist wichtig für die Funktionalität des hALOX15 Enzyms.	91
4.2.3.	Ist der funktionell wichtige Glycinrest auch in anderen LOX-Isoformen konserviert?	93
4.2.4.	Die fehlerhafte Proteinfaltung und Proteinaggregation spielt in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen eine wichtige Rolle.	94
5.	Zusammenfassung/Abstract.....	95

6. Literaturverzeichnis	97
7. Publikationsliste	119
8. Lebenslauf	121
9. Anhang	123

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angstrom – Langeneinheit (1 Å = 100 pm = 10 ⁻¹⁰ m)
ALOX5	Arachidonat 5-Lipoxygenase
ALOX15	Arachidonat 15-Lipoxygenase
ALOX12	Arachidonat 12-Lipoxygenase
ALOX15B	Arachidonat 15-Lipoxygenase Typ II
bp	„base pairs“ – Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ – Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
Co-Sepharose	Cobalt-Sepharose
cDNA	„complementary DNA“ – zur mRNA komplementäre DNA
CP-HPLC	„chiral phase-HPLC“ – Chiralphasen-HPLC
Cu	"Cuprum" – Kuper
CysLTR1	Cysteinyl-Leukotrienrezeptor 1
CysLTR2	Cysteinyl-Leukotrienrezeptor 2
DNA	„desoxiribonucleic acid“ – Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat-Set
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“ – Ethylendiamintetraessigsäure
Fe	"Ferrum" – Eisen
FLAP	Fünf-Lipoxygenase-Aktivierendes-Protein
5-HETE	5-Hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-HETE	8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
12-HETE	12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-HETE	15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
5-H(p)ETE	5-Hydroperoxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-H(p)ETE	8-Hydroperoxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
12-H(p)ETE	12-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-H(p)ETE	15-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
HDL	„high density lipoprotein“ – Lipoprotein hoher Dichte
9-HODE	9-Hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure
13-HODE	13-Hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure
HPLC	„high performance liquid chromatography“ – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton – atomare Masseneinheit (1 kDa = 1000 Da)

LB _{Amp}	Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin
LB _{Amp, Cap}	Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin und Chloramphenicol
LDL	„ <i>low density lipoprotein</i> “ – Lipoprotein niedriger Dichte
LOX	Lipoxygenase
LTA ₄	5-trans-5,6-epoxy-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTB ₄	5,12-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraensäure
LTC ₄	5-hydroxy-6-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTD ₄	5-hydroxy-6-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTE ₄	5-hydroxy-6R-(S-cysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
LTB4R	Leukotrien B4 Rezeptor
LTB4R2	Leukotrien B4 Rezeptor 2
LX	Lipoxin
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “ – Boten-RNA
Ni	Nickel
O	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ – Phosphat-gepufferte Saline
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ – Polymerasekettenreaktion
PDB	„ <i>Protein Databank</i> “ – Proteinstrukturdatenbank
PMDB	„ <i>Protein Model Database</i> “ – Protein Model Datenbank
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “ – Ribonukleinsäure
PPAR _γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
RP-HPLC	„ <i>reverse phase-HPLC</i> “ – Umkehrphasen-HPLC
rcf	„ <i>relative centrifugal force</i> “ – relative Zentrifugalkraft (x g)
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “ – Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP-HPLC	„ <i>straight phase-HPLC</i> “ – Normalphasen-HPLC
SNP	„ <i>single nucleotide polymorphism</i> “ – Einzelnukleotidpolymorphismen
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TED	Triscarboxymethylethylendiamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Zsfg.	Zusammenfassung

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Klassifizierung von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind Enzyme, die eine Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer cis/cis 1,4-Pentadienylstruktur zu den entsprechenden Hydroperoxiden katalysieren (Ivanov *et al.* 2010; Haeggstrom *et al.*, 2011). Sie sind in der Lage pro- und antiinflammatorische Moleküle (z.B. Leukotriene, Lipoxine) zu synthetisieren, können aber auch komplexe makromolekulare Strukturen (z.B. Lipoproteine, Biomembranen) oxidativ modifizieren (s. 1.1.4). Ursprünglich wurden LOXn in pflanzlichen und tierischen Organismen entdeckt (Andreou *et al.*, 2009; Haeggstrom *et al.*, 2011). Neuere bioinformatische Analysen zeigen allerdings, dass diese Enzyme auch in Bakterien vorkommen, wobei bisher noch nicht geklärt ist, ob es sich dabei um eine gerichtete Enzymevolution aus einer LOX-Urform oder um einen horizontalen Gentransfer von LOX-Genen höherer Organismen handelt (Hansen *et al.*, 2013; Kühn *et al.*, unveröffentlicht). Weiterhin bleibt unklar, ob Archaeen als Urformen des einzelligen Lebens auf der Erde nicht auch LOXn besitzen. In einer erst kürzlich durchgeführten Datenbankrecherche wurde in zwei Archaeobakterien (*Halorubrum kocurii*, *Methanococcus voltae*) eine Proteinsequenz entdeckt, die möglicherweise einer Lipoxygenase entspricht (Jansen und Adel *et al.*, unveröffentlicht). Allerdings muss derzeit noch geprüft werden, ob es sich bei den identifizierten Sequenzen tatsächlich funktionsfähige LOXn handelt.

Die Nomenklatur tierischer Lipoxygenasen bezieht sich traditionell auf ihre Fähigkeit molekularen Sauerstoff in Arachidonsäure einzubauen. In Abhängigkeit davon, an welches Kohlenstoffatom der Arachidonsäure der molekulare Sauerstoff eingeführt wird, spricht man entweder von einer 15-LOX (Einbau des Sauerstoffs am C15 der Arachidonsäure) oder 5-LOX (Einbau des Sauerstoffs am C5 der Arachidonsäure). Neuere phylogenetische Ansätze, welche vor allem die Sequenzverwandtschaft der Enzyme untereinander berücksichtigen, unterteilen die Säugetier-LOXn dagegen in 4 verschiedene Subfamilien: 12/15-LOX, 5-LOX, Plättchen-Typ 12-LOX sowie die epidermalen LOXn. Beim Menschen existieren 6 verschiedene LOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, LOX5, ALOXE3). Wenn immer möglich sollte für die Klassifizierung neu entdeckter Säugetier-LOXn die orthologe Isoform des Menschen angegeben werden. So sollte die detailliert charakterisierte Kaninchen 15-LOX als rabALOX15 beschrieben werden. Analog dazu wäre die Ratten 12-LOX vom Plättchen-Typ als ratALOX12 zu kennzeichnen. Die Nomenklatur bei Pflanzen dagegen ist gänzlich verschieden und wird hier nicht weiter berücksichtigt (s. 1.1.3.).

Neben unterschiedlicher Verbreitung ist auch die biologische Rolle der verschiedenen LOX-Isoformen komplex und zum großen Teil auch noch nicht verstanden. Insgesamt ist bekannt, dass LOXn an verschiedenen inflammatorischen Prozessen sowie an der Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt sind (s. 1.1.4). Obwohl bereits seit Jahrzehnten an diesen

Enzymen geforscht wird und ein interdisziplinäres Interesse aufgrund ihrer Rolle in der Atherosklerose, der Kanzerogenese sowie beim Asthma bronchiale besteht, ist bis jetzt wenig über ihre exakte Funktionsweise auf molekularer Ebene klar. Das liegt zum einen daran, dass es bis zum heutigen Tag nur für einige wenige LOX-Isoformen überhaupt strukturelle Daten gibt, was eine detaillierte Analyse der LOX-Reaktion (Substratbindung, Reaktionsintermediate etc.) erschwert. Zudem gibt es derzeit wenig funktionelle Daten zur Struktur-Wirkungsbeziehung von LOXn, zum Mechanismus der Biosynthese der unterschiedlichen Reaktionsprodukte sowie zu den zellulären Rezeptoren verschiedener LOX-Produkte. Ein weiterer Grund für die Komplexität der LOX-Reaktion ist die Tatsache, dass die unterschiedlichen LOX-Isoformen verschiedene Struktur-Wirkungsbeziehungen aufweisen. So können 15-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen relativ einfach in 12-lipoxygenierende Enzyme umgewandelt werden, wobei die molekularen Mechanismen für den Unterschied in der Positionsspezifität weitestgehend geklärt sind (Borngräber *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 2010). Daneben kann durch eine gezielte Mutagenese-strategie eine 5-LOX in ein überwiegend 12- bzw. 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden. Es bleibt dabei allerdings weitgehend unklar, was ALOX5-Isoformen von ALOX15-Isoformen unterscheidet und warum sich die Positionsspezifität der beiden Enzyme sich so dramatisch unterscheidet. Zwar gibt es unterschiedliche Hypothesen für die unterschiedliche Reaktionsspezifität dieser LOX-Isoformen, aber derzeit existiert noch kein einheitliches Funktionsmodell für diese Enzyme (s. 1.2.4.1.).

1.1.1 Reaktionsmechanismus von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen katalysieren die positions- und stereospezifische Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren die mindestens ein *cis/cis* 1,4 Pentadienylfragment enthalten, wie z.B. Arachidonsäure bzw. Linolsäure (s. Abb. 1.1.), zu den entsprechenden Hydroperoxiden (Brash *et al.* 1999; Ivanov *et al.* 2010). Das katalytische Eisenion wird dabei im Gegensatz zu den meisten eisenhaltigen Enzymen weder über den Kofaktor Häm noch über ein Eisen-Schwefel-Zentrum komplexiert, sondern ist in einer oktaedrischen Ligandensphäre eingebaut, die aus 5 Aminosäuren und einem Wassermolekül besteht (Kuban *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1999). Vereinfachend dargestellt, besteht die LOX-Reaktion aus 4 Teilreaktionen: I) Wasserstoffabstraktion, II) Radikalumlagerung, III) Sauerstoffinsertion und IV) Radikalreduktion. Intrazellulär liegen LOXn nach ihrer Biosynthese zunächst in ihrer katalytisch inaktiven Fe²⁺-Form vor. Um die LOX-Reaktion starten zu können, muss das Enzym zunächst von seiner inaktiven Fe²⁺- in seine aktive Fe³⁺-Form oxidiert werden. Das kann z.B. durch Oxidation des Enzyms mit Peroxiden geschehen. Die Reaktionsprodukte der LOXn, die Hydroperoxyfettsäuren, können eine derartige

Oxidation bewirken. Es wird in diesem Zusammenhang auch vom autokatalytischen Charakter der Lipoxygenasen gesprochen (Yamamoto *et al.*, 1989; Schilstra *et al.*, 1992). Im ersten Reaktionsschritt erfolgt eine Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einer doppelallylständigen Methylengruppe, wobei das bei Säugetierlipoxygenasen, welche hauptsächlich Arachidonsäure umsetzen, in der Regel an einem von drei Kohlenstoffatomen der Arachidonsäure (C7, C11, C13) geschieht. Die Wasserstoffabstraktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der LOX-Reaktion (Glickman *et al.*, 1995; Weckler *et al.*, 2009). Bei dieser Teilreaktion wird ein Proton freigesetzt, das korrespondierende Elektron reduziert das Eisenion anschließend von seiner Fe^{3+} - zu seiner Fe^{2+} -Form. Die Wasserstoffabstraktion ist in zweierlei Hinsicht stereoselektiv. Zum einen wird der Wasserstoff nur von einem der drei doppelallylständigen Methylengruppen (z.B. C7 bei 5-LOX) abstrahiert, während die anderen Methylengruppen unberührt bleiben. Daneben wird stets entweder nur das *proS* bzw. *proR* Wasserstoffatom von der doppelallylständigen Methylengruppe abgespalten, nie aber beide gleichzeitig.

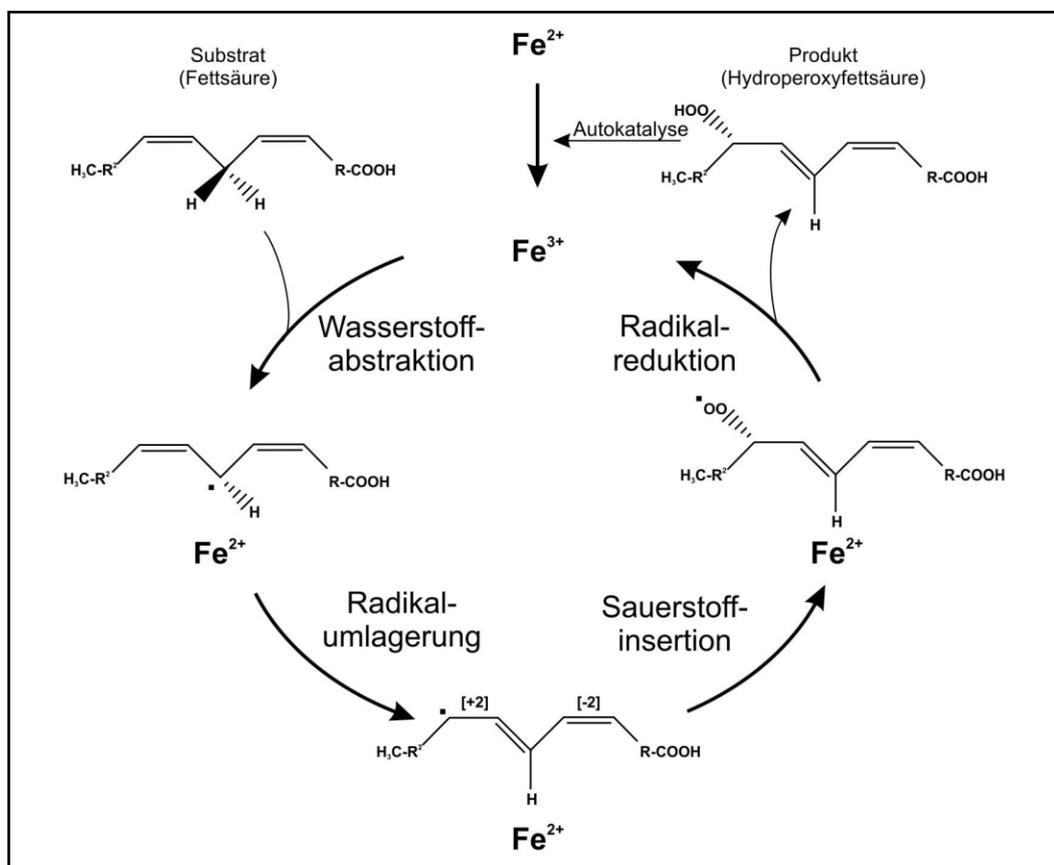


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung der LOX-Reaktion. Nach der Aktivierung des Eisenions verläuft die LOX-Reaktion in 4 Teilreaktionen: 1. Wasserstoffabstraktion 2. Radikalumlagerung 3. Sauerstoffinsertion 4. Radikalreduktion (modifiziert nach Ivanov *et al.*, 2010).

Das Radikalelektron ist durch die benachbarten Doppelbindungen delokalisiert und kann sich an verschiedenen C-Atomen aufhalten (Mesomeriestabilisierung). Dadurch kann es zu einer

[-2] (Richtung Carboxylende) oder [+2] Verschiebung (Richtung Methylende) kommen. Weshalb eine der beiden Richtungen durch die meisten LOX-Isoformen favorisiert wird, ist bislang nicht klar. Bei der Umlagerung der Doppelbindung nach der Wasserstoffabstraktion entsteht ein cis/trans-konjugiertes Doppelbindungssystem mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm (Ingram *et al.*, 1988). Auf dieser Eigenschaft beruhen sowohl der photometrische als auch der HPLC-basierte LOX-Aktivitätsassay.

Die Sauerstoffinsertion bei LOXn mit einem katalytischen Eisenion erfolgt stereospezifisch und *antarafacial*. Das heißt der molekulare Sauerstoff wird von der Seite der Doppelbindungsebene aus gesehen eingefügt, die der Wasserstoffabstraktion gegenüberliegt, wobei stets ein enantiomerenreines Endprodukt gebildet wird. Die strukturellen Ursachen für den positions- und stereospezifischen Charakter der Sauerstoffinsertion sind allerdings noch immer umstritten, wobei mehrere plausible Theorien existieren: I) Sauerstoff-Zielführung/Ala-vs-Gly-Konzept (Coffa *et al.*, 2004; Coffa *et al.*, 2005), II) eine Radikal-Dislokation könnte die Elektronendichte des Pentadienylradikals einseitig erhöhen, wenn positive Reste in die Nähe des Substrats gelangen III) Konformationsänderungen des Radikals führen zur Priorisierung der Sauerstoffinsertion an bestimmten C-Atomen, IV) im Fall der zufälligen Sauerstoffinsertion könnte die stereospezifische Reduktion des Pentadienylradikals zur Bildung der chiralen Endprodukte führen (Schneider *et al.*, 2007; Jansen *et al.*, 2011). Zudem wird auf Basis von verschiedenen LOX-Kristallstrukturen schon lange über die Existenz von separaten Sauerstofftunneln nachgedacht, wobei moleküldynamische Experimente an der rabALOX15 Kristallstruktur zeigen konnten, dass der molekulare Sauerstoff vermutlich über definierte Routen in das aktive Zentrum gelangt (Saam *et al.*, 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass immer noch kein einheitliches Konzept für den molekularen Mechanismus der Sauerstoffinsertion während der LOX-Reaktion existiert.

Im letzten Reaktionsschritt wird das bei der Reaktion entstehende Peroxidradikal zunächst zum entsprechenden Anion reduziert. Das dafür notwendige Elektron stammt aus der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} . Das dabei entstehende oxidierte Enzym steht anschließend für einen erneuten Katalysezyklus zur Verfügung. Anschließend wird das Peroxid anion protoniert, wodurch das Endprodukt der Lipoxygenasereaktion, die Hydroperoxyfettsäure, entsteht.

1.1.2 Vorkommen von LOXn und evolutive Aspekte

In zwei von drei taxonomischen Domänen der belebten Natur (Woese *et al.*, 1990) kommen nach heutigem Stand der Wissenschaft LOXn vor. Dabei sind LOX-Sequenzen in

verschiedenen Bakterien und Eukaryonten nachgewiesen worden (Ivanov *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2013). In Archaeen galten LOXn bis jetzt als weitestgehend ausgeschlossen, da sie ja für ihre Reaktion molekularen Sauerstoff benötigen, welcher für die meisten Archaeen toxisch ist. Dennoch konnte in einer Datenbankrecherche für die Archaeobakterien *Halorubrum kocurii* und *Methanococcus voltae* eine Proteinsequenz gefunden werden, welche mit den bekannten Lipoxygenasen eine hohe Sequenzhomologie aufwies (Susan Adel *et al.*, unveröffentlicht). Bei *Halorubrum kocurii* handelt es sich um ein aerobes, extrem halophiles (NaCl Optimum 3.4 M), gram-negatives und stabförmiges Archeon, welches erstmals aus einem Salzsee in der Inneren Mongolei (VR China) isoliert wurde (Gutierrez *et al.*, 2008). Dagegen handelt es sich bei *Methanococcus voltae* um ein methanogenes, gram-negatives und kugelförmiges Archeon, welches in überwiegend anaeroben Lebensbereichen wie dem Darm von Wiederkäuern sowie in Süß- und Meerwassersedimenten vorkommt (Tumbula *et al.*, 1999). Wenn die aus den Sequenzdaten postulierte Lipoxygenase durch enzymologische Untersuchungen bestätigt würde, dann wären in allen drei Domänen des irdischen Lebens LOX-Enzyme beschrieben worden.

Nach heutigem Stand der Wissenschaft kommen LOXn in verschiedensten Bakterien (Cyanobakterien, Proteobakterien, Bakteroidete), Protisten (Rotalge, Grünalge, Amöbe), Pilzen, Pflanzen und Tieren vor (s. Tab. 1.). Bei den Tieren reicht ihre Verbreitung von einfach strukturierten, mehrzelligen Tieren (z.B. Gattung Placozoa) bis hin zu höheren Primaten einschließlich einiger Hominiden (*Homo sapiens*, *H. neandertalensis*, *H. denisovan*). Ob im Laufe der Evolution eine Ur-LOX existierte, aus der sich die heute bekannten LOX-Isoformen in den höheren Organismen entwickelt haben, oder es durch horizontalen Gentransfer zu einer Übertragung von Lipoxygenasen von höheren auf niedrigere Lebewesen gekommen ist, kann zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig definiert werden (Porta *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass bereits Cyanobakterien LOX-Gene enthalten, bestätigt zum Teil den Verdacht, dass sich die Enzyme evolutiv mit der oxygenen Photosynthese entwickelt haben könnten. Im Verlaufe der Erdgeschichte kam es im Kambrium zu einem plötzlichen starken Anstieg der irdischen Sauerstoffproduktion aufgrund eines abrupten Anstiegs der Photosyntheseaktivität von Cyanobakterien. Damit stieg der Sauerstoffgehalt der Uratmosphäre von ca. 3 % auf 15 % an und es kam evolutionär zu einer wahren Explosion der Artenvielfalt auf dem Planeten. Sollte es eine Koevolution von oxygenen Photosynthese und LOXn geben, dann sollten die in dieser Phase der Evolution entstandenen Arten auch LOXn als Sauerstoff metabolisierende Enzyme enthalten haben. Damit könnte das Kambrium die Entstehungsperiode von LOXn auf der Erde sein.

Wie bereits erwähnt, besitzt der moderne Mensch (*Homo sapiens*) sechs funktionelle LOX-Gene. Die gleiche Anzahl an LOX-Genen konnte auch bei zwei unterschiedlichen und heute

ausgestorbenen Frühzeitmenschen (*Homo neandertalensis*, *homo denisova*) gefunden werden, die mit dem *Homo sapiens* einen gemeinsamen Vorfahren haben, an unterschiedlichen Orten der Erde (Europa, Zentralasien) lebten und vor ca. 30000 Jahren ausstarben. Eine ähnliche genomische Konstellation liegt bei allen hochentwickelten Primaten (Bonobo, Gorilla, Schimpanse, Orang Utan) vor. Dagegen besitzt der Zebrafisch 7 LOX-Gene, die aber für eine geringere Anzahl von LOX-Isoformen kodieren. Generell lässt die Anzahl der LOX-Gene daher keine Rückschlüsse auf den jeweiligen Entwicklungsstand der entsprechenden Spezies zu.

<u>Archaea</u>		<u>Bacteria</u>			<u>Eukarya</u>			
	<u>Proteo-bacteria</u>	<u>Cyano-bacteria</u>	<u>Bakteroi-dete</u>	<u>Protista</u>	<u>Fungi</u>	<u>Plantae</u>	<u>Animalia</u>	
<i>Haloerubrum kocurii</i> ?	<i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908,	<i>Variovorax</i> sp. CF313, <i>Thiocapsa marina</i> 5811,	<i>Indibacter alkaliphilus</i> LW1	Rhodophyta <i>Porphyra purpurea</i>	Ascomycota <i>Neurospora crassa</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Haematonectria</i>	Angiospermidae/ Magnoliophytina <u>Eudikotyledonen</u> <i>Glycine max</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Betula pendula</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>Persea Americana</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Citrus jambhiri</i>	Invertebrata <u>Placozoa</u> <i>Trichoplax adhaerens</i> <u>Cnidaria</u> <i>Gersemia fruticosa</i> , <i>Nematostella vecten-sis</i> , <i>Clavuraria viridis</i> , <i>Plexaura homomalla</i> , <i>Hydrumagnipapillata</i> <u>Echinodermata</u> <i>Stronglyocentrus purpuratus</i> , <u>Plathyhelminthes</u> <i>Schistosoma mansoni</i> <u>Arthropoda</u> <i>Ixodes scapularis</i>	Chordata <u>Ascidiacea</u> <i>Cione intestinalis</i> <u>Leptocardii</u> <i>Branchiostoma floridae</i> <u>Actinopterygii</u> <i>Danio rerio</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Takifugu Gasterosteus</i> <u>Amphibia</u> <i>Ambystoma Xenopus laevis</i> <u>Reptilia</u> <i>Anolis carolinensis</i> <u>Aves:</u> <i>Gallus gallus aculeatus mexic</i> , <i>rubripes</i> , <u>mammalia</u> <i>Bos Taurus</i> , <i>Tursiops truncates</i> , <i>Myotis lucifugus</i> , <i>Felis catus</i> , <i>Macropus eugenii</i> , <i>Omithorhyncus anatinus</i> , <i>Erinaceus europaeus</i> , <i>Choleopus hoffmanii</i> , <i>Loxodonta africana</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Oryctolagus cuniculus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Homo neandertalensis</i> , <i>Denisovan</i>
<i>Methanococcus voltae</i> ?	<i>Shewanella violacea</i> DSS12, <i>Shewanella denitrificans</i> OS217, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42 A2 NCIMB 40045, <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622, <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718, <i>Photobacterium profundum</i> 3TCK, <i>Burkholderia thailandensis</i> E264 <i>Burkholderia thailandensis</i> Bt4, <i>Citromicrobium bathyomarimum</i> JL354, <i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259, <i>Nitrosococcus watsonii</i> C-113, <i>Nitrosospora multiformis</i> ATCC 25196, <i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, <i>Calothrix</i> sp. PCC 630, <i>Rivularia</i> sp. PCC 7116 <i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304, <i>Anabaena cylindrica</i> PCC 7122 <i>Anabaena flos-aque</i> , <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417, <i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375, <i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7376, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335, <i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605, <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> PCC 7420, <i>Microcoleus vaginatus</i> FGP-2, <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9808 <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112		Heterokontophyta <i>Phytophthora infestans</i> Mycetozoa <i>Dictyostelium discoideum</i>	Basidiomycota <i>Laccaria bicolor</i>	Monokotyledonen <i>Oryza sativa</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Triticum aestivum</i> Bryophyta <i>Physcomitrella patens</i>		<u>Hemichordata</u> <i>Saccoglossus kowalevskii</i>

Tab. 1.1.: Auszug von Organismen mit LOX-Sequenzen aus drei Domänen und fünf Königreichen der belebten Natur. Bei der Domäne der Archaeen besteht erst jüngst der Verdacht, dass sie LOX-Sequenzen enthalten (Kühn et al., unveröffentlicht). Aufgrund der Fülle von veröffentlichten Sequenzen konnten in dieser Tabelle nicht alle berücksichtigt werden (modifiziert nach Ivanov et al., 2010).

1.1.3 Nomenklatur von Lipoxygenasen

Die Nomenklatur von Lipoxygenasen ist sehr vielfältig und in großen Teilen sogar verwirrend. Ursprünglich erfolgte die Benennung tierischer LOXn entsprechend der Positionsspezifität der Oxygenierung von Arachidonsäure (5-LOX, 15-LOX etc.). Dabei kennzeichnet die Zahl im Namen, die Nummer des Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure, an welches gemäß des Reaktionsmechanismus (Abb. 1.1) der molekulare Sauerstoff eingebaut wird. Diese Einteilung ist zwar einfach, allerdings zum Teil schwierig umzusetzen, da nicht alle LOXn Arachidonsäure als Substrat verwenden. Für Säugetier-LOXn existiert auf Grundlage von phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen die Einteilung in folgende 4 Subfamilien: 12/15-LOX, 5-LOX, Plättchen-Typ 12-LOX und epidermale LOXn. Diese ist allerdings für viele niedere Tierformen nicht anwendbar. Pflanzliche LOXn werden in der Regel entsprechend der jeweiligen Pflanze in fortlaufender Nummerierung benannt (Sojabohnen-LOX-1, LOX-2 etc.). Derzeit gibt es allerdings kein allgemein gültiges Konzept für die Nomenklatur von LOXn, wobei sich für die Säugetier-LOXn bewährt hat, die jeweiligen Enzyme entsprechend ihrer Gene zu benennen (Mensch: ALOX5, ALOX15, ALOX12, ALOX15B, ALOX12B, ALOXE3).

1.1.4 Biologische Bedeutung von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind in verschiedenste biologische Prozesse involviert. In den folgenden Kapiteln sollen die Funktionen in den wichtigsten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen benannt werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Arbeit im Wesentlichen mit der funktionellen Charakterisierung von genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) in humanen Lipoxygenasen beschäftigt, wird auf einen Bezug zu der Funktion von pflanzlichen LOXn verzichtet. Hierbei soll lediglich auf zwei Übersichtsartikel zur Struktur und Funktion pflanzlicher LOXn hingewiesen werden (Liavonchanka *et al.*, 2006; Andreou *et al.*, 2009).

1.1.4.1 Entzündung und Asthma bronchiale

Die humane 5-Lipoxygenase (hALOX5) stellt das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese dar (Radmark *et al.*, 2010; Haeggstrom *et al.*, 2011), wobei das während der Reaktion gebildete 5-H(p)ETE in einem weiteren Reaktionsschritt zum instabilen Epoxid Leukotrien A₄ (LTA₄) umgewandelt wird (s. Abb. 1.2.). Dieses kann dann durch die LTA₄ Hydrolase in das Cysteinyl-freie Leukotrien LTB₄ umgewandelt werden. In weiteren Reaktionen können aus LTA₄ durch die LTC₄ Synthase, die γ -Glutamyltransferasen (GGT1, GGT5) sowie durch Dipeptidasen (DPEP1, DPEP2) die Cysteinyl-Leukotriene (Cys-LTs) LTC₄, LTD₄ und LTE₄ hergestellt werden (Haeggstrom *et al.*, 2011). Alternativ kann LTA₄ durch die ALOX15 in die antiinflammatorischen Lipoxine (LXA₄) umgewandelt werden (s. Abb. 1.2.).

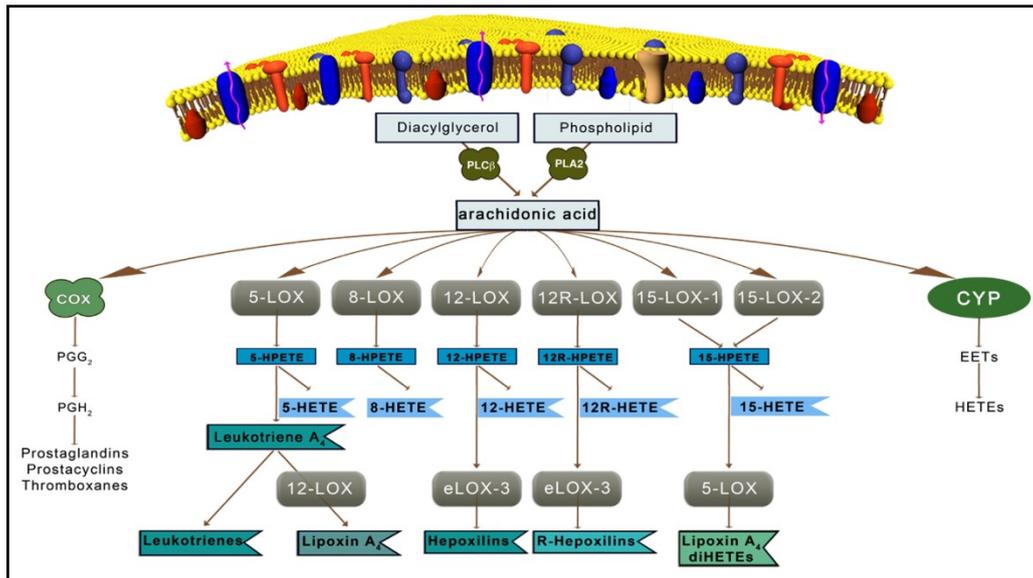


Abb.1.2.: LOX-Stoffwechsel (Arachidonsäurekaskade). Dargestellt sind die möglichen Reaktionen verschiedener tierischer LOXn mit Arachidonsäure sowie der Biosynthese von Leukotrienen, Lipoxinen und Hepoxilinen. Dabei ist zu erkennen, dass die 5-LOX sowohl bei der Biosynthese der proinflammatorischen Leukotriene (LT) als auch der antiinflammatorischen Lipoxine (LX) beteiligt ist, wohingegen die 15-LOX hauptsächlich an der Lipoxinbiosynthese beteiligt ist. (übernommen von http://www.dkfz.de/en/f020/groups/krieg/pics/figure_1.jpg).

Leukotriene (LT) gelten als proinflammatorische Moleküle, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Asthmas haben (Duroudier *et al.*, 2009). Obwohl die biologische Wirkung von Leukotrienen auf die Bronchialmuskulatur schon seit mehr als 70 Jahren bekannt ist (die auslösende Substanz wurde damals als „*slow reacting substance of anaphylaxis*“ bezeichnet, weil sie eine lang anhaltende Bronchokonstriktion verursachte), konnte die chemische Struktur der SRS-A erst zu Beginn der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts aufgeklärt werden (Samuelsson *et al.*, 1983). Leukotriene (insbesondere LTC₄ und LTD₄) induzieren eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege (Devchand *et al.*, 1996; Gronert *et al.*, 2001) und führen damit zu einem Abfall der Einsekundenexpirationskapazität (FEV₁), was eine Einschränkung der ventilatorischen Flussreserve bedeutet (Heise *et al.*, 2000). Die durch die LTs gesteigerte Gefäßpermeabilität sowie die daraus resultierende Plasmaextravasation erhöhen den Atemwiderstand und verschlechtern die alveoläre Atemgasdiffusion (Walch *et al.*, 2000; Thunnissen *et al.*, 2001; Mellor *et al.*, 2001). Neben der obstruktiven wird auch die sekretorische Komponente des Asthmas maßgeblich durch Leukotriene beeinflusst. Die Cys-LTs sind für eine erhöhte Schleimproduktion der Becherzellen (Yu *et al.*, 1995) verantwortlich und führen langfristig zu einer Becherzellhyperplasie (Kliwer *et al.*, 1995). Neben einer Verringerung der Zilienbewegung des Bronchialepithels (Devchand *et al.*, 1996), wird auch die für das Asthma übliche bronchiale Hyperreagibilität maßgeblich durch Cys-LTs verursacht (Thunnissen *et al.*, 2001). Letztlich kommt es langfristig zu einem Umbau des Bronchialsystems, wobei die Cys-LTs neben der Vermehrung von Becherzellen sowie einer erhöhten Schleimproduktion, den fibrotischen

Umbau des Lungengewebes bewirken (Kliwer *et al.*, 1995; Holgate *et al.*, 2003). Diese Pathomechanismen dienen als Angriffspunkte für Therapien von Asthma bronchiale. Zum Beispiel handelt es sich bei dem in den USA zugelassenen Therapeutikum Zileuton um einen Inhibitor der hALOX5, der die Biosynthese von proinflammatorischen Leukotrienen hemmt. Zudem sind zur Therapie Leukotrienrezeptorantagonisten (z.B. Montelukast) zugelassen, welche vor allem in der frühen Phase des allergischen Asthmas sowie bei Analgetika-Asthma eine gute Behandlungsoption darstellen (Mastalerz *et al.*, 2010).

Daneben sind Leukotriene auch in der Pathogenese der allergischen Rhinitis involviert, auch wenn sie hier im Vergleich zum Histamin eine eher untergeordnete Rolle spielen (He *et al.*, 1999). Dennoch werden Leukotrienrezeptorantagonisten auch hier für die Therapie verwendet (Uzzaman *et al.*, 2012). Lipoxygenasen werden vor allem in Leukozyten exprimiert und daher sind LOX-Produkte an der primären Immunantwort, bei zellulärem Stress, Verletzungen und der Exposition gegenüber Pathogenen beteiligt (Di Gennaro *et al.*, 2012). Die nachfolgende Tabelle stellt eine Zusammenfassung verschiedener lokaler Effekte von Leukotrienen im Milieu aseptischer und septischer Inflammation dar (Di Genarro *et al.*, 2012). Dabei ist zu erkennen, dass sich Cys-LTs erheblich von dem Cysteinyl-freien LTB₄ in ihrer Wirkweise unterscheiden.

Effektor-Zelltyp	LTB ₄	Cys-LTs
Neutrophiler Granulozyt	Chemotaxis, Aggregation, Adhärenz, Aktivierung, Degranulierung	-
Mastzelle	Rekrutierung unreifer Mastzellen	Produktion von IL-5, IL-8, TNF- α , MIP-1 β
Dendritische Zelle	Chemotaxis, Migration zu Lymphknoten	Migration zu Lymphknoten
Monozyt/Makrophage	Produktion von IL-6, MCP-1, TNF- α	Produktion von MCP-1, TNF- α , MMP-9
Lymphozyt	T-Zell-Rekrutierung von lymphatischem Gewebe nach peripher, Expression von CD23, CD54 und CD105 in B-Lymphozyten	Sensibilisierung auf Allergene bei entzündlichen Prozessen der Lunge, Th2-Immunantwort
Glatte Muskelzelle	Proliferation, Migration	Vasospasmus, Bronchospasmus
Endothel	-	Permeabilitätserhöhung, erhöhte Mikrozirkulation, Hochregulation von Adhäsions-Proteinen

Tab. 1.2.: Vergleich der Wirkung von Cysteinyl- gegenüber Cysteinylfreien-Leukotrienen in inflammatorischen Gewebe (IL= Interleukin, MCP-1= monocyte chemoattractant protein-1, TNF- α = Tumornekrosefaktor α , MIP-1 β = Macrophage inflammatory protein-1 β , MMP-9= matrix metalloproteinase-9) (übernommen aus Dissertation Christian Jansen; modifiziert nach Di Genarro *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Kanzerogenese

Für Lipoxygenasen und ihre Reaktionsprodukte (HETEs, Lipoxine etc.) wurden in der Literatur sowohl pro- als auch antikanzerogene Effekte beschrieben (Pidgeon *et al.*, 2007;

Schneider *et al.*, 2011). Diese hängen zum Teil von der jeweiligen Tumorart und den unterschiedlichen LOX-Isoformen ab. Aufgrund der Vielzahl von malignen Tumoren wird in diesem Abschnitt eher auf die allgemeine Rolle der einzelnen LOX-Isoformen im Zusammenhang mit der Kanzerogenese eingegangen.

Für die hALOX5 werden allgemein eher prokanzerogene Effekte diskutiert. Das Enzym scheint vor allem in den frühen Stadien des Kolonkarzinoms eine wichtige Rolle zu spielen, da eine vermehrte Enzymexpression stark mit einer Vergrößerung der Polypen sowie einer Zunahme von gut- (Adenome) und bösartigen Veränderungen (intraepithelialer Neoplasie) in der Darmschleimhaut korreliert (Wasilewicz *et al.*, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass die selektive Hemmung der 5-LOX sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von Kolonkarzinomzellen verhindert (Melstrom *et al.*, 2008). Dabei wird allgemein angenommen, dass die hALOX5 direkt durch Kontrolle des Tumorzellwachstums als auch indirekt über die Beeinflussung des Tumormikromilieus Einfluss auf die Karzinogenese nimmt (Schneider *et al.*, 2011). Unterstützt wird dieser Fakt durch die Tatsache, dass zwei Produkte des ALOX5-Stoffwechsels (5-HETE, LTB₄) sowohl für die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen als auch für die Vergrößerung der Vasopermeabilität verantwortlich sind, wobei beides wichtige Teilschritte in der Karzinogenese darstellen (Peters-Golden *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004).

Für die Maus Alox15b (8-LOX, Ortholog zur hALOX15B) ist derzeit noch nicht geklärt, ob sie pro- bzw. antikanzerogen wirkt. Zum einen führt eine Überexpression der Maus Alox15b in premalignen Keratinozyten zu einer Verringerung des Zellwachstums, was auf eine Hemmung der DNA-Synthese zurückzuführen ist (Schweiger *et al.*, 2007). Dagegen sprach, dass die Alox15b in einem Maus Hautkarzinommodell deutlich hoch reguliert war (Burger *et al.*, 1999). Die Expression der hALOX15B ist beim Mammakarzinom herunterreguliert (Jiang *et al.*, 2006). Studien am Prostatakarzinom zeigten zudem, dass hALOX15B als Tumorsupressor wirkt, welcher den Zellzyklus hemmt (Tang *et al.*, 2007). Dagegen spricht, dass die Überexpression von hALOX15B zu einer vermehrten Expression von Stammzellvorläufermarkern sowie einer allgemein verstärkten Zellproliferation in der Prostata führen, was eher prokanzerogene Eigenschaften sind (Suraneni *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Daten kann die ALOX15B sowohl als pro- als auch als antikanzerogenes Gen bezeichnet werden.

Die hALOX12 (Plättchen-Typ 12-LOX) wird allgemein eher als prokanzerogen eingestuft, da bei Prostatakarzinomen eine Korrelation der Enzymexpression mit einem fortschreitenden Stadium der Krankheit assoziiert wurde (Gao *et al.*, 1995). Zudem konnte festgestellt werden, dass sowohl 20-HETE als auch 12-HETE, ein Stoffwechselprodukt der hALOX12, im Urin von Patienten mit Prostatakarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht war (Nithipatikom *et al.*, 2006). Ein weiterer Beleg für den prokanzerogenen Charakter

dieses Enzyms ist die Tatsache, dass die Behandlung von zwei verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien mit den 12-LOX inhibierenden Molekülen Baicalein und BHPP (N-benzyl-N-hydroxy-5-phenylpentamid) zu einer verringerten Zellproliferation sowie einer vermehrten Tumorzellapoptose führten. Dabei wird angenommen, dass es durch Behandlung der Tumorzelllinien mit den Inhibitoren zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase kommt, welcher auf eine Herunterregulierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) zurückzuführen ist (Pidgeon *et al.*, 2002). Neben diesen direkten Effekten auf die Tumorzellproliferation wird auch angenommen, dass die hALOX12 einen positiven Effekt auf die tumorassoziierte Angiogenese hat. Dabei bewirkt 12S-HETE eine Stimulierung der Endothelzellproliferation sowie deren Migration (Nie *et al.*, 2000) durch Stimulation der Neusynthese von VEGF (*vascular epidermal growth factor*), einer PKC-abhängigen Rückgewinnung von Endothelzellen sowie einer gesteigerten Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ an der Oberfläche (Nie *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 1993 I; Tang *et al.*, 1993 II). Obwohl die hALOX12 allgemein einen onkogenen Charakter besitzt, so sind die unterschiedlichen Wirkmechanismen der 12-LOX-Reaktionsprodukte auf das Tumorwachstum weitgehend unbekannt.

Dagegen wird hALOX15 eine allgemein eher antikanzerogene Rolle zugesprochen. Insbesondere das Reaktionsprodukt der Linolsäureoxidation, 13S-HODE, wirkt über die endogene Aktivierung der PPAR γ -Rezeptoren antikanzerogen, da es zum einen die Proliferation von Tumorzellen verhindert und zum anderen zu einer verstärkten Zelldifferenzierung und Apoptose führt (Pozzi *et al.*, 2008; Keshamouni *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 13-HODE Levels in humanem Lungenkarzinomgewebe signifikant im Verhältnis zu gesundem Gewebe verringert waren (Yuan *et al.*, 2010). Die antikanzerogene Wirkung von hALOX15 wird dadurch unterstützt, dass die Behandlung von humanen Kolonkarzinomzellen mit 13-HODE bzw. die Überexpression von hALOX15 in diesen Zellen zu einer Verringerung der Zellproliferation sowie zum Verlust ihres tumorigenen Charakters führte (Nixon *et al.*, 2004). Unterstützt werden diese Daten durch den allgemeinen Fakt, dass das Enzym bei der Biosynthese von antiinflammatorischen Lipoxinen, Resolvinen und Protektinen eine wichtige Funktion hat (Schwab *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008). Da chronische Inflammation direkt mit der Kanzerogenese in Verbindung gebracht wird, ist das ein weiterer Hinweis für den antikanzerogenen Charakter von hALOX15 (Lee *et al.*, 2011, Schneider *et al.*, 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bestimmte LOX-Isoformen (ALOX5, ALOX12) einen eher prokanzerogenen Charakter haben, während andere Isoformen (ALOX15) eher antikanzerogen zu sein scheinen. Aufgrund der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse gibt es bisher keine einheitliche Theorie für das Verhalten der unterschiedlichen LOX-Isoformen während der Kanzerogenese.

1.1.4.3 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine systemische Erkrankung der Arterien, bei denen es zu einer Ablagerung von Blutfetten, Thromben, Bindegewebe und teilweise auch geringen Mengen an Kalk in den Gefäßwänden kommt. Sie gilt als eine der Hauptursachen für eine Reihe von kardiovaskulären Komplikationen wie z.B. dem ischämischen Schlaganfall, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), der koronaren Herzerkrankung (KHK) sowie dem Herzinfarkt (Artenjak *et al.*, 2012). Allgemein entsteht Atherosklerose durch einen chronisch inflammatorischen Prozess, der entweder nach der *Response-to-injury*-Hypothese durch eine Verletzung der inneren Arterienwandschicht (Intima) als Folge von Bluthochdruck, Toxinen bzw. einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Russel *et al.*, 1976 I-III) oder durch oxidative Modifikation von LDL (*low density lipoprotein*) als Folge von chronischer Hypercholesterinämie ausgelöst wird. Chemisch modifiziertes LDL wird durch Makrophagen über *Scavenger*-Rezeptoren aufgenommen, wodurch diese in Schaumzellen umgewandelt werden (Steinberg *et al.*, 1989). Über einen positiven *feedback*-Mechanismus führt die Aufnahme von oxidiertem LDL zu einer Hochregulierung der *Scavenger*-Rezeptoren, was wiederum eine Steigerung der LDL-Internalisierung zur Folge hat (Yoshida *et al.*, 2010). Das schränkt die Schaumzellen in ihrer Migrationsfähigkeit weiter ein, wodurch sie nicht mehr in der Lage sind, den Subendothelialraum zu verlassen. Sie lagern sich dort an, sterben ab und die in ihnen enthaltenen Lipide werden im Extrazellularraum deponiert. An aufgebrochenen atherosklerotischen *Plaques* kommt es zu einer verstärkten Blutgerinnung, welche eine fortlaufende Verengung der Arterie (Stenose) zur Folge haben. Daneben kommt es zu einer Einwanderung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten in den Subendothelialraum, was eine zunehmende Fibrosierung der Arterienwand bewirkt, wodurch die Arterienwand zunehmend geschädigt und brüchig wird. Im weiteren Verlauf kann es dann außerdem zur Kalzifizierung der Läsionen kommen (Lusis *et al.*, 2000). In den ersten Schritten der Pathogenese von Atherosklerose kommt es zur Infiltration von verschiedenen inflammatorischen Zellen (u.a. Makrophagen) in die betroffenen Gefäßareale, wodurch es zu einer Überexpression von ALOX5 in diesem Gewebe kommt. Die ALOX5 wird hauptsächlich von Makrophagen, welche die atherosklerotischen *Plaques* infiltrieren, produziert (Riccioni *et al.*, 2012). Die Bildung von verschiedenen Entzündungsmediatoren (z.B. LTB₄, Cys-LTs) hat eine zunehmende Rekrutierung von weiteren Immunzellen (Monozyten, neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten) sowie glatten Muskelzellen zur Folge (Samuelsson *et al.*, 2000). Zudem konnte für die Cys-LTs gezeigt werden, dass sie die Proliferation von arteriellen glatten Muskelzellen stimulieren können und zudem die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. P-Selektinen) an der Zelloberfläche von kultivierten Endothelzellen bewirken, wodurch diese möglicherweise eine verbesserte Adhäsionsfähigkeit an Arteriengefäßwände haben. Als Folge davon können zudem weitere Immunzellen in das

Innere der Arterienwand gelangen, was eine zunehmende Verengung der Gefäße und eine verstärkte Entzündungsreaktion verursacht (Funk *et al.*, 2001; Mehrabian *et al.*, 2003; Spanbroek *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Aspekte scheint die hALOX5 eine überwiegend proatherosklerotische Rolle zu haben. Dagegen besitzt die hALOX15 eine Janus-Rolle in der Pathogenese von Atherosklerose, wobei für das Enzym sowohl pro- als auch anti-atherosklerotische Eigenschaften diskutiert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass das Enzym in der frühen Phase der Atherosklerose als katalytisch aktive ALOX15 in atherosklerotischen *Plaques* vorkommt (Hiltunen *et al.*, 1995; Ylä-Herttuala *et al.*, 1990). Zudem konnten Stoffwechselprodukte der ALOX15 in verschiedenen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Ylä-Herttuala *et al.*, 1991; Kühn *et al.*, 1994). Außerdem ist das Enzym in der Lage, LDL direkt zu oxidieren, was einen der ersten Schritte in der Pathogenese von Atherosklerose darstellt (Cathcart *et al.*, 1991; Belkner *et al.*, 1993). Ursprünglich wurde daher ein eher proatherosklerotischer Charakter des Enzyms angenommen. In Tiermodellen konnte diese Hypothese jedoch nur teilweise bestätigt werden. Die Überexpression der hALOX15 in Mäusen mit einem LDL-Rezeptordefekt (LDLR) führte zu einer verstärkten Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in diesen Tieren (Harats *et al.*, 2000). Dagegen zeigten Mäuse, bei denen neben dem Apolipoprotein E (apo-E) zusätzlich das Gen für die Alox15 fehlte, eine verringerte Entwicklung von den atherosklerotischen Läsionen (Cyrus *et al.*, 1999; Cyrus *et al.*, 2001; Huo *et al.*, 2004). Interessanterweise führte die Überexpression der hALOX15 in Makrophagen von transgenen Kaninchen auch zu einer verringerten Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Shen *et al.*, 1996). Es ist bekannt, dass die Pathogenese der Atherosklerose in allen Stadien mit einer chronischen Inflammation verknüpft ist. Daher sollten Enzyme, die antiinflammatorische Moleküle synthetisieren, auch antiatherosklerotischen Charakter haben. Es wird angenommen, dass die hALOX15 an der Biosynthese von antiinflammatorischen, atheroprotektiven Resolvinen (RvD), Protektinen (PD) aus omega-3-Fettsäuren (Eikosapentaensäure EPA, Docosahexaensäure DHA) bzw. Lipoxinen aus Arachidonsäure beteiligt ist, was für einen eher antiinflammatorischen Charakter des Enzyms spricht (Schwab *et al.*, 2007; Serhan *et al.*, 2008).

Die hALOX15B scheint dagegen einen eher proatherosklerotischen Charakter zu haben. Das Enzym wird in primären Makrophagen auf einem höheren Niveau als alle anderen LOX-Isoformen exprimiert (Wuest *et al.*, 2012). In einer weiteren Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass der *in vitro knockdown* von der hALOX15B in humanen primären Makrophagen die zellulären Lipidlevel, die Schaumzellgröße und die Zytokinsekretion (IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12) verringerte. Außerdem führte der *in vivo knockdown* der Maus Alox15b in LDL-Rezeptordefizienten Mäusen zu einer Verringerung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta (Magnusson *et al.*, 2012). Zusammenfassend kann man sagen, dass die verschiedenen

LOX-Isoformen sowohl pro- als antiatherosklerotische Eigenschaften besitzen, obwohl ihre eindeutigen Funktionen in der Pathogenese bislang nicht klar sind.

1.1.4.4 Epidermale Differenzierung

Die beiden epidermalen LOXn (ALOX12B, ALOXE3) wurden erstmals in der Haut von Mäusen und Menschen entdeckt (Sun *et al.*, 1998; Boeglin *et al.*, 1998; Krieg *et al.*, 1999; Krieg *et al.*, 2001; Kinzig *et al.*, 1997). Die ALOX12B und ALOXE3 fördern dabei die Differenzierung von Keratinozyten und Adipozyten in der Haut (Fürstenberger *et al.*, 2007; Krieg *et al.*, 2013). Wird das Gen der *Alox12b* bei Mäusen ausgeschaltet, so sterben diese wenige Stunden nach der Geburt aufgrund von Dehydratation. Aufgrund dieser Tatsache wird für das Enzym eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der epidermalen Barriere angenommen (Epp *et al.* 2007). Bestärkt wird diese Annahme durch den Fakt, dass Mutationen, die zu inaktiven hALOX12B bzw. hALOXE3 Varianten führen, die zweithäufigste Ursache für die autosomal rezessive kongenitale Ichthyose (ARCI) sind. Dabei handelt es sich um eine extrem seltene Hauterkrankung (1: 300000 Fälle in Europa und Nordamerika), die wie alle Ichthyosen durch genetisch bedingte Verhornungsstörungen in der Haut gekennzeichnet ist (Eckl *et al.* 2005; Eckl *et al.* 2009). Funktionell unterscheiden sich die beiden LOX-Isoformen sich erheblich von den anderen humanen Lipoxygenasen. Das Produkt der Arachidonsäureoxygenierung von hALOX12B unterscheidet sich von den anderen LOXn aufgrund der Tatsache, dass das 12-H(p)ETE in *R*- anstelle der sonst üblichen *S*-Konfiguration vorliegt. Die molekulare Ursache hierfür soll an anderer Stelle diskutiert werden (s. 1.2.4.2.). Bei ALOXE3 dagegen handelt es sich um eine Hydroperoxidisomerase, die vornehmlich *R*-H(p)ETEs in die spezifischen Epoxyalkohole (Hepoxiline) und Ketoverbindungen im Verhältnis 2:1 umwandelt (Yu *et al.*, 2006), wobei das Enzym auch eine untergeordnete Dioxygenaseaktivität besitzt (Zheng *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass beide Enzyme zusammen eine wichtige Funktion beim Aufbau der epidermalen Barriere haben (s. oben). Dabei konnte gezeigt werden, dass das *O*-linoleoyl- ω -hydroxyacyl-sphingosin (Ceramid 1, EOS) das natürliche Substrat der ALOX12B ist, wobei das bei der Reaktion entstehende *9R*-hydroperoxy-linoleoyl- ω -hydroxyceramid durch ALOXE3 weiter zum spezifischen Epoxyalkohol *9R,10R-trans*-epoxy-11*E*-13*R*-hydroxylineoyl- ω -hydroxyceramid metabolisiert wird. Dabei ist ein Derivat dieses Epoxyalkohols, das *9R,10R-trans*-epoxy-11*E*-13-oxo-hydroxylineoyl- ω -hydroxyceramid, das am häufigsten vorkommende oxidierte Ceramid in der Haut von Mäusen. Bei *Alox12b* defizienten Mäusen fehlt dieses Stoffwechselprodukt vollständig, was zur Folge hat, dass keine Proteingebundenen ω -9-Hydroxyceramide existieren und es keine wasserabweisende Lipidschicht um die Keratinozyten gibt. Daher sterben die *Alox12b* defizienten Mäuse aufgrund von Dehydratation bereits wenige Stunden nach ihrer Geburt (Zheng *et al.*, 2011).

1.2 Strukturelle Grundlagen der Lipoxygenasereaktion

1.2.1 Kristallstruktur der Lipoxygenasen

Seit über 80 Jahren sind Lipoxygenasen als Enzyme bekannt, doch erst 1990 gelang es die erste Struktur der Sojabohnen-LOX-1 zu lösen, welche mittlerweile durch ein strukturelles Refinement auf eine Auflösung von 1,4 Å verbessert wurde (Boyington *et al.*, 1990; Minor *et al.*, 1996). Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass sich die Polypeptidkette dieser Enzymklasse ähnlich wie bei einigen Lipasen in eine kleinere N-terminale β -Faltblattdomäne (auch als PLAT/LH2-Domäne bezeichnet) und eine große C-terminale katalytische mit Domäne mit vielen α -Helices faltet. Dabei enthält die katalytische Domäne das für die LOX-Reaktion essentielle Eisen(II/III)-Ion (Boyington *et al.* 1990, Minor *et al.* 1996). 1997 konnte dann erstmals die Struktur einer Säugetierlipoxygenase, der Kaninchen 12/15-Lipoxygenase (rabALOX15) als Enzym-Hemmstoff-Komplex (Inhibitor RS7) gelöst werden (Gillmor *et al.*, 1997). Ein strukturelles Refinement der kristallografischen Daten brachte dann zu Tage, dass die Streuungsdaten eigentlich zwei unterschiedliche Konformationen des Enzyms repräsentieren, nämlich einen offenen (ohne Inhibitor, PDB: 2P0M Kette A) und einen geschlossenen Zustand (mit Inhibitor, PDB: 2P0M Kette B). Beide Konformationen unterscheiden sich strukturell erheblich voneinander (Choi *et al.*, 2008). Erst vor zwei Jahren ist es gelungen, die Struktur der hALOX5 aufzuklären. Dazu wurde zunächst durch gentechnische Modifizierung eine stabilisierte Enzymvariante (stabile 5-LOX) hergestellt (Gilbert *et al.*, 2011). Außerdem ist es mittlerweile gelungen die katalytische Domäne der ALOX15 des Wildschweins (porALOX15) zu kristallisieren. Dabei konnte dieses 12-lipoxygenierende Enzym in Gegenwart eines Inhibitors kokristallisiert werden, wodurch ein neuer möglicher Substratsbindungskanal für die LOX-Katalyse entdeckt wurde (Xu *et al.*, 2012).

Es zeigt sich, dass die Gesamtstruktur zwischen den tierischen und pflanzlichen LOXn weitestgehend konserviert ist, obwohl sich die verschiedenen LOXn hinsichtlich ihrer Substrat- und auch Produktspezifität erheblich voneinander unterscheiden (s. Abb. 1.3.). Dabei faltet sich die Polypeptidkette stets in eine N-terminale regulatorische und eine C-terminale katalytische Domäne. Dennoch sind die tierischen LOXn in der Regel wesentlich kleiner als die pflanzlichen Enzyme. Außerdem haben die pflanzlichen Lipoxygenasen eine eher ellipsoide Form, während die tierischen LOXn eher zylindrisch aufgebaut sind (Ivanov *et al.*, 2010).

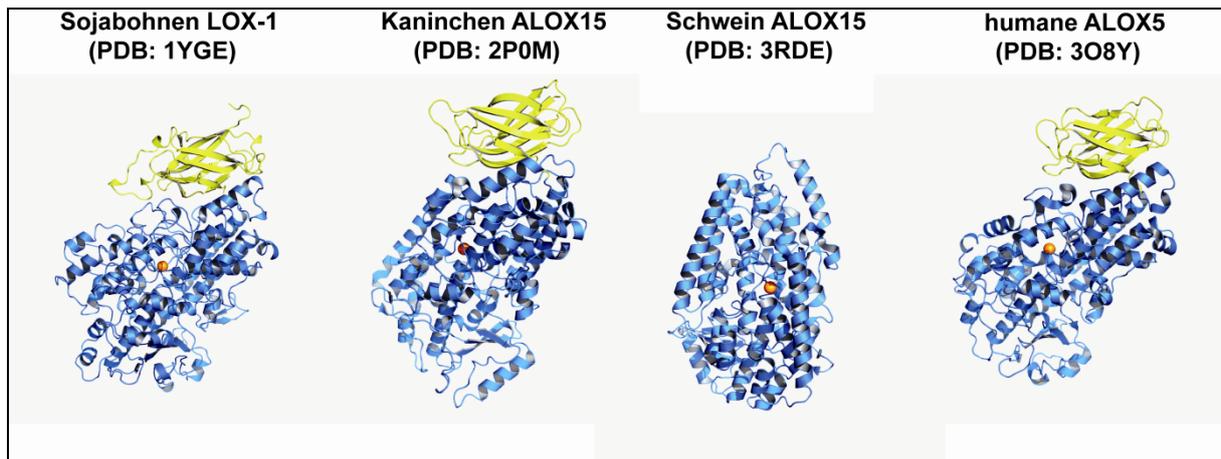


Abb. 1.3.: Cartoon-Darstellung der Kristallstrukturen von verschiedenen tierischen und pflanzlichen Lipoxygenasen. Die N-terminale regulatorische Domäne ist gelb gefärbt, während die C-terminale Domäne in marineblau dargestellt ist. Das katalytische Eisen(II/III)-Ion ist als orangene Kugel dargestellt.

1.2.2 N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne von LOXn besteht überwiegend aus β -Faltblättern und variiert in ihrer Länge zwischen 110 bis 146 Aminosäuren. Ein struktureller Vergleich zeigte, dass die N-terminale Domäne der C2-Domäne humaner Lipasen ähnelt (Gillmor *et al.*, 1997; Chahinian *et al.*, 2000). Diese ist für die Membranbindung humaner Lipasen essentiell und daher wird für die N-terminale Domäne von LOX-Enzymen ähnliches angenommen. Die N-terminale Domäne scheint in der Tat eine Funktion bei Membranbindung von LOXn zu besitzen, da N-terminal trunkierte Enzymvarianten der rabALOX15 sowie der hALOX12 eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Membranbindung zeigten. Allerdings wurde diese lediglich reduziert und nicht vollständig verhindert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass auch die katalytische Domäne an der Membranbindung beteiligt ist (Walther *et al.*, 2002; Aleem *et al.*, 2009). Dabei konnte für die hALOX5 in Versuchen mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) gezeigt werden, dass das Enzym mit Hilfe der N-terminalen Domäne an Kernmembranen bindet, wobei diese Bindung durch Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ausgelöst werden kann (Chen *et al.*, 2001). Ca^{2+} -Ionen sind für die Aktivierung und Bindung von ALOX5 an Biomembranen essentiell, wobei die Reste Asn44, Asp45 und Glu47 in der N-terminalen Domäne eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -Bindung haben (Hammarberg *et al.*, 2000). Die Bindung des Enzyms an Biomembranen, Phosphatidylcholin (PC) sowie an das als Gerüstprotein agierende *coactosin-like protein* (CLP) wird dagegen hauptsächlich durch die in den Calciumbindeschleifen (*loops*) lokalisierten hydrophoben Aminosäurereste Trp13, Trp75 und Trp102 bewirkt (Esser *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2002). Die gezielte Mutagenese dieser Aminosäurereste führte zu einer verringerten Membranbindung durch das Enzym (Kulkarni *et al.*, 2002). Dagegen sind für die ALOX15 keine spezifischen Ca^{2+} -Bindungsstellen bekannt und dennoch erfolgt die Membranbindung auch erst nach Ca^{2+} -

Zugabe, wobei eine Ladungsmaskierung vermutet wird (Brinckmann *et al.*, 1998; Walther *et al.*, 2004). Neben den Membranbindungseigenschaften scheint die N-terminale Domäne auch einen Einfluss auf die katalytische Aktivität von LOXn zu haben. Zum Beispiel zeigt eine durch limitierte Proteolyse der Sojabohnen-LOX-1 entstandene „Mini-LOX“ eine gesteigerte katalytische Aktivität (Maccharone *et al.*, 2001), während die N-terminal trunkeierten Säugetier-LOXn (ALOX15 von verschiedenen Spezies, hALOX12, Maus Alox5, hALOX15B) häufig eine verringerte Aktivität aufweisen (Aleem *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2011).

Die N-terminale Domäne der Sojabohnen-LOX-1 ist über eine 2600 Å² umfassende Kontaktfläche mit der C-terminalen Domäne verbunden. Diese Kontaktfläche ist bei der Kaninchen ALOX15 (rabALOX15) lediglich 1600 Å² groß (Gillmor *et al.*, 1997). Die unterschiedliche Größe der Interdomänenkontaktflächen könnte eine Ursache dafür sein, dass die N-terminale Domäne des Kaninchenenzym einen höheren Grad an Bewegungsfreiheit besitzt, als die entsprechende Domäne der Sojabohnen-LOX. Für das Kaninchenenzym wurde mittels SAXS-Untersuchungen gezeigt, dass in wässriger Lösung die N-terminale Domäne von der C-terminalen Domäne wegschwingen kann, so dass das Enzym veränderte Molekülkoordinaten aufweist (Hammel *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2011). Für das Sojabohnenenzym ist das offensichtlich nicht der Fall. Hier deckt sich die Kristallstruktur mit der Lösungsstruktur (Dainese *et al.*, 2005).

1.2.3 Die C-terminale Domäne

In der katalytischen Domäne von Säugetier-LOXn befinden sich das Nicht-Häm-Eisen sowie die hydrophobe Substratbindungstasche. Wie in Abb. 1.4. zu erkennen ist, besteht diese im Wesentlichen aus α -Helices und Schleifenregionen (*loops*). Dabei unterscheidet sich die Zahl der Helices zwischen den unterschiedlichen LOX-Isoformen. So besitzt die Sojabohnen-LOX-1 20 Helices, welche entweder parallel/antiparallel ausgerichtet sind und sich zentral um die Helix 9 (Minor *et al.*, 1996) gruppieren. Die rabALOX15 besteht aus 21 Helices, welche durch ein β -Faltblatt unterbrochen sind (Gillmor *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2007). Analog verhält es sich bei den Strukturen der hALOX5 sowie der Wildschwein ALOX15 mit ihren 26 bzw. 22 Helices (Gilbert *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012).

Bei Säugetier-LOXn wird das katalytische Eisen durch sechs Liganden komplexiert, weshalb man häufig auch von einer oktaedrischen Ligandensphäre spricht. Dabei wird die Komplexbildung durch fünf Aminosäurereste und einem Hydroxidion bzw. einem Wassermolekül übernommen (Kuban *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1999). Ein multiples Aminosäurealignment von 153 in der NCBI Datenbank veröffentlichten LOX-Sequenzen zeigte, dass die ersten drei Liganden in allen Isoformen durch Histidinreste repräsentiert werden. Der vierte proteinogene Eisenligand ist dagegen variabel (z.B. Ser, Asn, Gly) und

der fünfte Ligand wird durch die Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (Ile, Val) gebildet (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Bei der rabALOX15 wird das Eisen durch vier Histidine (His360, His365, His540 und His544) und das C-terminale Isoleucin 663 komplexiert (Gillmor *et al.*, 1997), während die hALOX5 durch drei Histidine (His367, His372 und His550), ein Asparagin (Asn554) sowie das C-terminale Isoleucin 674 komplexiert wird. Dabei weist die Struktur der hALOX5 eine Besonderheit auf, da die Helix 2 im Vergleich zu anderen LOX-Isoformen verkürzt ist und eine andere Orientierung einnimmt, wodurch der Zugang zum katalytischen Zentrum erschwert wird und eine besonders geformte Substratbindungstasche entsteht (Gilbert *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012). Das katalytische Eisen in der Wildschwein ALOX15 (12-LOX) wird analog wie bei der Kaninchen ALOX15 durch vier Histidine (His361, His365, His541, His545) sowie das C-terminale Isoleucin 663 komplexiert (Xu *et al.*, 2012). Dagegen erfolgt die Komplexierung des katalytischen Eisens in der Sojabohnen-LOX-1 analog zur hALOX5 durch drei Histidine, ein Asparagin sowie das C-terminale Isoleucin (Boyington *et al.*, 1993; Minor *et al.*, 1996). Die Substratbindungstasche besitzt bei verschiedenen LOX-Isoformen eine unterschiedliche Form (Ivanov *et al.*, 2010). So besteht sie bei der Sojabohnen-LOX-1 aus zwei Hohlräumen, die beim katalytischen Eisen aufeinandertreffen. Dabei wird ein Hohlraum als Sauerstofftunnel angenommen, während der andere als Substratbindungstasche fungiert und sich in zwei weitere Hohlräume untergliedert (Boyington *et al.*, 1993). Für die rabALOX15 konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Substrats erhebliche strukturelle Änderungen in der Substratbindungstasche verursacht. Dabei liegt das Enzym ohne Ligand in einer offenen, entspannten Form vor, wobei die Bindung des Liganden einen Übergang in eine geschlossene, kondensierte Konformation bewirkt (Choi *et al.*, 2007). Dabei hat das Enzym in der offenen Konformation eine flache und trichterförmige Bindetasche, während es in der geschlossenen Form eine gebogene und tiefere Bindungstasche aufweist. Die Ursache hierfür ist ein Leucinrest in der Helix 18 (Leu597) der in der ligandenfreien Form in die Bindetasche hineinragt und somit deren Größe limitiert. Durch Ligandenbindung wird nun die Position der Helix 18 um 6 Å verschoben, wodurch sich das Volumen der Substratbindungstasche vergrößert (Choi *et al.*, 2007). Das ist ein gutes Beispiel für die Bestätigung der von Daniel E. Koshland aufgestellten *induced fit*-Theorie, welche konformationelle Anpassung von Enzymen bei der Ausbildung eines Protein-Liganden-Komplexes erklärt (Koshland *et al.*, 1958). Ähnliche strukturelle Anpassungen während der Substratbindung sollte man auch für andere LOX-Isoformen erwarten dürfen. Den Boden der Substratbindungstasche der rabALOX15 bilden die Aminosäuren Phe353, Met417, Ile418 und Ile593, während Arg403 die Bindetasche an der Oberfläche des Proteins begrenzt (s. Abb. 1.4.). *In silico* Studien und praktische Daten konnten zeigen, dass Arg403 eine wichtige Funktion für die Substratbindung und Stabilität

des Enzyms hat (Gan *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2011; Di Venere *et al.*, 2013).

Dagegen besitzt die Substratbindungstasche der hALOX5 eine längliche Form, wobei die beiden Enden durch ein Tryptophan (Trp148) auf der einen Seite sowie ein Phenylalanin und Tyrosin (Phe178, Tyr182), auch als FY-Korke bezeichnet, auf der anderen Seite geschlossen wird. Dadurch wird ein Eindringen des Substrats ins aktive Zentrum verhindert. Insgesamt werden zwei unterschiedliche Mechanismen für das Eindringen von Arachidonsäure in das aktive Zentrum diskutiert: I) Bewegung des FY-Korke (Entkorkung); II) Rotation der Trp148 Seitenkette. Dabei kann die Arachidonsäure mit ihrem Methylen voran ins aktive Zentrum gelangen, wobei die Carboxylgruppe mit einem Lysinrest (entspricht Arg403 rabALOX15) interagieren kann (Horn *et al.*, nicht veröffentlicht). Insgesamt wird der hydrophobe Charakter der Substratbindungstasche von hALOX5 durch vier konservierte Leucine und ein Isoleucin (Leu368, Leu373, Leu414, Leu607, Ile406) des Enzyms bedingt (Gilbert *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012).

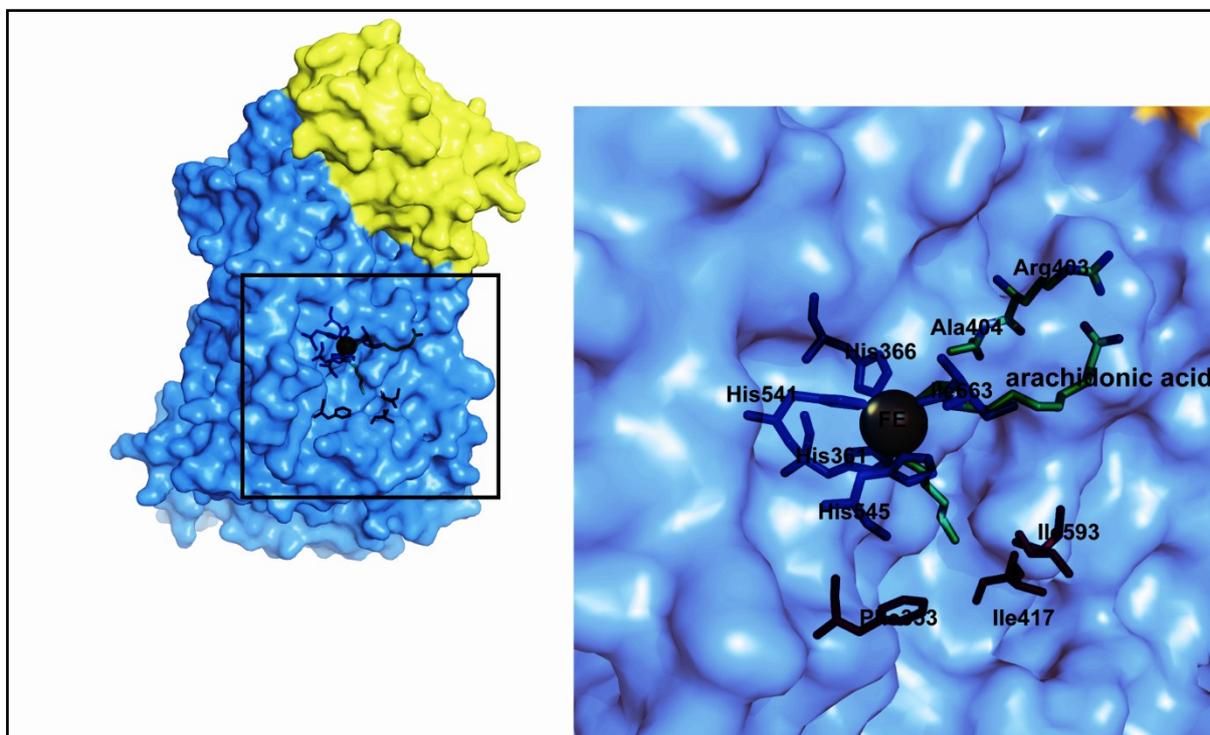


Abb. 1.4.: Oberflächen-Darstellung der rabALOX15 Kristallstruktur (PDB: 2P0M). (links) Die N-terminale Domäne ist gelb gefärbt, während die C-terminale Domäne in marineblau dargestellt ist. (rechts) Im aktiven Zentrum ist das katalytische Eisenion als orangene Kugel dargestellt, während die Eisenliganden (His361, His366, His541, His545 und Ile663) als blaue sticks zu sehen sind. Die Arachidonsäure wurde mit Hilfe der Software Autodock ins aktive Zentrum gedockt. Sie ist in stick-Form dargestellt und entsprechend den Elementen (Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot, Sauerstoff blau) gefärbt. Analog sind die Enantioselektivitätsdeterminante (Ala404) sowie der wichtige Aminosäurerest Arg403 (komplexiert die Carboxylgruppe der Arachidonsäure) dargestellt. Die Triaden-Determinanten (Phe353, Ile417, Ile593) sind als rote sticks zu erkennen.

Die Kokristallisation der ALOX15 des Wildschweins mit dem gebundenen 12-LOX Inhibitor OPP führte zur Entdeckung eines neuen U-förmigen Substratbindungskanal. Dieser ist an einem Ende (Proteinoberfläche) offen und am anderen Ende führt er am katalytischen Eisen vorbei, ins Innere des Proteins (Xu *et al.*, 2012). Ob es sich dabei tatsächlich um den Substratbindungskanal handelt, bleibt allerdings weiterhin offen.

1.2.4 Grundlagen der Positions- und Stereospezifität von Lipoxygenasen

1.2.4.1 Positionsspezifität von Lipoxygenasen

Es muss erwähnt werden, dass bis zum heutigen Tage keine Wildtyp LOX-Isoform mit Arachidonsäure bzw. Linolsäure erfolgreich kokristallisiert worden ist, weshalb die genaue Position und Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum weiterhin unklar bleibt. Daher können auch keine definitiven Aussagen über die strukturelle Basis der unterschiedlichen Positionsspezifitäten von verschiedenen LOX-Isoformen gemacht werden. Derzeit existieren zwar kristallographische Daten für einen Enzym-Arachidonsäure-Komplex der pseudo-phosphorylierten hALOX5 Variante (Ser663Asp). Allerdings fehlen in dieser Struktur die Elektronendichten für wichtige Teile des aktiven Zentrums und es scheint, dass das Substrat sich eher an der Enzymoberfläche angelagert hat, als dass es im aktiven Zentrum gebunden ist. Daher ist es eher fragwürdig, ob es sich dabei um einen enzymatisch aktiven Komplex handelt (Gilbert *et al.*, 2012). Zudem ist die Auflösung nicht ausreichend genug, um genaue Aussagen über die Orientierung der Arachidonsäure im aktiven Zentrum zu treffen. So kann z.B. zwischen COOH- und CH₃-Ende der Fettsäure nicht wirklich unterschieden werden. Außerdem konnten wichtige Kernaussagen der oben genannten Publikation (Umwandlung einer 5-LOX in eine 15-LOX durch Pseudophosphorylierung an Ser663) trotz immensem Aufwand weder durch uns noch durch andere Gruppen bestätigt werden, weshalb die veröffentlichten strukturellen Daten mit Vorsicht betrachtet werden müssen.

Trotz mangelnder Enzym-Substrat-Komplexe gibt es auf Grundlage von Mutagenesestudien eine Reihe von Theorien zur Positions- und Stereospezifität von LOXn. Die Volumen-hypothese (Triadenkonzept) wurde ursprünglich für die rabALOX15 entwickelt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Arachidonsäure mit ihrem Methylende voran in die Substratbindungstasche eindringt und mit ihrem Carboxylende mit Arg403 am Eingang der Bindetasche interagiert. Die Tiefe der Substratbindungstasche bestimmt, welches Kohlenstoffatom in der Nähe des katalytischen Eisens gelangt und wo folglich die Wasserstoffabstraktion stattfindet (s. Abb. 1.5. A). Dabei wird die Tiefe der Substratbindungstasche durch die am Boden der Tasche befindlichen Aminosäurereste (Phe353, Ile418 und Ile593) definiert. Werden diese großen Aminosäuren in verschiedenen ALOX15-Isoformen durch weniger voluminöse Aminosäuren substituiert, so kommt es zu einer Verschiebung der Positionsspezifität in Richtung 12-lipoxygenierender Enzyme. Es wird als

mögliche Ursache angenommen, dass die Substratsbindungstasche durch den Austausch größer wird und die Arachidonsäure tiefer eindringen kann (s. Abb. 1.5. A), was eine Wasserstoffabstraktion an C10 (12-LOX) anstelle C13 (15-LOX) begünstigt (Sloane *et al.*, 1995; Borngräber *et al.*, 1996; Borngräber *et al.*, 1999). Damit lassen sich sehr einfach 15-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen (Mensch, Kaninchen) in 12-lipoxygenierende Enzyme umwandeln. Die Umwandlung der hALOX12 in ein 15-lipoxygenierendes Enzym ist zumindest partiell ebenfalls möglich (Vogel *et al.*, 2010).

Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass das Volumen der ALOX5 um etwa 20 % größer ist als das der ALOX15 (Gillmor *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 2011) und es konnte gezeigt werden, dass das Triadenkonzept auch auf ALOX5-Isoformen anwendbar ist. Durch multiple Austausche der Positionsdeterminanten (Phe359, Ala424, Asn425 und Ala603) gegen größere, voluminösere Aminosäuren konnte eine Umwandlung der humanen und der murinen ALOX5 in überwiegend 15-lipoxygenierende Enzyme erreicht werden (Schwarz *et al.*, 2001; Hofheinz *et al.*, 2013). Durch die Verkleinerung der Substratbindetasche kann die Arachidonsäure nicht mehr so tief in das aktive Zentrum eindringen, wodurch die Wasserstoffabstraktion vom C13 (15-Lipoxygenierung) anstelle von C7 (5-Lipoxygenierung) erfolgt und daher die Sauerstoffinsertion an C15 anstelle von C5 bevorzugt wird (s. Abb. 1.5.). Eine Umwandlung einer 15-LOX in ein 5-lipoxygenierendes Enzym war bisher nicht möglich.

Dennoch muss erwähnt werden, dass es neben der Volumenhypothese noch den Ansatz der inversen Substratorientierung (Orientierungshypothese) gibt. Sie geht davon aus, dass bei 12- und 15-lipoxygenierenden Enzymen das Fettsäuresubstrat mit seinem Methylende voran in die Substratbindetasche eindringt, wohingegen für 5-lipoxygenierende Enzyme Fettsäuren mit ihrer Carboxylgruppe zuerst in die Bindetasche eintauchen (s. Abb. 1.5. A). Dies ist eine logische Erklärung für die Produktion von S-Enantiomeren durch 5-LOXn unter der Annahme, dass die Sauerstoffinsertion von derselben Seite wie bei 12- und 15-LOXn geschieht. Dies kann allerdings nur unter relativ hohem Energieaufwand geschehen, da eine hydrophile Carboxylgruppe in eine hydrophobe Umgebung gebracht werden muss (Browner *et al.*, 1998). Es konnte für die rabALOX15 gezeigt werden, dass unter Verwendung von verschiedenen Arachidonsäurederivaten eine inverse Substratorientierung zu einer 5-Lipoxygenierung führt (Walther *et al.*, 2001), was allerdings mit einer drastischen Reduktion der Substrataffinität (starker Anstieg des K_m -Wertes) und mit einer deutlichen Reduktion der Umsatzrate einhergeht. Daneben zeigte die pseudophosphorylierte Mutante an Ser663 von hALOX5 eine nahezu vollständige Umwandlung von einem 5- nach einem 15-lipoxygenierendem Enzym und der kristallisierte Enzym-Substrat-Komplex deutet laut Autoren auf eine inverse Substratorientierung hin (Gilbert *et al.*, 2012). Dennoch sind diese Daten aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit durch andere Gruppen derzeit schwierig

zu interpretieren. Zudem fehlt es weiterhin an Strukturen von Enzym-Substrat-Komplexen für andere LOXn. Nur mit diesen kann ein Vergleich bezüglich der Substratorientierung und -bindung in verschiedenen LOX-Isoformen gezogen werden.

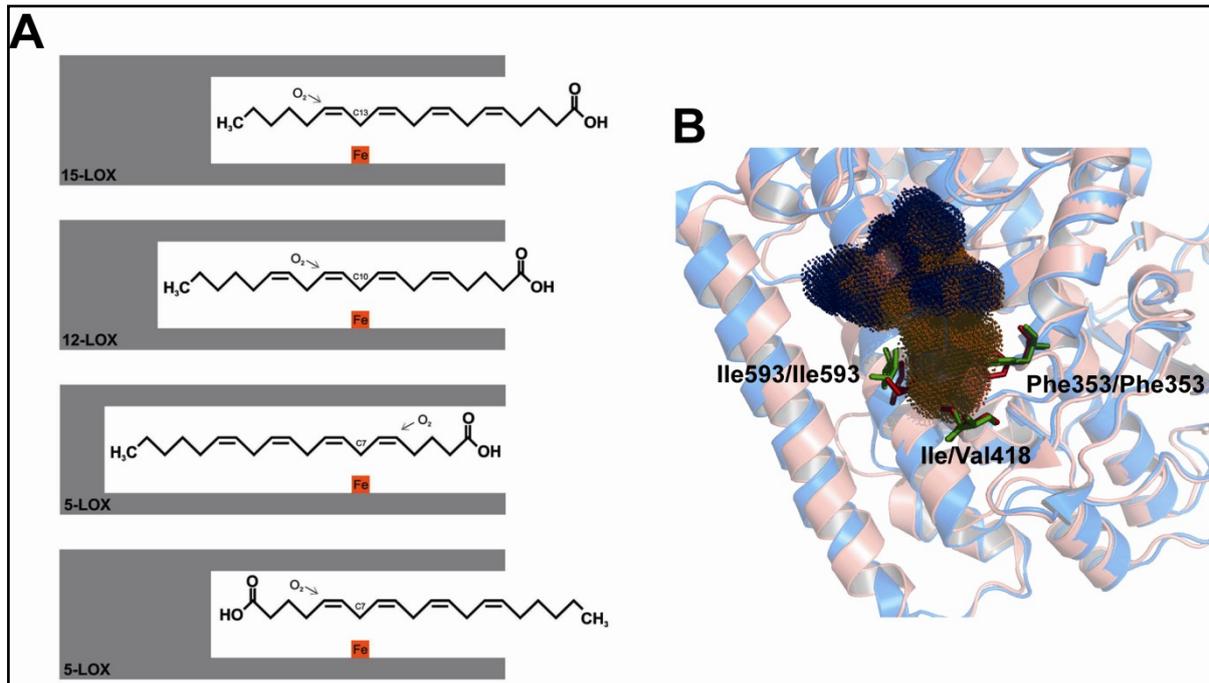


Abb. 1.5.: (A) Im Sinne der Volumenhypothese kommt es zu einer steten Vergrößerung der Substratbindungstasche von 15-, über 12- nach 5-LOXn. Daraus resultiert die Oxygenierung der Arachidonsäure an den unterschiedlichen Kohlenstoffatomen, die jeweils näher am katalytischen Eisen liegen. Laut Orientierungshypothese (s. A. unten) kommt es bei 5-lipoxygenierenden Enzymen zu einer inversen Substratorientierung im aktiven Zentrum, wodurch die Oxygenierung am C5 der Arachidonsäure erfolgt (modifiziert nach Ivanov et al., 2010) (B) Strukturelles Alignment der rabALOX15 (marineblau) sowie der porALOX12 (rosa). Die jeweiligen Substratbindetaschen sind als Punkte angedeutet, wobei die der porALOX12 (orange) um etwa 15 % größer zu sein scheint als die der rabALOX15 (blau), was die Volumenhypothese teilweise unterstützt. Die jeweiligen Positions determinanten für die ALOX12 bzw. ALOX15 sind als grüne bzw. rote stick-Form dargestellt.

1.2.4.2 Stereospezifität von Lipoxygenasen

Neben der Tatsache, dass sich LOXn durch eine hohe Positionsspezifität auszeichnen, besitzen sie auch eine hohe Stereoselektivität bei der Sauerstoffinsertion. Nach erfolgter Wasserstoffabstraktion kann der molekulare Sauerstoff theoretisch an zwei verschiedenen Positionen ([+2] und [-2] Verschiebung des radikalischen Elektrons) insertiert werden. Dabei kann der Sauerstoff an beiden Positionen sowohl in einer *R*- bzw. *S*-Konfiguration an den sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff eingeführt werden, woraus sich vier theoretisch mögliche Produktisomere ergeben, die im Falle einer nicht enzymatischen Reaktion alle in etwa gleichen Mengen gebildet werden. Dagegen steuern LOXn die Stereochemie der Oxygenierungsreaktion so, dass überwiegend nur ein Produktisomer gebildet wird. Bei 5-LOXn bedeutet das die Wasserstoffabstraktion an C7 und Sauerstoffinsertion an C5 ([-2] Verschiebung des radikalischen Elektrons) in *S*-Konfiguration. Dagegen wird bei 15-LOXn

der Wasserstoff an C13 abstrahiert und die Insertion des molekularen Sauerstoffs erfolgt an C15 ([+2] Verschiebung des radikalischen Elektrons) in *S*-Konfiguration. Um die Grundlagen der Enantioselektivität von LOXn zu untersuchen, wurden in multiplen Sequenzalignments die Primärstrukturen von LOX-Isoformen verschiedener Spezies verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass LOXn mit *S*-Konfiguration (*S*-LOXn) an einer kritischen Position in ihrer Primärstruktur ein Alanin (Ala) tragen, während LOXn mit *R*-Konfiguration (*R*-LOXn) an dieser Stelle ein Glycin (Gly) tragen. Um diese Theorie zu bestätigen, wurde versucht verschiedene *R*-LOXn durch ortsgerichtete Mutagenese in *S*-LOXn umzuwandeln. Die Korallen 8*R*-LOX konnte so zum Beispiel nahezu vollständig in ein 12*S*-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (Coffa *et al.*, 2004). Umgekehrt ist es auch gelungen, die hALOX15B durch Mutagenese von Ala416Gly von einer 15*S*-LOX in ein überwiegend 11*R*-H(p)ETE produzierendes Enzym umzuwandeln (Coffa *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2011). Auffällig bei beiden ist jedoch, dass die Änderung der Stereospezifität der Enzyme immer auch mit der Änderung der Positionsspezifität einhergeht. Die Modifikation einer Lipoxygenase, welche anstelle des einen Enantiomers ausschließlich das andere produziert ohne dabei seine Positionsspezifität zu ändern, konnte bislang nicht gezeigt werden, was ein klares Indiz dafür ist, dass Positions- und Stereokontrolle der Oxygenierungsreaktion eng miteinander verknüpft sind. Dennoch wurde auf Grundlage dieser experimentellen Ergebnisse postuliert, dass die zusätzliche Methylgruppe des Alanin den Zugang des molekularen Sauerstoffs zum *R*-Position des Pentadiens versperrt, wodurch die Oxygenierung an der *S*-Position geschieht (s. Abb. 1.6).

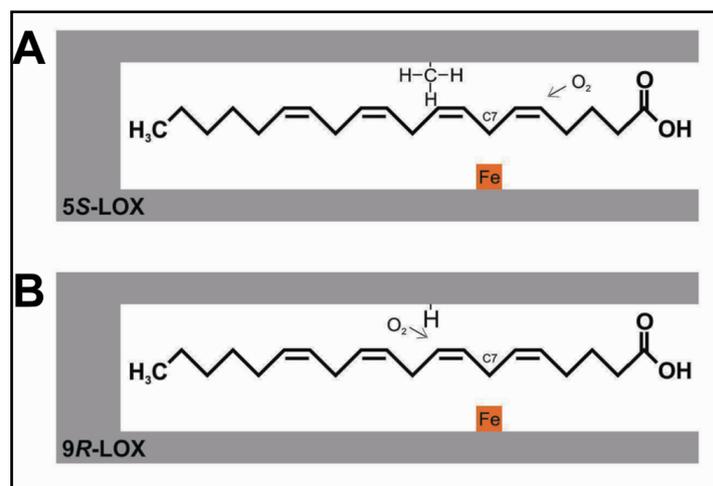


Abb. 1.6.: Mögliche Ursachen der Stereospezifität von verschiedenen LOXn am Beispiel von 5*S*- und 9*R*-LOX. Die Wasserstoffabstraktion erfolgt an C7, weshalb die Sauerstoffinsertion theoretisch an C5 bzw. C9 möglich ist. (A) Ein Alaninrest blockiert C9, weshalb die Sauerstoffinsertion an C5 unter Bildung des *S*-Enantiomers erfolgt. (B) Die C9-Position ist nun aufgrund des kleineren Glycinrestes nicht mehr versperrt, wodurch die Oxygenierung an C9 unter Bildung des *R*-Enantiomers möglich ist. (modifiziert nach Ivanov *et al.* 2010, übernommen aus Dissertation Katharina Hofheinz)

Auf Basis der Struktur für die Korallen 8R-LOX wurde postuliert, dass der Gly/Ala-Rest mit einem konservierten Leucin interagiert und somit den Zugang für den molekularen Sauerstoff versperrt bzw. freigibt. Dabei wurde für die 8R-LOX vermutet, dass die Interaktion zwischen Gly428 und Leu432 die Oxygenierung an der 12S-Position verhindert. Auf Grundlage der Wildtypkristallstruktur wird angenommen, dass die Einführung einer Methylgruppe an Position 428 zu einer Umlagerung des Leucinrestes und einer Abschirmung der 8R-Position führt. Diese Theorie wurde durch Mutagenese von Leu432 unterstützt, wobei einige der erzeugten Mutanten einen erhöhten Anteil an 12S-HETE besaßen. Allerdings hatten die erzeugten Mutanten mit einer Ausnahme eine relative spezifische Aktivität von unter 5 % im Vergleich zum Wildtypenzym, weshalb die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten sind (Neau *et al.*, 2009). Außerdem konnte bis zum heutigen Tag keine Ala428 Mutante kristallisiert werden, weshalb weiterhin unklar bleibt, ob es tatsächlich zu einer Umlagerung von Leu432 kommt. Das Ala-vs-Gly-Konzept (Coffa/Brash-Prinzip) ist für die Erklärung der Stereospezifität von vielen LOX-Isoformen anwendbar. Dennoch konnte anhand einer Zebrafisch 12S-LOX gezeigt werden, dass es auch hier Ausnahmen gibt. Aufgrund eines Glycin an der kritischen Position in der Primärsequenz wurde eine R-Konfiguration des Oxygenierungsprodukts erwartet, allerdings zeigten die experimentellen Daten, dass das Reaktionsprodukt zu 96 % S-konfiguriert war. Der entsprechende Gly-Ala-Austausch brachte auch keine wesentlichen Änderungen in der Stereospezifität hervor, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass das Enzym nicht dem Coffa/Brash-Prinzip folgt. Ähnlich verhält es sich bei der Maus Alox5 sowie ALOX15-Isoformen verschiedener Spezies (Maus, Mensch, Kaninchen, Rhesusaffe, Orang Utan), was die Universalität des Prinzips weiter einschränkt (Jansen *et al.*, 2011). Das Ala-vs-Gly-Konzept scheint daher ähnlich wie die Volumenhypothese nicht universell auf alle LOXn anwendbar zu sein, was allerdings noch durch zusätzliche Untersuchungen an anderen LOX-Isoformen bestätigt werden muss.

1.3 Genetische Variationen (SNPs, Mutationen) in LOXn und ihre Funktion in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen

Der Begriff Polymorphismus stammt vom griechischen Wort *Polymorphismos* ab und bedeutet „Vielgestaltigkeit“. In der Genetik wird der Begriff für das Auftreten einer oder mehrerer Genvarianten (Allele) innerhalb einer Population verwendet. Dabei muss die Allelfrequenz > 1 % sein, da sonst von einer Mutation gesprochen wird. Es werden dabei drei Arten von Polymorphismen unterschieden: 1. Einzelnukleotidpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), 2. kleine Insertions- und Deletionspolymorphismen (INDELs), sowie 3. Strukturvarianten (*Copy number variations*, CNVs).

Nach einer neueren Definition durch das 1000 Genom Projekt handelt es sich bei INDELs um kleinere Insertionen und Deletionen, welche in der Regel nicht größer als 50 Nukleotide

sind, während die CNVs größere Abweichungen in der Kopienzahl eines DNA-Abschnitts (Genduplikation, Gendeletion) darstellen (Abecasis *et al.*, 2010). Dabei sind bis zum heutigen Tag ca. 30000 CNVs beim Menschen bekannt (Conrad *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2011). Als SNPs werden dagegen einzelne Basenaustausche in der DNA-Sequenz bezeichnet. Sie stellen mit 90 % die am häufigsten vorkommenden genetischen Polymorphismen dar. Sie können dabei sowohl in kodierenden bzw. nicht-kodierenden Genregionen oder intergenischen Regionen auftreten. Allerdings ist ihre genomische Verteilung nicht homogen, sondern sie treten gehäuft in nicht-kodierenden Genregionen auf (Barreiro *et al.*, 2008). Dabei stellt die *minor allele frequency* (MAF), welche in dieser Arbeit allgemein als Allelfrequenz bezeichnet wird, ein Maß für die Häufigkeit des SNPs in der humanen Population dar. In kodierenden Bereichen unterscheiden wir zwischen synonymen und nicht-synonymen SNPs. Dabei haben synonyme SNPs keinen Einfluss auf die Proteinsequenz, während nicht-synonyme SNPs die Aminosäuresequenz eines Proteins verändern. Es werden dabei zwei Arten von nicht-synonymen SNPs unterschieden, wobei solche die zu einem Aminosäureaustausch führen als *missense* SNPs bezeichnet werden, während solche die zur Einführung eines Stopcodons führen als *nonsense* SNPs bezeichnet werden. In dieser Arbeit sollte ausschließlich der Einfluss der beiden zuletzt genannten genetischen Variationen untersucht werden.

Die meisten der bekannten genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) wurden entweder in klinischen Studien oder durch verschiedene internationale Genomprojekte entdeckt. Die zuletzt genannten untersuchten dabei das Vorkommen und die Verteilung von genetischen Variationen in der humanen Bevölkerung. Dabei hat das Internationale HapMap Projekt (www.hapmap.org) in seiner 3. Phase 1,6 Mio. häufig vorkommende genetische Variationen in 1184 Individuen in 11 verschiedenen humanen Populationen genotypisiert (*International Hapmap Consortium 3*, 2010). In einer neueren Veröffentlichung wurden die Genome von 1092 Individuen in 14 verschiedenen humanen Subpopulationen auf das Vorkommen und die Verteilung von genetischen Variationen untersucht (*1000 Genome Project*, 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in der 1000 Genom Datenbank (www.1000genomes.org) zusammengefasst und enthalten zudem noch die genetischen Variationen, die in anderen Genomprojekten (HapMap, ESP, COSMIC etc.) gefunden worden sind. Obwohl die Datenbank die genetische Variabilität bestimmter ethnischer Subpopulationen nicht adäquat widerspiegelt (Lu *et al.*, 2013), so stellt sie doch ein gutes Werkzeug für die funktionelle Analyse von natürlich vorkommenden genetischen Variationen in Enzymen, Hormonen, Rezeptoren und Strukturproteinen dar. Dabei enthält die 1000 Genom Datenbank alle in dieser Arbeit erwähnten bzw. funktionell charakterisierten LOX-Variationen.

Für die Medizin sind genetische Variationen (SNPs, Mutationen) von außerordentlicher Bedeutung. Zum einen können Mutationen die molekulare Ursache für verschiedene

monogene Erkrankungen wie z.B. die Phenylketonurie (Gao *et al.*, 2011), Sichelzellanämie (Ingram *et al.*, 1956), Zystische Fibrose (Hamosh *et al.*, 1992) oder β -Thalassämie (Chang *et al.*, 1979) sein. Daneben werden genetische Variationen auch häufig mit verschiedenen polygenen Erkrankungen wie Osteoporose, Atherosklerose und verschiedenen Karzinomen assoziiert, wobei dies am Beispiel der humanen LOXn ausführlich diskutiert wird. In einer in Zukunft personalisierten Medizin werden SNPs helfen, die unterschiedliche Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Medikamenten in Patienten besser zu verstehen um eine Optimierung der Therapie und damit eine Verbesserung der Heilungschancen zu erzielen (Howland *et al.*, 2012). SNPs wurden nämlich schon häufiger mit dem unterschiedlichen Metabolismus verschiedener Medikamente in Verbindung gebracht. Zum Beispiel konnte für Patienten mit Polymorphismen in den Genen für den Abbau von Zytostatika wie z.B. Taxanen (Krebstherapie) gezeigt werden, dass für diese die Behandlung mit diesen Medikamenten aufgrund des zu geringen Abbaus der Zytostatika extrem toxisch war (Jabir *et al.*, 2012). Daneben sind SNPs in Genen der humanen CYP2C Familie (Subfamilie der CYP450 Enzyme) mit einem verschlechterten Abbau verschiedener Medikamente (Antidepressiva, Antidiabetika, Entzündungshemmer etc.) assoziiert (Goldstein *et al.*, 2001). Zudem konnten SNPs in dem ABCG2 Gen (*breast cancer resistance protein*, BCRP) mit unterschiedlichen Erfolgsaussichten bei der Brustkrebstherapie assoziiert werden (Yanase *et al.*, 2006). Insgesamt lässt sich anhand der hier ausgewählten Beispiele abschätzen, dass SNPs bei einer in Zukunft immer stärker zunehmenden Individualisierung der Medizin eine herausragende Stellung einnehmen werden.

Wie schon in Abschnitt 1.1.4. diskutiert haben LOXn und ihre Reaktionsprodukte wichtige physiologische Funktionen und sind in der Pathogenese verschiedener polygener Erkrankungen (z.B. Atherosklerose, Kanzerogenese etc.) involviert, auch wenn ihre genaue Rolle bisweilen noch nicht vollständig verstanden ist. In diesem Abschnitt wollen wir uns daher verschiedenen genetischen Variationen in LOX-Genen und ihrer Rolle in den oben genannten Erkrankungen widmen. Ein großer Teil der genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) sind durch das Internationale HapMap Projekt (www.hapmap.org) bzw. das 1000 Genom Projekt (www.1000genomes.org) entdeckt bzw. bestätigt worden, wobei diese Projekte die Vielfalt und das Vorkommen von genetischen Variationen in der humanen Population analysiert haben. Die daraus erhaltenen Ergebnisse können nun als eine gute Grundlage für Genomweite-Assoziationsstudien (GWAS) von polygenen Erkrankungen mit SNPs in verschiedenen Genen genutzt werden.

In verschiedenen epidemiologischen Studien wurden LOX-Variationen mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Erkrankungen assoziiert. So konnte für die hALOX5 gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen im hALOX5 Promotorbereich zur Insertion und Deletion von 1-2 Bindungsstellen des humanen Transkriptionsfaktors Sp1 führten (In *et al.*, 1997).

Dabei zeigte sich, dass homozygote Träger einer Sp1-deletierenden Variation eine verschlechterte Antwort auf die Asthmabehandlung mit dem 5-LOX Inhibitor ABT-761 hatten (Drazen *et al.*, 1999), was auf eine reduzierte Expression der hALOX5 sowie LTC₄ in zurückzuführen ist (Kalayci *et al.*, 2006). In einer späteren klinischen Studie an einer kaukasischen Population konnte allerdings keine Assoziation dieser genetischen Promotervariation mit einem erhöhten Risiko für Asthma oder einem für Asthma typischen Phänotyp festgestellt werden (Sayers *et al.*, 2003). Für zwei SNPs (rs10507391, rs730012) in Proteinen der Leukotrienbiosynthese (hALOX5AP, LTC4S) konnte in einer chinesischen Han Population gezeigt werden, dass Träger des mutierten Allels ein signifikant erhöhtes Risiko für Asthma hatten. Dabei besaßen Träger des LTC4S SNPs (rs730012) zudem eine gesteigerte Wirksamkeit des CysLT1-Rezeptor-Antagonisten Montelukast (Cai *et al.*, 2011). Neben Asthma konnten für genetische Variationen in Genen des Lipoxygenasestoffwechsel (hALOX5, hALOX12, hALOX15, hALOX5AP) gezeigt werden, dass diese mit unterschiedlich hohen Risiken für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms korrelierten. Zum Einen konnte für Träger eines VNTR SNP (*variable nucleotide tandem repeat*) im ALOX5 Promotor ein reduziertes Risiko für die Entstehung eines rektalen Karzinoms beobachtet werden. Dagegen hatten Träger der SNPs in hALOX5AP (rs17239025), hALOX12 (rs2073438) und hALOX15 (rs4796535, rs2619112) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines rektalen Karzinoms. Ein SNP in hALOX5AP (rs12429692) wurde zudem mit einem erhöhten Risiko einer Adenomentwicklung assoziiert (Kleinstein *et al.*, 2013).

Die Rolle von Lipoxygenasen und Leukotrienen bei kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose wird weitläufig diskutiert. Ein LTA4H SNP (rs6538697) war in einer chinesischen Han Population signifikant mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkt assoziiert, wohingegen Träger eines hALOX5 SNPs (rs2029253) ein verringertes Risiko besaßen (Sun *et al.*, 2013). Daneben besaßen Träger von zwei hALOX5 Promotor SNPs ein signifikant erhöhtes Risiko für Atherosklerose (Dwyer *et al.*, 2004). Unglücklicherweise befinden sich alle oben genannten SNPs entweder in intronischen, im Promoter oder anderen nicht-kodierenden DNA-Bereichen, weshalb eine funktionelle Charakterisierung dieser genetischen Variationen schwierig ist und in den erwähnten Studien auch meist nicht durchgeführt wurde.

Es existieren jedoch auch wenige Arbeiten, in denen der funktionelle Einfluss genetischer Variationen untersucht wurde: 1) Der nicht-synonyme kodierende SNP hALOX12 Gln261Arg (rs28395860) konnte in verschiedenen epidemiologischen Studien mit einem erhöhten Risiko für Osteoporose, das Mammakarzinom sowie Schizophrenie assoziiert werden (Harslof *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). *In vitro* Studien von verschiedenen Gruppen mit rekombinanter hALOX12 zeigten allerdings, dass die Mutation die Funktionalität des Enzyms nur geringfügig beeinflusste (Aleem *et al.*, 2009; Chaitidis *et al.*, 2013). 2)

Heterozygote Träger des funktionell inaktiven hALOX15 Thr560Met SNP (rs34210653) hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für die koronare Herzerkrankung (KHK) (Assimes *et al.*, 2008). In einer anderen Studie konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht endgültig bestätigt werden (Hersberger *et al.*, 2009). In dieser Studie unterschreitet die Wahrscheinlichkeit eines kausalen Zusammenhangs nicht die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Das bedeutet, dass der Umfang dieser Studie wahrscheinlich nicht groß genug war, um einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu erreichen. Weitere epidemiologische Studien mit größeren Patientenzahlen werden daher benötigt, um den kausalen Zusammenhang zwischen dem SNP und kardiovaskulären Erkrankungen endgültig zu bestätigen. Unabhängig vom derzeit noch unklaren statistischen Zusammenhang dieses SNPs mit kardiovaskulären Erkrankungen zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass es sich bei Thr560Met um eine *loss-of-function* Mutation von hALOX15 handelt. Die molekulare Ursache für die Inaktivität dieser Enzymvariante ist wahrscheinlich die Zerstörung eines Wasserstoffbrückennetzwerks in der Nähe zu einer der bekannten Positionsdeterminanten von hALOX15 (Ile417), wodurch es zu einer partiellen Fehlfaltung des Proteins kommt (Schurmann *et al.*, 2011; Horn *et al.*, 2013 II). 3) Inaktive Enzymvariationen in hALOX12B und hALOXE3 wurden mit der extrem seltenen Hauterkrankung ARCI (autosomal rezessive kongenitale Ichthyose) assoziiert (Eckl *et al.*, 2005; Lesueur *et al.*, 2007; Eckl *et al.*, 2009). 4) In einer weiteren Studie wurde der nicht-synonyme kodierende hALOX5 SNP (rs2228065), der zu einem Glu254Lys Austausch führte, mit einem signifikant erhöhten Risiko für Asthma bronchiale assoziiert (Bai *et al.*, 2008). Dagegen konnte ein Zusammenhang zwischen dem SNP und einem erhöhten Risiko für das Mammakarzinom nicht gezeigt werden (Wang *et al.*, 2008). Für diese genetische Variation existieren derzeit keine funktionellen Daten.

Zusammenfassend muss man sagen, dass es eine Reihe von publizierten genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) in den humanen LOX-Genen gibt, die durch mehr oder weniger signifikante statistische Korrelation bestimmten Krankheiten bzw. Krankheitsgruppen zugeordnet wurde. Ob diese Zuordnung jedoch kausaler Natur ist und auf welchem Mechanismus diese Zuordnung beruht, bleibt in den meisten Fällen unklar, da bisher nur sehr wenige natürlich vorkommende Variationen funktionell charakterisiert worden sind.

1.4 Ziele der Arbeit

Lipoxygenasen sind evolutiv hochkonservierte Enzyme, die an den unterschiedlichsten physiologischen Prozessen beteiligt sind. Mittlerweile sind durch die verschiedenen Genomprojekte, GWAS und klinischen Studien eine Vielzahl an genetischen Variationen in den humanen LOX-Genen beschrieben worden. Einige konnten dabei mit einem unterschiedlichen Risiko für verschiedene polygene Erkrankungen assoziiert werden. Leider liegen die meisten der genannten Variationen zumeist in nicht-kodierenden DNA-Regionen

bzw. handelt es sich um synonyme Variationen, weshalb ihre funktionelle Charakterisierung äußerst schwierig ist, und daher auch für die meisten dieser Polymorphismen keine funktionellen Daten vorhanden sind (s. 1.3.). Daneben sind auch noch eine Reihe kodierender nicht-synonymer SNPs in der Literatur beschrieben worden (s. 1.3.), wobei auch hier für die meisten keine funktionellen Daten existieren.

Ziel dieser Arbeit war es nun die Lücke zwischen der relativ großen Anzahl an veröffentlichten LOX-Variationen und der verhältnismäßig kleinen Anzahl an funktionell vorhandenen Daten zu schließen. Dabei ging es um die systematische Analyse von kodierenden nicht-synonymen Variationen (SNPs, Mutationen) in vier verschiedenen LOX-Genen. Da es sich bei LOXn um Enzyme handelt, sollten nicht-synonyme kodierende Variationen einen größeren Einfluss auf die Funktionalität des Gens haben als solche die in den nicht-kodierenden Bereichen des Gens liegen.

Da es aufgrund der Vielzahl an veröffentlichten LOX-Variationen unmöglich ist, alle funktionell zu charakterisieren, sollte sich in dieser Arbeit auf häufig vorkommende Variationen (SNPs, Allelfrequenz > 1%), nicht-konservierte Aminosäureaustausche mit bereits bekannter Sequenz und Variationen die funktionell wichtige Aminosäurereste betreffen, fokussiert werden. Die N-terminale Domäne von LOXn hat überwiegend regulatorische Funktionen und wenig Einfluss auf die katalytische Aktivität und Produktspezifität von LOXn. Daher wurde auf die funktionelle Analyse von Variationen in den N-terminalen Domänen der LOX-Isoformen verzichtet.

Um die funktionellen Effekte von genetischen Variationen in verschiedenen LOX-Isoformen genauer zu charakterisieren, wurden sowohl *in vitro* (rekombinante Proteinherstellung, punktgerichtete Mutagenese) als auch *in silico* Strategien (computergestützte Strukturmodellierung, *in silico* Mutagenese) angewandt. Die ausgewählten genetischen Variationen sollten hinsichtlich ihrer Allelfrequenz, strukturellen Position und ihres Effekts auf die katalytische Aktivität der Enzyme, auf reaktionskinetische Grundparameter (K_m , k_{cat}), die Positions- und Stereospezifität, die Thermostabilität sowie ihrem strukturellen Einfluss (Faltung) untersucht werden.

Dabei war es das Ziel neben den bereits bekannten hALOX *loss-of-function* Mutationen (s. 1.3.) neue genetische Variationen (SNPs, Mutationen) mit einem einen starken funktionellen Effekt zu finden, da die homozygoten Träger dieser mutierten Allele einen unterschiedlichen physiologischen Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyp Allelträgern aufweisen sollten. In der weiteren Arbeit sollten dann die molekularen Ursachen für die funktionelle Andersartigkeit dieser Variationen genauer untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Promega (Mannheim, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin-Natrium	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
anti- <i>His</i> -HRP Antikörper	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Arachidonsäure	Serva (Heidelberg, Deutschland)
ATP	Roche (Mannheim, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fraktion V Serva (Heidelberg, Deutschland)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cobalt-Sepharose	Clontech (Heidelberg, Deutschland)
dNTP-Lösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Sigma (Dreieichenhofen, Deutschland)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glucose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Hexan	Baker (Deventer, Niederlande)
HPLC Standards 5-, 8 -, 9 -, 11-, 12-, 15-HETE (R/S); 9-, 13-HODE (R/S)	Cayman Chem., Alexis Deutschland GmbH (Grünberg, Deutschland)
Imidazol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
IPTG (Dioxan-frei)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol (2-Propanol)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Linolsäure	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Methanol	VWR (Leuven, Niederlande)
Natriumborhydrid	Sigma (Steinheim, Deutschland)

Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge (1N, 2N)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nickel-Agarose	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Nickel-Sulfat	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
N-Nitroso-N-methylharnstoff	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Phosphatidylcholin	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
ResourceQ™ (6 ml)	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Großbritannien)
Salzsäure (1N, 2N)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sepharose	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
Sypro® Orange	Life Technologies (Carlsbad, USA)
TCEP	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
TEMED	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tris-Lösung (1 M, pH 8,0)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2 Nährmedien und Pufferlösungen

Die Nährmedien zur Kultivierung der *E. coli* Bakterien wurden von den folgenden Firmen bezogen.

Medium	Hersteller
LB Agar	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB Medium	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EnPresso tablet set	BioSilta (Berlin, Deutschland)

LB-Nährmedium

Bacto-Trypton (10 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), NaCl (5 g/L), pH= 7,0

LB-Agarplatten

Bacto-Trypton (10 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), NaCl (5 g/L), Bacto-Agar (15 g/L), pH= 7,0

SOC-Medium

20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glucose

Zusätzlich wurden je nach Bakterienstamm und Expressionsplasmid folgende Antibiotika zu den Medien bzw. Agarplatten zugesetzt:

- Ampicillin (100 µg/ml)
- Kanamycin (25 µg/ml)
- Chloramphenicol (35 µg/ml)

Phosphate buffered saline (PBS)

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

Reinigung der hALOX15 und hALOX15B

Ni-Agarose-Affinitätschromatografie

Waschpuffer I

100 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH= 8,0

Waschpuffer II

100 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH= 8,0

Elutionspuffer

100 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH= 8,0

Anionenaustauschchromatografie (ResQ 6 ml)

Puffer I

20 mM Tris/Cl, pH= 8,0

Puffer II

20 mM Tris/Cl, 1 M NaCl, pH= 8,0

Proteinaufbewahrungspuffer

20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 10 % (v/v) Glycerol, pH= 8,0

Partielle Reinigung der hALOX5

Cobalt-Sepharose-Affinitätschromatografie

Waschpuffer

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH= 8,0

Elutionspuffer

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

Elektrophoresepuffer

TAE-Puffer (Agarose-Elektrophorese)

40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 29,6 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH= 7,8

Trenngelpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

1,5 M Tris/HCl, 0,6 % SDS pH= 8,8

Sammelgelpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS pH= 6,8

1x Laemmli-Laufpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS pH= 8,3

2.1.3 Kits und Enzyme

Die verwendeten Kits und Enzyme wurden von folgenden kommerziellen Herstellern bezogen.

Kit	Hersteller
LigaFast™ rapid DNA Ligation	Promega (Madison, USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermoscientific (Dreieich, Deutschland)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
GeneJET Gel extraction kit	Thermoscientific (Dreieich, Deutschland)
Western Lightning Chemilumineszenz plus	Perkin Elmer (Boston, USA)
Nucleobond XtraMidiPlus	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Plasmide und Oligonukleotide wurden von den folgenden Herstellern bezogen.

Plasmide	Hersteller
pET28b	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pET15b	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pQe9	Qiagen (Hilden, Deutschland)
pRSET-A	Life Technologies (Carlsbad, USA)
humane 12-LOX Plättchen-Typ in pQe9	Monika Anton
humane 15-2 LOX in pQe9	Monika Anton
humane 15-1 LOX in pQe9	Monika Anton
humane 15-1 LOX in pET28b	Thomas Horn
humane 15-1 LOX in pET15b	Thomas Horn
humane 5-LOX in pRSETA	Monika Anton
murine 5-LOX in pRSETA	Monika Anton

Die in der Arbeit verwendeten Primer (s. Anhang) für die zielgerichtete Mutagenese der Lipoxygenasen wurden durch die Firma BioTeZ (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die jeweiligen *up*- und *dw*- Primer sind in 5' nach 3'-Orientierung dargestellt.

2.1.5 Bakterienstämme

Folgende *E. coli* Bakterienstämme wurden in der Arbeit verwendet.

XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA)

BL21 (DE3)pLysS (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Rosetta2 (DE3)pLysS (Life Technologies, Carlsbad, USA)

2.2 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden entsprechend den bekannten Standardprotokollen durchgeführt und sind in verschiedenen Methodensammlungen dargestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die weiteren Methoden wurden entsprechend den Vorgaben der Hersteller durchgeführt.

- PCR
- DNA-Spaltungen mit Restriktionsenzymen
- Ligation
- DNA-Gelexktraktion
- Agarosegelelektrophorese
- punktgerichtete Mutagenese

- analytische und präparative Plasmidpräparationen
- Transformation von Plasmid-DNA in verschiedene *E. coli*- Stämme

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten durch die Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland).

2.2.1 Klonierung und Ligation

Aufgrund einer zu geringen Proteinausbeute durch die Expression der hALOX15 im pQe9 in den *E. coli* XL1 Blue Zellen wurde die kodierende hALOX15 Sequenz in den pET28b (Novagen, Darmstadt, Deutschland) Expressionsvektor über einen *Sall* und *HindIII* Verdau und eine anschließende DNA Ligation umkloniert. Bei anderen LOX-Isoformen konnte aufgrund ausreichender Proteinmengen und Aktivität darauf verzichtet werden.

2.2.2 Plasmid-DNA Transformation in Bakterien

Sowohl für die Isolierung von Plasmid-DNA (z.B. für die Sequenzierung) als auch für die rekombinante Proteinherstellung von verschiedenen LOX-Isoformen in *E. coli* Bakterien mussten die bakteriellen Expressionsplasmide, welche die codierende DNA der LOX-Isoformen enthielten, in chemisch kompetente Bakterien transformiert werden. Dabei wurde die Plasmid-DNA für ca. 20-30 min auf Eis mit den Zellen inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die Zellen für 2-3 min auf Eis herunter gekühlt und anschließend für 1 h bei 37 °C in SOC-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechender Antibiotikaresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Herstellung von Punktmutanten wurde eine PCR mit der *Pfu* Turbo Polymerase und geeigneten *mismatch*-Primern entsprechend den Herstellerangaben (Protokoll QuikChange®, Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Der methylierte parentale DNA-Strang wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI* bei 37 °C für 15 min verdaut und das mutierte, eingekerbte Plasmid in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert (siehe 2.2.2).

2.2.4 Rekombinante Proteinherstellung und Reinigung von verschiedenen LOX-Isoformen

Da in dieser Arbeit verschiedene Expressionssysteme für verschiedene LOX-Isoformen verwendet wurden, sollen hier nur die allgemeinen Schritte der rekombinanten LOX-Herstellung genannt werden. Zunächst wurden Bakterien mit Plasmid-DNA transformiert (siehe 2.2.2.). Für die Vorkultur wurden anschließend 5-10 bakterielle Klone mit je 20 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum versetzt und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden je 1,5 l LB-Medium mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 3-5 wachsen gelassen. Die Induktion des Zielgens erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und die Zellen wurden anschließend bei ca. 25 °C (5-LOX) bzw. 28 °C (15-2 LOX) für 4 h weiter inkubiert.

Die Herstellung der hALOX15 erfolgte mit dem *EnBase fedbatch* System der Firma BioSilta (Berlin, Deutschland) und wurde entsprechend der Vorgabe durch den Hersteller durchgeführt (Induktion 23 °C, 24 h).

Nach dem Ende der Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (3600 x g, 4 °C, 10 min) und in eiskalter PBS-Lösung resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte entweder durch Ultraschall (Branson Digital Sonifier, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) oder durch *french press* (Emulsiflex C5 Homogenisator, 10 000 kPa). Die durch die Lyse entstandenen Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (23000 x g, 4 °C, 45 min) entfernt und der lösliche Bestandteil des Zelllysats wurde je nach LOX-Präparation entweder mit Ni-Agarose oder Co-Sepharose für 45 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Reinigung der LOX über eine solche Affinitätschromatografie ist möglich, da alle in der Arbeit verwendeten rekombinanten LOX-Enzyme einen N-terminalen Polyhistidintag besitzen. Dieser ermöglicht durch die Komplexbildung von zweiwertigen Metallionen (z.B. Ni^{2+} , Co^{2+}) eine Bindung des rekombinanten Enzyms an die Säulenmatrix, wodurch diese von anderen schwächer bindenden Proteinen getrennt werden können. Um die schwache Bindung von Proteinen ohne *His-tag* zu minimieren, wurde schon während der Inkubation des Zelllysats mit der Säulenmatrix 10 mM Imidazol zu der Lösung gegeben. Dieses interagiert ebenfalls mit zweiwertigen Metallionen und verringert dadurch die schwache Bindung von ungewünschten Proteinen. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Säulenmatrix abzentrifugiert (3600 x g, 4 °C, 10 min) und in eine Leersäule (BioRad, München, Deutschland) überführt. Anschließend wurden die schwach gebundenen Proteine durch Waschen der Säule mit Puffer, welcher 10 mM bzw. 25 mM Imidazol enthält, entfernt und das rekombinante Enzym mit 200 mM Imidazol (Elutionspuffer) eluiert. Die Elutionsfraktionen der hALOX15 sowie der hALOX15B wurden anschließend entsalzt und über eine Anionenaustauschchromatografie (ResourceQ™ 6 ml) bis zu einer elektrophoretischen Reinheit von 90-95 % aufgereinigt. Nach Zugabe von 10 % (v/v)

Glycerin wurden die FPLC-Fraktionen auf 0,5-1 mg/ml aufkonzentriert und bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Reinigung der hALOX5 erfolgte entsprechend dem Protokoll von Frau Katharina Hofheinz (Hofheinz *et al.*, 2013).

Die hALOX12 wurde entsprechend dem Protokoll für den 5 ml LOX-Aktivitätsassay hergestellt (Jansen *et al.*, 2011).

2.2.5 Eisenbestimmung der über die FPLC gereinigten Enzympräparationen mit Atomabsorptionsspektroskopie

Grundlage der Methodik ist die Fähigkeit von Atomen nach Energiezuführung diese auf- und wieder abzugeben, wobei ein für das jeweilige Element charakteristisches Atomspektrum entsteht. Die Bestimmungen des Eisengehaltes wurden mit einem AAAnalyst800 Instrument der Firma Perkin Elmer (Waltham, USA) durchgeführt. Das Temperaturprogramm bestand aus 5 Teilschritten: 1. 15 s 110 °C Entfernung des Wassers, 2. 30 s 130 °C Entfernung des Wassers, 3. 20 s 1400 °C Pyrolyse, 4. 5 s 2100 °C Atomisierung, 5. 3 s 2450 °C Ausheizen. Die Absorption des Eisens wurde bei 248,2 nm (*Slit*: 0,2 nm) gemessen und der Eisengehalt der einzelnen Enzympräparationen über Peakflächenauswertung bestimmt. Die Einstellung des Basiswertes erfolgte mit einer 0,14 N HNO₃-Lösung, während eine 1 g/L Eisenlösung (Fluka, St. Gallen, Schweiz) als Standard verwendet wurde. Für die Messungen wurden alle zu analysierenden Proben in 0,14 N HNO₃-Lösung verdünnt.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 HPLC basierter LOX-Aktivitätsassay

1-5 µg gereinigte rekombinante hALOX15 sowie hALOX15B in 450 µL PBS wurden mit 100-150 µM Arachidonsäure bzw. 50 µM Linolsäure für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Aktivitätsmessungen der hALOX5 wurden je 20 µl partiell gereinigte LOX mit je 0,4 mM CaCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ATP und 1,4 µg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin versetzt (Reaktionsvolumen 450 µl) und mit 100 µM Arachidonsäure bei 30 °C für 10 min inkubiert.

Der Aktivitätsassay für die hALOX12 wurde entsprechend dem Protokoll für den 5 ml LOX-Aktivitätsassay durchgeführt (Jansen *et al.*, 2011).

Die während der LOX-Reaktion gebildeten Hydroperoxidverbindungen wurden durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumborhydrid zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH von ca. 3 eingestellt und die enthaltenen Proteine durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Methanol präzipitiert. Anschließend wurden die Proben gevortext und abzentrifugiert (15300 x g, 8 °C, 10 min). Der daraus resultierende Überstand wurde für die HPLC-Analytik verwendet.

2.3.2 HPLC-Analytik

Die während der LOX-Reaktion gebildeten oxidierten Fettsäureprodukte konnten nun mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC) getrennt werden. Dabei besteht die Möglichkeit die Produktmenge über die Peakoberflächen in Relation zu setzen, da bei den jeweiligen Systemen die Absorptionseigenschaften der gemessenen Produkte annähernd identisch sind.

2.3.2.1 Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

Für die RP-HPLC wurde eine Nucleodur C18 Gravity Säule (Macherey-Nagel, Düren, 250 x 4 mm) mit einer entsprechenden Vorsäule (8 x 4 mm) verwendet. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Methanol/Wasser/Essigsäure im Verhältnis 85/15/0,05 (%) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden mit einem LC-20 System (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit Autoinjektorfunktion analysiert, wobei während der einzelnen Läufe die Absorption bei 235 nm (konjugierte Diene), 242 nm (5,15-DiHETE), 268 nm (8,15-DiHETE und konjugierte Triene) sowie 300 nm (konjugierte Tetraene, Arachidonsäure) gemessen wurde. Beim Extinktionsmaximum von 235 nm erfolgte die Detektion der konjugierten Diene (Mono-HETEs) mit einem SPD M20A-Detektor.

2.3.2.2 Straight Phase HPLC (SP-HPLC)

Die Trennung von 8- bzw. 12-HETE ist über die RP-HPLC nicht möglich. Daher wurde für die weitere Analyse die Normalphasen-HPLC verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden nach der RP-HPLC aufgefangen, das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers verdampft und in dem SP-HPLC-Laufmittel aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte über eine Nucleosil 100-5 Säule (Macherey-Nagel, Düren, 250 x 4 mm) und einem Fluss von 1 ml/min. Als Laufmittel wurde ein Gemisch bestehend aus n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure in einem Verhältnis von 100/2/0,1 (%) verwendet.

2.3.2.3 Chiral Phase HPLC (CP-HPLC)

Zur Feststellung der Chiralität der verschiedenen LOX-Reaktionsprodukte wurde eine Analyse mit der CP-HPLC durchgeführt. Dabei wurden Säulen mit verschiedenen chiralen stationären Phasen verwendet (Chiralcel OD bzw. OB 250 x 4,6 mm, Daicel Chemical Industries, Osaka, Japan). Als Laufmittel wurden verschiedene Lösungsmittelgemische aus n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure im Verhältnis von 100/2-5/0,1 (%) verwendet. Die LOX-Reaktionsprodukte wurden nach RP-HPLC beziehungsweise SP-HPLC aufgefangen und das jeweilige Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers verdampft. Anschließend wurden die LOX-Produkte im CP-Laufmittel wieder aufgenommen. Die 5-, 8- und 12-HETE Proben wurden zur besseren Chiralphasenanalyse mit Diazomethan methyliert.

2.3.2.4 Methylierung mit Diazomethan

Diazomethan wurde mit Hilfe von N-Nitroso-N-methylharnstoff hergestellt. Dafür wurde eine 40 %ige Kaliumhydroxidlösung (KOH) mit Diethylether überschichtet und dazu der N-Nitroso-N-methylharnstoff gegeben. Dieser reagiert anschließend mit der KOH zu Diazomethan, welches als Gas aufsteigt und im Diethylether gelöst wird. Das im Ether gelöste Diazomethan wurde anschließend zu den zu methylierenden Proben aus der RP- und SP-HPLC hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde der Überstand mit Stickstoff verblasen, wobei die methylierten HETEs zurückblieben.

2.3.3 photometrischer LOX-Aktivitätsassay

Neben der Quantifizierung von Hydroperoxidfettsäureverbindungen über die HPLC sollten die kinetischen Parameter der Lipoxygenasereaktion bestimmt werden. Dafür wurden zwischen 1-5 μg FPLC gereinigter Lipoxygenase (hALOX15, hALOX15B) mit 1-100 μM Linolsäure/Arachidonsäure in 1 ml PBS bei 25 °C inkubiert. Während der Reaktion kommt es durch den Einbau von molekularem Sauerstoff in die Linolsäure/Arachidonsäure zur Bildung eines konjugierten Diens (15S-HpETE/13S-HpODE), dessen Absorptionsmaximum bei 235 nm liegt. Der Anstieg der Absorption wurde für 60-120 s spektrophotometrisch an einem UV/VIS Scanning Spektrophotometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland) verfolgt. Dabei wurde der Anstieg im linearen Abschnitt der Progresskurve ermittelt. Aus den jeweiligen Anstiegen für die verschiedenen Substratkonzentrationen wurden die entsprechenden Wechselzahlen (k) berechnet. Diese wurden gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen und mit Hilfe einer hyperbolen Gleichung konnten daraus die kinetischen Parameter (k_{cat} , K_{m}) für die Linolsäureoxidation bestimmt werden.

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der bakteriellen Lysate erfolgte mit der Proteinquantifizierungsmethode von Bradford (Bradford *et al.*, 1976) mit Hilfe des Roti®-Quant Systems (Roth). Die Eichung erfolgte mit verschiedenen BSA-Konzentrationen im Bereich von 2-14 mg/ml und mit Hilfe der Eichgerade konnten dann die in den Proben vorhandenen Proteinmengen quantifiziert werden.

Der Proteingehalt der über die FPLC gereinigten und anschließend aufkonzentrierten Enzympräparationen wurde spektrophotometrisch über die Absorption der im Enzym enthaltenen Tyrosine ($\epsilon_{280} = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Tryptophane ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 280 nm bestimmt. Aufgrund der Tatsache, dass der Aufbewahrungspuffer TCEP enthielt, wurde davon ausgegangen, dass alle im Protein enthaltenen Cysteine im reduzierten Zustand vorlagen und somit Disulfidbindungen ($\epsilon_{280} = 125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei der Proteinquantifizierung keine Rolle spielen.

2.3.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970). Dafür wurden die Proteinpräparationen und bakteriellen Lysate mit 4xRotiLoad-Probenpuffer (reduzierend) für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die in den jeweiligen Präparationen enthaltenen Proteine wurden in einem 10 %igen Gel (geeignet für Proteine mit atomaren Masseneinheiten von 20 bis 300 kDa) bei einer Stromstärke von 20 bis 30 mA entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach erfolgter Trennung wurde das Gel entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder es wurde anschließend für einen *Immunoblot* weiter verwendet (s. 2.3.6).

2.3.6 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der *semidry*-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dies geschah bei 10 V über 1 h. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 5 %iger Magermilch in PBS/Tween® inkubiert. Dies geschah um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde mit PBS/Tween20® gewaschen. Darauf wurde die Membran mit einem anti-*His*-Antikörper (konjugiert mit der *Horse Radish Peroxidase*; Verdünnung 1:10000) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser bindet spezifisch Proteine mit einem Polyhistidin-*tag*. Nach Erneutem waschen der Membran mit PBS/Tween20® wird die Membran für 1 min mit der *Western Lightning*® Chemilumineszenz-Lösung (PerkinElmer, Waltham, USA) behandelt. Dabei setzte die an den Anti-*His*-Antikörper gebundene

Peroxidase ein chromogenes Substrat unter Freisetzung von Licht um. Diese Reaktion wurde über einen Fotofilm sichtbar gemacht.

2.3.7 Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte anhand der entwickelten *Western Blots* mit Hilfe der *Quantity One* Software (Biorad, München, Deutschland). Die Banden wurden nach ihrer Intensität verglichen. Die Quantifizierung erfolgte immer als relativer Wert in Bezug zum Wildtyp.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die Gleichgewichts-Fluoreszenzmessungen wurden an einem ISS-K2 Fluorimeter (ISS, Champaign, IL, USA) durchgeführt, wobei die im Protein enthaltenen Tryptophane bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt wurden. Die Fluoreszenzintensität wurde als Funktion der Emissionswellenlänge dargestellt. Dabei ist die Emission (Intensität, Position) eine Funktion der Tertiärstruktur des Proteins, da diese von der Position der Tryptophane in der Proteinmatrix abhängt. Für die Messungen wurde eine Quarzküvette (Durchmesser: 1 cm) in einem Gesamtvolumen 1 ml verwendet, wobei die Proteinkonzentration bei ~ 0,3 mg/ml lag.

2.4.2 Circulardichroismus (CD)

CD ist eine spektroskopische Methode, die die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive (chiral) Moleküle ausnutzt und dadurch Rückschlüsse auf deren strukturelle Zusammensetzung zulässt. Die Protein-denaturierung von Lipoxygenasen wurde mit Hilfe von CD an einem Jasco-710-spektropolarimeter bei unterschiedlichen Temperaturen in einer Quarzküvette (Durchmesser 0,1 cm, Proteinkonzentration ~ 0,3 mg/ml) bei 200-250 nm untersucht, da in diesem Wellenlängenbereich (Fern-UV-CD, Absorption der Peptidbindung) Rückschlüsse auf den Sekundärstrukturgehalt von Proteinen gezogen werden konnte. Für die thermische Denaturierung wurde der Verlauf des CD-Signals bei 208 bzw. 220 nm gegen die Temperatur untersucht.

2.4.3 Thermal Shift Assay

Bei SYPRO® Orange handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff dessen Fluoreszenz im wässrigen Milieu *gequencht* wird. Während der thermischen Denaturierung von Proteinen

kommt es strukturellen Änderungen, wobei ursprünglich im Kern des Proteins befindliche hydrophobe Aminosäurereste an die Oberfläche gelangen. An diese kann nun unspezifisch das SYPRO® Orange binden, wodurch es zu einem *dequenching* des Fluoreszenzfarbstoffs kommt.

Mit zunehmender Proteindenaturierung gelangen zunehmend immer mehr hydrophobe Reste an die Oberfläche des Proteins, wodurch die Fluoreszenz bis zum einem Maximalwert (maximale Farbstoffbindung entspricht denaturiertem Zustand) steigt. Der Umkehrpunkt der dadurch entstehenden thermischen Übergangskurve entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins (T_m). Bei sehr hohen Temperaturen ($> 60-70\text{ °C}$) neigen die meisten Proteine zunehmend zur Aggregation, wodurch die Bindung des Farbstoffs wieder verringert wird, was wiederum eine Abnahme der Fluoreszenz zur Folge hat.

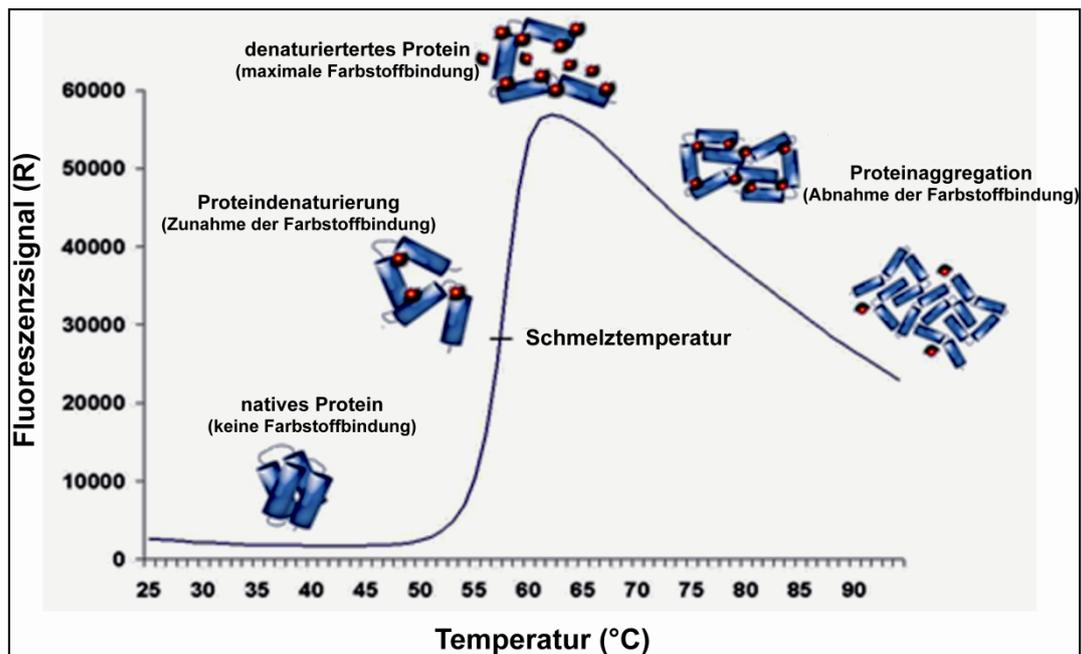


Abb. 2.: Prinzip des thermal shift assay 1. Proteindenaturierung 2. Farbstoffbindung 3. Wendepunkt der Übergangskurve ist der Schmelzpunkt (T_m) 4. Abnahme der Fluoreszenz durch zunehmende Proteinaggregation übernommen von http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor_images/assay_theory_figure.png

2.5 Bioinformatische Methoden

2.5.1 *in silico* Mutagenese

Die Kristallstruktur für die rabALOX15 (PDB: 2P0M) wurde der PDB Datenbank (www.pdb.org) entnommen. Da die rabALOX15 eine große Sequenzhomologie ($> 80\%$) mit dem humanen Enzym aufweist, wurde die Kristallstruktur dieses Enzyms als Modell für die hALOX15 verwendet. Die *in silico* Mutagenese an der rabALOX15 Kristallstruktur sowie die anschließende Strukturenergieminimierung (PDB: 2P0M Chain A) wurde durch Herrn Kumar Reddy Kakularam aus der Gruppe von Herrn Prof. Dr. Reddanna (Universität von

Hyderabad, Andhra Pradesh, Indien) durchgeführt. Dafür wurde die rabALOX15 Struktur an den entsprechenden Aminosäurepositionen mit Hilfe der Software Maestro 9.3 (Schrödinger, LLC, New York, USA, 2012) mutiert. Die daraus entstandenen Strukturen wurden mit dem Programm Macromodel 9.9 (Schrödinger, LLC, New York, USA, 2012) zunächst für 5000 Schritte mit einem Gradientenverfahren (*SD-steepest descent*) und anschließend für 10000 Schritte mit einem konjugierten Gradientenverfahren (*PRCG-Polak-Ribiere-type Conjugate Gradient*; Gradient 0.05) energetisch minimisiert. Dabei dient das SD-Verfahren als Optimierungsalgorithmus der ersten Ordnung, wobei man von einem Näherungswert ausgeht, von welchem man in Richtung des negativen Gradienten (gibt die Richtung des steilsten Abstiegs von diesem Näherungswert an) so lange fortschreitet bis es zu keiner numerischen Verbesserung mehr kommt. Das CG-Verfahren stellt eine effiziente numerische Methode zur Lösung von großen, symmetrischen, positiv definiten linearen Gleichungssystemen dar. Das Verfahren liefert spätestens nach m Schritten die exakte Lösung, wobei der Fehler monoton fällt.

2.5.2 Homologiemodellierung

Das Strukturmodell der hALOX12 wurde mit Hilfe des Homologiemodellierungswebserver M4T (Albert Einstein College of Medicine, New York USA) erstellt (Fernandez-Fuentes *et al.*, 2007 I + II) und das daraus entstandene Modell wurde mit dem Strukturrefinementserver 3DRefine (Bhattacharya *et al.*, 2013) energetisch optimiert. Anschließend wurde das hALOX12 Modell in einem TP3P Wassermodellsystem gelöst und das gesamte System mit Hilfe der Software NAMD (Universität von Illinois, Urbana-Champaign, USA) unter Verwendung der CHARMM27 *forcefield* Parameter für 250000 Schritte energetisch minimisiert.

Das Modell der hALOX15B wurde der Proteinmodelldatenbank (PMDb code: PM0078035) entnommen und für die Strukturanalyse verwendet (Arora *et al.*, 2012).

Die Qualität aller entstandenen bzw. verwendeten hALOX-Modelle wurde mit Hilfe des Qmean Server (Biozentrum, Universität von Basel, Schweiz) überprüft (Benkert *et al.*, 2009).

2.5.3 Visualisierung und Strukturanalyse

Die Darstellung der Kristallstrukturen (rabALOX15, hALOX5), der hALOX-Homologiemodelle sowie die strukturelle Analyse der *in silico*-Mutanten erfolgte mit Hilfe der Visualisierungssoftware PyMol v1.5 (Schrödinger, LLC, New York, USA, 2012).

2.5.4 Analyse von LOX-Sequenzen und genetischen Variationen

Die LOX-Sequenzen für das multiple Sequenzalignment verschiedener Lipoxygenasen wurden der NCBI Datenbank (NCBI, Bethesda, USA) entnommen. Die Sequenzanalysen wurden mit den Programmen BLAST (NCBI, Bethesda, USA), Lasergene (DNASTAR, Madison, USA), ClustalW2 (EMBL-EBI, Cambridge, UK) und Mega 5.2 (Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan) durchgeführt.

Das Vorkommen sowie die Verteilung von genetischen Variationen in den verschiedenen LOX-Isoformen wurde mit Hilfe der der 1000 Genom Datenbank (www.1000genomes.org) sowie der NCBI dbSNP Datenbank (NCBI, Bethesda, USA) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von genetischen Variationen (SNPs, Mutationen) in verschiedenen humanen Lipoxygenasen

Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von kodierenden nicht-synonymen genetischen Einzelnukleotidvariationen (SNPs, Mutationen) in den katalytischen Domänen von humanen Lipoxygenasen. Für diese Studie wurden die genetischen LOX-Variationen der 1000 Genom Datenbank entnommen und mit einer *in vitro* und *in silico* Strategie systematisch charakterisiert. Dabei sollte zunächst das Vorkommen und die Verteilung der genetischen Variationen in der humanen Population untersucht werden. Die Ergebnisse dieser bioinformatischen Analyse sind in der folgenden Tabelle (s. Tab. 3.1.) zusammengefasst. Aufgrund der Vielzahl an veröffentlichten genetischen Variationen ist diese Tabelle hier in nur verkürzter Form dargestellt und wird in ausführlicher Form im Anhang ergänzt (s. Anhang Tab. A1.). Bis zum heutigen Tag sind mehr als 1200 genetische Variationen (*missense*, *nonsense* etc.) für Enzyme und Rezeptoren des Lipoxygenase- und Leukotrienstoffwechsel beschrieben worden. Lediglich 35 genetische Variationen kommen mit einer Allelfrequenz $> 1\%$ vor, und werden daher *per definitionem* als SNPs bezeichnet. Zudem sind derzeit 34 *nonsense* Mutationen in der Datenbank beschrieben. Dabei ist ihre Allelfrequenz stets $< 0,1\%$, was bedeutet, dass sie in der Regel nicht häufiger als einmal in der Analyse der 1092 Genome gefunden worden sind. Ähnlich verhält es sich mit den meisten in der Datenbank veröffentlichten *missense* Mutationen, da für diese auch oft keine Allelfrequenz angegeben worden ist. Zur Vereinfachung der Sachlage nehmen wir daher an, dass alle diese Variationen mit Allelfrequenz $< 0,1\%$ vorkommen. Insgesamt bleibt dabei festzuhalten, dass diese Gruppe mit ca. 95 % den mit Abstand größten Anteil der veröffentlichten genetischen Variationen ausmacht. In den nachfolgenden Kapiteln wird immer wieder auf diese Tabelle Bezug genommen. Da es sich bei den analysierten Enzymen und Rezeptoren um eine sehr große Anzahl an Molekülen handelt, soll sich in dieser Arbeit auf die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von genetischen Variationen in vier verschiedenen humanen LOX-Isoformen (hALOX15, hALOX5, hALOX12 und hALOX15B) fokussiert werden. Die Analyse von genetischen Variationen in den anderen beiden LOX-Isoformen (hALOX12B, hALOXE3) sowie in anderen Enzymen und Rezeptoren des LOX- und LT-Stoffwechsel erfolgte anhand der einschlägigen Literatur sowie auf Basis der praktischen Erfahrungen mit genetischen Variationen in den experimentell analysierten Enzymen. Da die Variationen in diesen Proteinen weitgehend auf theoretischer Basis untersucht wurden, sollen sie in dieser vornehmlich praktischen Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen.

Anzahl von nicht-synonymen kodierenden Variationen in Genen des LOX-Stoffwechsel				
Enzyme und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsel (UniProt-Code)	Gesamt	SNPs	<i>missense</i>	<i>nonsense</i>
		(Allelfrequenz > 1%)	Mutationen (Allelfrequenz < 1%)	Mutationen
ALOX15 (P16050)	94	2	84	8
ALOX5 (P09917)	69	1	68	0
ALOX12 (P18054)	67	2	64	1
ALOX15B (O15296)	86	6	76	4
ALOX12B (O75342)	69	1	68	0
ALOXE3 (Q9BYJ1)	83	2	75	6
PLA2G4 (P47712)	54	1	52	1
ALOX5AP (P20292)	25	0	24	1
COTL1 (Q14019)	14	0	13	1
LTA4H (P09960)	42	1	39	2
LTC4S (Q16873)	10	0	10	0
GGT1 (P19440)	73	3	70	0
GGT5 (P36269)	72	4	66	2
DPEP1 (P16444)	77	2	73	2
DPEP2 (Q9H4A9)	68	2	64	2
GPX4 (P36969)	28	2	25	1
LTB4R (Q15722)	16	0	16	0
LTB4R2 (Q9NPC1)	43	2	41	0
CYSLTR1 (Q9Y271)	49	0	49	0
CYSLTR2 (Q9NS75)	71	1	69	1
GPR17 (Q13304)	67	0	66	1
P2RY12 (Q9H244)	35	1	34	0
PPARG (P37231)	53	2	1	0
Gesamt	1265	35	1196	34

Tab. 3.1.: Zusammenfassung der nicht-synonymen genetischen Variationen in Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsel (1000 Genom Datenbank).

3.1.1 Humane Arachidonat 15-Lipoxygenase (hALOX15)

Die Sequenz von hALOX15, die aus 662 Aminosäuren besteht, wurde erstmalig 1988 publiziert (Sigal *et al.*, 1988). In der 1000 Genom Datenbank sind derzeit 94 nicht-synonyme Variationen veröffentlicht (s. Tab. 3.1.). Dabei besitzen zwei von ihnen (Thr560Met,

Pro617Ser) eine Allelfrequenz von > 1 %, weshalb diese als SNPs bezeichnet werden. Da die funktionelle Analyse von allen genetischen Variationen kaum möglich ist, wurden fünf nicht-konservative genetische Variationen (Arg205Gln, Gly422Glu, Gly422Arg, Thr560Met, Pro617Ser) in der katalytischen Domäne von hALOX15 ausgewählt. Diese Mutanten wurden rekombinant hergestellt, bis zu einer elektrophoretischen Reinheit von > 95 % aufgereinigt und auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin untersucht.

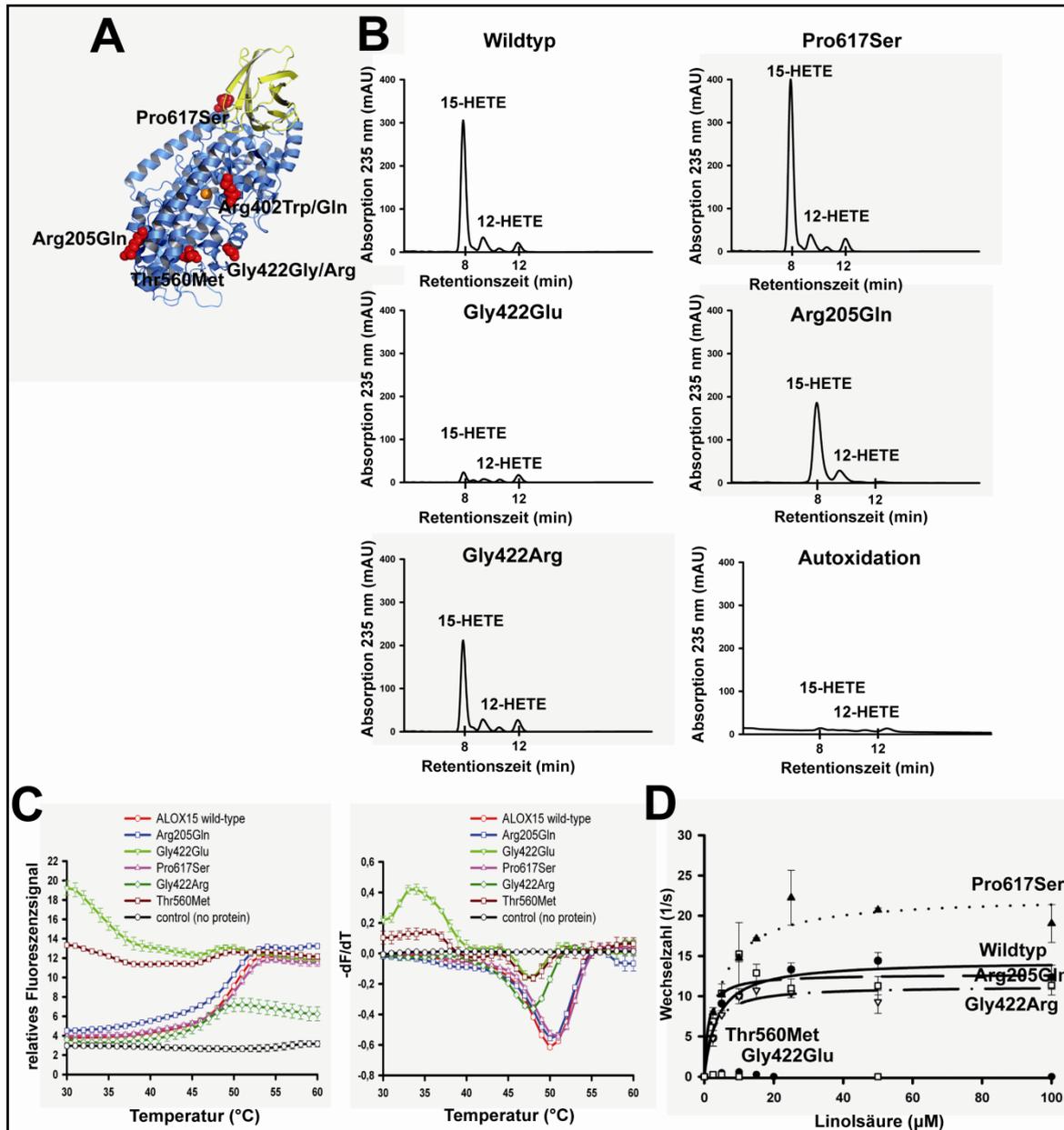


Abb. 3.1.: Genetische Variationen in der hALOX15. (A) Strukturelle Position von verschiedenen hALOX15-Variationen (B) Produktspezifität (RP-HPLC) verschiedener hALOX15-Variationen (C) thermische Denaturierung von verschiedenen hALOX15-Variationen (D) Michaelis-Menten Kinetik verschiedener hALOX15 Variationen.

Die Kristallstruktur der rabALOX15 (Sequenzhomologie zur hALOX15 > 80 %) ließ vermuten, dass zwei der untersuchten Variationen (Arg205Gln, Pro617Ser) an der Enzymoberfläche lagen, ohne dabei einen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum zu besitzen. Dagegen

befanden sich Thr560Met und Gly422Glu in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum (s. Abb. 3.1. A), was eine plausible Erklärung für die katalytische Inaktivität dieser beiden Enzymvariationen darstellt (s. Tab. 3.2.). Dabei handelte es sich bei Gly422Glu um eine neu entdeckte hALOX15 *loss-of-function* Mutation. Die Ergebnisse für die Thr560Met Variation, die in dieser Arbeit erhalten wurden, stimmten mit Literaturdaten überein (Assimes *et al.*, 2009; Schurmann *et al.*, 2011). Die oberflächenorientierten Variationen (Arg205Gln, Pro617Ser) besaßen eine ähnliche Dioxygenaseaktivität wie das Wildtypenzym (s. Tab. 3.2.). Keine der untersuchten Variationen hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Produktspezifität der Lipoxygenase, da 15-HETE (76-96 %) bei allen Enzymvarianten als dominantes Reaktionsprodukt identifiziert werden konnte (s. Abb. 3.1. B). Um den Einfluss der genetischen Variationen auf die Enzymstruktur abschätzen zu können, wurde die Thermostabilität der Enzyme und deren Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass die enzymatisch aktiven Variationen (Arg205Gln, Glu422Arg, Pro617Ser) ein ähnliches thermisches Denaturierungsverhalten wie das Wildtypenzym besaßen, wobei ein 2-Phasenübergang (N \leftrightarrow D) beobachtet wurde. Dagegen waren das Fluoreszenzverhalten und die Denaturierungskurven der beiden inaktiven Variationen (Thr560Met, Gly422Glu) deutlich verändert (s. Abb. 3.1. C). Beide zeigten bereits bei 30 °C (nativer Zustand Wildtyp) eine deutlich erhöhte Affinität zum Fluoreszenzfarbstoff, was auf eine vermehrte Exposition von hydrophoben Aminosäureresten an der Enzymoberfläche hindeutet. Die Enzyme lagen somit schon bei 30° C in einer teilweise denaturierten Struktur vor. Diese strukturellen Änderungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für die Inaktivität dieser beiden Enzymvarianten. Aufgrund der ungewöhnlichen Denaturierungskurven war die Bestimmung der Schmelztemperatur für beide Variationen nicht möglich (s. Tab 3.2.).

hALOX15	SNP code	Allelfrequenz (%)	15-HETE (%)	Relative Aktivität (%)	Schmelztemperatur T _m (°C)
Wildtyp			93 ± 4	100 ± 6	50,0 ± 0,6
Arg205Gln	rs11568101	0,5	89 ± 6	89 ± 7	50,4 ± 0,1
Arg402Trp	rs144038526	0,1	77 ± 2	36 ± 3	50,5 ± 0,2
Gly422Glu	rs61099320	< 0,1	83 ± 4	< 1	n.d.
Gly422Arg	rs147238486	0,1	87 ± 2	46 ± 4	47,6 ± 0,1
Thr560Met	rs34210653	1,5	74 ± 5	< 2	n.d.
Pro617Ser	rs41432647	1,0	96 ± 1	141 ± 17	51,0 ± 0,2

Tab. 3.2.: Zusammenfassung der Produktspezifitäten, relativen Aktivitäten und Schmelztemperaturen von verschiedenen hALOX15-Variationen. Gereinigte hALOX15 Wildtyp und verschiedene Variationen wurden mit Arachidonsäure entsprechend dem Material- und Methodenteil inkubiert (n=4-5). Die Menge an gebildetem 15-HETE wurde für jede Probe quantifiziert, wobei die 15-HETE-Bildung des Wildtyps auf 100 % gesetzt wurde. Die thermischen Denaturierungen wurden entsprechend dem Material- und Methodenteil durchgeführt, wobei der Wendepunkt der ersten negativen Ableitung die Schmelztemperatur (T_m) der Enzymvariation darstellt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss die genetischen Variationen auf die Kinetik der Lipoxygenasereaktion haben. Die kinetischen Parameter für die beiden Variationen (Arg205Gln, Pro617Ser) sind kaum verändert, da sie ähnliche Wechselzahlen ($9,6-22,4 \text{ s}^{-1}$) und K_m -Werte ($1,2-4,8 \text{ }\mu\text{M}$) wie das Wildtypenzym aufweisen (s. Tab. 3.3.). Dagegen zeigten die Thr560Met und Gly422Glu Variation mit Linolsäure keinerlei katalytische Aktivität (s. Abb. 3.2. D + Tab. 3.3.).

hALOX15	SNP code	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	K_m	R^2
Wildtyp	-	$14,4 \pm 0,8$	$3,8 \pm 1,0$	0,89
Arg205Gln	rs11568101	$12,7 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,8$	0,84
Gly422Glu	rs61099320	-	-	-
Gly422Arg	rs147238486	$9,6 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,8$	0,96
Thr560Met	rs34210653	-	-	-
Pro617Ser	rs140549513	$22,4 \pm 1,5$	$4,8 \pm 1,3$	0,95

Tab. 3.3.: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Lipoxygenasereaktion von verschiedenen hALOX15-Variationen. Gereinigte hALOX15 Wildtyp und verschiedene Variationen wurden mit unterschiedlichen Linolsäurekonzentrationen entsprechend dem Material und Methodenteil inkubiert ($n=3$). Die Bildung konjugierter Diene (Absorption 235 nm) wurde für 60-120 s am Spektrophotometer verfolgt. Die aus dem hyperbolischen Fit resultierenden Wechselzahlen (k_{cat}) und Michaelis-Konstanten (K_m) sind hier aufgeführt, wobei der R^2 -Wert das Maß für die Richtigkeit des hyperbolischen Fits dargestellt.

Bei allen bis heute beschriebenen LOXn fungiert die C-terminale Aminosäure (Ile, Val) als Eisenligand und die Deletion dieses Restes führt stets zu einem Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms (Kuban *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1999). Daher sollten C-Terminale truncierte Enzymvariationen *loss-of-function* Mutationen sein, wobei homozygote Allelträger ALOX15 defiziente Menschen wären. Es sind derzeit acht *nonsense* Mutationen in der 1000 Genom Datenbank beschrieben. Keine dieser Mutationen besitzt eine Allelfrequenz $> 0,1 \%$ (s. Anhang Tab. A1.), was die Existenz von homozygoten Allelträgern sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Anschließend suchten wir in der 1000 Genom Datenbank nach genetischen Variationen (*missense*, *nonsense*), die funktionell wichtige Aminosäurereste (Eisenligation, Positions- und Enantioselektivitätsdeterminanten) beeinflussen. Alle bekannten LOXn tragen redoxaktive Metallionen (Eisen- bzw. Mangan) in ihrem aktiven Zentrum (Haeggstrom *et al.*, 2011; Oliw *et al.*, 2010; Wennman *et al.*, 2013). Bei der hALOX15 bilden die Aminosäurereste His360, His365, His540, His544 und Ile662 die Eisenligandensphäre (Gillmor *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2008). Allerdings ist für keinen der genannten Reste bisher eine genetische Variation beschrieben worden.

Die hALOX15 besitzt eine duale Positionsspezifität, da sie die Arachidonsäure zu 15- bzw. 12-H(p)ETE im Verhältnis von etwa 9:1 umsetzt (Berger *et al.*, 1998). Dabei spielen die

Aminosäurereste Phe352, Ile417 und Ile593 als Positionsdeterminanten für diese LOX-Isoform eine besondere Rolle (Sloane *et al.*, 1991; Sloane *et al.*, 1995; Berger *et al.*, 1998). Die Recherche in der 1000 Genom Datenbank zeigte, dass es eine seltene genetische Variation (Allelfrequenz < 0,1 %) am Phe352 gibt, wobei das voluminöse Phenylalanin (Phe) durch die verhältnismäßig kleinere Aminosäure Leucin (Leu) ersetzt ist (rs143365387). Basierend auf dem Triadenkonzept sollte es sich dabei um ein 12-lipoxygenierendes Enzym handeln und frühere Mutagenesestudien bestätigten diesen Verdacht (Berger *et al.*, 1998; Monika Anton, unveröffentlicht). Die Daten legen den Verdacht nahe, dass homozygote Träger dieser Variation ähnlich wie Mäuse ein 12-lipoxygenierendes Enzym (Gen: ALOX15) besitzen. Aufgrund der geringen Allelfrequenz ist die Existenz solcher Individuen allerdings höchst fragwürdig.

Multiple Sequenzvergleiche verschiedener LOX-Isoformen zeigten, dass S-LOXn an einer kritischen Position ihrer Primärsequenz ein Alanin (Ala) besitzen, während R-LOXn dort ein kleineres Glycin (Gly) tragen (Coffa *et al.*, 2004). Obwohl die ALOX15-Enzyme nicht vollständig dem Ala-vs-Gly-Konzept folgten (s. 1.2.4.2), konnte auch für diese Enzyme gezeigt werden, dass nach entsprechenden Mutationen erhöhte Anteile an R-HETEs gebildet wurden (Jansen *et al.*, 2011). Bei der hALOX15 ist Ala403 die korrespondierende Aminosäure, allerdings wurde bisher noch keine genetische Variation für diese Position beschrieben.

Die Bindung der hALOX15 an Biomembranen erhöht deren katalytische Aktivität mit freien Fettsäuren. Gleichzeitig ist diese Membranbindung die Voraussetzung für die Oxygenierung von Membranlipiden (Kühn *et al.*, 1990). Die oberflächenexponierten hydrophoben Aminosäurereste Tyr15, Leu70, Leu71, Lys180 und Leu194 wurden als Membranbindungs-determinanten identifiziert (Walther *et al.*, 2004). Für zwei dieser Reste sind genetische Variationen beschrieben worden. Tyr15His (rs13306168) besitzt eine Allelfrequenz von 0,6 %, wohingegen für den Leu194Pro Austausch (rs11867874) keine Frequenzdaten vorhanden sind (Allelfrequenz < 0,1 %). Bei beiden Mutationen handelt es sich allerdings um weitgehend konservative Aminosäureaustausche, so dass nur geringe Effekte auf die Membranbindungskapazität des Enzyms zu erwarten sind.

In silico Docking-Studien und moleküldynamische Simulationen mit verschiedenen Fettsäuresubstraten (Arachidonsäure, Linolsäure) zeigten, dass die Reste Arg402 und Phe414 an der Substratbindung beteiligt zu sein scheinen (Gan *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2011). Dabei wurden für Arg402 zwei seltene genetische Variationen mit einer Allelfrequenz < 1 % in der 1000 Genom Datenbank beschrieben [Arg402Gln (TMP_ESP_17_4536752) und Arg402Trp (rs144038526)]. Um den funktionellen Einfluss von Mutationen an dieser Position zu untersuchen, wurde die Arg402Trp Mutation exprimiert und charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Mutation eine verringerte katalytische Aktivität

hatte (Restaktivität ~ 36 %), wohingegen die Thermostabilität und Produktspezifität kaum beeinflusst waren (s. Tab. 3.2.). Dennoch bleibt festzuhalten, dass der Verlust der katalytischen Aktivität *in vitro* bei weitem nicht so dramatisch war wie bei den hALOX15 *loss-of-function* Mutationen (Thr560Met; Gly422Glu), weshalb davon ausgegangen wird, dass Träger dieses mutierten Allels weiterhin eine funktionsfähige hALOX15 besitzen.

Zsfg. Die meisten der analysierten hALOX15-Variationen besitzen ähnliche enzymatische Eigenschaften wie das Wildtypenzym. Dagegen handelt es sich bei Thr560Met und Gly422Glu um *loss-of-function* Mutationen. Daneben sind acht *nonsense* Mutationen beschrieben, die zur Entstehung C-terminal trunkierter inaktiver hALOX15-Variationen führen sollten. Weiterhin sind einzelne genetische Variationen beschrieben worden, welche die Positionsspezifität (Phe352Leu) und die Membranbindungsfähigkeit (His15Tyr, Leu194Pro) beeinflussen. Diese funktionell relevanten Variationen kommen jedoch überwiegend nur mit geringen Allelfrequenzen ($\leq 1,5$ % für Thr560Met) vor.

3.1.2 Humane Arachidonat 5-Lipoxygenase (hALOX5)

Die hALOX5 besteht aus 674 Aminosäuren. Ihre Aminosäuresequenz wurde erstmals 1988 veröffentlicht (Matsumoto *et al.*, 1988). Es handelt sich hierbei um das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese, da es Arachidonsäure schrittweise über 5S-H(p)ETE zum instabilen Leukotrien LTA₄ metabolisiert (Funk *et al.*, 1988; Radmark *et al.*, 2010; Haeggstrom *et al.*, 2011). Bei Leukotrienen handelt es sich um proinflammatorische Mediatoren, die eine Rolle bei der Pathogenese des Asthma bronchiale und der allergischer Rhinitis spielen (s. 1.1.4.1). Derzeit sind 69 nicht-synonyme (kodierende) Variationen für die hALOX5 beschrieben (s. Tab. 3.1.), wobei lediglich die hALOX5 Glu254Lys (rs2228065) Variation mit einer Allelfrequenz von > 1 % vorkommt und daher als SNP bezeichnet werden kann. Für die funktionelle Charakterisierung wählten wir 7 nicht-synonyme Variationen in der katalytischen Domäne des Enzyms aus (s. Tab. 3.4.). Unsere strukturellen Analysen zeigten, dass sich im Gegensatz zum Ala549Val Austausch, der tief im Innern des Proteins lokalisiert war, die meisten Variationen an der Enzymoberfläche befanden (s. Abb. 3.1. A). Daher waren nur geringe funktionelle Effekte zu erwarten. Diese Vermutung wurde durch ortsgerichtete Mutagenese bestätigt. Alle getesteten Variationen zeigten ähnliche Produktspezifitäten und spezifische katalytische Aktivitäten (Dioxygenase) wie das Wildtypenzym (s. Abb. 3.1. B). Alle Mutanten metabolisierten die Arachidonsäure zu hauptsächlich 5-HETE (74-90 %), wobei die relativen katalytischen Aktivitäten zwischen 22-130 % bezogen auf das Wildtypenzym variierten (s. Tab. 3.4.). Dabei zeigt die Ala549Val Variation (rs1133889689) die stärkste Reduktion der katalytischen Aktivität (Restaktivität ~ 22 %), was vermutlich auf

die räumliche Nähe des Aminosäurerestes zu einem der Eisenliganden der hALOX5 zurückzuführen ist (His551). Eine direkte Mutation dieses Eisenliganden (His551) führte zu einem kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität (Ishii *et al.*, 1992).

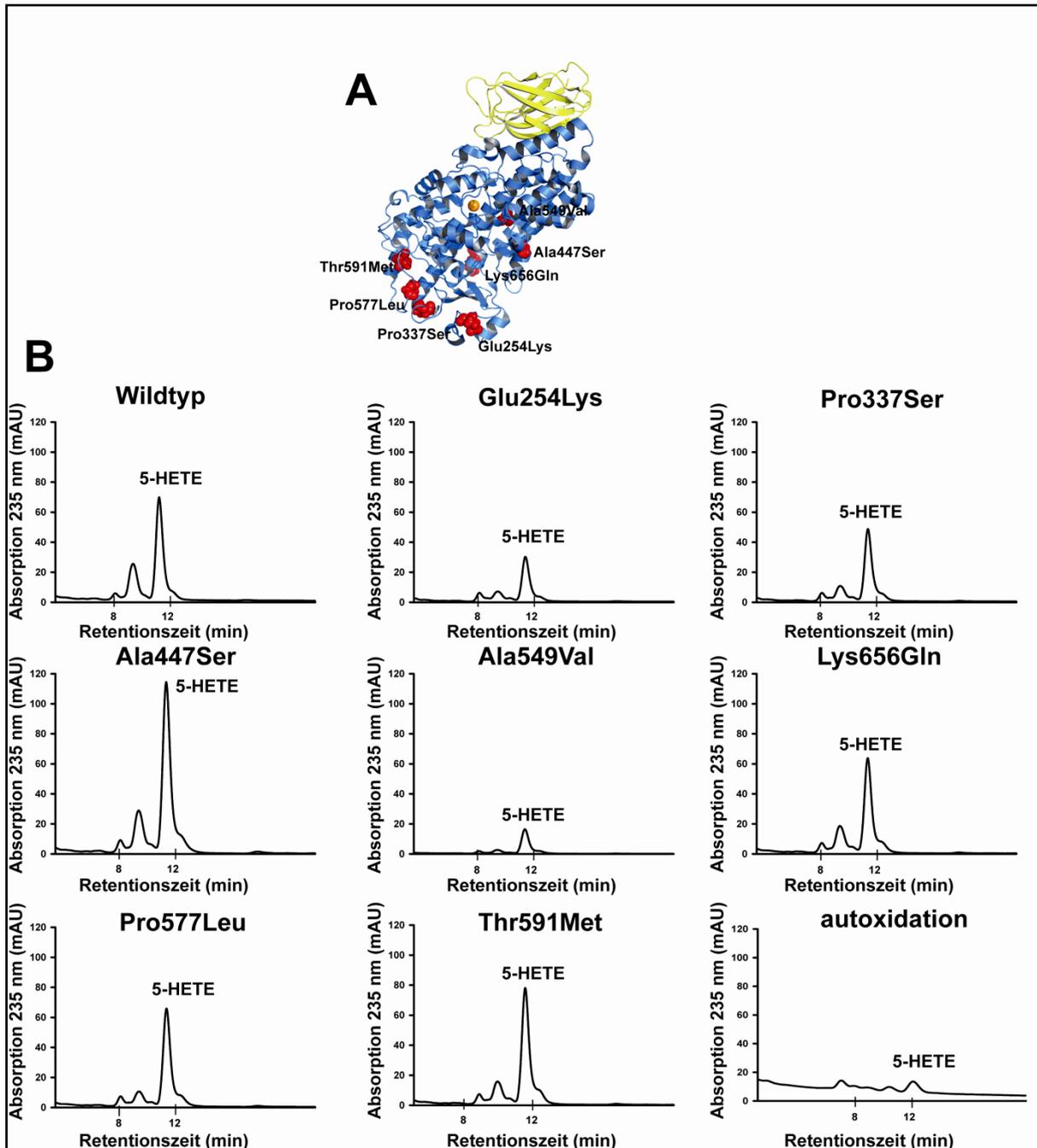


Abb. 3.2.: Genetische Variationen in der hALOX5. (A) Strukturelle Position von verschiedenen hALOX5 Variationen (B) Produktspezifität (RP-HPLC) verschiedener hALOX5 Variationen.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten analysierten wir den Einfluss von verschiedenen hALOX5-Variationen auf die LTA₄ Synthase Aktivität des Enzyms. Ein Glu254Lys und Thr591Met Austausch beeinflusste diese katalytische Aktivität des Enzyms nicht wesentlich, was gut mit den für die Dioxygenaseaktivität erhaltenen Ergebnissen übereinstimmt.

Im Gegensatz zur hALOX15 sind für die hALOX5 keine *nonsense* Mutationen beschrieben worden (s. Tab. 3.1.).

hALOX5	SNP code	Allelfrequenz (%)	5-HETE (%)	rel. Aktivität (%)
Wildtyp			74 ± 1	100 ± 2
Glu254Lys	rs2228065	7,5	90 ± 1	58 ± 5
Pro337Ser	rs28395860	0,1	85 ± 1	54 ± 1
Ala447Ser	rs28395869	0,0	81 ± 1	118 ± 5
Ala549Val	rs113388968	< 0,1	84 ± 1	22 ± 1
Pro577Leu	rs143439556	< 0,1	89 ± 1	95 ± 4
Thr591Met	rs146768497	< 0,1	86 ± 1	130 ± 7
Lys656Gln	rs147238486	0,0	80 ± 2	122 ± 3

Tab. 3.4.: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der LOX-Reaktion von verschiedenen hALOX5-Variationen. Partiiell gereinigte hALOX5 Wildtyp und verschiedene Variationen wurden nach entsprechender Western Blot Analyse in gleichen Mengen für die Aktivitätsassays mit Arachidonsäure eingesetzt ($n=4$). Dabei wurde die HETE-Bildung für jeden Ansatz mit Hilfe von HPLC bestimmt um die katalytische Aktivität der verschiedenen Variationen zu berechnen. Die HETE-Menge für den Wildtyp wurde dabei auf 100 % gesetzt.

Als nächstes suchten wir in der 1000 Genom Datenbank nach genetischen Variationen die funktionell wichtige Aminosäuren (Eisenliganden, Positions- und Enantioselektivität, Substratbindung etc.) des Enzyms betrafen. Die Aminosäurereste His368, His373, His551, Asn555 und Ile674 stellen die Eisenliganden der hALOX5 dar (Gilbert *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012), wobei für keinen der genannten Reste eine genetische Variation beschrieben wurde. Ähnlich verhält es sich mit den Positions- (Schwarz *et al.*, 2001) sowie der Enantioselektivitätsdeterminante (Coffa *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2011), für die bisher ebenfalls keine genetischen Variationen nachgewiesen werden konnten (s. Anhang Tab. A1.).

Bei der Substratbindetasche der hALOX5 handelt es sich eine langgestreckte Höhle, die in der Kristallstruktur an beiden Enden verschlossen zu sein scheint. Dabei verschließen Phe178 und Tyr182 (FY-Korken) die Höhle an einem Ende und Trp148 blockiert vermutlich den Eingang am gegenüberliegenden Ende der Substratbindetasche (Gilbert *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012). Weder für den FY-Korken noch für Trp148 sind bislang genetische Variationen beschrieben worden.

In der Literatur existieren bereits seit Jahren eine Reihe von hALOX5 aktivierenden Faktoren (Ca^{2+} , PC, CLP) (Radmark *et al.*, 2010; Haeggstrom *et al.*, 2011). Dabei scheinen die Reste Asn44, Asp45 und Glu47 in der N-terminalen Domäne eine wichtige Rolle für die Ca^{2+} -Bindung zu spielen (Hammarberg *et al.*, 2000). Die Bindung des Enzyms an Biomembranen, PC-Vesikel sowie an das Adapterprotein CLP wird hauptsächlich durch die Reste Trp13,

Trp75 und Trp102 vermittelt (Kulkarni *et al.*, 2002; Esser *et al.*, 2010). Allerdings wurde keine der genannten Reste bisher als genetische Variation beschrieben.

In vitro Kinase Assays zeigten, dass die hALOX5 durch Phosphorylierung an drei spezifischen Serinen in der katalytischen Domäne reguliert werden kann: Ser271 durch MAP-Kinasen (Werz *et al.*, 2002), Ser523 durch die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (Luo *et al.*, 2004) und Ser663 durch ERK2 (Werz *et al.*, 2003). Dabei scheint die Phosphorylierung an Ser271 den Export der hALOX5 aus dem Zellkern zu verhindern (Flamand *et al.*, 2009), wobei die Phosphorylierung an Ser523 die Aktivität des Enzyms reduziert und zudem den Import des Proteins in den Zellkern verhindert (Luo *et al.*, 2004). Durch die Phosphorylierung der hALOX5 an beiden Stellen (Ser271, Ser523) wird somit also der Transport des Enzyms in und aus dem Zellkern kontrolliert, wodurch die subzelluläre hALOX5 Verteilung beeinflusst wird. Interessanterweise existiert in der 1000 Genom Datenbank eine seltene genetische Variation an Ser271 (Ser271Ile, TMP_ESP_10_45920561, Allelfrequenz < 0,1 %). Diese Mutation zerstört eine der möglichen Phosphorylierungsstellen und sollte damit die subzelluläre Lokalisation des Enzyms beeinflussen. Ob diese Beobachtung von funktioneller Relevanz ist, muss durch andere experimentelle Strategien untersucht werden.

Zsfg. Die meisten der analysierten hALOX5-Variationen besitzen ähnliche enzymatische Eigenschaften wie das Wildtypenzym, so dass nicht von funktionell bedeutsamen Mutationen ausgegangen werden kann. Lediglich der Ala549Val Austausch (rs1133889689) wies eine um ca. 80 % reduzierte Enzymaktivität auf. An der putativen Phosphorylierungsstelle Ser271 wurde ein seltener Aminosäureaustausch beschrieben, dessen funktionelle Bedeutung jedoch nicht näher untersucht wurde.

3.1.3 Humane Arachidonat 12-Lipoxygenase (hALOX12)

Die hALOX12 besteht aus 663 Aminosäuren und wurde 1974 als erste tierische LOX-Isoform beschrieben (Hamberg *et al.*, 1974). In der 1000 Genom Datenbank existieren für diese LOX-Isoform 67 nicht-synonyme Variationen (s. Tab. 3.1.). Dabei haben lediglich zwei von ihnen, Gln261Arg (rs28395860) und Asn322Ser (rs4344739), eine Allelfrequenz > 1 % (38,8 % bzw. 34,4 %). Insgesamt analysierten wir vier verschiedene nicht-synonyme genetische Variationen (Asp134His, Glu259Lys, Gln261Arg, Asn322) in der katalytischen Domäne der hALOX12. Ein Strukturmodell auf der Basis der katalytischen Domäne von hALOX12 (PDB: 3D3L) zeigte, dass sich alle analysierten Variationen an der Enzymoberfläche der hALOX12 befanden, weshalb nur geringe funktionelle Konsequenzen erwartet wurden (s. Abb. 3.3. A). Diese Vermutung konnte durch die experimentellen Daten bestätigt werden, da alle

analysierten Variationen fast ausschließlich 12-HETE als Reaktionsprodukt bildeten und zudem die relativen spezifischen Aktivitäten für die verschiedenen genetischen Variationen (rel. Aktivität 60-109 %) mit der des Wildtypenzym verglichbar waren (s. Tab. 3.5.). Interessanterweise wurde der Gln261Arg Austausch auch bei zwei ausgestorbenen Verwandten des modernen Menschen, dem *Homo Neanderthalensis* (Chaitidis *et al.*, 2013) sowie dem Denisova-Menschen gefunden (Adel *et al.*, unveröffentlicht).

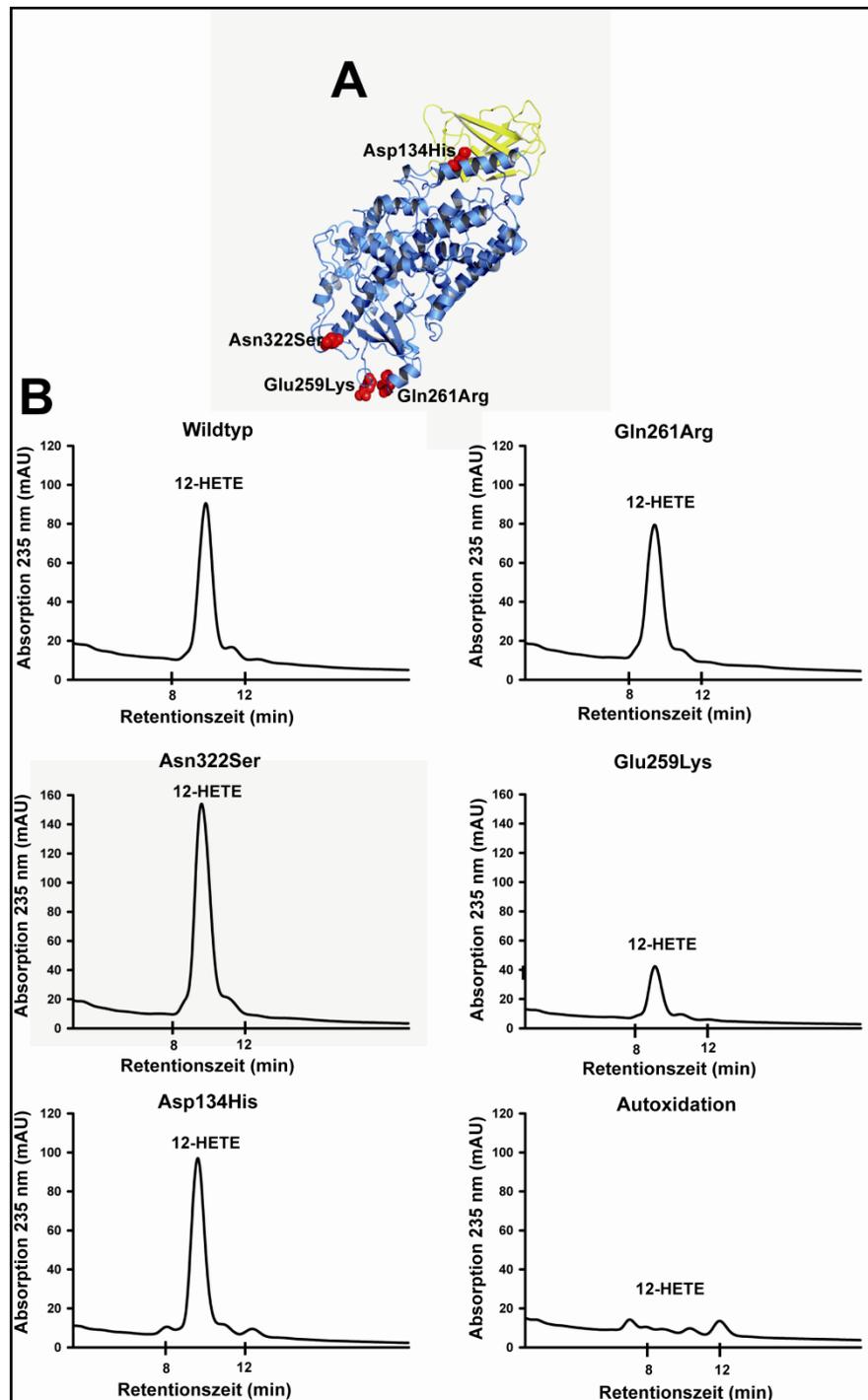


Abb. 3.3.: Genetische Variationen in der hALOX12. (A) Strukturelle Position von verschiedenen hALOX12 Variationen (B) Produktspezifität (RP-HPLC) verschiedener hALOX12-Variationen.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der funktionellen Analyse der genetischen Variationen in der hALOX12 zusammengefasst.

hALOX12	SNP code	Allelfrequenz (%)	12-HETE (%)	rel. Aktivität (%)
Wildtyp			> 99	100 ± 23
Asp134His	rs114985038	0,4	> 99	109 ± 36
Glu259Lys	rs4987104	0,0	> 99	60 ± 18
Gln261Arg	rs1126667	38,8	> 99	91 ± 10
Asn322Ser	rs434473	34,4	> 99	101 ± 23

Tab. 3.5.: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Lipoxygenasereaktion von verschiedenen hALOX12-Variationen. Die rekombinante hALOX12 Expression und HPLC Produktanalyse wurde entsprechend dem Protokoll für den 5 ml LOX-Aktivitätsassay (Jansen *et al.*, 2011) durchgeführt (n=5-10). Der LOX-Gehalt für die einzelnen bakteriellen Lysate wurde mit Hilfe eines Western Blot quantifiziert und die HETE-Bildung für die einzelnen Klone wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe korreliert. Dabei wurde die HETE-Bildung für den Wildtyp auf 100 % gesetzt.

Daneben gibt es in der Datenbank des 1000 Genom Projektes eine beschriebene *nonsense* Variation (Arg348stop, rs141346813), welche zu der Entstehung eines C-terminal trunkierten hALOX12 Enzyms führen sollte. Analog zu den für die hALOX15 beschriebenen *nonsense* Mutationen kommt auch diese mit einer Allelfrequenz < 0,1 % vor, weshalb die Existenz homozygoter Allelträger unwahrscheinlich ist.

Ähnlich wie bei der hALOX15 und der hALOX5 untersuchten wir anschließend die 1000 Genom Datenbank auf genetische Variationen, die funktionell wichtige Aminosäurereste betrafen (Eisenligation, Positions- und Stereospezifität etc.). Das katalytische Eisenion wird durch His360, His365, His540, Asn544 sowie das C-terminale Ile663 koordiniert, es wurde jedoch keine genetische Variation gefunden, die einen der Eisenliganden betraf. Das Triadenkonzept ist partiell auf dieses Enzym anwendbar (Vogel *et al.*, 2010) und das Enzym trägt an der für die Enantioselektivität wichtigen Aminosäureposition 403 ein Ala, weshalb es sich um eine S-LOX handelt (Coffa *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2011). Weder für die Positions- (Phe353, Ala417, Ile593) noch für die Enantioselektivitätsdeterminante (Ala403) konnten bislang genetische Variationen beschrieben werden (s. Anhang Tab. A1.).

Arg402 soll ähnlich wie bei der hALOX15 eine Funktion bei der Positionierung des Fettsäuresubstrats im aktiven Zentrum haben (Gan *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 2010; Toledo *et al.*, 2011). An dieser Stelle wurde mit dem Arg402Gln Austausch (rs143539715) eine seltene genetische Variation (Allelfrequenz < 0,1 %) beschrieben. Da Mutationen an dieser Position bei der hALOX15 (s. Abschnitt 3.1.1.) und rabALOX15 (Di Venere *et al.*, 2013) nur einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die enzymatische Funktion hatten (kein vollständiger Aktivitätsverlust bzw. keine Veränderung der Produktspezifität), wurde auf die funktionelle Analyse der hALOX12 Arg402Gln Variation verzichtet. Aufgrund der Seltenheit

(Allelfrequenz < 0,1 %) können ähnlich wie bei anderen funktionell relevanten genetischen Variationen keine homozygoten Allelträger erwartet werden.

Zsfg. Alle analysierten hALOX12-Variationen besitzen ähnliche enzymatische Eigenschaften (Produktspezifität, spezifische Aktivität) wie das Wildtypenzym. Es ist mit der *nonsense* Variation Arg348stop (rs141346813) eine vermutliche *loss-of-function* Mutation für die hALOX12 beschrieben. Daneben gibt es eine seltene genetische Variation (Arg402Gln), die möglicherweise die Positionierung des Fettsäuresubstrats am aktiven Zentrum beeinflusst.

3.1.4 Humane Arachidonat 15-Lipoxygenase Typ II (hALOX15B)

Diese humane LOX-Isoform besteht aus 676 Aminosäuren (Isoform D) und wurde erstmals 1997 entdeckt (Brash *et al.*, 1997). Derzeit sind 86 funktionell nicht-synonyme genetische Variationen für die hALOX15B beschrieben, wobei sechs von ihnen eine Allelfrequenz von > 1 % aufweisen (s. Tab. 3.1.): Pro77Ala (rs78230493), Ala311Val (rs148602477), Arg486His (rs9895916), Arg635Gln (rs61730298), Gln656Arg (rs4792147) und Ile676Val (rs7225107) (s. Anhang Tab. A1.). Wir wählten drei der SNP Variationen, die in der katalytischen Domäne des Enzyms lokalisiert sind (Arg486His, Gln656Arg, Ile676Val), für eine detaillierte Charakterisierung des Einflusses von genetischen Variationen auf die Enzymfunktionalität aus. Diese wurden erstmals in einer an der Universität Zürich durchgeführten klinischen Assoziationsstudie beschrieben. In dieser Studie wurde die Häufigkeit genetischer hALOX15B Variationen (SNPs) bei Europäern mit dem Risiko für die Entstehung der koronaren Herzerkrankung (KHK) korreliert. Die Kontrollgruppe bestand aus 238 Personen, die in ihrer Vergangenheit weder an einer KHK, einem Herzinfarkt noch einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) litten. Dagegen besaßen alle Mitglieder der Fallgruppe eine durch Angiografie gesicherte mindestens 50 %ige Stenose in einer der Koronararterien. Angiografisch negativ dokumentierte Individuen wurden ebenfalls in die Kontrollgruppe aufgenommen. Neben den für kardiovaskuläre Erkrankungen bereits bekannten Risikofaktoren (Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus etc.) konnte in dieser Studie erstmals ein statistischer Zusammenhang zwischen genetischen Variationen des hALOX15B-Gens und einem erhöhten Risiko für die KHK nachgewiesen werden (s. Anhang Tab. A3.). Zum Beispiel war ein spezifischer dreifach Haplotyp (rs11870212, rs60050159, rs61312861) mit einem signifikant verringerten Risiko für die KHK assoziiert (OR:0,51 (CI 95 %: 0,27-0,94), p-Wert: 0,03). Problematisch war jedoch die Tatsache, dass sich die gefundenen SNPs entweder in intronischen DNA-Regionen (rs11870212, rs60050159) befanden bzw. es sich um einen synonymen SNP (rs6131286) handelte. Deshalb gestaltete sich die Suche nach der mechanistischen Grundlage des

statistischen Zusammenhangs schwierig. Daneben zeigte der nicht-synonyme SNP Gln656Arg einen statistischen Trend in Richtung eines verringerten Risikos für die Entwicklung der KHK (OR: 0,81 (CI 95 %: 0,62-1,04), p-Wert 0,10). Die beiden anderen Variationen (Arg486His, Ile676Val) waren dagegen nicht mit der KHK assoziiert (s. Anhang Tab. A3.).

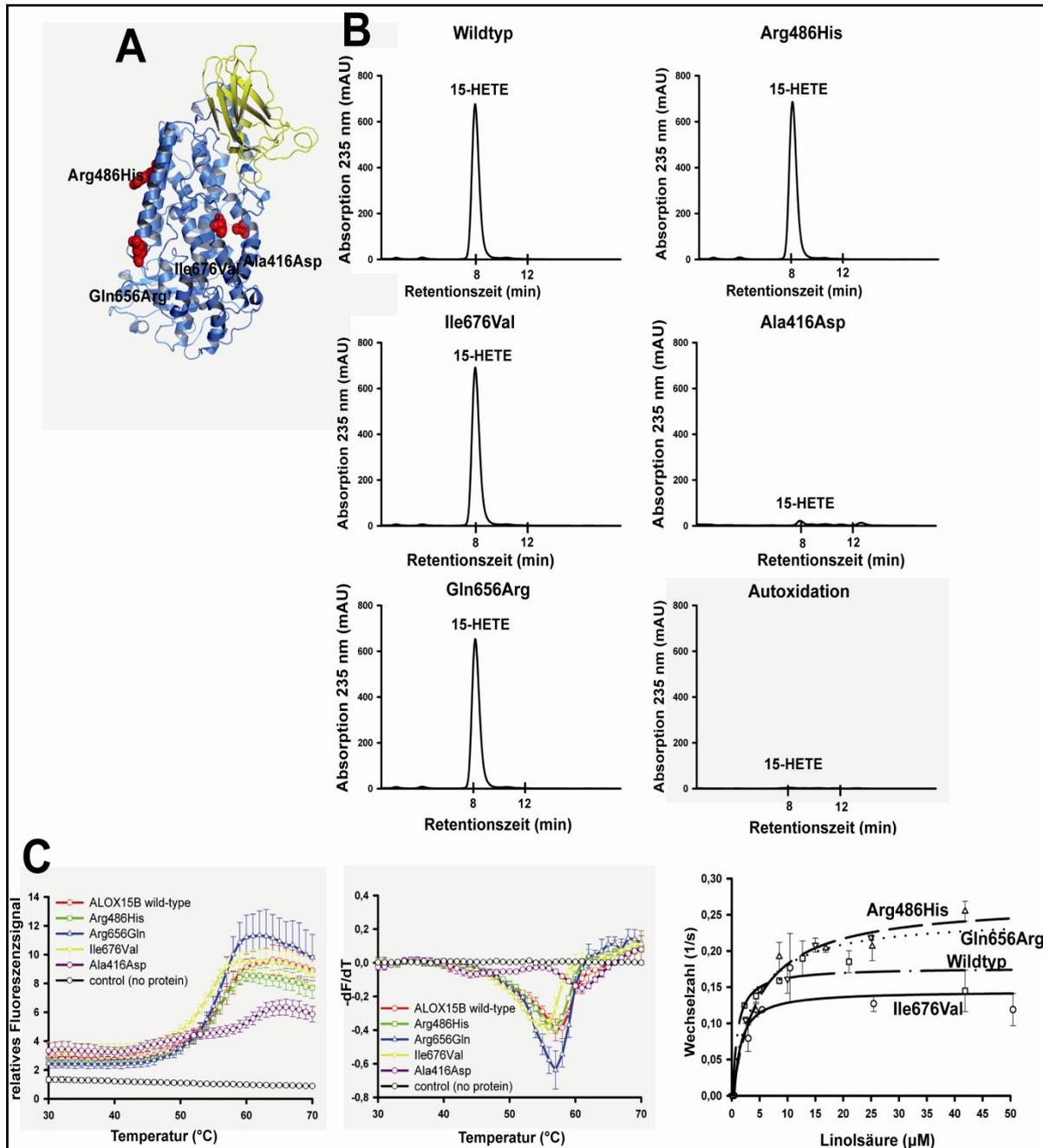


Abb. 3.4.: Genetische Variationen in der hALOX15B (A) Strukturelle Position von verschiedenen hALOX15B-Variationen (B) Produktspezifität (RP-HPLC) verschiedener hALOX15B-Variationen (C) thermische Denaturierung von verschiedenen hALOX15B Variationen (D) Michaelis-Menten Kinetik verschiedener hALOX15B Variationen.

Strukturmodellierungen auf der Grundlage der Kristallstruktur der hALOX5 zeigten, dass zwei der analysierten SNPs (Arg486His, Gln656Arg) an der Oberfläche des Enzyms lagen

und daher nur geringe funktionelle Effekte zu erwarten waren. Dagegen handelt es sich beim Ile676 um einen Eisenliganden, so dass der Ile676Val Austausch möglicherweise die Funktionalität des Enzyms beeinflussen könnte (s. Abb. 3.4 A). Andererseits hat ein Ile-zu-Val Austausch konservativen Charakter, so dass die zu erwartenden funktionellen Effekte eher gering sein sollten. Weiterhin ist zu beachten, dass für die Eisenligandierung die freie Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure bedeutsam ist. Die räumliche Lage dieser funktionellen Gruppe ist weitgehend unabhängig von der Art der Aminosäureseitenkette, so dass die funktionelle Relevanz des Ile-zu-Val Austausches begrenzt sein dürfte. Die experimentelle Analyse bestätigte diese Annahme, da keine der analysierten Variationen die Positionsspezifität des Enzyms wesentlich beeinflusste (s. Abb. 3.4. B). Daneben stimmen auch die relativen spezifischen Aktivitäten (94-104 %) weitgehend mit dem Wildtypenzym überein (s. Tab. 3.6.).

hALOX15B	SNP code	Allelfrequenz (%)	15-HETE (%)	rel. Aktivität (%)	Schmelztemperatur T_m (°C)
Wildtyp			> 99	100 ± 2	57,4 ± 0,2
Arg486His	rs9895916	8,7	> 99	100 ± 2	56,6 ± 0,3
Gln656Arg	rs28395869	38,6	> 99	104 ± 1	56,9 ± 0,2
Ile676Val	rs7225107	10,3	> 99	94 ± 7	55,0 ± 0,3
Ala416Asp	rs140152561	0,1	n.d.	< 1	n.d.

Tab. 3.6.: Zusammenfassung der Produktspezifitäten, relativen Aktivitäten und Schmelztemperaturen von verschiedenen hALOX15B-Variationen. Gereinigte hALOX15B Wildtyp und verschiedene Variationen wurden mit Arachidonsäure entsprechend dem Material und Methodenteil inkubiert (n=4-5). Die Menge an gebildetem 15-HETE wurde für jede Probe quantifiziert, wobei die 15-HETE-Bildung des Wildtyps auf 100 % gesetzt wurde. Die thermischen Denaturierungen wurden entsprechend dem Material- und Methodenteil durchgeführt, wobei der Wendepunkt der ersten negativen Ableitung die Schmelztemperatur (T_m) der Enzymvariation darstellt.

Die thermischen Denaturierungskurven für die analysierten hALOX15B SNPs zeigten, dass der Wildtyp sowie die analysierten hALOX15B SNPs thermische Übergangskurven mit zwei thermodynamischen Zuständen (nativ, denaturiert) aufwiesen (s. Abb. 3.4. C). Dabei hatte der Ile676Val SNP eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Schmelztemperatur (T_m), was auf einen destabilisierenden Charakter dieses Aminosäureaustausches hindeutet. Dagegen besaßen der Wildtyp und die anderen analysierten SNPs (Arg486His, Gln656Arg) ähnliche Schmelztemperaturen, was darauf hindeutet, dass die Struktur dieser Enzymvarianten kaum beeinflusst wurde (s. Tab. 3.5.).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Produktspezifität der hALOX15B durch die SNPs nicht beeinflusst wurde. Nun sollte untersucht werden, in wie weit die Aminosäureaustausche einen Einfluss auf die kinetischen Parameter der Lipoxigenasereaktion hatten. Die

Untersuchung ergab, dass alle untersuchten genetischen Variationen mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden konnten (s. Abb. 3.5. D), wobei die aus dem hyperbolischen Fit erhaltenen kinetischen Parameter (K_m , k_{cat}) für die analysierten SNPs und den Wildtyp weitgehend übereinstimmten (s. Tab. 3.6.). Diese Daten belegen, dass sowohl die Substratbindung als auch die Oxygenierungsrate (Reaktionsgeschwindigkeit) durch die analysierten SNPs kaum beeinflusst wurden.

Derzeit sind vier *nonsense* Variationen für die hALOX15B beschrieben, die zur Entstehung C-terminaler truncierter Enzymvariationen führen. Analog zu den für die anderen LOX-Isoformen beschriebenen Stop-Mutationen kommen auch diese stets mit einer Allelfrequenz < 0,1 % vor, weshalb die Existenz von homozygoten Allelträgern eher unwahrscheinlich ist.

hALOX15B	SNP code	k_{cat} (s^{-1})	K_m	R^2
Wildtyp	-	$0,18 \pm 0,01$	$1,2 \pm 1,2$	0,82
Arg486His	rs9895916	$0,27 \pm 0,02$	$2,8 \pm 0,8$	0,98
Gln656Arg	rs28395869	$0,25 \pm 0,02$	$3,7 \pm 0,2$	0,98
Ile676Val	rs7225107	$0,12 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,6$	0,93

Tab. 3.7.: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Lipoxygenasereaktion von verschiedenen hALOX15B-Variationen. Gereinigte hALOX15B Wildtyp und verschiedene SNPs wurden mit unterschiedlichen Linolsäurekonzentrationen entsprechend dem Material- und Methodenteil inkubiert ($n=3$). Die Bildung konjugierter Diene (Absorption 235 nm) wurde für 120 s am Spektrophotometer verfolgt. Die aus dem hyperbolischen Fit resultierenden Wechselzahlen (k_{cat}) und Michaelis-Konstanten (K_m) sind hier aufgeführt, wobei der R^2 -Wert das Maß für die Richtigkeit des hyperbolischen Fits dargestellt.

In der hALOX15B ist das katalytische Eisenion durch die Aminosäuren His373, His378, His553, Ser557 sowie das C-terminale Ile676 koordiniert. Interessanterweise handelt es sich bei Ile676Val um einen SNP mit Allelfrequenz von 9,6 %, allerdings zeigte die funktionelle Charakterisierung keine wesentlichen Unterschiede in der enzymatischen Funktion im Vergleich zum Wildtypenzym auf (s. Abb. 3.4.).

Im Vergleich zur dualen Positionsspezifität von 12/15 LOXn (Mensch, Orang Utan, Schimpanse etc.) oxidiert hALOX15B Arachidonsäure zu nahezu ausschließlich 15-H(p)ETE (Brash *et al.*, 1997). Das orthologe Enzym bei der Maus (Alox15b) ist eine 8-LOX, wobei zwei Aminosäurereste (Tyr603, His604) für den Unterschied in der Positionsspezifität verantwortlich sind (Jisaka *et al.*, 2000). In der hALOX15B befinden sich Asp603 und Val604 an diesen Positionen und es konnte bereits gezeigt werden, dass durch ortsgerichtete Mutagenese (Ty603Asp, His604Val) die Maus 8-LOX in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden kann. In der 1000 Genom Datenbank gibt es mit Val604Ile (rs192653434) eine seltene Mutation (Allelfrequenz 0,1 %) an dieser Aminosäureposition.

Allerdings handelt es sich hierbei um einen konservierten Aminosäureaustausch, weshalb die zu erwartenden Effekte gering sein sollten.

Bei der hALOX15B handelt es sich um eine S-LOX, da sie an der für die Enantioselektivität kritischen Position in der Primärsequenz (Ala416) ein Alanin trägt. Mutagenesestudien bestätigten, dass das Enzym dem Ala-vs-Gly-Konzept folgt (Coffa *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2011). Interessanterweise gibt es in der Datenbank mit Ala416Asp (rs140152561) eine seltene genetische Variation an dieser Position (Allelfrequenz $\leq 0,1$ %). Die funktionelle Analyse ergab, dass diese Mutation enzymatisch nahezu inaktiv war (s. Abb. 3.4. B). Die thermische Denaturierungskurve der Ala416Asp Variation unterschied sich wesentlich von der des Wildtypenzym sowie den funktionell aktiven SNPs, was auf Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung der verschiedenen Enzymspezies hindeutet. Es bleibt festzuhalten, dass es sich beim Ala416Asp Austausch um die nach unserem Erkenntnistand erste bekannte hALOX15B *loss-of-function* Mutation handelt. Aufgrund der geringen Allelfrequenz ist die Existenz von homozygoten Allelträgern jedoch sehr unwahrscheinlich.

Zsfg. Die in der klinischen Studie entdeckten kodierenden nicht-synonymen hALOX15B SNPs (Arg486His, Gln656Arg, Ile676Val) hatten alle ähnliche enzymatische Eigenschaften (Produktspezifität, spezifische Aktivität, Thermostabilität) wie das Wildtypenzym. Neben vier in der Datenbank veröffentlichten *nonsense* Variationen konnte mit Ala416Asp (rs140152561) eine weitere *loss-of-function* Mutation für diese LOX-Isoform beschrieben werden. Wie bereits bei inaktiven hALOX15-Variationen (Thr560Met, Gly422Glu) gezeigt wurde, ist die Inaktivität vermutlich auf eine partielle Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen.

3.2 Molekulare Ursachen für die Inaktivität der natürlich vorkommenden hALOX15 Gly422Glu Variation

3.2.1 Die Gly422Glu Mutation ist eine fehlgefaltete hALOX15 Enzymvariante.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1. beschrieben wurde, handelte es sich bei der Gly422Glu (rs61099320) Variante um eine *loss-of-function* Mutation der hALOX15. Dabei zeigte die Enzymvariante sowohl mit Arachidonsäure als auch Linolsäure keinerlei katalytische Aktivität (s. Abb. 3.1. A + D). Es sollte zunächst überprüft werden, ob die katalytische Aktivität nicht durch den Verlust des katalytischen Eisenions verursacht wurde. Die Ergebnisse der Atomabsorptionsspektroskopie zeigten jedoch, dass der Eisengehalt der Mutante in guter Übereinstimmung mit dem des Wildtypenzym war, wobei das Eisen-Protein-Verhältnis stets bei 0,8-0,9 lag (Horn *et al.*, 2013 I). Das Fehlen des katalytischen Eisen(II/III)-Ions kann also als Ursache für die Inaktivität der hGly422Glu Variation weitgehend ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der thermischen Denaturierungsstudien deuteten darauf hin, dass die

Inaktivität der hGly422Glu Variation möglicherweise durch eine Fehlfaltung des Enzyms verursacht wird (Abb. 3.1. C). Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass es sich beim diesem Fluoreszenzfarbstoffbindungsstudien um eine indirekte Messmethode handelt, deren Ergebnisse einen großen Spielraum für Interpretationen offen lassen. Daher sollte der strukturelle Einfluss der Gly-zu-Glu Mutation mit unabhängigen Methoden (Messung des Circular dichroismus (CD), direkte Fluoreszenzspektroskopie des Proteins) untersucht werden. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Di Venere (Universität *Tor Vergata*, Rom, Italien) und Herr Dr. Ivanov (Universität Rostock, Rostock, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden Fern-UV-CD-Spektren (200-250 nm) vom Wildtyp und der Gly422Glu Mutante bei verschiedenen Temperaturen (13 °C, 37 °C, 53 °C) aufgenommen. Dabei sollten die ersten beiden Temperaturen den nativen Zustand des Enzyms repräsentieren, während das CD-Spektrum bei 53 °C den denaturierten bzw. partial denaturierten Zustand des Wildtypenzym darstellte. Es ist zu erkennen, dass die CD-Spektren der hGly422Glu Mutante unter nativen Bedingungen (13 °C, 37 °C) dem Spektrum des Wildtypenzym bei denaturierenden Bedingungen (53 °C) ähnelte (s. Abb. 3.5. A). Die Mutation scheint damit eine strukturelle Änderung des Enzyms zu induzieren, was sich durch einen verringerten Anteil an geordneten Sekundärstrukturelementen (schwächeres CD-Signal) widerspiegelt. Die humane Wildtyp-ALOX15 zeigte eine thermische Denaturierungskurve mit zwei thermodynamischen Gleichgewichtszuständen (2-Phasenübergang; $N \leftrightarrow D$), wobei der Umkehrpunkt (Schmelztemperatur) bei 45-46 °C lag (Abb. 3.5. B). Dagegen konnte für die Gly422Glu Variation kein echter thermischer 2-Phasenübergang beobachtet werden (Abb. 3.5. B). Um die thermodynamischen Denaturierungsparameter zu bestimmen, wurde die Entfaltung der beiden Enzymvarianten bei steigenden Konzentrationen von Guanidiniumchlorid (GuaHCl) untersucht und die resultierenden Änderungen in den CD- und Fluoreszenzspektren aufgenommen (s. Abb. 3.5. C). Auf Grundlage der experimentellen Rohdaten haben wir für die chemische Denaturierung des Wildtypenzym und der Gly422Glu Mutante die thermodynamischen Parameter für einen 3-Phasenübergang ($N \leftrightarrow I \leftrightarrow D$) berechnet (s. Tab. 3.9.). Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit bereits für andere LOX-Isoformen veröffentlichten Ergebnissen (Sudharshan *et al.*, 1999; Di Venere *et al.*, 2013).

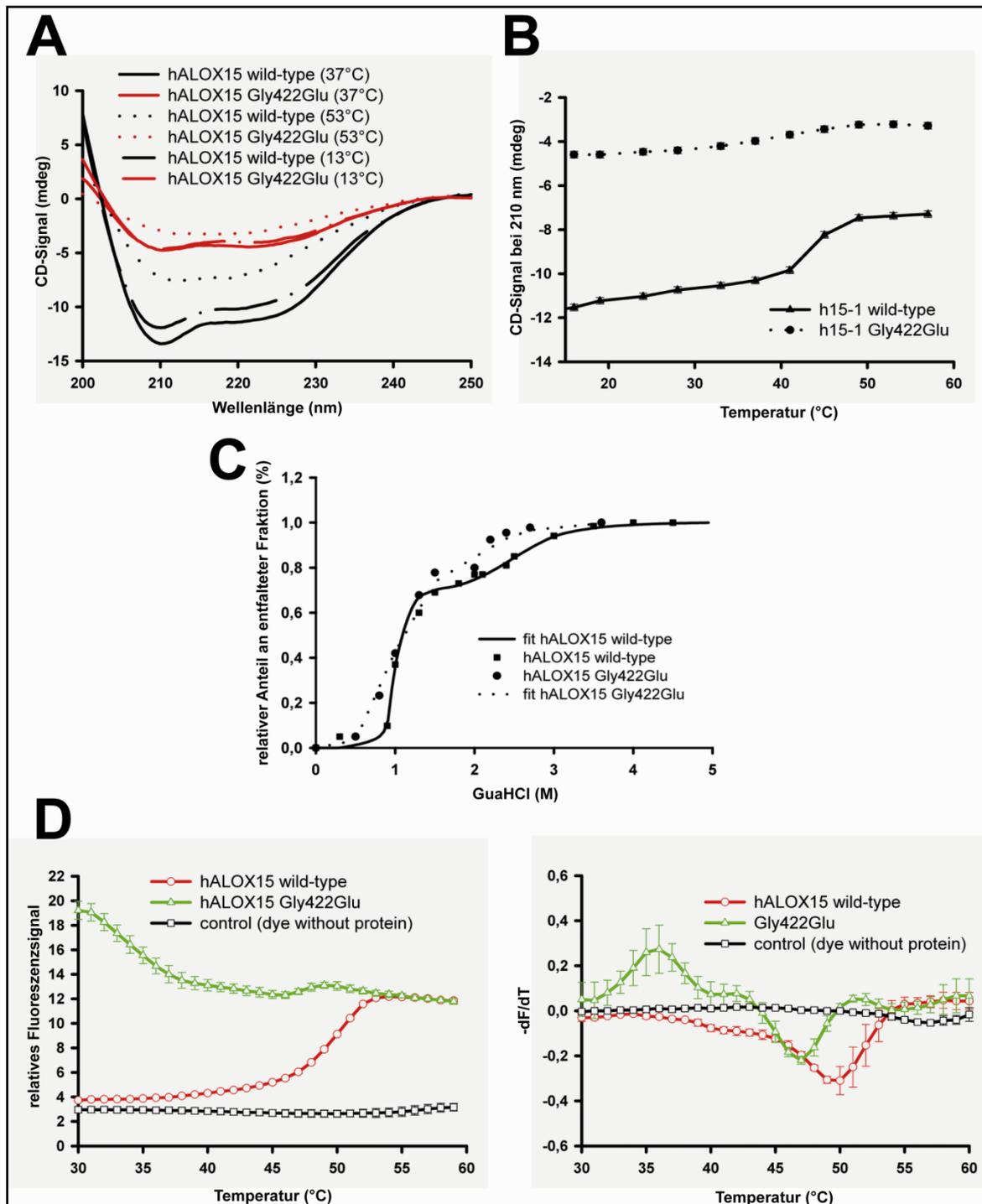


Abb. 3.5.: Zusammenfassung der biophysikalischen Charakterisierung des hALOX15 Wildtyps sowie der Gly422 Glu Variation. (A) CD-Spektren von hALOX15 Wildtyp sowie der Gly422Glu Mutante bei verschiedenen Temperaturen (B) thermische Denaturierungskurve hALOX15 Wildtyp und Gly422Glu Mutante (CD Signal 210 nm vs. Temperatur) (C) Thermodynamische Entfaltung des hALOX15 Wildtyp als Funktion des chemischen Denaturanz Guanidiniumchlorid (GuaHCl) (D) thermal shift assay von hALOX15 Wildtyp und Gly422Glu Mutante.

Die Energie die für den ersten thermischen Übergang ($N \leftrightarrow I$) benötigt wird, ist bei der Mutante um etwa 2,5-mal niedriger als für das Wildtypenzym ($\Delta\Delta G_1 = 6$ kcal/mol) und ist zudem mit einer geringeren Änderung der *accessible surface area* des (ΔASA) des Enzyms während seiner Denaturierung (geringere Unterschiede in den Anstiegen von beiden

Übergängen) verknüpft (Courtenay *et al.*, 2000). Dagegen gab es beim zweiten thermodynamischen Übergang keine größeren Unterschiede zwischen hALOX15 Wildtyp und der Gly422Glu Mutante (s. Tab. 3.9.).

hALOX15	N↔I		I↔D	
	ΔG_1 (kcal/mol)	$^a m_1$ (kcal* mol^{-1} * M^{-1})	ΔG_2 (kcal/mol)	$^a m_2$ (kcal* mol^{-1} * M^{-1})
Wildtyp	10,5	10,0	4,0	1,6
Gly422Glu	4,0	3,9	3,5	1,8

Tab. 3.9.: Thermodynamische Denaturierungsparameter für den hALOX15 Wildtyp sowie die Gly422Mutante (a Anstieg der freien Energiekurven in Abb. 3.5. A in kcal* mol^{-1} * M^{-1})

Alternativ dazu untersuchten wir die thermische Denaturierung von Wildtyp und hGly422Glu Mutante mit Hilfe eines *thermostability shift Assays* (s. Material und Methodenteil). Analog zu den CD-Messungen konnte auch hier die thermische Denaturierung des Wildtypenzym als 2-Phasenübergang (N↔D) mit einem nativen (30 °C) und einem denaturierten Zustand (Plateau 50-60 °C) beschrieben werden. Dabei entspricht der Umkehrpunkt der ersten negativen Ableitung der Schmelztemperatur (T_m) des Enzyms, welcher mit 50 °C relativ gut mit dem für die CD-Messungen erhaltenen Wert (45-46 °C) übereinstimmt.

Zsfg. Die katalytische Inaktivität der Gly422Glu Variation der hALOX15 ist auf mutationsinduzierte Veränderung der Globalstruktur des Enzyms zurückzuführen.

3.2.2 Gly422 liegt in der räumlichen Nähe zum aktiven Zentrum und bildet eine polare Wechselwirkung mit Asp415.

In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, warum der Gly422Glu Austausch zu einer Fehlfaltung des Enzyms führt. Für diese Untersuchungen wurde auf der Basis der rabALOX15 Kristallstruktur (PDB: 2P0M) die mögliche Funktion des hALOX15 Gly422 Restes diskutiert. Das ist möglich, da die hALOX15 und rabALOX15 eine Sequenzhomologie von > 80 % aufweisen. Um Verwechslungen zwischen den Resten von beiden Enzymen zu vermeiden werden im Folgenden die Reste der Kaninchen ALOX15 und des humanen Ortholog mit den Präfixen „r“ bzw. „h“ vermerkt. Die strukturelle Analyse ergab dabei, dass sich der rGly423 (Gly422 in hALOX15) in unmittelbarer räumlicher Nähe zu einer der bekannten Positionsspezifitätsdeterminanten rIle418 (Ile417 in hALOX15) befindet. Mutationen an dieser Stelle haben einen Einfluss auf die Positionsspezifität verschiedener

ALOX15-Isoformen in unterschiedlichen Spezies (Sloane *et al.*, 1991; Sloane *et al.*, 1995; Borngräber *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 2010).

rGly423 (rabALOX15) ist allerdings nicht direkt in der Substratbindetasche gelegen, sondern befindet sich in einer *loop*-Region die zwei α -Helices verbindet, wobei in einer der Helices das rIle418 lokalisiert ist. Dabei interagiert rGly423 über polare Wechselwirkung mit rAsp416, wodurch das aktive Zentrum möglicherweise stabilisiert wird. Der Abstand zwischen beiden Bindungspartnern beträgt 2,6 Å, was eine geeignete Distanz für eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung darstellt (Jeffrey *et al.*, 1997). Aufgrund seiner räumlichen Nähe zu funktionell wichtigen Aminosäureresten erscheint es daher möglich, dass ein Gly-zu-Glu-Austausch an dieser Stelle eine starke Beeinträchtigung der Enzymstruktur zur Folge hat. Es bleibt nun die Frage offen, ob die Zerstörung einer polaren Wechselwirkung die partielle Fehlfaltung des Enzyms bewirkt oder ob es da möglicherweise noch andere Ursachen gibt.

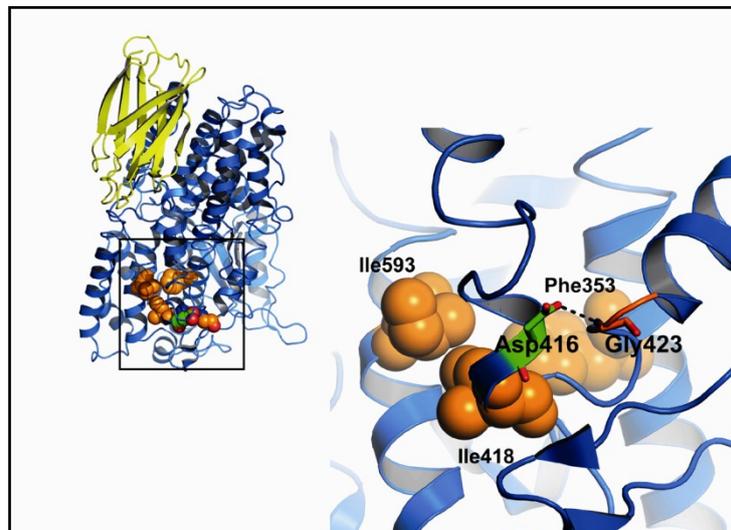


Abb. 3.6.: Darstellung des aktiven Zentrums von rabALOX15. Der rGly423 Rest befindet sich in räumlicher Nähe zur Positionsspezifitätsdeterminante rIle418 (Sloane) und interagiert mit rAsp416 über eine polare Wechselwirkung. Des Weiteren sind die zwei anderen bekannten Positionsspezifitätsdeterminanten rPhe353, rIle593 (Borngräber I + II) für das ALOX15-Enzym dargestellt. Die Aminosäurereste rGly423 und rAsp416 sind in stick-Form dargestellt und entsprechend den Elementen gefärbt (Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot, Stickstoff blau), während die Positionsdeterminanten als orangefarbene Kugeln zu erkennen sind.

Zsfg. rGly423 der rabALOX15 befindet sich in einer Schleifenregion, die zwei α -Helices miteinander verbindet. Eine dieser Helices enthält die Positionsdeterminante rIle418 und trägt damit zum aktiven Zentrum bei. Die Struktur des aktiven Zentrums wird dabei über eine polare Wechselwirkung zwischen rGly423 und rAsp416 stabilisiert.

3.2.3 Verschiedene hALOX15 Gly422 Mutationen bewirken einen Verlust der enzymatischen Aktivität und verursachen eine partielle Fehlfaltung.

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Inaktivität der hGly422Glu Variation auf eine partielle Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist. In der Kristallstruktur der rabALOX15 (PDB: 2P0M) interagiert rGly423 (hGly422) mit rAsp416 (hAsp415) über eine polare Wechselwirkung, wodurch das aktive Zentrum stabilisiert wird. Um nun den Einfluss der polaren Interaktion zwischen Glycin (hGly422) und Aspartat (hAsp415) auf die enzymatische Funktion zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten an beiden Aminosäureresten charakterisiert. Eine mögliche Ursache für die Fehlfaltung der hGly422Glu Mutante könnte zum Beispiel sein, dass es zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Seitenketten von Aspartat (hAsp415) und Glutamat (hGlu422) kommt. Weiterhin ist es denkbar, dass das Einfügen eines relativ großen Seitenkettenrestes an dieser Position (hGly422) zu sterischen Behinderungen mit benachbarten Aminosäureresten führt. Auch das könnte eine mögliche Ursache für die partielle Fehlfaltung sein. Um zu zeigen, ob die Ladung oder die Größe der natürlich vorkommenden hGly422Glu Variation die Ursache für dessen katalytische Inaktivität ist, wurde der Einfluss einer unpolaren Mutation mit ähnlicher Größe (Leu) sowie einer anderen potenziell negativ geladenen Aminosäure (Asp) an dieser Stelle untersucht. Dabei hatten beide Mutanten (hGly422Leu, hGly422Asp) zwar die gleiche Positionsspezifität wie das Wildtypenzym (s. Abb. 3.7. A), allerdings war ihre katalytische Aktivität erheblich reduziert (s. Tab. 3.10.). Ähnlich wie bei der natürlich vorkommenden hGly422Glu Variation hatten die beiden Mutanten bereits unter nativen Bedingungen (30 °C) eine erhöhte Affinität zum Fluoreszenzfarbstoff, was auf strukturelle Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym hindeutet. Dabei scheinen die strukturellen Unterschiede für die negativ geladenen Mutanten (Asp, Glu) etwas stärker zu sein als die für den hGly422Leu Austausch (s. Abb. 3.7. B). Dagegen liefert die andere natürlich vorkommende hALOX15 Variation an dieser Stelle (hGly422Arg, rs147238486) ein ähnliches Fluoreszenzsignal bei 30 °C wie der Wildtyp weshalb diese Mutante wohl nur geringere strukturelle Veränderungen verursacht. Mit Ausnahme von hGly422Glu für die kein thermischer 2-Phasenübergang beobachtet werden konnte, besaßen die anderen analysierten Mutanten (hGly422Asp, hGly422Leu, hGly422Arg) eine gegenüber dem Wildtypenzym um 2-3 °C erniedrigte Schmelztemperatur (T_m). Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich dabei um destabilisierende Mutanten handelt (s. Tab. 3.10.). Zudem wurde noch der Einfluss von kleineren, weniger raumfordernden Aminosäuren (Ala, Ser) an dieser Position untersucht. Die strukturellen und funktionellen Konsequenzen dieser Mutationen waren ähnlich wie bei den oben beschriebenen Austauschen. Deshalb wird auf eine genauere Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit verzichtet.

Durch *in silico* Experimente sollte nun gezeigt werden, was die molekulare Ursache für den Verlust der enzymatischen Aktivität der verschiedenen hGly422 Mutanten war.

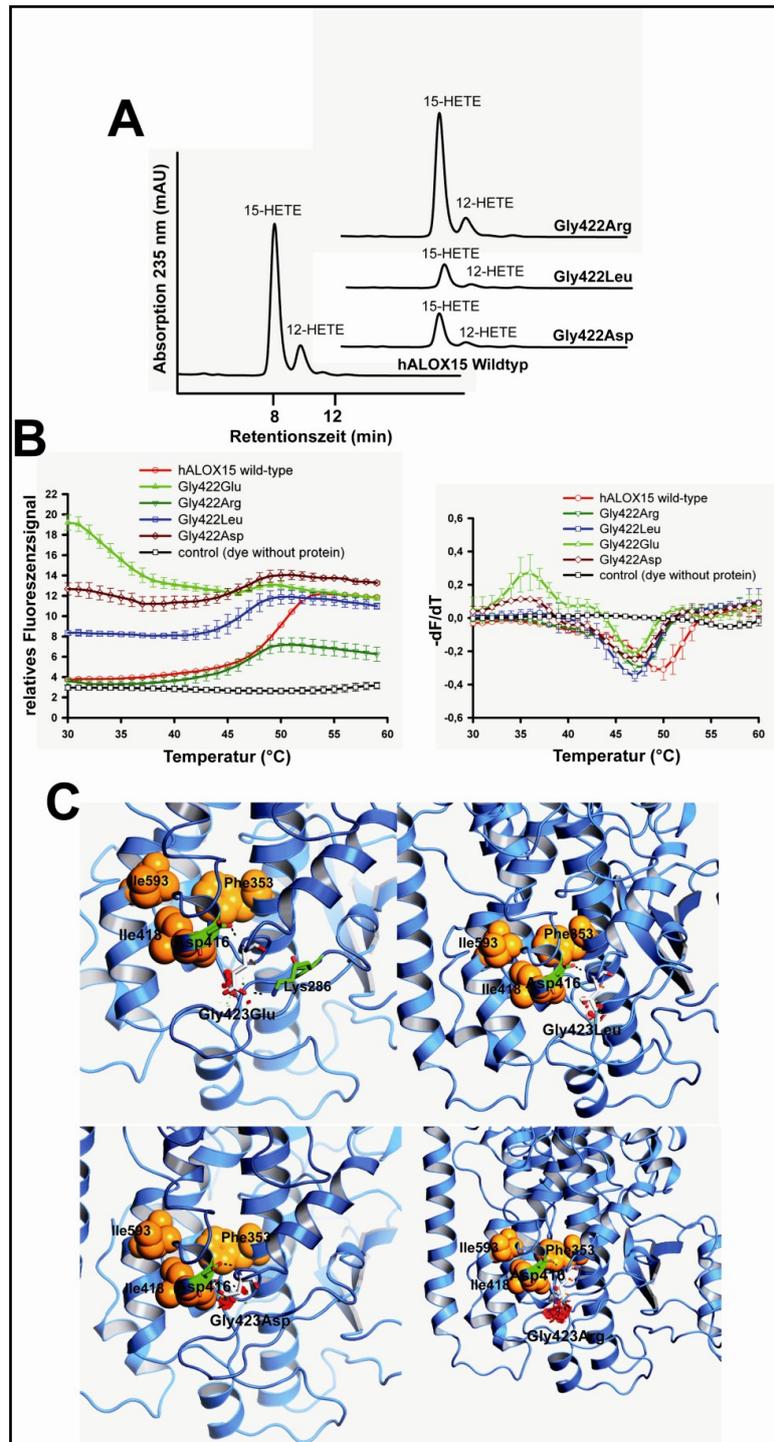


Abb.3.7.: Charakterisierung verschiedener hALOX15 Gly422 Mutationen. (A) RP-HPLC Spektren hALOX15 und hGly422 Mutanten (B) Thermostabilität von hALOX15 Wildtyp und verschiedenen hGly422 Mutanten (C) Strukturelle Effekte von *in silico* Mutationen an rGly423 (hGly422). Die Positionsspezifitätsdeterminanten (rPhe353, rIle418, rIle593) sind als orangene Kugeln zu erkennen, während rAsp416 sowie rGly423 in stick-form (Kohlenstoff grün, Sauerstoffatom rot, Stickstoff blau) dargestellt sind. Die durch die Mutation entstehende sterische Behinderung ist als rote Punkte angedeutet.

Dafür wurde die rabALOX15 an der korrespondierenden Position (rGly423) mutiert und die daraus entstandenen Strukturen energetisch minimiert. Dabei zeigte die strukturelle Analyse, dass alle Mutationen bei rGly423 Position zu sterischen Behinderungen mit in der Umgebung befindlichen Aminosäuregruppen führen (s. Abb. 3.7 C). Diese sterischen Effekte könnten die molekularen Ursachen für den Verlust der enzymatischen Aktivität und die partielle Fehlfaltung der meisten hGly422 Mutanten sein (s. Abb. 3.7.C). Warum die hGly422Arg Variation keine so starken strukturellen Effekte aufwies, konnte mit *in silico* Experimenten nicht begründet werden, da in den *in silico* Experimenten auch diese Mutation zu sterischen Komplikationen mit den benachbarten Aminosäuren führte (s. Abb. 3.7. C).

Zsfg. Verschiedene Mutationen an hGly422 führen zum Verlust der katalytischen Aktivität, was auf eine Destabilisierung und partielle Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist. *In silico* Untersuchungen ergaben, dass die Fehlfaltung wahrscheinlich auf sterische Behinderungen mit umliegenden Aminosäureresten zurückzuführen ist.

3.2.4 Mutationen an Asp415 haben geringere funktionelle Effekte.

Nachdem mit experimentellen und *in silico* Methoden gezeigt werden konnte, dass Mutationen an hGly422 zu einer Fehlfaltung und Verringerung der enzymatischen Aktivität führten, sollte nun der Einfluss des potenziellen Interaktionspartners rAsp416 (hAsp415) auf die enzymatische Funktion untersucht werden. Dafür wurde der Aspartatrest zunächst gegen eine unpolare Aminosäure (Valin) ausgetauscht, um die für die polare Interaktion wichtige Carboxylgruppe zu entfernen. Zudem sollte gezeigt werden, dass der Erhalt der negativ geladenen Carboxylgruppe durch Einfügen einer konservierten Mutation (Glutamat) zu einem Erhalt der enzymatischen Funktion führte. Beide Mutationen führten zu katalytisch aktiven Enzymvarianten. Die Positionsspezifität des Enzyms wurde durch die beiden Mutationen (hAsp415Val, hAsp415Glu) nicht wesentlich beeinflusst (s. Abb. 3.8. A). Die relative spezifische Aktivität variierte zwischen 36 und 97 % (bezogen auf den Wildtypenzym, s. Tab. 3.10.). Die thermischen Denaturierungskurve der hAsp415Val Mutante unterschied sich im Gegensatz zur Kurve der hGly422 Mutanten nur geringfügig vom Wildtyp, was für einen geringen strukturellen Einfluss der Mutation sprach (s. Abb. 3.8. B). Dagegen hatte die hAsp415Glu Mutante schon bei niedrigen Temperaturen (30 °C) eine erhöhte Affinität zum Fluoreszenzfarbstoff, was ein Indiz für strukturelle Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp ist. Dennoch hatten diese einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die enzymatische Aktivität (s. Tab. 3.10.), was ein wesentlicher Unterschied zu den Mutanten an der hGly422 Position ist. Insgesamt hatten beide Mutationen an der hAsp415 Position analog

zu den hGly422 Mutanten einen destabilisierenden Einfluss da alle Varianten eine im Vergleich zum Wildtyp um 2-3 °C reduzierte Schmelztemperatur aufwiesen (s. Tab. 3.10.).

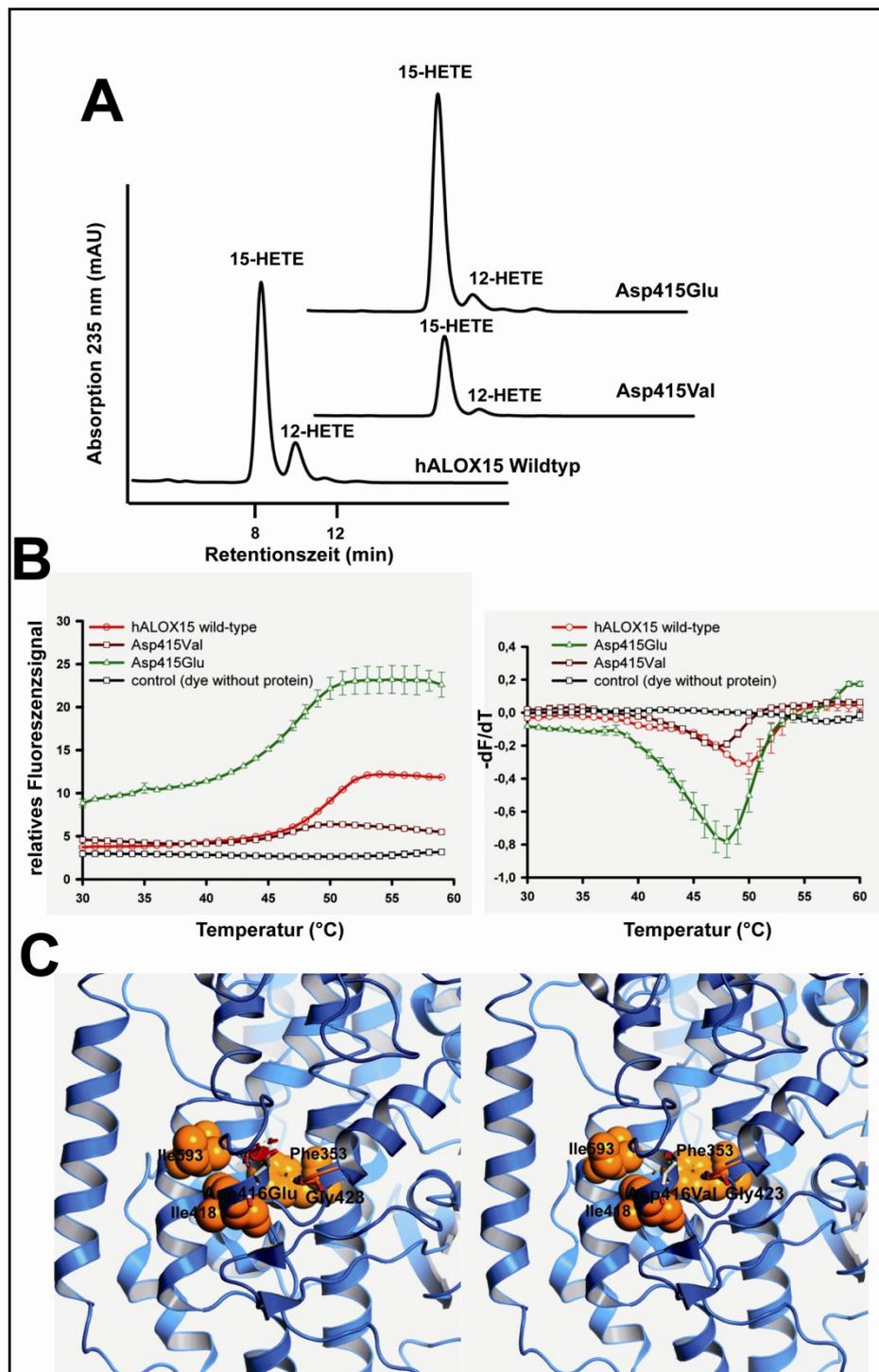


Abb.3.8.: Charakterisierung verschiedener hALOX15 Asp415 Mutationen. (A) RP-HPLC Spektren hALOX15 und hGly422 Mutanten (B) Thermostabilität von hALOX15 Wildtyp und verschiedenen hGly422 Mutanten (C) Strukturelle Effekte von *in silico* Mutation an rAsp416 (hAs415). Die Positionsspezifitätsdeterminanten (rPhe353, rIle418, rIle593) sind als orangene Kugeln zu erkennen, während rAsp416 sowie rGly423 in stick-form (Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot, Stickstoff blau) dargestellt sind. Die durch die Mutation entstehende sterische Behinderung ist als rote Punkte angedeutet.

Analog zu den hGly422 Mutanten sollten die molekularen Effekte der hAsp415 Mutationen (Val, Glu) mit *in silico* Experimenten untersucht werden. Die strukturelle Analyse ergab, dass die rAsp416Glu Mutation zu sterischen Behinderungen mit umliegenden Aminosäuren führten, was eine mögliche Ursache für die strukturellen Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym sein könnte. Dagegen verursachte die Asp416Val Mutation *in silico* keine wesentlichen strukturellen Veränderungen, was in guter Übereinstimmung mit den thermodynamischen Messungen ist (s. Abb. 3.8. C).

hALOX15	15-HETE (%)	rel. Aktivität (%)	Schmelztemperatur T_m (°C)	ΔT (°C)
Wildtyp	83 ± 4	100 ± 1	50,0 ± 0,6	0
Gly422Glu	83 ± 4	< 1	n.d.	n.d.
Gly422Arg	89 ± 7	36 ± 3	47,8 ± 0,3	-2,2
Gly422Leu	87 ± 1	14 ± 1	47,4 ± 0,4	-2,6
Gly422Asp	91 ± 1	18 ± 1	47,1 ± 0,1	-2,9
Asp415Glu	91 ± 1	97 ± 1	47,2 ± 0,3	-2,8
Asp415Val	91 ± 1	34 ± 5	47,5 ± 0,5	-2,5

Tab. 3.10.: Zusammenfassung der Produktspezifitäten, relativen Aktivitäten und Schmelztemperaturen von verschiedenen hALOX15 Gly422 und Asp415 Mutationen. Gereinigte hALOX15 Wildtyp und verschiedene Mutationen wurden mit Arachidonsäure entsprechend dem Material- und Methodenteil inkubiert (n=4-5). Die Menge an gebildetem 15-HETE wurde für jede Probe quantifiziert, wobei die 15-HETE-Bildung des Wildtyps auf 100 % gesetzt wurde. Die thermischen Denaturierungen wurden entsprechend dem Material- und Methodenteil durchgeführt, wobei der Wendepunkt der ersten negativen Ableitung die Schmelztemperatur (T_m) der Enzymvariation darstellt.

Zsfg. Verschiedene Mutationen an hAsp415 führen zwar auch zu einer Destabilisierung des Enzyms, wobei die strukturellen und funktionellen Effekte insgesamt deutlich schwächer waren, als die für die hGly422 Mutanten. Diese Daten deuten auf eine geringere Bedeutung dieser Aminosäure für die Funktionalität des Proteins hin.

3.2.5 Ist der konservierte Glycinrest auch von funktioneller Bedeutung für andere LOX-Isoformen?

Sämtliche natürlich vorkommende und unnatürliche Mutationen an der hGly422 Position von hALOX15 führten zu einem Verlust der katalytischen Aktivität. Strukturmodellierungen deuteten darauf hin, dass der Glycinrest über eine polare Wechselwirkung mit einem Aspartat das aktive Zentrum stabilisiert, was für die katalytische Effizienz der hALOX15 essentiell zu sein scheint. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, in wie weit diese polare Interaktion in der LOX-Genfamilie konserviert ist und ob Mutationen an den

korrespondierenden Aminosäurepositionen anderer LOX-Isoformen ähnliche funktionelle Effekte wie bei der hALOX15 verursachten. Ein multiples Aminosäuresequenzalignment verschiedener LOX-Isoformen unterschiedlicher tierischer Spezies ergab, dass die beiden Interaktionspartner (Gly, Asp) in allen untersuchten ALOX5, ALOX12 und ALOX15-Isoformen konserviert waren. Im Gegensatz dazu fanden sich bei epidermalen LOX-Isoformen (ALOX15B, ALOX12B, ALOXE3) häufig andere Reste an diesen Positionen. Lediglich der Aspartatrest war ALOX15B und ALOXE3 konserviert, während in ALOX12B keiner der beiden Interaktionspartner existiert (s. Abb. 3.10.).

ALOX15B (Homo sapiens)	TRYTLHINTLARELLIVPGQVVD R STGIG I EGFSELIQRNM	446
ALOX15B (Rattus norvegicus)	TRYTLHINTLARELLIAPGKVVD K STGLG I GGFSDLIKRNM	447
ALOX15B (Mus musculus)	IRYTLHINTLARELLVAPGKL I D K STGLG T GGFSDLIKRNM	447
ALOXE3 (Rattus norvegicus)	TRYTLQVNTIARATLLNPDGLVD K V T SIG R RGLIYLMSTGL	481
ALOXE3 (Mus musculus)	TRYTLQVNTIARATLLNPDGLVD K V T SIG R QGLIYLMSTGL	481
ALOXE3 (Homo sapiens)	TRYTLQVNTIARATLLNPEGLVD Q V T SIG R QGLIYLMSTGL	481
ALOX12B (Bos taurus)	TRYTIQINSIGRAVLLNEGGLS A R S M S L G L A G F A E A M V R A L	469
ALOX12B (Homo sapiens)	TRYTVQINSIGRAVLLNEGGLS A K G M S L G V E G F A G V M V R A L	471
ALOX12B (Mus musculus)	TRYNVQINSIGRALLLNKGGLS A R A M S L G L E G F A Q V M V R G L	471
ALOX12B (Rattus norvegicus)	TRYNVQINSIGRALLLNKGGLS A R A M S L G L E G F A Q V M V R G L	471
ALOX12B (Xenopus laevis)	LRYLEINTLARQTLIGPDGF F D Q A V V I G NGGVPVLLARAT	440
ALOX12B (Xenopus tropicalis)	LRYLEINTLARQTLIGPKGL F D Q A V V T G NGGVPVLLARAM	439
ALOX5 (Mus musculus)	VRFTIAINTKAREQLICEYGL F D K A N A T G G G H V Q M V Q R A V	441
ALOX5 (Rattus norvegicus)	VRFTIAINTKAREQLNCEYGL F D K A N A T G G G H V Q M V Q R A V	440
ALOX5 (Homo sapiens)	VRFTIAINTKAREQLICEGL F D K A N A T G G G H V Q M V Q R A M	441
ALOX5 (Bos taurus)	VRFTIAINTKAREQLICEYGL F D K A N A T G G G H V Q M V Q R A M	441
ALOX5 (Canis lupus fam.)	VRFTIAINTKAREQLICEYGL F D K A N A T G G G H V Q M V Q R A M	443
ALOX5 (Danio rerio)	IRFTIAINTKAREQLICEGL F D K A N G T G G G H I E L V Q R S M	441
ALOX15 (Pongo abelii)	LRYLEINVRARTGLVSDMG I F D Q I M S T G G G H V Q L L K Q A G	433
ALOX15 (Homo sapiens)	LRYLEINVRARTGLVSDMG I F D Q I M S T G G G H V Q L L K Q A G	433
ALOX15 (Macaca mulatta)	LRYLEINVRARTGLVSDMG V F D Q V V S T G G G H V E L L R R A G	433
ALOX15 (Oryctolagus cuniculus)	LRYLEINVRAR N GLVSD F G I F D Q I M S T G G G H V Q L L Q Q A G	434
ALOX15 (Mus musculus)	LLYTMEINVRAR S DL I S E R G F F D K V M S T G G G H L D L L K Q A G	434
ALOX12 (Homo sapiens)	IRYTMEINTRARTQL I S D G G I F D K A V S T G G G H V Q L L R R A A	433
ALOX12 (Bos taurus)	IRYTMEINTRARTQL I S D G G I F D K A V S T G G G H V H L L R R A L	433
ALOX12 (Mus musculus)	IRYTMEINTR S R T QL I S D G G I F D Q V V S T G G G H V Q L L T R A V	433

Abb. 3.9.: Multiples Sequenzalignment von LOX-Isoformen verschiedener Spezies. Die potenziellen Interaktionspartner (Gly, Asp) scheinen in verschiedenen ALOX5, ALOX12 und ALOX15-Isoformen weitgehend konserviert zu sein, während sie in den epidermalen LOX-Isoformen nicht konserviert sind (rot Aspartat + Glycin; blau Sloane Positionsspezifitätsdeterminanten).

Die strukturelle Analyse von drei weiteren LOX-Isoformen ergab, dass die Gly-Asp-Interaktion auch in anderen LOX-Kristallstrukturen (5-LOX, 12-LOX) konserviert ist. In der Kristallstruktur für die hALOX5 (PDB: 3O8Y) existiert dabei eine polare Wechselwirkung

zwischen Asp422 und Gly429 (entspricht hALOX15 Asp415 + Gly422), während in der hALOX12 eine Interaktion zwischen Asp415 und Gly422 (entspricht hALOX15 Asp415 und Gly422) zu erkennen ist (s. Abb. 3.10. A + B). Der funktionell wichtige Glycinrest scheint in den verschiedenen epidermalen LOXn nicht konserviert zu sein, wobei in der hALOX15B das Glycin durch ein Isoleucin substituiert ist (s. Abb. 3.10. C). Dennoch ist einem in einem hALOX15B Strukturmodell basierend auf der Struktur der hALOX5 zu erkennen, dass die polare Wechselwirkung möglicherweise auch in epidermalen LOXn konserviert sein könnte (s. Abb. 3.10.). Wenn dies der Fall wäre, sollte der Ile-zu-Glu Austausch ähnliche strukturelle und funktionelle Konsequenzen wie der Gly-zu-Glu Austausch bei den anderen LOX-Isoformen hervorrufen.

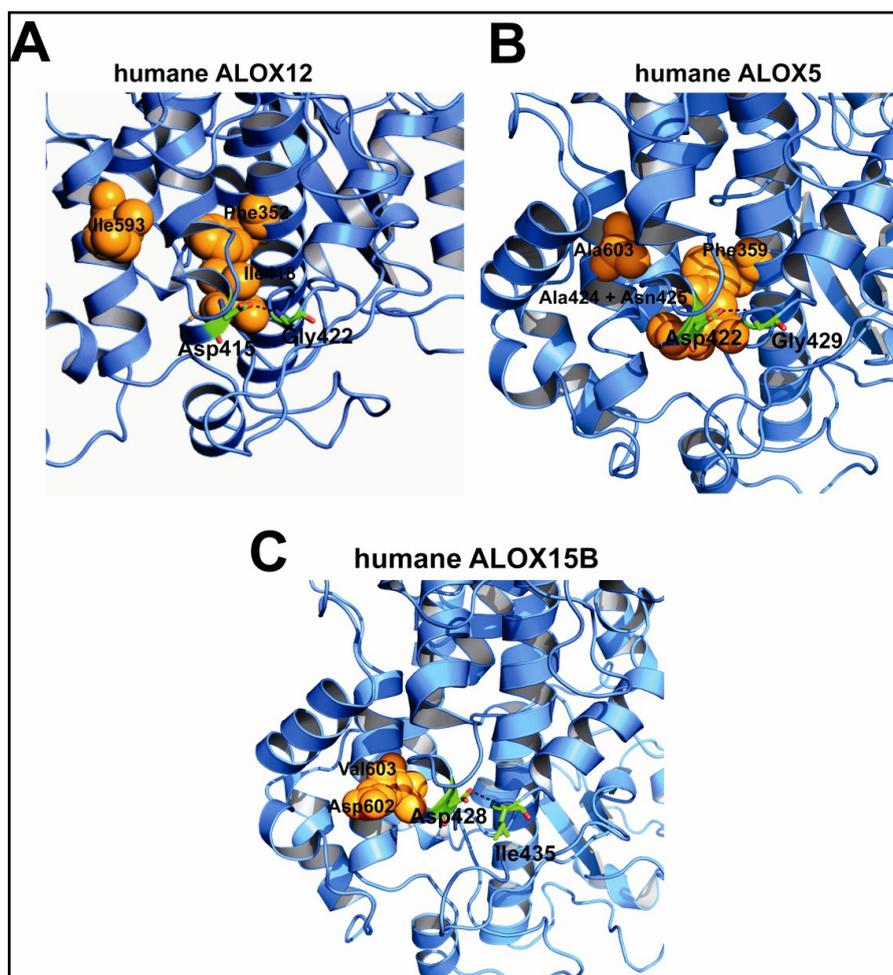


Abb. 3.10.: Konservierung der Asp-Gly-Interaktion in unterschiedlichen Säugetier-LOXn. (A) Modell der ALOX12 des Menschen (hALOX12) (B) Kristallstruktur der hALOX5 (PDB: 3O8Y) (C) Modell der hALOX15B basierend auf hALOX5 Kristallstruktur (PMDB: PM0078035). In der hALOX5 sowie der hALOX12 scheint die Asp-Gly-Interaktion konserviert zu sein, während das Modell der hALOX15B die Möglichkeit, dass das Glycin (Gly) durch ein größeres Isoleucin (Ile) als Interaktionspartner substituiert werden kann. Für alle drei LOX-Isoformen sind die jeweiligen Positions determinanten der verschiedenen LOX-Isoformen als orangene Kugeln dargestellt, während die putativen Interaktionspartner (Aspartat, Glycin bzw. Isoleucin) in stick-Form zu erkennen sind (Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot, Stickstoff blau).

Basierend auf den Mutagenesestudien der hALOX15 nahmen wir an, dass eine ähnliche Mutagenese-strategie für hALOX5 und hALOX12 ebenfalls zu inaktiven Enzymspezies führen sollte. Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, stellten wir die korrespondierenden Gly-zu-Glu Mutanten her und analysierten die katalytische Aktivität und die Produktspezifität der Enzyme. Die Ergebnisse zeigten, dass der Gly422Glu Austausch in der hALOX12 zu einer Verringerung der katalytischen Aktivität um ca. 70 % führte, wobei die Produktspezifität des Enzyms nicht beeinflusst wurde (s. Tab. 3.11.). Eine ähnliche Mutagenese-strategie bei der hALOX5 führte zu einer um ca. 50 % verringerten katalytischen Aktivität, wobei sich das Produktspektrum durch die Mutation von einem 5S-lipoxygenierendem zu einem überwiegend 8S- und 12R-H(p)ETE produzierendem Enzym verschob (s. Tab. 3.11.).

hALOX-Isoform	8-HETE (%)	5-HETE (%)	12-HETE (%)	15-HETE (%)	rel. Aktivität (%)
hALOX12					
Wildtyp	-	-	> 99	-	100 ± 33
Gly422Glu	-	-	> 99	-	30 ± 8
hALOX5					
Wildtyp	12 ± 4	76 ± 4	12 ± 4	-	100 ± 3
Gly429Glu	48 ± 3	4 ± 3	52 ± 3	-	53 ± 5
hALOX15B					
Wildtyp	-	-	-	> 99	100 ± 37
Ile435Glu	-	-	-	> 99	53 ± 8

Tab.3.11.: Einfluss der Gly-zu-Glu Mutationen in verschiedenen LOX-Isoformen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=4-6) für die jeweiligen unabhängigen Experimente. Die relativen großen Standardabweichungen sind auf die unterschiedlichen analysierten bakteriellen Klone zurückzuführen.

Der funktionell wichtige Glycinrest ist in den verschiedenen epidermalen LOXn nicht konserviert (s. Abb. 3.9.). Dennoch ist in einem Strukturmodell der hALOX15B zu erkennen, dass die polare Wechselwirkung möglicherweise auch in epidermalen Lipoxygenasen konserviert ist (s. Abb. 3.10.). In diesem Fall sollte der Ile-zu-Glu bei der hALOX15B ähnliche Effekte induzieren wie der Gly-zu-Glu Austausch bei den anderen LOX-Isoformen. Die Ile435Glu Mutante der hALOX15B verringerte analog zu den anderen LOXn die enzymatische Aktivität des Enzyms (rel. Aktivität ca. 50 %), allerdings führte die Mutation zu keinerlei Veränderung in der Produktspezifität der Arachidonsäureoxygenierung (s. Tab. 3.11.).

Zsfg. Die funktionell wichtige Gly-Asp-Interaktion ist in verschiedenen ALOX5, ALOX15, ALOX12-Isoformen konserviert. In epidermalen LOXn ist der Glycinrest hingegen nicht konserviert. Dennoch scheint in der hALOX15B eine polare Interaktion zwischen den entsprechenden Aminosäuren zu bestehen, was durch Aktivitätsmessungen von entsprechenden Mutanten belegt werden konnte. Diese Position in der Primärstruktur scheint daher für die meisten LOX-Isoformen von funktioneller Bedeutung zu sein.

4 Diskussion

4.1 Einzelnukleotidvariationen (SNP, Mutationen) in humanen Lipoxygenasen und anderen Enzymen des Lipoxygenasestoffwechsel

Säugetier-LOXn und ihre Reaktionsprodukte haben wichtige Funktionen bei Reifungs- und Differenzierungsprozessen (Steinhilber *et al.*, 1993; Kamitani *et al.*, 1998) normaler Zellen, sind aber auch bei der Pathogenese von entzündlichen (Fanning *et al.*, 2013), kardiovaskulären (Riccioni *et al.*, 2012), neurodegenerativen (Manev *et al.*, 2011) und hyperproliferativen Erkrankungen (Li *et al.*, 2005; Funk *et al.*, 2006) beteiligt. Obwohl die genauen Mechanismen ihrer pathophysiologischen Wirkungen noch nicht vollständig geklärt sind, lieferten Experimente mit *knockout* Mäusen überzeugende Hinweise für die Rolle von LOXn. Als lipidperoxidierende Enzyme sind sie an der Bildung freier Radikale beteiligt und haben daher eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase (O'Donnell *et al.*, 2003; Bochkov *et al.*, 2010). Da der zelluläre Redoxstatus ein wichtiger Regulator für die Genexpression und die Koordination anderer grundlegender Prozesse des Zellstoffwechsels ist, kommt ihm eine zentrale Rolle bei der Steuerung zellulärer Funktionen zu. Daher sollten kodierende nicht-synonyme genetische Variationen, die die Funktion von humanen Lipoxygenasen sowie anderen Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsels stark beeinflussen, einen funktionellen Effekt auf den zellulären Phänotyp haben. Ob und in wie weit genetische Variationen potenziell dazu in der Lage wären, den zellulären LOX-Stoffwechsel zu beeinflussen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

4.1.1 Die funktionellen Effekte von nicht-synonymen SNPs in Enzymen des LOX-Stoffwechsels sind meist gering.

Um die funktionellen Konsequenzen der natürlich vorkommenden Mutationen in Enzymen und Rezeptoren der Arachidonsäurekaskade abzuschätzen, wurden die in der 1000 Genom Datenbank veröffentlichten genetischen Einzelnukleotidvariationen in 23 unterschiedlichen Proteinen zusammengefasst, wobei bis zum heutigen Tage mehr als 1200 solcher Variationen publiziert worden sind (www.1000genomes.org). Lediglich 35 von ihnen haben allerdings eine Allelfrequenz von $> 1\%$, was sie *per definitionem* zu SNPs macht (s. Tab. 4.1.). Bei allen anderen in der Datenbank erwähnten Variationen handelt es sich hingegen um seltene Mutationen. Wie bereits in Abschnitt 1.3. diskutiert, sind SNPs nicht gleichmäßig über das Genom verteilt, sondern treten gehäuft in nicht-kodierenden DNA-Regionen auf. Ähnlich verhält es sich auch mit der Verteilung von SNPs in den kodierenden Regionen der Gene. Auch deren Verteilung scheint heterogen zu sein. Die strukturelle Analyse in vier LOX-Isoformen ergab dabei, dass es sich bei den meisten funktionell analysierten nicht-

synonymen SNPs um Nukleotidaustausche handelt, die zur Mutation oberflächenexponierter Aminosäurereste führen. Diese haben zumeist keinen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum und daher auch keinen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität der LOX-Isoformen. Lediglich der bereits bekannte enzymatisch inaktive hALOX15 Thr560Met SNP (rs34210653) hatte einen starken funktionellen Effekt, was höchstwahrscheinlich auf seine räumliche Nähe zu einer der Positionsdeterminanten des Enzyms (hIle417) zurückzuführen ist (Assimes *et al.*, 2009; Schurmann *et al.*, 2011; Horn *et al.*, 2013 I + II). Dagegen hat der hALOX15 Pro617Ser SNP (rs41432647) vergleichsweise geringe Effekte auf die enzymatische Funktion (s. 3.1.1.).

Ähnlich verhält es sich mit dem hALOX5 Glu254Lys SNP (rs2228065), der in einer klinischen Studie mit einem erhöhten Risiko für Asthma bronchiale assoziiert worden ist (Bai *et al.*, 2008). Bei Trägern des mutierten Allels konnte in anderen Studien kein erhöhtes Risiko für Osteoporose bzw. das Mammakarzinom nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2008; Foroud *et al.*, 2008). Die Zuordnung der mutierten Aminosäure (Glu254) in der Raumstruktur zeigte, dass der SNP an der Oberfläche des hALOX5 Enzyms lag, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass er nur geringe funktionelle Unterschiede im Verhältnis zum Wildtypenzym aufwies. Die Enzymvariation hatte zwar eine um etwa 40 % verringerte katalytische Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym (s. 3.1.2.), allerdings war die Produktspezifität des Enzyms nicht durch den SNP beeinflusst. Eine der möglichen Ursachen für die verringerte enzymatische Aktivität könnte dabei eine SNP-induzierte Destabilisierung des Enzyms sein, wobei diese Arbeitshypothese mit verschiedenen thermodynamischen Methoden (CD, Fluoreszenz, *thermal shift assay*) untermauert werden könnte. Leider gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die hALOX5 Enzympräparationen auf eine Reinheit von > 90 % zu bringen, wodurch Untersuchungen zur thermischen Inaktivierung der Proteine möglich geworden wären. Dennoch bleibt festzuhalten, dass der hALOX5 Glu254Lys SNP immer noch eine 60 %ige Restaktivität aufwies und damit im Vergleich zum hALOX15 Thr560Met eine funktionell aktive Enzymvariation darstellt. Homo- und heterozygote Merkmalsträger sollten damit nur geringe funktionelle Unterschiede im Vergleich zu homozygoten Wildtypallelträgern aufweisen, die *in vivo* jederzeit durch eine geringgradige Hochregulation der Expression des mutierten Gens ausgeglichen werden könnte. Ähnlich geringe Effekte auf die Enzymfunktion wiesen die nicht-synonymen SNPs im hALOX12 Gen auf (s. 3.1.3.). Der in klinischen Studien mit einem erhöhten Risiko für Osteoporose (Harslof *et al.*, 2011), Mammakarzinom (Prasad *et al.*, 2011) und Schizophrenie (Kim *et al.*, 2010) assoziierte hALOX12 Gln261Arg SNP (rs1126667) zeigte nur geringe funktionelle Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym (s. 3.1.3.). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur veröffentlichten Daten von anderen Gruppen (Aleem *et al.*, 2009). Interessanterweise handelt es sich bei diesem SNP um eine genetische Variation, die bereits

im Neandertalergenom sowie im Genom des Denisova-Mensch gefunden wurde. Deshalb kann vermutet werden, dass dieser SNP bereits früh in der Entwicklung entstanden ist (Chaitidis *et al.*, 2013; Susan Adel *et al.*, unveröffentlicht). Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass in verschiedenen ALOX12-Sequenzen verschiedener Primaten und anderer Wirbeltiere sowohl das Arginin (Gorilla, Pavian, Bonobo, Rhesusaffe, Weißbüschelaffe, Rind) als auch das Glutamin (Mensch, Gibbon, Maus, Ratte) vorkommen (s. Abb. 4.1.). Offensichtlich scheint die Mutation an dieser Stelle keinen besonders großen Effekt auf die Funktionalität des ALOX12 Gens zu haben, weshalb sich evolutionär beide Aminosäuren an dieser Stelle durchgesetzt haben.

Bonobo	FLNGANPMLLRRSTSLPCRLVLPSPGMEEL RA QLEKELQ	269
Gorilla	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL RA QLEKELQ	269
Mensch	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL Q AQLEKELQ	269
Denisova-Mensch	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL RA QLEKELQ	269
Neandertaler	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL RA QLEKELQ	269
Gibbon	FLNGVNPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL Q AQLEKELQ	269
Schimpanse	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL RA QLEKELQ	269
Pavian	FVNGANPMLLRRSTSLPSRLALPSGMEEL RS QLEKELQ	269
Rhesusaffe	FVNGANPMLLRRSTSLPSRLALPSGMEEL RA QLEKELQ	269
Weißbüschelaffe	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL RT QLERELQ	269
Totenkopffäffchen	FLNGANPMLLRRSASLPSRLVLPSPGMEEL RT QLERELQ	269
Galago	FLNGTNPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGTEEL RA QLDKELQ	269
Maus	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGMEEL Q AQLEKELK	269
Ratte	FLNGANPMLLRRSTSLPSRLVLPSPGTEEL Q AQLEKELK	269
Schwein	FLNGANPMLLRRCTSLPSRLVLSSGMEAL RA QLEKELE	269
Rind	FLNGANPMLLRRCTSLPSRLVLPSPGMEEL RA QLERELQ	269

Abb. 4.1.: Aminosäuresequenzalignment von ALOX12 verschiedener Spezies. Sowohl Arg als Gln sind in der Primärsequenz von ALOX12 (hALOX12 Gln261) von verschiedenen Vertebraten vorhanden, weshalb sich beide Aminosäuren vermutlich koevolutiv an dieser Stelle entwickelt haben ohne einen Effekt auf das ALOX12-Gen zu haben.

Daneben ist mit Asn322Ser (rs434473, Allelfrequenz 34,4 %) ein weiterer häufig vorkommender SNP in der 1000 Genom Datenbank beschrieben worden. Dieser konnte in klinischen Studien mit erhöhtem Risiko für Schizophrenie (Kim *et al.*, 2011) und einem verfrühten Einsetzen der Menopause bei Frauen (Liu *et al.*, 2010) assoziiert werden. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Effekt dieses SNPs auf die Funktionalität des hALOX12-Gen äußerst gering war (s. 3.1.3.). Die Ursache hierfür ist vermutlich, dass es sich bei den beiden hALOX12 SNPs ähnlich wie bei den anderen analysierten SNPs um oberflächenexponierte Aminosäurereste handelt, die keinen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum haben. Aufgrund dieser funktionellen Daten kann nicht so ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass eine kompromittierte Aktivität der hALOX12 für den epidemiologischen Zusammenhang verantwortlich ist. Die molekularen Ursachen für den beobachteten Zusammenhang bleiben deshalb weitgehend unklar.

Die funktionelle Analyse der in epidemiologischen Studien gefundenen nicht-synonymen hALOX15B SNPs bestätigte in weiten Teilen die Ergebnisse anderer hALOX-Gene. Es handelt es sich zwar mit hALOX15B Ile676Val (rs7225107) um den einzigen hALOX SNP der einen der funktionell wichtigen Aminosäurereste (Positions- und Stereoselektivität, Eisenligation, Phosphorylierung etc.) in humanen LOXn beeinflusst, weshalb funktionelle Effekte denkbar wären. Tatsächlich führt die Mutation des C-terminalen Eisenliganden Ile676 zu einer Destabilisierung des gesamten Enzyms um 2,4 °C (s. Tab. 3.6.). Allerdings hatte dies nur einen vergleichsweise geringen Effekt auf die enzymatische Aktivität des Enzyms, wobei das vermutlich darauf zurückzuführen sein sollte, dass sich die räumliche Lage der eisenligandierenden Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure durch den konservativen Seitenkettenaustausch nicht wesentlich verändern sollte (s. Tab. 3.6.). Diese experimentellen Daten passen zu der Beobachtung, dass dieser SNP sowie der hALOX15B His486Arg Austausch (rs9895916) in der epidemiologischen Studie mit keinem unterschiedlichen Risiko für die KHK assoziiert worden ist. Dagegen besaßen hetero- und homozygote Träger des hALOX15B Gln656Arg SNP (rs28395869) ein leicht verringertes Risiko für die KHK (1,5 bzw. 3,7 %, OR 0,8), wobei mit einem $p=0,10$ eine Tendenz in Richtung statistischer Signifikanz zu erkennen war (Sophia Wuest *et al.*, 2013, angenommen). Allerdings wurden im Rahmen dieser Studie lediglich 496 Genome analysiert, weshalb man vermuten könnte, dass diese Anzahl zu klein war um eine statistische Signifikanz zu erreichen. Ein ähnliches Problem war ja auch in einer früheren Studie aufgetreten, in der für den hALOX15 Thr560Met SNP (rs34210653) eine Tendenz in Richtung eines statistisch erhöhten Risikos für die KHK ($p=0,06$) gefunden wurde (Hersberger *et al.*, 2009). In Folgeuntersuchungen sollte der leicht atheroprotektive Charakter des hALOX15B Gln656Arg SNP in anderen Probandenkollektiven bestätigt werden. Allerdings muss man schon kritisch bemerken, dass der Vergleich zwischen den beiden SNPs hinsichtlich ihrer funktionellen Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen schwierig ist. Bei hALOX15 Thr560Met handelt es sich um eine funktionell nachgewiesene *loss-of-function* Mutation des besagten Gens, wobei heterozygote Allelträger dieses SNP ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose hatten, während hALOX15B Gln656Arg *in vitro* keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym hervorbrachte und Träger dieses Allels ein funktionell aktives Gen besitzen (s. 3.1.4.). Offensichtlich scheint die physiologische Rolle dieses sowie der anderen funktionell aktiven SNPs nicht auf Unterschiede in der enzymatischen Funktion des Gens zurückzuführen zu sein, sondern vermutlich auf komplexere noch kaum verstandene zelluläre Prozesse, welche mit der hier verwendeten Methodologie nicht adressiert wurden.

Neben den funktionell untersuchten SNPs in den vier hALOX-Isoformen (hALOX15, hALOX5, hALOX12, hALOX15B), sollten Vorkommen und Verteilung von nicht-synonymen

genetischen Variationen in anderen Genen des LOX-Stoffwechsels untersucht werden. Da die funktionelle Charakterisierung von SNPs in allen diesen Genen den Rahmen dieser Doktorarbeit sprengen würde, wurde für den Großteil der genannten SNPs eine Vorhersage über ihre mögliche Funktionalität mit dem bioinformatischen Programm PolyPhen2 gemacht (Adzhubei *et al.*, 2010). Des Weiteren wurden für die Proteine, für die Strukturdaten vorhanden sind, die strukturelle Lage der bekannten SNPs ermittelt (s. Tab. 4.1.). Dabei scheinen die bioinformatischen Daten in gewisser Weise unsere experimentellen Daten zu bestätigen, da lediglich für den hALOX15 *loss-of-function* SNP Thr560Met (rs34210653) sowie für zwei andere SNPs [(DPEP1 Val104Met, rs73265359); (LTB4R2 Arg80Gln, rs150416614)] durch das Programm PolyPhen2 ein wahrscheinlich funktionell zerstörender Effekt (score > 0,900) vorhergesagt wurde. Das liegt vermutlich daran, dass die meisten der hier genannten SNPs ähnlich wie die funktionell charakterisierten hALOX SNPs oberflächenlokalisiert sind, weshalb man eher geringfügige funktionelle Effekte erwarten sollte (s. Tab. 4.1.).

Gen (UniProt-Code)	SNP (code)	Allel-frequenz (%)	Strukturelle Lage (Oberfläche - OF, Kern - K, aktives Zentrum - AZ)	PolyPhen2 (SNP funktionell ja, nein, vielleicht)	Praktische Ergebnisse (funktionell ja/nein)	Assoziation mit Erkrankung
ALOX15 (P16050)	Thr560Met (rs34210653)	1,5 %	AZ	ja	ja (inaktiv)	Atherosklerose
	Pro617Ser (rs41432647)	1,0 %	OF	nein	nein	-
ALOX5 (P09917)	Glu254Lys (rs2228065)	7,5 %	OF	nein	nein	Asthma bronchiale
ALOX12 (P18054)	Gln261Arg (rs28395860)	38,8 %	OF	nein	nein	Schizophrenie, Mammakarzinom, Osteoporose
	Asn322Ser (rs434473)	34,4 %	OF	nein	nein	Schizophrenie, Menopause
ALOX15B (O15296)	Pro77Ala (rs78230493)	3,2 %	OF	nein	-	-
	Ala311Val (rs148602477)	1,0 %	OF	vielleicht	-	-
	Arg486His (rs9895916)	7,4 %	OF	nein	nein	-
	Arg635Gln (rs61730298)	1,9 %	OF	nein	-	-
	Gln656Arg (rs4792147)	40,3 %	OF	nein	nein	(Atherosklerose)
	Ile676Val (rs7225107)	9,6 %	AZ	vielleicht	nein	-
ALOX12B (O75342)	Pro127Ser (rs72842957)	1,1 %	OF	vielleicht	-	(Ichtyose)
ALOXE3 (Q9BYJ1)	Ile515Val (rs3027205)	3,0 %	K	nein	-	(Ichtyose)

	Arg678Cys (rs143246503)	1,9 %	OF	nein	-	-
PLA2G4 (P47712)	Arg651Lys (rs2307198)	1,5 %	OF	nein	-	-
LTA4H (P09960)	Glu481Asp (rs45630739)	1,6 %	OF	nein	-	-
GGT1 (P19440)	Gly87Val (rs2330842)	3,1 %	K	vielleicht	-	-
	Arg257Cys (rs113647199)	2,2. %	OF	nein	-	-
	Asp361Asn (rs138813205)	2,0 %	OF	nein	-	-
GGT5 (P36269)	Ser10Gly (rs78246933)	5,0 %	-	nein	-	-
	Ala160Val (rs117249571)	1,6 %	-	nein	-	-
	Lys330Arg (rs2275984)	31,6 %	-	nein	-	-
	Ile475Val (rs7288201)	2,0 %	-	vielleicht	-	-
DPEP1 (P16444)	Val104Met (rs73265359)	1,2 %	OF	ja	-	-
	Glu351Lys (rs1126464)	24,3 %	OF	nein	-	Atherosklerose
DPEP2 (Q9H4A9)	Asp106Ala (rs7689487)	1,6 %	-	nein	-	-
	His468Asp (rs1133090)	6,9 %	-	nein	-	-
GPX4 (P36969)	S2N (rs8178967)	2,8 %	-	nein	-	-
	S131G (rs73507255)	2,9 %	OF	nein	-	-
LTB4R2 (Q9NPC1)	Arg80Gln (rs150416614)	1,1 %	-	ja	-	-
	Asp196Gly (rs1950504)	3,9 %	-	nein	-	-
CYSLTR2 (Q9NS75)	Ser236Leu (rs61735175)	2,1 %	-	nein	-	-
P2RY12 (Q9H244)	Glu330Gly (rs16846673)	2,1 %	-	nein	-	-
PPARG (P37231)	Pro12Ala (rs1801282)	6,6 %		nein	-	Rheumatoide Arthritis, Diabetes Typ II, Fettleibigkeit

Tab. 4.1.: Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse von nicht-synonymen SNPs in Genen des LOX-Stoffwechsel.

Offensichtlich scheinen sich die nicht-synonymen SNPs an der Oberfläche von Proteinen zu konzentrieren und sie sind meist nicht in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Daher ist ein funktioneller Effekt für die meisten dieser SNPs auch eher unwahrscheinlich. Allerdings gibt es ja auch Enzyme mit einem oberflächenorientierten aktiven Zentrum (z.B. Gpx4), weswegen hier eine theoretische Vorhersage der Funktionalität von oberflächenorientierten SNPs schwierig ist. Ähnlich verhält es sich bei Rezeptoren, da hier die Ligandenbindungsstellen zumeist oberflächenexponiert sind. Außerdem wäre es denkbar, dass ein SNP an der Proteinoberfläche das Membranbindungsverhalten des Rezeptors

beeinflussen kann, wie es ja bereits für zwei TLR1 (*toll-like receptor 1*) SNPs gezeigt werden konnte (Johnson *et al.*, 2007; Uciechowski *et al.*, 2011). Daher werden hier in Zukunft noch weitere experimentelle Daten benötigt. Dennoch bleiben während der Evolution von Enzymen mit internen aktiven Zentren die funktionell wichtigen katalytischen Bereiche sowie die das Protein stabilisierenden hydrophoben Kernbereiche von nicht-synonymen SNPs weitestgehend verschont. Unterstützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass an den korrespondierenden Aminosäurepositionen von humanen SNPs in evolutionär verwandten Spezies häufig auch unterschiedliche Aminosäuren zu finden sind (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Während der Evolution der verschiedenen ALOX-Isoformen haben sich offenbar einige Aminosäurepositionen entwickelt, an denen der Aminosäureaustausch keinen so großen Effekt hat. Diese Positionen zeichnen sich daher durch eine große genetische Pluralität aus, weshalb dort auch die häufig vorkommenden humanen SNPs anzutreffen sind. Logischerweise befinden sich diese Positionen zumeist an der Oberfläche von Proteinen und eher selten im Proteinkern oder in der räumlichen Nähe zu wichtigen Aminosäureresten, weshalb ihr Effekt auf die Funktionalität des Proteins vergleichsweise gering ist. Dabei stellen die SNPs in humanen Lipoxygenasegenen keine Ausnahme dar, sondern verhalten sich funktionell ähnlich wie SNPs in anderen humanen Genen. So hatte zum Beispiel der oberflächenorientierte Lys27Gln SNP (rs2072671; Allelfrequenz 21,4 %) in der humanen Cytidin-Desaminase eine nur äußerst geringfügig verbesserte katalytische Effizienz gegenüber den natürlichen Enzymsubstraten, wohingegen die seltene Mutation Ala70Thr (rs60369023), welche in der Nähe zum aktiven Zentrum lag, eine deutlich reduzierte katalytische Effizienz besaß (Micozzi *et al.*, 2013). Ähnlich geringe funktionelle Effekte konnten für einen häufigen SNP in der Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP, UniProt P00491) beobachtet werden. Dabei ist das Enzym für die Entfernung von Ribose aus Ribo- und Desoxyribo-Purinnukleosiden und den Abbau des Virostatikum Ribavirin essentiell. Der PNP Gly51Ser SNP (rs1049564, Allelfrequenz 22,2 %) hatte keinen Einfluss auf die Ribavirin-Phosphorylaseaktivität des Enzyms (Furihata *et al.*, 2013). Unterstützt werden diese Daten durch eine neuere Publikation über die funktionelle Charakterisierung eines SNPs im IFIH1 Gen. Dieses kodiert für das MDA5 Protein (*Melanoma differentiation-associated protein 5*), welches zur Familie der RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLR) gehört. Das MDA5 fungiert als Pathogen-Erkennungs-Rezeptor (*Pattern recognition receptor* - PRR) der virale dsRNA erkennt und besitzt eine RNA-Helikaseaktivität (Kato *et al.*, 2008). In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass der häufig vorkommende IFIH1 Thr946Ala SNP (rs1990760, Allelfrequenz 36,7 %) keinen Effekt auf die Funktion des Enzyms hat (Zouk *et al.*, 2013). Anhand der hier genannten Beispiele lässt sich gut erklären, dass die während der Evolution entstandenen nicht-synonymen SNPs im humanen Genom überwiegend keinen oder nur geringe Effekte auf die Funktion des Gens haben. Offensichtlich wird die

Akkumulation von inaktiven SNPs in den kodierenden Bereichen des humanen Genoms verhindert.

Wie oben ausführlich besprochen, sind nicht-synonyme SNPs von ALOX15-Isoformen überwiegend an der Oberfläche der Proteine lokalisiert. Sie haben deshalb vergleichsweise geringe funktionelle Effekte, da die aktiven Zentren von LOXn im Inneren der Proteine liegen und selten eine direkte Verbindung von Oberflächenamino­säuren zu Resten des aktiven Zentrums besteht. Dennoch können bestimmte Oberflächenamino­säuren von LOXn auch funktioneller Bedeutung haben. Zum Beispiel können sie das Dimerisierungsverhalten von LOXn beeinflussen. Zwar wurde bisher überwiegend angenommen, dass die meisten Lipoxygenasen als Monomere katalytisch aktiv sind. In jüngster Zeit wurde jedoch für verschiedene LOX-Isoformen gezeigt, dass sie auch als Dimer funktionell sind bzw. dass eine Liganden-induzierte Dimerisierung für die allosterische Regulation dieser Enzyme verantwortlich ist (Aleem *et al.*, 2008; Häfner *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2012). Für humane γ -Gutamy­ltransferase (hGGT1, hGGT5) ist bekannt, dass sie als Heterodimere agieren (Castellano *et al.*, 2010). Es konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass nicht-synonyme genetische Variationen in der Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) vermutlich eine für die Aktivität essentielle Tetramerisierung des Enzyms verhindern. Allerdings handelt es sich dabei ausschließlich um seltene Mutationen, während für die häufigen SNPs nur geringe funktionelle Effekte erwartet wurden (Kapoor *et al.*, 2011). Auch für genetische Variationen im Adiponektin konnte gezeigt werden, dass diese die Oligomerisierung des Proteins beeinflussten (Kotlyan *et al.*, 2012). In wie weit allerdings SNPs und andere genetische Variationen das Dimerisierungsverhalten von LOXn beeinflussen, ist noch weitgehend unklar. Neben dem eigenen Oligomerisierungsverhalten können oberflächenorientierte SNPs auch einen Effekt auf die Protein-Protein-Interaktion des jeweiligen Proteins haben (Yates *et al.*, 2013), wobei krankheitsassoziierte SNPs häufig in den Proteininteraktionsstellen zu finden sind (David *et al.*, 2012). So wurde in einer Studie mit Hilfe von *in silico* Experimenten der funktionelle Einfluss von nicht-synonymen Variationen auf die Interaktion in 264 verschiedenen Protein-Protein-Komplexen untersucht. Es zeigte sich, dass Variationen an konservierten Aminosäurepositionen (seltene Mutationen) häufig stärkere Effekte auf die Bindungsenergie hatten, während die Effekte für Variationen an wenig konservierten Proteinbereichen (SNPs) eher gering waren (Teng *et al.*, 2009). Offensichtlich scheinen häufig vorkommende SNPs weder die Funktion des Proteins, dessen Oligomerisierungsverhalten noch die Protein-Protein-Interaktion wesentlich zu beeinflussen. Es wäre auch möglich, dass häufige nicht-synonyme SNPs auf Nukleotidebene (DNA, RNA) wirken, wobei sie möglicherweise die Bindung von regulatorischen Proteinen während der Transkription, Translation sowie der mRNA-Prozessierung (z.B. Spleißen) beeinflussen (Pedersen *et al.*, 2011; De Conti *et al.*, 2013). Weiterhin ist auch ein Einfluss

von SNPs auf epigenetische Prozesse der Expressionsregulation denkbar (Boks *et al.*, 2009). Die korrekte Prozessierung von Genen auf DNA- bzw. RNA-Ebene ist für deren biologische Funktion essentiell. Deshalb liegt auf dieser Prozessierung ein ähnlicher evolutionärer Druck wie auf der Funktionalität des Expressionsproduktes. Deshalb ist es eher fragwürdig, ob häufig vorkommende SNPs die Genprozessierung überhaupt wesentlich beeinflussen. Dagegen spricht vor allem auch, dass die meisten der häufig vorkommenden SNPs an Aminosäurepositionen liegen, die zwischen den verschiedenen Spezies weniger konserviert sind, weshalb diese Positionen für die Funktionalität des Gens scheinbar auch nicht so wichtig sind. Um dennoch den funktionellen Effekt von nicht-synonymen SNPs auf Nukleotidebene zu untersuchen, müsste eine andere methodische Strategie verwendet werden.

4.1.2 Seltene Mutationen (*missense*, *nonsense*) sind die Zukunft der personalisierten Medizin.

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass nicht-synonyme SNPs in Genen des LOX-Stoffwechsels sowie auch in den anderen humanen Genen meist oberflächenexprimiert sind und daher nur einen geringen Einfluss auf die Funktion des Gens besitzen. Daher sollten hetero- und homozygote Träger dieser genetischen Variationen auch nur geringe physiologische Unterschiede im Vergleich zu den homozygoten Wildtypallelträgern haben. Offensichtlich müssen die genetischen LOX-Variationen, die den zellulären Phänotyp beeinflussen, überwiegend bei den seltenen genetischen Variationen (Mutationen) gesucht werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass die meisten in dieser Arbeit untersuchten LOX-Mutationen ebenfalls an der Enzymoberfläche lokalisiert waren und daher nur geringe funktionelle Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym aufwiesen (s. 3.1.). Daneben konnten mit hALOX15 Gly422Glu (rs61099320) und hALOX15B Ala416Asp (rs140152561) zwei neue bisher unbekannte *loss-of-function* Mutationen in zwei hALOX Genen beschrieben werden (Horn *et al.*, 2013 I + II), wobei die Inaktivität der beiden Mutationen vermutlich auf eine partielle Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist. Ursache hierfür ist vermutlich, dass sich die betroffenen Aminosäurereste in der Nähe des aktiven Zentrums befinden und daher in für das Enzym kritischen Strukturbereichen lokalisiert sind. Dabei befindet sich der hALOX15 Gly422Glu Austausch in räumlicher Nähe zu einer der Positionsdeterminanten (h1le417) des Enzyms (Sloane *et al.*, 1995), wobei die molekularen Ursachen für die Inaktivität der hALOX15 Gly422Glu Mutation sowie deren mögliche physiologische Folgen näher in Abschnitt 4.2. diskutiert werden. Beim hALOX15 Ala416Asp Austausch handelt es sich dagegen um eine Mutation, die direkt die Enantioselektivitätsdeterminante des Enzyms beeinflusst. Im Gegensatz zur Ala-zu-Gly-Mutation, die entsprechend dem Ala-vs-Gly-Konzept zu einer Verschiebung des Reaktionsprodukts von 15S- nach 11R-H(p)ETE führen

würde (Coffa *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2011), verursachte die Ala-zu-Asp-Mutation einen nahezu vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität, was vermutlich auf eine Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist (s. 3.1.4.). Allerdings sollten die Ergebnisse des *thermal shift assay* in Zukunft noch mit direkten CD- und Fluoreszenzdaten von hALOX15B Wildtyp sowie der Ala416Asp Mutation bestätigt werden. Die biologischen Effekte dieser *loss-of-function* hALOX15B Mutation sind schwierig zu untersuchen, da das mutierte Allel erst einmal in den 1092 analysierten Genomen in heterozygoter Form gefunden worden ist (Allelfrequenz = 0,1 %). Im Gegensatz zu den hALOX15 *loss-of-function* Mutationen sollten inaktivierende hALOX15B Variationen eher einen atheroprotektiven Charakter haben. Nach neueren Untersuchungen ist die hALOX15B die am stärksten exprimierte LOX in primären humanen Makrophagen (Wuest *et al.*, 2012). In einer weiteren Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass der *in vitro knockdown* von der hALOX15B in humanen primären Makrophagen die zellulären Lipidlevel, die Schaumzellgröße und die Zytokinsekretion (IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12) verringerte. Außerdem führte der *in vivo knockdown* der Maus Alox15b in LDL-Rezeptordefizienten Mäusen zu einer Verringerung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta. Dafür wurde Mäusen mit einem C57BL/6 *Idlr*^{-/-} Hintergrund Knochenmark mit hämatopoetischen Stammzellen entnommen. Diese wurden anschließend in entsprechendem Medium kultiviert und mit Hilfe lentiviraler shRNA (*short-hairpin RNA*) wurden stabile Alox15b *knockdown* Mutanten hergestellt. Diese wurden anschließend in Mäuse, deren eigene hämatopoetische Stammzellen durch Röntgenstrahlung zerstört wurden, transplantiert und der physiologische Effekt des Alox15b *in vivo knockdowns* untersucht. Obwohl es sich bei der Maus Alox15b im Gegensatz zum humanen Ortholog um eine 8S-LOX handelt (Jisaka *et al.*, 2000), so scheint doch der *knockdown* ähnliche physiologische Effekte zu haben, was auf ähnliche zelluläre Stoffwechselprozesse hindeutet (Magnusson *et al.*, 2012). Dabei scheint der atheroprotektive Effekt des ALOX15B *knockdowns* wohl eher nicht auf ein verringertes Level an Arachidonsäureoxygenierungsprodukten (8S-HpETE, 15S-HpETE) zurückzuführen sein, sondern auf andere zelluläre Prozesse wie z.B. eine verringerte Membranoxidierung oder ein geringeres Level an radikalen Sauerstoffspezies. hALOX15B *loss-of-function* Mutationen sollten ähnliche atheroprotektive Effekte besitzen. Allerdings sollte der atheroprotektive Effekt des Verlusts eines oder beider ALOX15B Allele durch *knockout* Mäuse bestätigt werden. Neben den beiden neu entdeckten inaktiven hALOX Mutationen sind für die hALOX12B und hALOXE3 bereits seit einigen Jahren *loss-of-function* Mutationen bekannt, welche mit einer extrem seltenen Hauterkrankung (1:300000 in Europäern und Nordamerikanern), der autosomal rezessiven kongenitalen Ichtyose (ARCI), in Verbindung gebracht wurden (Eckl *et al.*, 2005; Lesueur *et al.*, 2007; Eckl *et al.*, 2009). Die meisten LOXn tragen ein katalytisches Eisenion in ihrem aktiven Zentrum (de Groot *et al.*, 1975), wobei das C-terminale Ile für die oktaedrische Eisenkoordination essentiell ist

(Kuban *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1999). Daher sollte es sich bei allen C-terminal trunkierten LOX-Variationen um *loss-of-function* Mutationen der entsprechenden Enzyme handeln. Ähnliches ist auch für die C-terminal trunkierten Variationen in den anderen Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsels zu erwarten. Insgesamt sind derzeit in der 1000 Genom Datenbank 34 *nonsense* Mutationen in Genen des LOX-Stoffwechsels beschrieben worden (s. Tab. 3.1.). Allerdings hat keine der analysierten Variationen eine Allelfrequenz $< 0,1$ %. Ähnlich verhält es sich mit Mutationen, die funktionell wichtige Aminosäurereste (Eisenligation, Positions- und Stereospezifität, Phosphorylierung etc.) verändern. Es gibt seltene Mutationen, die die Eisenligation (hALOX12B), die Positions- (hALOX15, hALOX15B) und Stereoselektivität (hALOX15B), die Membranbindung (hALOX15), die Glykosylierung (hGGT1, hGGT5, hDPEP1) sowie die Phosphorylierungspositionen (hALOX5, hLTC4S, hPPARG) von verschiedenen Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsels beeinflussen. Außerdem können seltene Mutationen funktionell wichtige Aminosäurereste im aktiven Zentrum der analysierten Proteine verändern (hALOX12, hALOX15, hLTC4S, hGGT1, hDPEP1/2), wobei homozygote Träger dieser genetischen Variationen in den meisten Fällen auch defizient für die entsprechenden Gene wären (s. Tab. 4.2.). Mit Ausnahme des hALOX15 Thr560Met SNP wurde bisher keine andere *loss-of-function* Mutation in den analysierten Genen beschrieben, die mit einer Frequenz $> 0,1$ % vorkommt, weshalb die Existenz homozygoter Allelträger unwahrscheinlich ist. Allerdings kann ja auch schon der Ausfall von einem Allel physiologische Effekte haben. So hatten zum Beispiel heterozygote Träger des hALOX15 Thr560Met SNP ein erhöhtes Risiko für die KHK (Assimes *et al.*, 2009; Hersberger *et al.*, 2010). Folglich können auch seltene Mutationen, die zur Veränderung eines Allels eines bestimmten Gens führen, durchaus von biologischer Relevanz sein. Bedauerlicherweise werden sie aufgrund ihrer geringen Häufigkeit in epidemiologischen Studien oft nicht beachtet, da sie zu selten vorkommen, um statistisch auswertbar zu sein. Dennoch wird ihre Bedeutung in Zukunft zunehmen. Es zeigt sich nämlich, dass jeder Mensch zwischen 9000-11000 nicht-synonyme Variationen (0,4-0,5 pro Gen) besitzt, wobei sich von selbst versteht, dass nicht jede davon funktionell sein kann. Lediglich 40-100 davon werden aufgrund ihrer möglichen Auswirkungen auf die Proteinstruktur als krankheitsverursachend angesehen (Gonzaga-Jauregui *et al.*, 2012), wobei ein Großteil dieser Variationen eher selten vorkommt. Daher wurde bereits durch das 1000 Genom Projekt und andere Studien bemerkt, dass man sich in Zukunft vermehrt auf genetische Variationen mit einer Allelfrequenz ≤ 5 % fokussieren sollte, da diese für die zukünftig personalisierte Medizin von größerer Bedeutung sind (Gorlov *et al.*, 2011; Abecasis *et al.*, 2012). In Zukunft wird es deshalb eine Hauptaufgabe sein, Vorkommen und Verteilung dieser seltenen Genomveränderungen in der humanen Bevölkerung zu untersuchen und ihre Rolle bei verschiedenen Erkrankungen zu definieren. Ein großes Problem mit solchen

seltenen Mutationen ist jedoch, dass sie zumeist nur ein bis zweimal in großen humanen Populationen vorkommen und dass ihre Existenz häufig auf eine bestimmte ethnische Gruppe beschränkt ist (Abecasis *et al.*, 2012). Daher können nach derzeitigem Stand bei solchen seltenen Mutationen auch Sequenzierungsartefakte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zudem wurde bei der Konzipierung des 1000 Genom Projekts nicht auf die adäquate Zusammensetzung verschiedener ethnischer Subpopulationen geachtet, weshalb vor allem ethnische Subpopulationen in Südostasien deutlich unterrepräsentiert sind (Lu *et al.*, 2013). Daher werden in Zukunft größere humane Populationen mit mehr als 10000 Menschen und ein breiteres Spektrum an ethnischen Gruppen benötigt, um das Vorkommen, die Verteilung von seltenen Mutationen in der humanen Bevölkerung zu untersuchen und ihre Rolle in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen genauer zu charakterisieren.

Gen (UniProt-Code)	Missense Mutation	Allelfrequenz (%)	Funktion	Strukturelle Lage (Oberfläche - OF, Kern - K, aktives Zentrum - AZ)	PolyPhen2 (SNP funktionell ja, nein, vielleicht)	Praktische Ergebnisse (funktionell ja/nein)
ALOX15 (P16050)	Phe352Leu (rs143365387)	< 0,1 %	Positionsspezifität (Triade)	AZ	vielleicht	ja (Verschiebung Produktspektrum von 15- nach 12-HpETE)
	Arg402Gln (rs376212812)	< 0,1 %	Substratbindung	AZ	ja	-
	Arg402Trp (rs144038526)	< 0,1 %	Substratbindung	AZ	ja	nein
ALOX5 (P09917)	Ser271Leu (rs376649785)	< 0,1 %	Phosphorylierung	OF	vielleicht	-
ALOX12 (P18054)	Arg402Gln (rs1433539715)	< 0,1 %	Substratbindung	AZ	ja	-
ALOX15B (O15296)	Val603Ile (rs192653434)	0,1 %	Positionsspezifität (Jisaka)	AZ	nein	-
	Ala416Asp (rs140152561)	0,1 %	Enantioselektivität (Coffa)	AZ	ja	ja (inaktiv)
ALOX12B (O75342)	His398Tyr (rs140063508)	< 0,1 %	Eisenligand	AZ	ja	-
LTC4S (Q16873)	Ser28Leu (rs368527006)	< 0,1 %	Phosphorylierung		vielleicht	
GGT1 (P19440)	Asn344Ser (rs377589316)	< 0,1 %	N-Glykosylierung	OF	vielleicht	-
	Pro427Ser (rs372750547)	< 0,1 %	<i>lid loop</i>	OF	ja	-
	Arg107Cys (rs142987478)	< 0,1 %	aktives Zentrum	AZ	ja	-
GGT5 (P36269)	Asn535Ser (rs372732410)	< 0,1 %	N-Glykosylierung	-	nein	-

	Pro443Ser (rs148922656)	< 0,1 %	lid loop	-	nein	-
DPEP1 (P16444)	His36Tyr (rs201263684)	< 0,1 %	Zn ²⁺ - Bindung	AZ	ja	-
	Asn279Asp (372554004)	< 0,1 %	N-Glyko- sylierung	OF	nein	-
DPEP2 (Q9H4A9)	Asp91Asn (rs144507252)	< 0,1 %	Zn ²⁺ - Bindung	-	ja	-
	Glu188Ala (rs146393703)	< 0,1 %	Zn ²⁺ - Bindung	-	ja	-
	Arg293Trp (TMP_ESP_16_68024756)	< 0,1 %	Substrat- bindung	-	ja	-
	Ser463Thr (rs143876744)	< 0,1 %	GPI-Anker	-	vielleicht	-
PPARG (P37231)	Thr84Pro (TMP_ESP_3_12421370)	< 0,1 %	Phospho- rylierung	-	ja	-

Tab. 4.2.: Zusammenfassung der bioinformatischen Analyse von missense Mutationen in Genen des LOX-Stoffwechsel, welche funktionell wichtige Aminosäurereste betreffen.

4.1.3 Biologische Bedeutung von genetischen Variationen in Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsel während der Evolution von Vertebraten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten der häufig vorkommenden genetischen Variationen (SNPs) in den Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsels nur geringe funktionelle Effekte haben. Das liegt zumeist daran, dass sie an der Oberfläche von den untersuchten Proteinen lokalisiert sind und daher häufig keinen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum haben. Außerdem scheinen gerade die sehr häufig vorkommenden SNPs an Aminosäurepositionen in der Primärstruktur von Proteinen zu liegen, die sich durch eine geringe Konservierung zwischen verschiedenen Spezies auszeichnen (s. Abb. 4.1.). Dabei haben die meisten dieser häufigen SNPs auch keinen Effekt auf funktionell wichtige Aminosäurereste.

Es gibt zwar einige seltene Mutationen die wichtige Aminosäurereste beeinflussen, allerdings kommen diese zumeist mit einer Allelfrequenz < 0,1 % vor. Offensichtlich obliegt hier ein gewisser evolutionärer Druck der für den funktionellen Erhalt dieser für die Enzymfunktion wichtigen Aminosäurereste sorgt, wobei dies in guter Übereinstimmung mit den Daten für andere humane Gene ist (Abecasis *et al.*, 2012). Obwohl die biologische Bedeutung von LOXn bisher nicht endgültig geklärt ist, so gibt es doch klare Hinweise, dass die Enzyme in zwei von drei Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, Eukaryonten) weit verbreitet sind. Zusätzlich wurden in zwei Archaeenspezies (*Halorubrum kocurii*, WP_008846855.1; *Methanococcus voltae*, YP_003707015.1) genomische Sequenzen beschrieben, die für eine Lipoxygenase kodieren könnten. Sollten funktionelle Untersuchungen den Lipoxygenasecharakter in einer dieser beiden Proteine bestätigen, dann wären in allen drei Domänen des irdischen Lebens LOXn beschrieben worden. Allerdings erscheint die Existenz einer LOX vor

allem in *Methanococcus voltae* eher unwahrscheinlich, da es sich um ein Archeon handelt, welches vor allem im Darm von Wiederkäuern sowie in Süß- und Salzwassersedimenten vorkommt. Dies sind äußerst anaerobe Lebensbereiche, weshalb die Existenz von sauerstoffverbrauchenden Enzymen in diesem Organismus relativ unwahrscheinlich ist (Tumbula *et al.*, 1999). Außerdem handelt es sich bei der *M. voltae* Sequenz um eine PLAT-(Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha α toxin) oder LH2-Domäne, welche sowohl bei LOXn als auch einer Reihe von anderen Proteinen vorkommt. *Halorubrum kocurii* ist dagegen ein extrem halophiles, photoorganoheterotrophes, und aerobes Archeon, weshalb es möglich erscheint, dass sie LOXn besitzen (Gutierrez *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Sequenz mit anderen bakteriellen und humanen LOXn zeigte jedoch, dass die für die Katalyse wichtigen Eisenliganden nicht konserviert sind, weshalb es dabei vermutlich um keine LOX handelt (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Nach derzeitigem Stand bleibt daher weiter unklar, ob es in Archaeobakterien überhaupt LOXn gibt. Dennoch bestätigt die Konservierung dieser Enzyme über die Evolution der Arten von niederen Bakterien bis hin zu komplexen Organismen bestätigt in gewisser Weise ihre biologische Bedeutung. Obwohl die spezifische Rolle von LOXn in Bakterien, Pilzen und Pflanzen vermutlich eine andere sein wird als in den hochentwickelten tierischen Organismen, so zeigt sich doch, dass lipoxidierende Enzyme bereits früh in der Evolution entstanden sind.

Auch wenn die biologische Bedeutung der tierischen LOXn noch nicht vollständig geklärt ist, so weiß man doch, dass die ALOX5 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese von proinflammatorischen Leukotrienen katalysiert (Radmark *et al.*, 2010; Haeggstrom *et al.*, 2011). Diese binden auto- oder parakrin über spezifische Leukotrienrezeptoren an ihre Zielzellen und haben vor allem in der Pathogenese von Asthma bronchiale und anderen inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Funktion. Eine Datenbankrecherche legt den Verdacht nahe, dass sich der Leukotrienstoffwechsel bereits bei den Knochenfischen wie dem Zebrafisch entwickelt hat, da für diesen sowohl die ALOX5 als auch verschiedene Leukotrienrezeptoren in der NCBI Datenbank beschrieben wurden (NCBI, Bethesda, USA). Das evolutionär weiter entfernte Lanzettfischchen scheint jedoch noch keinen LT-Stoffwechsel zu haben. Es gibt hier zwar Hinweise auf die Existenz einer ALOX5-ähnlichen Sequenz (XP_002601197.1), allerdings ist bis zum heutigen Tag nicht eindeutig geklärt, ob es sich dabei wirklich um eine echte ALOX5 oder um eine Allenoxidsynthase handelt (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Außerdem hat der Lanzettfisch nach derzeitigem Kenntnisstand noch keine LT-Rezeptoren, was wohl gegen die Existenz eines funktionsfähigen Leukotrienstoffwechsel spricht. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch die Tatsache, dass die LTA₄-Hydrolase von *C. elegans* (Fadenwurm) und die des Knorpelfisches *Raja Clavata* (Nagelrochen) nicht in der Lage sind, LTA₄ in LTB₄ umzuwandeln (Baset *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 2005), was eine Schlüsselreaktion in der

Leukotrienbiosynthese darstellt. Zudem konnten weder im Genom des Knorpelfisches *Callorhinchus milii* (Elefantenhai) noch in *C. elegans* wichtige Gene des Leukotrienstoffwechsel (ALOX5, LTC4S, LT-Rezeptoren) identifiziert werden (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Offensichtlich scheinen selbst die evolutionär dem Menschen näher stehenden Knorpelfische noch keinen LT-Stoffwechsel zu haben. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich der Leukotrienstoffwechsel wahrscheinlich erst mit der Entstehung von Knochenfischen herausgebildet hat (Morgan *et al.*, 2005). Die evolutionär ersten Fische, die Kieferlosen (Neunaugen, Schleimaale), sind bereits im Kambrium vor etwa 530 Millionen Jahren in den Meeren geschwommen (Bockelie *et al.*, 1976; Smith *et al.* 1996; Shu *et al.*, 1999 + 2003). Die Abspaltung des Lanzettfischchen von den heutigen Vertebraten erfolgte dann vor ca. 520 Mio. Jahren (Putnam *et al.*, 2008). Knorpel- und Knochenfische sind nahezu zeitgleich vor ca. 420-400 Mio. Jahren beim Übergang vom Silur zum Devon entstanden (Zhu *et al.*, 2009 + 2013). Im selben Zeitraum kam es wohl auch zur evolutiven Trennung von Fleischflossern (Quastenflosser, Lungenfische) und Strahlenflossern. Die Genome des Quastenflosser *Latimeria chalumnae* sowie von verschiedenen Strahlenflossern (Buntbarsch, Lachs, Zebrafisch) enthalten sowohl die ALOX5 als auch Gene für verschiedene Leukotrienrezeptoren (Amemiya *et al.*, 2013; Horn *et al.*, unveröffentlicht). Es ist daher äußerst wahrscheinlich, dass sich der Leukotrienstoffwechsel koevolutiv mit der Entstehung von Knochenfischen bereits im frühen Devon vor ca. 350-400 Mio. Jahren entwickelt hat, wobei er nach den heutigen Erkenntnissen auf Vertebraten begrenzt ist. Invertebraten besitzen zwar bereits verschiedene Gene der Eikosanoidbiosynthese, allerdings scheint hier der Leukotrienstoffwechsel zu fehlen (Heckmann *et al.*, 2008). Diese Hypothese muss allerdings noch durch zusätzliche Sequenzabgleiche mit verschiedenen Invertebratengenomen bestätigt werden. Höhere Lebewesen zeichnen sich in der Regel durch eine hohe Mobilität aus, weshalb die Anpassung an verschiedenste Habitate enorm wichtig ist. Dabei spielt die spezifische Immunantwort und eine damit verbundene Inflammation für das Überleben in einer mit Pathogenen „verseuchten“ Umgebung eine tragende Rolle. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass sich der Leukotrienstoffwechsel in der Evolution nicht wesentlich verändert hat bzw. dass sich keine häufig vorkommenden SNPs herausgebildet haben, die diesen Stoffwechsel negativ beeinflussen.

Ähnliches sollte für andere Enzyme des LOX-Stoffwechsels auch zu erwarten sein. So ist zum Beispiel bekannt, dass ALOX12B und ALOXE3 über einen spezifischen Stoffwechselweg für die epidermale Barrierefunktion und Hautentwicklung von Säugern wichtig sind (Krieg *et al.*, 1999; Eckl *et al.*, 2005 + 2009; Epp *et al.*, 2007; Fürstenberger *et al.*, 2007). Daneben existiert in Vertebraten mit der überwiegend proatherosklerotischen ALOX15B noch eine dritte epidermale LOX (Brash *et al.*, 1997). Es konnten bereits in

verschiedenen Knochenfischen (Strahlenflosser, Fleischflosser) putative Gene für die ALOX15B, ALOX12B als auch die ALOXE3 nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass sich diese Enzyme ähnlich wie der LT-Stoffwechsel bereits vor ca. 350-400 Mio. Jahren entwickelt haben (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Allerdings scheinen Lipoxygenasen in Vertebraten auch noch andere Funktionen zu besitzen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der *knockout* einer Zebrafisch 12S-Lipoxygenase (NP_955912.1) zu einer abnormalen Embryonalentwicklung führte. Dabei wird aufgrund der vermehrten Ödembildung am Kopf und Schwanz der *knockout* Embryonen eine mögliche Rolle dieser LOX-Isoform bei der Entwicklung der epidermalen Barriere von Fischen ähnlich wie bei Säugern diskutiert (Haas *et al.*, 2011). Allerdings scheint eine Dehydrierung nicht der ursprüngliche Grund für die Missbildung der Zebrafischembryonen zu sein. Dabei hat die Zebrafisch 12-LOX eine 41-46 %ige Sequenzübereinstimmung mit den humanen und Maus 12-LOXn (hALOX12B, hALOX12, mAloxe12 etc.), weshalb nach derzeitigem Stand unklar ist, welcher dieser Säugetier-LOXn dieses Enzym entspricht (s. Anhang Tab. A5.). Möglicherweise handelt es sich um das Mäuse Alox12b Ortholog (41 %), es könnte aber auch genauso gut der Leukozyten-Typ oder der epidermalen 12-LOX (47 bzw. 43 % Sequenzhomologie) entsprechen. Daher ist die genaue Interpretation dieser Ergebnisse schwierig, aber es spricht einiges dafür, dass die epidermalen LOXn neben dem Aufbau der epidermalen Barriere noch andere Funktionen besitzen, die bisweilen noch nicht vollständig verstanden sind.

Die ALOX15 sowie ALOX12 scheinen sich erst später in der Evolution von den Vertebraten entstanden zu sein, da beide Gene in ihrer klassischen Form erst bei Säugetieren gefunden werden (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Wo und wann sich diese beiden LOX-Isoformen in der Evolution herausgebildet haben, muss durch zukünftige bioinformatische und experimentelle Ergebnisse genauer untersucht werden.

4.2 Molekulare Ursachen für die Inaktivität der natürlich vorkommenden hALOX15 Gly422Glu Variation

4.2.1 Gly422Glu und Gly422Arg sind seltene Mutationen des hALOX15 Gens.

Die hALOX15 wird in der Pathogenese von Atherosklerose weitläufig diskutiert (Takano *et al.*, 1990; Ylä-Herttuala *et al.*, 1990; Resnick *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2005). Dabei werden verschiedene genetische Variationen mit einem unterschiedlich hohen Risiko für die Erkrankung assoziiert (Assimes *et al.*, 2008; Hersberger *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Neuere Daten sprechen für eine Schlüsselrolle der ALOX15 in der Biosynthese von antiinflammatorischen und atheroprotektiven Eikosanoiden wie den Lipoxinen, Resolvinen und Protektinen (Serhan *et al.*, 2008 I-III; Serhan *et al.*, 2011), weshalb dem Enzym nach neueren Erkenntnissen eine überwiegend ein antiatherosklerotische Funktion zugesprochen

wird. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass heterozygote Allelträger des hALOX15 *loss-of-function* SNP Thr560Met (rs34210653) ein erhöhtes Risiko für die KHK hatten, wobei noch weitere klinische Studien benötigt werden, um den kausalen Zusammenhang endgültig zu bestätigen (Assimes *et al.*, 2008; Hersberger *et al.*, 2009). Möglicherweise führt bereits der Verlust von einem der beiden Allele zu einer Reduktion der Synthese von antiinflammatorischen Resolvinen und Lipoxinen. Daher sollten andere *loss-of-function* Mutationen in diesem Gen ähnliche physiologische Effekte bewirken. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es sich bei hGly422Glu (rs61099320) um eine neu entdeckte hALOX15 *loss-of-function* Variation handelt, wobei der Verlust der katalytischen Aktivität auf eine Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist (s. Abb. 3.1. C). Die hGly422Arg Variation hatte zwar auch eine geringfügig verringerte enzymatische Aktivität, allerdings waren die strukturellen Unterschiede im Vergleich zur Gly422Glu Variation vergleichsweise gering, wobei die Reduzierung der katalytischen Aktivität vermutlich durch eine leichte Destabilisierung des Proteins zustande kommt (s. Tab. 3.2.).

Bei hGly422Arg handelt es sich um eine seltene Mutation mit einer Allelfrequenz von 0,1 %, wohingegen für die hGly422Glu Mutation bis heute keine Frequenzdaten publiziert worden sind (Abecasis *et al.*, 2012). Die hetero- und homozygoten Allelträger sollten analog zum hALOX15 Thr560M SNP ein erhöhtes Risiko für die KHK haben. Daher haben wir die Verteilung der Variation in 306 freiwilligen und gesunden Europäern (deutsch) untersucht. Da alle Probanden homozygot für das Wildtypallel waren, handelt es sich vermutlich um eine seltene Mutation mit einer Allelfrequenz < 0,2 % (Horn *et al.*, unveröffentlicht). Unsere Daten sind dabei in guter Übereinstimmung mit einer allgemeinen Feststellung des 1000 Genomprojekts, dass funktionell zerstörende und krankmachende Variationen zumeist mit einer Allelfrequenz < 0,5 % vorkommen (Abecasis *et al.*, 2012). Wie bereits in Abschnitt 4.1.2. diskutiert, werden größere Studiengruppen benötigt, um deren Rolle in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen zu untersuchen, auch wenn dadurch die Kosten von einzelnen Studien etwas größer wären.

4.2.2 Die Interaktion von hGly422 und hAsp415 ist wichtig für die Funktionalität des Enzyms.

Es wurde bereits im Ergebnisteil diskutiert, dass die Interaktion von Gly422 und Asp415 in der hALOX15 durch die Substitution von großen, raumfüllenden und anderen Aminosäuren an der Gly422 Position möglicherweise zerstört wird, was eine plausible Erklärung für die reduzierte enzymatische Aktivität und die partielle Fehlfaltung des Enzyms darstellt. Dagegen hatten Mutationen an der Asp415 Position geringere Effekte. Dennoch scheint die Interaktion eine stabilisierende Funktion zu haben, da die hAsp415Val Mutation eine reduzierte katalytische Aktivität und Thermostabilität besitzt (s. Tab. 3.10.). Allerdings deuten

die vergleichsweise geringen strukturellen Effekte der beiden hAsp415 Mutanten darauf hin, dass der Verlust der polaren Interaktion wahrscheinlich nicht die primäre Ursache für die partielle Fehlfaltung des Proteins ist.

In der Kristallstruktur der rabALOX15 (80 % Sequenzhomologie mit der hALOX15) befindet sich der rGly423 Rest zwar nicht direkt im aktiven Zentrum, allerdings in räumlicher Nähe zu zwei Aminosäureresten (rIle418, rMet419), die Bestandteil des aktiven Zentrums sind (Gillmor *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2008). Die *in silico* Experimente deuteten dabei an, dass der Verlust der enzymatischen Aktivität und die partielle Fehlfaltung der meisten hGly422 Mutanten vermutlich auf sterische Behinderungen mit benachbarten Aminosäuregruppen zurückzuführen war (s. Abb. 3.7. C). Überraschenderweise verursachte die hGly422Arg Variation entgegen der *in silico*-Vorhersage keine so starken strukturellen Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym und die Reduzierung der enzymatischen Funktion war im Vergleich zu den anderen hGly422 Mutanten moderat (ca. 40-50 % Restaktivität). Obwohl die strukturelle Basis für diesen Unterschied bislang nicht geklärt werden konnte, so kann man doch vermuten, dass die positiv geladene Guanidinogruppe über eine mögliche Salzbrücke die flexible Schleifenregion des Enzyms stabilisiert.

Wir konnten mit Hilfe von CD- und Fluoreszenzspektroskopie sowie dem *thermal shift assay* zeigen, dass die hALOX15 Gly422Glu Mutation strukturelle Unterschiede im Vergleich zum Wildtypenzym aufweist. Man muss hierbei allerdings kritisch anmerken, dass wir nicht die Faltung des Enzyms direkt untersucht haben, sondern lediglich das Endresultat eines Faltungsprozesses bzw. die thermische Entfaltung des Enzyms. Um zu sehen, ob es Unterschiede bei der Faltung zwischen den hGly422 Mutanten und dem Wildtypenzym gibt, müsste das Protein zunächst denaturiert werden und dann der Rückfaltungsprozess *in vitro* nachvollzogen werden. Es gibt zwar Hinweise, dass Lipoxygenasen nach partieller Denaturierung wieder zurückgefalten werden können (Sudharshan *et al.*, 1999), in wie weit dies allerdings für die hALOX15 gilt, muss durch zukünftige Experimente erst noch abgeklärt werden. Erst durch ein verlässliches Rückfaltungssystem kann der wirkliche Einfluss von Variationen auf die Enzymfaltung genauer charakterisiert werden. Ob und in wie weit LOXn sich rückfalten lassen bzw. ob für die Faltung Chaperone (Faltungshelfer) benötigt werden, lässt sich derzeit nicht vorhersagen. Außerdem bleibt es äußerst fragwürdig, ob die Eisenligandensphäre bzw. andere für die Enzymkatalyse wichtige Bereiche durch die Rückfaltung wieder in den katalytisch aktiven Zustand gebracht werden können. Daher gestalten sich solche Faltungsexperimente eher schwierig. Besser wären Kristallstrukturen vom hALOX15 Wildtyp sowie den beiden bekannten *loss-of-function* Variationen (Thr560Met, Gly422Glu). Bedauerlicherweise waren wir nicht in der Lage, das Wildtypenzym sowie die Mutanten bis zu einer für die Kristallisation benötigten Menge und Reinheit aufzureinigen, weswegen wir uns in dieser Arbeit auf die *in silico*-Vorhersagen beschränken mussten.

4.2.3 Ist der funktionell wichtige Glycinrest auch in anderen LOX-Isoformen konserviert?

Wie bereits in Abb. 3.9. angedeutet, ist der Gly422 Rest von hALOX15 in den Primärsequenzen der meisten ALOX5, ALOX12 und ALOX15-Isoformen von verschiedenen Spezies konserviert, was auf eine funktionelle Rolle des Aminosäurerestes auch in anderen LOX-Isoformen (ALOX5, ALOX12) hindeutet. Die Aktivitätsmessungen für die Gly429Glu Mutante von hALOX5 sowie für die Gly422Glu Mutante von hALOX12 (s. Tab. 3.11.) bestätigen diese Hypothese. Interessanterweise führt die Mutation bei hALOX5 nicht nur zu einer Verringerung der enzymatischen Aktivität, sondern auch zu einer Verschiebung des Produktspektrums von 5S-H(p)ETE zu einem überwiegend 8S- und 12R-H(p)ETE produzierenden Enzym. Obwohl die molekularen Ursachen für diese Verschiebung in der Produktspezifität für die Arachidonsäureoxidierung unklar bleiben, so befindet sich dieser Rest in der räumlichen Nähe zu den Positionsdeterminanten (Phe359, Ala424, Asn425, Ala603) von verschiedenen Säugetier-ALOX5 (Schwarz *et al.*, 2001; Hofheinz *et al.*, 2013). Daher scheint der Rest vermutlich neben der Stabilisierung des aktiven Zentrums auch für die Bindung des Fettsäuresubstrats eine wichtige Funktion zu haben. Um diese Hypothese zu bestätigen, werden in Zukunft weitere Mutagenesexperimente in Verbindung mit Strukturmodellierung sowie hochauflösende Kristallstrukturen von Enzym-Substrat-Komplexen (Wildtyp/Mutante) benötigt.

Neben der Konservierung des Glycinrestes in ALOX5, ALOX12 und ALOX15-Isoformen, konnte in einem hALOX15B Modell gezeigt werden, dass die polare Interaktion vermutlich auch in epidermalen LOX-Isoformen konserviert ist. Dabei interagiert in der hALOX15B das Ile435 (Gly422 in hALOX15) mit dem Asp428 (Asp415 in hALOX15) über eine polare Wechselwirkung (Arora *et al.*, 2012). Die hALOX15B folgt im Gegensatz zu ALOX5, ALOX12 und ALOX15 nicht dem Triadenkonzept. Für dieses Enzym sind Asp603 und Val604 die primären Positionsdeterminanten (Jisaka *et al.*, 2000). Ile435 befindet sich nicht in unmittelbarer räumlicher Nähe zu diesen beiden Aminosäureresten, weshalb die funktionellen Effekte des Ile-zu-Glu Austausch geringer sein sollten als die Substitutionen bei den anderen untersuchten LOX-Isoformen. Die Aktivitätsmessungen zeigten, dass die Ile435Glu Mutante eine im Vergleich zum ALOX15B-Wildtyp um etwa 50% reduzierte katalytische Aktivität besaß, was vermutlich auf eine Destabilisierung des gesamten Enzyms zurückzuführen ist. Diese Hypothese könnte man durch zusätzliche Thermostabilitätsmessungen (z.B. *thermal shift assay*) von Wildtyp und Mutante bestätigen. Offensichtlich scheint die Aminosäureposition auch in epidermalen LOXn zu wichtig zu sein, obwohl die funktionellen Effekte weniger dramatisch waren als bei den Leukozyten-Typ LOXn. Um diese Arbeitshypothese zu bestätigen, sollten in Zukunft noch ähnliche Mutagenesestudien an den anderen beiden epidermalen LOXn (ALOX12B, ALOXE3) durchgeführt werden.

4.2.4 Die fehlerhafte Proteinfaltung und Proteinaggregation spielt in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass der Verlust der enzymatischen Aktivität von zwei natürlich vorkommenden hALOX15 Variationen (Gly422Glu, Thr560Met) auf eine partielle Fehlfaltung des Enzyms zurückzuführen ist. Obwohl der Prozess der Proteinfaltung seit vielen Jahrzehnten untersucht wird, so ist bis heutigem Tage unklar, wie genau die Proteinfaltung *ab initio* abläuft. Weiterhin gibt es derzeit noch keine klaren Algorithmen, um die Struktur eines Proteins aus der Primärsequenz mit großer Genauigkeit vorherzusagen (Dill *et al.*, 2008 + 2012). Die pathophysiologische Rolle von fehlgefalteten Proteinen, insbesondere in neurodegenerativen Erkrankungen, ist bereits seit vielen Jahren bekannt (Agorogiannis *et al.*, 2004; Chaudhuri *et al.*, 2006). Dabei bilden die fehlgefalteten Proteine hochmolekulare intra- und extrazelluläre Komplexe, welche nicht mehr dem proteolytischen Abbau in der Zelle unterliegen und daher neurotoxisch wirken. Daneben konnte gezeigt werden, dass Proteinfehlfaltung auch für Stoffwechselerkrankungen wie den Mangel an kurzkettiger Acyl-CoA-Dehydrogenase (SCAD), eine angeborene Störung des Fettsäuremetabolismus in Mitochondrien, verantwortlich ist. Der Mangel an funktionsfähiger SCAD beeinträchtigt den Fettsäurestoffwechsel von Allelträgern, was als die Hauptursache für deren Lethargie und Hypoglykämie gilt (Pedersen *et al.*, 2003; Bross *et al.*, 2003; Jethva *et al.*, 2008). Bei der X-chromosomal rezessiv vererbten spondyloepiphysären Dysplasie tarda (SEDT) handelt es sich um eine genetische Krankheit, die durch ein anormales Knochenwachstum bei den Patienten charakterisiert ist. Als Ursache wird dabei eine Fehlfaltung des TRAPPC2 Proteins (*Trafficking protein particle complex subunit 2*) diskutiert, welches Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes ist, der eine wichtige Funktion beim Vesikeltransport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat hat. Der fehlerhafte Vesikeltransport führt dabei zu einer verminderten Zelldifferenzierung und Knochenzellentwicklung, was sich dann in dem anormalen Knochenwachstum äußert (Choi *et al.*, 2009). Der biologische Effekt der inaktiven und fehlgefalteten hALOX15 Variationen (Thr560Met, Gly422Glu) bleibt dagegen weiterhin unklar, auch wenn klinische Studien für heterozygote Allelträger des Thr560Met SNP ein erhöhtes Risiko für die KHK andeuten und ähnliche Effekte für andere hALOX15 *loss-of-function* Mutationen vermutet werden können. Möglicherweise führt bereits der Ausfall eines der beiden Allele zu einer verminderten Produktion von antinflammatorischen und atheroprotektiven Eikosanoiden (Lipoxinen, Resolvinen, Protektinen), wobei das erst noch durch eine genaue Analyse des Fettsäuremetabolismus von mutierten Allelträgern im Vergleich zu homozygoten Wildtypallelträgern bestätigt werden müsste.

5 Zusammenfassung (Abstract)

Lipoxygenasen (LOXn) bilden eine heterogene Gruppe von Dioxygenasen, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidieren. In epidemiologischen Studien sind eine Reihe von nicht-synonymen Einzelnukleotidvariationen (SNPs, Mutationen) in humanen LOXn mit einer Vielzahl an polygenen Erkrankungen (Asthma bronchiale, Atherosklerose etc.) assoziiert worden. Vor Beginn meiner Arbeit existierten für die meisten genetischen Variationen jedoch keinerlei funktionelle Daten, weshalb der epidemiologische Zusammenhang einen rein beschreibenden Charakter hatte. Vor diesem Hintergrund wurde zunächst eine systematische Analyse über das Vorkommen, die Verteilung und die funktionellen Effekte von nicht-synonymen genetischen Variationen in humanen LOXn und anderen Genen des LOX-Stoffwechsels durchgeführt. Es zeigt es sich, dass häufig vorkommende Variationen (SNPs) überwiegend an funktionell wenig bedeutsamen Positionen in den Primärsequenzen dieser Proteine vorkommen. Bei Enzymen, deren aktive Zentren vor allem im Inneren der Proteine vorliegen, sind diese Aminosäurereste häufig an der Oberfläche lokalisiert, was eine plausible Erklärung für ihre meist geringen funktionellen Effekte ist. Lediglich der mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit assoziierte hALOX15 Thr560Met SNP (rs34210653) war entsprechend früheren Daten katalytisch inaktiv. Dabei konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Inaktivität dieser Mutante durch eine partielle Fehlfaltung des Enzyms verursacht wird. Ähnliches konnte auch für die zwei neu entdeckte *loss-of-function* Variationen, hALOX15 Gly422Glu (rs61099320) und hALOX15B Ala416Asp (rs140152561), gezeigt werden. *In silico* Daten deuteten dabei an, dass die Fehlfaltung von hALOX15 Gly422Glu auf eine sterische Behinderung der normalen Proteinfaltung in der Nähe zum aktiven Zentrum zurückzuführen ist. Die Datenbankanalyse deutete zudem die Existenz von weiteren funktionell relevanten Variationen (Stopmutationen, Substitution von funktionell wichtigen Aminosäuren) in verschiedenen Genen des LOX-Stoffwechsels hin. Allerdings besitzt mit Ausnahme des Thr560Met SNPs der hALOX15 keine genetische Variation eine Allelfrequenz > 1 %. Die kodierenden Bereiche der untersuchten Gene unterliegen demnach einem evolutionären Druck, welcher die Akkumulation von funktionell fehlerhaften Allelen verhindert. Dies erscheint auch deshalb plausibel, da der LOX-Stoffwechsel seit der Entstehung von Knochenfischen vor 350-400 Mio. Jahren in den Vertebraten weit verbreitet vorkommt. Dennoch scheint es vereinzelt genetische Variationen zu geben, die einen Effekt auf die Funktionalität des LOX-Stoffwechsels haben. Diese potenziell krankmachenden Mutationen (*loss-of-function*) sind zwar selten, sollten aber in der personalisierten Medizin große Bedeutung für die Entwicklung individueller therapeutischer Konzepte haben.

Lipoxygenases are lipid-peroxidizing enzymes that catalyze the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids to their corresponding hydroperoxides. Non-synonymous genetic variations in human lipoxygenase genes have been associated in epidemiological studies with different polygenic diseases like Asthma bronchiale and atherosclerosis. Before we started this project most of these variations were not functionally characterized and thus, the epidemiological correlation was purely descriptive. To explore the mechanistic basis for the correlation we systematically analyzed the functional impact of selected genetic variations in human lipoxygenases and in other genes of the LOX pathway. We found that common genetic variations usually occur at functionally less important amino acid positions in the primary sequences of those proteins. In enzymes with an active site localized in the centre of the protein these residues are mostly located at the protein surface, which might be a plausible reason for their minor functional effects. However, some genetic variations such as the hALOX15 Thr560Met SNP (rs34210653; allele frequency 1,5 %), which was associated with a higher risk for coronary artery disease, were catalytically inactive. We found that the catalytic silence is due to severe misfolding of the enzyme. Similar observations were made for the two newly discovered loss-of-function mutations in human LOX genes: hALOX15 Gly422Glu (rs61099320) and hALOX15B Ala416Asp (rs140152561). Structural modeling indicated that the substitution of the Gly422 with bulkier amino acids causes sterical clash with surrounding residues. Database analysis suggests that there are additional functionally relevant non-synonymous genetic variations (nonsense, substitution of functionally important amino acid residues) in many genes of the LOX pathway but except for the hALOX15 Thr560Met SNP neither of them has an allele frequency > 1%. One may conclude that there is evolutionary pressure on these enzymes and receptors, which prevents accumulation of functionally inactive alleles within the human population. This conclusion is somehow plausible since LOX products are biologically relevant and the LOX pathway, which was introduced during evolution of life at 350-400 Mill years ago when bony fish appeared, has been highly conserved in vertebrates since then. Nevertheless there are some genetic variations, which might impact the lipoxygenase pathway. These rare, disease-related mutations (loss-of-function) will play an important role in the personalized medicine for the development of optimized therapeutically concepts.

6 Literaturverzeichnis

- Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., Hurles, M. E., McVean, G. A., and Consortium, G. P. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073
- Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., Kang, H. M., Marth, G. T., McVean, G. A., and Consortium, G. P. (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56-65
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., and Sunyaev, S. R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248-249
- Agorogiannis, E. I., Agorogiannis, G. I., Papadimitriou, A., and Hadjigeorgiou, G. M. (2004) Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 215-224
- Aleem, A. M., Jankun, J., Dignam, J. D., Walther, M., Kühn, H., Svergun, D. I., and Skrzypczak-Jankun, E. (2008) Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure. *J Mol Biol* 376, 193-209
- Aleem, A. M., Wells, L., Jankun, J., Walther, M., Kühn, H., Reinartz, J., and Skrzypczak-Jankun, E. (2009) Human platelet 12-lipoxygenase: naturally occurring Q261/R261 variants and N544L mutant show altered activity but unaffected substrate binding and membrane association behavior. *Int J Mol Med* 24, 759-764
- Altshuler, D. M., Gibbs, R. A., Peltonen, L., Dermitzakis, E., Schaffner, S. F., Yu, F., Bonnen, P. E., de Bakker, P. I., Deloukas, P., Gabriel, S. B., Gwilliam, R., Hunt, S., Inouye, M., Jia, X., Palotie, A., Parkin, M., Whittaker, P., Chang, K., Hawes, A., Lewis, L. R., Ren, Y., Wheeler, D., Muzny, D. M., Barnes, C., Darvishi, K., Hurles, M., Korn, J. M., Kristiansson, K., Lee, C., McCarroll, S. A., Nemesh, J., Keinan, A., Montgomery, S. B., Pollack, S., Price, A. L., Soranzo, N., Gonzaga-Jauregui, C., Anttila, V., Brodeur, W., Daly, M. J., Leslie, S., McVean, G., Moutsianas, L., Nguyen, H., Zhang, Q., Ghorri, M. J., McGinnis, R., McLaren, W., Takeuchi, F., Grossman, S. R., Shlyakhter, I., Hostetter, E. B., Sabeti, P. C., Adebamowo, C. A., Foster, M. W., Gordon, D. R., Licinio, J., Manca, M. C., Marshall, P. A., Matsuda, I., Ngare, D., Wang, V. O., Reddy, D., Rotimi, C. N., Royal, C. D., Sharp, R. R., Zeng, C., Brooks, L. D., McEwen, J. E., and Consortium, I. H. (2010) Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467, 52-58
- Amemiya, C. T., Alföldi, J., Lee, A. P., Fan, S., Philippe, H., Maccallum, I., Braasch, I., Manousaki, T., Schneider, I., Rohner, N., Organ, C., Chalopin, D., Smith, J. J., Robinson, M., Dorrington, R. A., Gerdol, M., Aken, B., Biscotti, M. A., Barucca, M., Baurain, D., Berlin, A. M., Blatch, G. L., Buonocore, F., Burmester, T., Campbell, M.

- S., Canapa, A., Cannon, J. P., Christoffels, A., De Moro, G., Edkins, A. L., Fan, L., Fausto, A. M., Feiner, N., Forconi, M., Gamielien, J., Gnerre, S., Gnirke, A., Goldstone, J. V., Haerty, W., Hahn, M. E., Hesse, U., Hoffmann, S., Johnson, J., Karchner, S. I., Kuraku, S., Lara, M., Levin, J. Z., Litman, G. W., Mauceli, E., Miyake, T., Mueller, M. G., Nelson, D. R., Nitsche, A., Olmo, E., Ota, T., Pallavicini, A., Panji, S., Picone, B., Ponting, C. P., Prohaska, S. J., Przybylski, D., Saha, N. R., Ravi, V., Ribeiro, F. J., Sauka-Spengler, T., Scapigliati, G., Searle, S. M., Sharpe, T., Simakov, O., Stadler, P. F., Stegeman, J. J., Sumiyama, K., Tabbaa, D., Tafer, H., Turner-Maier, J., van Heusden, P., White, S., Williams, L., Yandell, M., Brinkmann, H., Volff, J. N., Tabin, C. J., Shubin, N., Schartl, M., Jaffe, D. B., Postlethwait, J. H., Venkatesh, B., Di Palma, F., Lander, E. S., Meyer, A., and Lindblad-Toh, K. (2013) The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496, 311-316
- Andreou, A., and Feussner, I. (2009) Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70, 1504-1510
- Arora, N., Singh, V. K., Shah, K., and Pandey-Rai, S. (2012) Qualitative and Quantitative analysis of 3D predicted arachidonate 15-lipoxygenase-B (15-LOX-2) from Homo sapiens. *Bioinformatics* 8, 555-561
- Artenjak, A., Lakota, K., Frank, M., Čučnik, S., Rozman, B., Božič, B., Shoenfeld, Y., and Sodin-Semrl, S. (2012) Antiphospholipid antibodies as non-traditional risk factors in atherosclerosis based cardiovascular diseases without overt autoimmunity. A critical updated review. *Autoimmun Rev* 11, 873-882
- Assimes, T. L., Knowles, J. W., Priest, J. R., Basu, A., Borchert, A., Volcik, K. A., Grove, M. L., Tabor, H. K., Southwick, A., Tabibiazar, R., Sidney, S., Boerwinkle, E., Go, A. S., Iribarren, C., Hlatky, M. A., Fortmann, S. P., Myers, R. M., Kuhn, H., Risch, N., and Quertermous, T. (2008) A near null variant of 12/15-LOX encoded by a novel SNP in ALOX15 and the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 198, 136-144
- Bai, C., Matsui, E., Ohnishi, H., Kimata, K., Kasahara, K., Kaneko, H., Kato, Z., Fukao, T., and Kondo, N. (2008) A novel polymorphism, E254K, in the 5-lipoxygenase gene associated with bronchial asthma. *Int J Mol Med* 21, 139-144
- Barreiro, L. B., Laval, G., Quach, H., Patin, E., and Quintana-Murci, L. (2008) Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet* 40, 340-345
- Baset, H. A., Ford-Hutchinson, A. W., and O'Neill, G. P. (1998) Molecular cloning and functional expression of a Caenorhabditis elegans aminopeptidase structurally related to mammalian leukotriene A4 hydrolases. *J Biol Chem* 273, 27978-27987
- Belkner, J., Wiesner, R., Rathman, J., Barnett, J., Sigal, E., and Kühn, H. (1993) Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. *Eur J Biochem* 213, 251-

261

- Benkert, P., Künzli, M., and Schwede, T. (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res* 37, W510-514
- Berg, C., Hammarström, S., Herbertsson, H., Lindström, E., Svensson, A. C., Söderström, M., Tengvall, P., and Bengtsson, T. (2006) Platelet-induced growth of human fibroblasts is associated with an increased expression of 5-lipoxygenase. *Thromb Haemost* 96, 652-659
- Berger, M., Schwarz, K., Thiele, H., Reimann, I., Huth, A., Borngräber, S., Kühn, H., and Thiele, B. J. (1998) Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J Mol Biol* 278, 935-948
- Bhattacharya, D., and Cheng, J. (2013) 3Drefine: consistent protein structure refinement by optimizing hydrogen bonding network and atomic-level energy minimization. *Proteins* 81, 119-131
- Bochkov, V. N., Oskolkova, O. V., Birukov, K. G., Levonen, A. L., Binder, C. J., and Stöckl, J. (2010) Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal* 12, 1009-1059
- Bockelie, T., and Fortey, R. A. (1976) An early Ordovician vertebrate. *Nature* 260, 36-38
- Boks, M. P., Derks, E. M., Weisenberger, D. J., Strengman, E., Janson, E., Sommer, I. E., Kahn, R. S., and Ophoff, R. A. (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One* 4, e6767
- Borngräber, S., Browner, M., Gillmor, S., Gerth, C., Anton, M., Fletterick, R., and Kühn, H. (1999) Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem* 274, 37345-37350
- Borngräber, S., Kuban, R. J., Anton, M., and Kühn, H. (1996) Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol* 264, 1145-1153
- Boyington, J. C., Gaffney, B. J., and Amzel, L. M. (1990) Crystallization and preliminary x-ray analysis of soybean lipoxygenase-1, a non-heme iron-containing dioxygenase. *J Biol Chem* 265, 12771-12773
- 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
- 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, 23679-23682
- Brash, A. R., Boeglin, W. E., and Chang, M. S. (1997) Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6148-6152
- Bross, P., Winter, V., Pedersen, C. B., and Gregersen, N. (2003) Investigation of folding and degradation of in vitro synthesized mutant proteins in mitochondria. *Methods Mol Biol* 232, 285-293
- Bürger, F., Krieg, P., Kinzig, A., Schurich, B., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1999) Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effects of lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes. *Mol Carcinog* 24, 108-117
- Cai, C., Zhou, M. X., Li, Y. P., and Chen, C. S. (2011) [Association of leukotriene gene polymorphisms with response to antileukotriene treatment in patients with asthma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 34, 362-366
- Castellano, I., Merlino, A., Rossi, M., and La Cara, F. (2010) Biochemical and structural properties of gamma-glutamyl transpeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: an enzyme specialized in hydrolase activity. *Biochimie* 92, 464-474
- Cathcart, M. K., McNally, A. K., and Chisolm, G. M. (1991) Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res* 32, 63-70
- Chahinian, H., Sias, B., and Carrière, F. (2000) The C-terminal domain of pancreatic lipase: functional and structural analogies with c2 domains. *Curr Protein Pept Sci* 1, 91-103
- Chaitidis, P., Adel, S., Anton, M., Heydeck, D., Kuhn, H., and Horn, T. (2013) Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms. *J Lipid Res* 54, 1397-1409
- Chan, K. H., Niu, T., Ma, Y., You, N. C., Song, Y., Sobel, E. M., Hsu, Y. H., Balasubramanian, R., Qiao, Y., Tinker, L., and Liu, S. (2013) Common genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPARG) and type 2 diabetes risk among Women's Health Initiative postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 98, E600-604
- Chang, J. C., and Kan, Y. W. (1979) beta 0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2886-2889
- Chaudhuri, T. K., and Paul, S. (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* 273, 1331-1349
- Chen, X. S., and Funk, C. D. (2001) The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 276, 811-818
- Choi, J., Chon, J. K., Kim, S., and Shin, W. (2008) Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* 70, 1023-

1032

- Choi, M. Y., Chan, C. C., Chan, D., Luk, K. D., Cheah, K. S., and Tanner, J. A. (2009) Biochemical consequences of sedlin mutations that cause spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Biochem J* 423, 233-242
- Coffa, G., Schneider, C., and Brash, A. R. (2005) A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 87-92
- Conrad, D. F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T. D., Barnes, C., Campbell, P., Fitzgerald, T., Hu, M., Ihm, C. H., Kristiansson, K., Macarthur, D. G., Macdonald, J. R., Onyiah, I., Pang, A. W., Robson, S., Stirrups, K., Valsesia, A., Walter, K., Wei, J., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Lee, C., Scherer, S. W., Hurles, M. E., and Consortium, W. T. C. C. (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704-712
- Courtenay, E. S., Capp, M. W., Saecker, R. M., and Record, M. T. (2000) Thermodynamic analysis of interactions between denaturants and protein surface exposed on unfolding: interpretation of urea and guanidinium chloride m-values and their correlation with changes in accessible surface area (ASA) using preferential interaction coefficients and the local-bulk domain model. *Proteins Suppl* 4, 72-85
- Cyrus, T., Praticò, D., Zhao, L., Witztum, J. L., Rader, D. J., Rokach, J., FitzGerald, G. A., and Funk, C. D. (2001) Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 103, 2277-2282
- Cyrus, T., Witztum, J. L., Rader, D. J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M. F., and Funk, C. D. (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 103, 1597-1604
- Dainese, E., Sabatucci, A., van Zadelhoff, G., Angelucci, C. B., Vachette, P., Veldink, G. A., Agrò, A. F., and Maccarrone, M. (2005) Structural stability of soybean lipoxygenase-1 in solution as probed by small angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 349, 143-152
- David, A., Razali, R., Wass, M. N., and Sternberg, M. J. (2012) Protein-protein interaction sites are hot spots for disease-associated nonsynonymous SNPs. *Hum Mutat* 33, 359-363
- De Conti, L., Baralle, M., and Buratti, E. (2013) Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 49-60
- de Groot, J. J., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F., Boldingh, J., Wever, R., and van Gelder, B. F. (1975) Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1. *Biochim Biophys Acta* 377, 71-79
- Di Venere, A., Horn, T., Stehling, S., Mei, G., Masgrau, L., González-Lafont, A., Kühn, H., and Ivanov, I. (2013) Role of Arg403 for thermostability and catalytic activity of rabbit

- 12/15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1831, 1079-1088
- Dill, K. A., and MacCallum, J. L. (2012) The protein-folding problem, 50 years on. *Science* 338, 1042-1046
- Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., and Weikl, T. R. (2008) The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* 37, 289-316
- Drazen, J. M., Yandava, C. N., Dubé, L., Szczerback, N., Hippensteel, R., Pillari, A., Israel, E., Schork, N., Silverman, E. S., Katz, D. A., and Drajesk, J. (1999) Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 22, 168-170
- Duroudier, N. P., Tulah, A. S., and Sayers, I. (2009) Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* 64, 823-839
- Dwyer, J. H., Allayee, H., Dwyer, K. M., Fan, J., Wu, H., Mar, R., Lusk, A. J., and Mehrabian, M. (2004) Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 350, 29-37
- Eckl, K. M., de Juanes, S., Kurtenbach, J., Nätebus, M., Lugassy, J., Oji, V., Traupe, H., Preil, M. L., Martínez, F., Smolle, J., Harel, A., Krieg, P., Sprecher, E., and Hennies, H. C. (2009) Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. *J Invest Dermatol* 129, 1421-1428
- Eckl, K. M., Krieg, P., Küster, W., Traupe, H., André, F., Wittstruck, N., Fürstenberger, G., and Hennies, H. C. (2005) Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mutat* 26, 351-361
- Epp, N., Fürstenberger, G., Müller, K., de Juanes, S., Leitges, M., Hausser, I., Thieme, F., Liebisch, G., Schmitz, G., and Krieg, P. (2007) 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol* 177, 173-182
- Esser, J., Rakonjac, M., Hofmann, B., Fischer, L., Provost, P., Schneider, G., Steinhilber, D., Samuelsson, B., and Rådmark, O. (2010) Coactosin-like protein functions as a stabilizing chaperone for 5-lipoxygenase: role of tryptophan 102. *Biochem J* 425, 265-274
- Fanning, L. B., and Boyce, J. A. (2013) Lipid mediators and allergic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 111, 155-162
- Fernandez-Fuentes, N., Madrid-Aliste, C. J., Rai, B. K., Fajardo, J. E., and Fiser, A. (2007) M4T: a comparative protein structure modeling server. *Nucleic Acids Res* 35, W363-368
- Fernandez-Fuentes, N., Rai, B. K., Madrid-Aliste, C. J., Fajardo, J. E., and Fiser, A. (2007) Comparative protein structure modeling by combining multiple templates and

- optimizing sequence-to-structure alignments. *Bioinformatics* 23, 2558-2565
- Flamand, N., Luo, M., Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2009) Phosphorylation of serine 271 on 5-lipoxygenase and its role in nuclear export. *J Biol Chem* 284, 306-313
- Foroud, T., Ichikawa, S., Koller, D., Lai, D., Curry, L., Xuei, X., Edenberg, H. J., Hui, S., Peacock, M., and Econs, M. J. (2008) Association studies of ALOX5 and bone mineral density in healthy adults. *Osteoporos Int* 19, 637-643
- Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875
- Funk, C. D. (2006) Lipoxygenase pathways as mediators of early inflammatory events in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1204-1206
- Funk, C. D., Matsumoto, T., Hoshiko, S., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1989) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19, 470-473
- Furihata, T., Kishida, S., Sugiura, H., Kamiichi, A., Iikura, M., and Chiba, K. (2013) Functional analysis of purine nucleoside phosphorylase as a key enzyme in ribavirin metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet*
- Fürstenberger, G., Epp, N., Eckl, K. M., Hennies, H. C., Jørgensen, C., Hallenborg, P., Kristiansen, K., and Krieg, P. (2007) Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82, 128-134
- Gan, Q. F., Browner, M. F., Sloane, D. L., and Sigal, E. (1996) Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. Molecular modeling and mutagenesis. *J Biol Chem* 271, 25412-25418
- Gao, W. H., Zhang, Q. B., Liu, J. P., Yang, J. P., Zhang, G. X., Ma, Y. X., Zhang, X. G., Yu, L., and Zhou, Y. A. (2011) [Study on the mutations of phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria in Shanxi province]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 28, 393-396
- Gao, X., Grignon, D. J., Chbihi, T., Zacharek, A., Chen, Y. Q., Sakr, W., Porter, A. T., Crissman, J. D., Pontes, J. E., and Powell, I. J. (1995) Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology* 46, 227-237
- Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Waight, M. T., Neau, D. B., Boeglin, W. E., Brash, A. R., and Newcomer, M. E. (2011) The structure of human 5-lipoxygenase. *Science* 331, 217-219
- Gilbert, N. C., Rui, Z., Neau, D. B., Waight, M. T., Bartlett, S. G., Boeglin, W. E., Brash, A. R., and Newcomer, M. E. (2012) Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB J*

- 26, 3222-3229
- Gillmor, S. A., Villaseñor, A., Fletterick, R., Sigal, E., and Browner, M. F. (1997) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* 4, 1003-1009
- Glickman, M. H., and Klinman, J. P. (1995) Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction. *Biochemistry* 34, 14077-14092
- Goldstein, J. A. (2001) Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52, 349-355
- Gonzaga-Jauregui, C., Lupski, J. R., and Gibbs, R. A. (2012) Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med* 63, 35-61
- Gronert, K., Martinsson-Niskanen, T., Ravasi, S., Chiang, N., and Serhan, C. N. (2001) Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol* 158, 3-9
- Gutiérrez, M. C., Castillo, A. M., Pagaling, E., Heaphy, S., Kamekura, M., Xue, Y., Ma, Y., Cowan, D. A., Jones, B. E., Grant, W. D., and Ventosa, A. (2008) *Halorubrum kocurii* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2031-2035
- Haas, U., Raschperger, E., Hamberg, M., Samuelsson, B., Tryggvason, K., and Haeggström, J. Z. (2011) Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20479-20484
- Haeggström, J. Z., and Funk, C. D. (2011) Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111, 5866-5898
- Häfner, A. K., Cernescu, M., Hofmann, B., Ermisch, M., Hörnig, M., Metzner, J., Schneider, G., Brutschy, B., and Steinhilber, D. (2011) Dimerization of human 5-lipoxygenase. *Biol Chem* 392, 1097-1111
- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3400-3404
- Hammarberg, T., Provost, P., Persson, B., and Rådmark, O. (2000) The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 275, 38787-38793
- Hammel, M., Walther, M., Prassl, R., and Kuhn, H. (2004) Structural flexibility of the N-terminal beta-barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle X-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding. *J Mol Biol* 343, 917-929

- Hamosh, A., King, T. M., Rosenstein, B. J., Corey, M., Levison, H., Durie, P., Tsui, L. C., McIntosh, I., Keston, M., and Brock, D. J. (1992) Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly----Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet* 51, 245-250
- Hansen, J., Garreta, A., Benincasa, M., Fusté, M. C., Busquets, M., and Manresa, A. (2013) Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4737-4747
- Harsløf, T., Husted, L. B., Nyegaard, M., Carstens, M., Stenkjær, L., Brixen, K., Eiken, P., Jensen, J. E., Børglum, A. D., Mosekilde, L., Rejnmark, L., and Langdahl, B. L. (2011) Polymorphisms in the ALOX12 gene and osteoporosis. *Osteoporos Int* 22, 2249-2259
- Heckmann, L. H., Sibly, R. M., Timmermans, M. J., and Callaghan, A. (2008) Outlining eicosanoid biosynthesis in the crustacean *Daphnia*. *Front Zool* 5, 11
- Heise, C. E., O'Dowd, B. F., Figueroa, D. J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D. S., Stocco, R., Bellefeuille, J. N., Abramovitz, M., Cheng, R., Williams, D. L., Zeng, Z., Liu, Q., Ma, L., Clements, M. K., Coulombe, N., Liu, Y., Austin, C. P., George, S. R., O'Neill, G. P., Metters, K. M., Lynch, K. R., and Evans, J. F. (2000) Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275, 30531-30536
- Hersberger, M., Müller, M., Marti-Jaun, J., Heid, I. M., Coassin, S., Young, T. F., Waechter, V., Hengstenberg, C., Meisinger, C., Peters, A., König, W., Holmer, S., Schunkert, H., Klopp, N., Kronenberg, F., and Illig, T. (2009) No association of two functional polymorphisms in human ALOX15 with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 205, 192-196
- Hiltunen, T., Luoma, J., Nikkari, T., and Ylä-Herttuala, S. (1995) Induction of 15-lipoxygenase mRNA and protein in early atherosclerotic lesions. *Circulation* 92, 3297-3303
- Hofheinz, K., Kakularam, K. R., Adel, S., Anton, M., Polymarasetty, A., Reddanna, P., Kuhn, H., and Horn, T. (2013) Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. *Arch Biochem Biophys* 530, 40-47
- Horn, T. I., Reddy Kakularam, K., Anton, M., Richter, C., Reddanna, P., and Kuhn, H. (2013) Functional characterization of genetic enzyme variations in human lipoxygenases. *Redox Biol* 1, 566-577
- Horn T., Ivanov I., Di Venere A., Kakularam K. R., Reddanna P., Conrad M. L., Richter C., Scheerer P., Kuhn H. (2013) Molecular basis for the catalytic inactivity of a naturally occurring near-null variant of human ALOX15. *Biochim Biophys Acta*. 1831(12):1702-13
- Howland, R. H. (2012) Future prospects for pharmacogenetics in the quest for personalized

- medicine. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 50, 13-16
- Huo, Y., Zhao, L., Hyman, M. C., Shashkin, P., Harry, B. L., Burcin, T., Forlow, S. B., Stark, M. A., Smith, D. F., Clarke, S., Srinivasan, S., Hedrick, C. C., Praticò, D., Witztum, J. L., Nadler, J. L., Funk, C. D., and Ley, K. (2004) Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 110, 2024-2031
- Il Lee, S., Zuo, X., and Shureiqi, I. (2011) 15-Lipoxygenase-1 as a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metastasis Rev* 30, 481-491
- In, K. H., Asano, K., Beier, D., Grobholz, J., Finn, P. W., Silverman, E. K., Silverman, E. S., Collins, T., Fischer, A. R., Keith, T. P., Serino, K., Kim, S. W., De Sanctis, G. T., Yandava, C., Pillari, A., Rubin, P., Kemp, J., Israel, E., Busse, W., Ledford, D., Murray, J. J., Segal, A., Tinkleman, D., and Drazen, J. M. (1997) Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 99, 1130-1137
- Ingram, C. D., and Brash, A. R. (1988) Characterization of HETEs and related conjugated dienes by UV spectroscopy. *Lipids* 23, 340-344
- Ingram, V. M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 178, 792-794
- Ishii, S., Noguchi, M., Miyano, M., Matsumoto, T., and Noma, M. (1992) Mutagenesis studies on the amino acid residues involved in the iron-binding and the activity of human 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 1133-1134
- Ivanov, I., Di Venere, A., Horn, T., Scheerer, P., Nicolai, E., Stehling, S., Richter, C., Skrzypczak-Jankun, E., Mei, G., Maccarrone, M., and Kühn, H. (2011) Tight association of N-terminal and catalytic subunits of rabbit 12/15-lipoxygenase is important for protein stability and catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* 1811, 1001-1010
- Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V. B., Kuhn, H., and Walther, M. (2010) Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys* 503, 161-174
- Ivanov, I., Shang, W., Toledo, L., Masgrau, L., Svergun, D. I., Stehling, S., Gómez, H., Di Venere, A., Mei, G., Lluch, J. M., Skrzypczak-Jankun, E., González-Lafont, A., and Kühn, H. (2012) Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes? *Proteins* 80, 703-712
- Jabir, R. S., Naidu, R., Annuar, M. A., Ho, G. F., Munisamy, M., and Stanslas, J. (2012) Pharmacogenetics of taxanes: impact of gene polymorphisms of drug transporters on pharmacokinetics and toxicity. *Pharmacogenomics* 13, 1979-1988
- Jalil, S. F., Ahmed, I., Gauhar, Z., Ahmed, M., Malik, J. M., John, P., and Bhatti, A. (2013)

- Association of Pro12Ala (rs1801282) variant of PPAR gamma with Rheumatoid Arthritis in a Pakistani population. *Rheumatol Int*
- Jansen, C., Hofheinz, K., Vogel, R., Roffeis, J., Anton, M., Reddanna, P., Kuhn, H., and Walther, M. (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, 37804-37812
- Jeffrey, G. A. (1997) An introduction to hydrogen bonding. Oxford University Press
- Jethva, R., Bennett, M. J., and Vockley, J. (2008) Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 95, 195-200
- Jiang, W. G., Watkins, G., Douglas-Jones, A., and Mansel, R. E. (2006) Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 74, 235-245
- Jisaka, M., Kim, R. B., Boeglin, W. E., and Brash, A. R. (2000) Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem* 275, 1287-1293
- Johanson, Z., Long, J. A., Talent, J. A., Janvier, P., and Warren, J. W. (2006) Oldest coelacanth, from the Early Devonian of Australia. *Biol Lett* 2, 443-446
- Johnson, C. M., Lyle, E. A., Omueti, K. O., Stepensky, V. A., Yegin, O., Alpsy, E., Hamann, L., Schumann, R. R., and Tapping, R. I. (2007) Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* 178, 7520-7524
- Kalayci, O., Birben, E., Sackesen, C., Keskin, O., Tahan, F., Wechsler, M. E., Civelek, E., Soyer, O. U., Adalioglu, G., Tuncer, A., Israel, E., and Lilly, C. (2006) ALOX5 promoter genotype, asthma severity and LTC production by eosinophils. *Allergy* 61, 97-103
- Kamitani, H., Geller, M., and Eling, T. (1998) Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem* 273, 21569-21577
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., and Akira, S. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205, 1601-1610
- Keshamouni, V. G., Reddy, R. C., Arenberg, D. A., Joel, B., Thannickal, V. J., Kalemkerian, G. P., and Standiford, T. J. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23, 100-108
- Kim, T., Kim, H. J., Park, J. K., Kim, J. W., and Chung, J. H. (2010) Association between

- polymorphisms of arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12) and schizophrenia in a Korean population. *Behav Brain Funct* 6, 44
- Kinzig, A., Fürstenberger, G., Bürger, F., Vogel, S., Müller-Decker, K., Mincheva, A., Lichter, P., Marks, F., and Krieg, P. (1997) Murine epidermal lipoxygenase (Aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform. *FEBS Lett* 402, 162-166
- Kleinsteinst, S. E., Heath, L., Makar, K. W., Poole, E. M., Seufert, B. L., Slattery, M. L., Xiao, L., Duggan, D. J., Hsu, L., Curtin, K., Koepl, L., Muehling, J., Taverna, D., Caan, B. J., Carlson, C. S., Potter, J. D., and Ulrich, C. M. (2013) Genetic variation in the lipoxygenase pathway and risk of colorectal neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 52, 437-449
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., and Lehmann, J. M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813-819
- Koshland, D. E. (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 98-104
- Kottyan, L. C., Woo, J. G., Keddache, M., Banach, W., Crimmins, N. A., Dolan, L. M., and Martin, L. J. (2012) Novel variations in the adiponectin gene (ADIPOQ) may affect distribution of oligomeric complexes. *Springerplus* 1, 66
- Krieg, P., and Fürstenberger, G. (2013) The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*
- Krieg, P., Marks, F., and Fürstenberger, G. (2001) A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. *Genomics* 73, 323-330
- Krieg, P., Siebert, M., Kinzig, A., Bettenhausen, R., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1999) Murine 12(R)-lipoxygenase: functional expression, genomic structure and chromosomal localization. *FEBS Lett* 446, 142-148
- Kuban, R. J., Wiesner, R., Rathman, J., Veldink, G., Nolting, H., Solé, V. A., and Kühn, H. (1998) The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases. *Biochem J* 332 (Pt 1), 237-242
- Kuhn, H., Belkner, J., Wiesner, R., and Brash, A. R. (1990) Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem* 265, 18351-18361
- Kühn, H., Belkner, J., Zaiss, S., Fährenklemper, T., and Wohlfeil, S. (1994) Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J Exp Med* 179, 1903-1911
- Kühn, H., Kuban, R., Walther, M., and Veldink, G. A. (1999) X-ray absorption studies into the iron ligand sphere of plant and animal lipoxygenases. *Adv Exp Med Biol* 469, 99-104
- Kulkarni, S., Das, S., Funk, C. D., Murray, D., and Cho, W. (2002) Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*

- 277, 13167-13174
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lang, I., Göbel, C., Porzel, A., Heilmann, I., and Feussner, I. (2008) A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem J* 410, 347-357
- Lemaitre, R. N., Rice, K., Marciante, K., Bis, J. C., Lumley, T. S., Wiggins, K. L., Smith, N. L., Heckbert, S. R., and Psaty, B. M. (2009) Variation in eicosanoid genes, non-fatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Atherosclerosis* 204, e58-63
- Lesueur, F., Bouadjar, B., Lefèvre, C., Jobard, F., Audebert, S., Lakhdar, H., Martin, L., Tadini, G., Karaduman, A., Emre, S., Saker, S., Lathrop, M., and Fischer, J. (2007) Novel mutations in ALOX12B in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and evidence for genetic heterogeneity on chromosome 17p13. *J Invest Dermatol* 127, 829-834
- Li, N., Sood, S., Wang, S., Fang, M., Wang, P., Sun, Z., Yang, C. S., and Chen, X. (2005) Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin Cancer Res* 11, 2089-2096
- Liavonchanka, A., and Feussner, I. (2006) Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* 163, 348-357
- Liu, P., Lu, Y., Recker, R. R., Deng, H. W., and Dvornyk, V. (2010) ALOX12 gene is associated with the onset of natural menopause in white women. *Menopause* 17, 152-156
- Lu, D., and Xu, S. (2013) Principal component analysis reveals the 1000 Genomes Project does not sufficiently cover the human genetic diversity in Asia. *Front Genet* 4, 127
- Luo, M., Jones, S. M., Flamand, N., Aronoff, D. M., Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2005) Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 280, 40609-40616
- Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241
- Maccarrone, M., Salucci, M. L., van Zadelhoff, G., Malatesta, F., Veldink, G., Vliegenthart, J. F., and Finazzi-Agrò, A. (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* 40, 6819-6827
- Magnusson, L. U., Lundqvist, A., Karlsson, M. N., Skålen, K., Levin, M., Wiklund, O., Borén, J., and Hultén, L. M. (2012) Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. *PLoS One* 7, e43142
- Manev, H., Chen, H., Dzitoyeva, S., and Manev, R. (2011) Cyclooxygenases and 5-

- lipoxygenase in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 315-319
- Mastalerz, L., and Kumik, J. (2010) Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Pol Arch Med Wewn* 120, 103-108
- Matsumoto, T., Funk, C. D., Rådmark, O., Höög, J. O., Jörnvall, H., and Samuelsson, B. (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 26-30
- Mehrabian, M., and Allayee, H. (2003) 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 14, 447-457
- Mellor, E. A., Maekawa, A., Austen, K. F., and Boyce, J. A. (2001) Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7964-7969
- Melstrom, L. G., Bentrem, D. J., Salabat, M. R., Kennedy, T. J., Ding, X. Z., Strouch, M., Rao, S. M., Witt, R. C., Ternent, C. A., Talamonti, M. S., Bell, R. H., and Adrian, T. A. (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, 6525-6530
- Micozzi, D., Carpi, F. M., Pucciarelli, S., Polzonetti, V., Polidori, P., Vilar, S., Williams, B., Costanzi, S., and Vincenzetti, S. (2013) Human cytidine deaminase: A biochemical characterization of its naturally occurring variants. *Int J Biol Macromol* 63C, 64-74
- Mills, R. E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R. E., Chen, K., Alkan, C., Abyzov, A., Yoon, S. C., Ye, K., Cheetham, R. K., Chinwalla, A., Conrad, D. F., Fu, Y., Grubert, F., Hajirasouliha, I., Hormozdiari, F., Iakoucheva, L. M., Iqbal, Z., Kang, S., Kidd, J. M., Konkel, M. K., Korn, J., Khurana, E., Kural, D., Lam, H. Y., Leng, J., Li, R., Li, Y., Lin, C. Y., Luo, R., Mu, X. J., Nemes, J., Peckham, H. E., Rausch, T., Scally, A., Shi, X., Stromberg, M. P., Stütz, A. M., Urban, A. E., Walker, J. A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, Z. D., Batzer, M. A., Ding, L., Marth, G. T., McVean, G., Sebat, J., Snyder, M., Wang, J., Eichler, E. E., Gerstein, M. B., Hurles, M. E., Lee, C., McCarroll, S. A., Korbel, J. O., and Project, G. (2011) Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470, 59-65
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., and Axelrod, B. (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 35, 10687-10701
- Morgan, E. L., Maskrey, B. H., and Rowley, A. F. (2005) At what stage in metazoan evolution did leukotriene generation first appear?--key insights from cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol* 29, 53-59
- Muga, S. J., Thuillier, P., Pavone, A., Rundhaug, J. E., Boeglin, W. E., Jisaka, M., Brash, A. R., and Fischer, S. M. (2000) 8S-lipoxygenase products activate peroxisome

- proliferator-activated receptor alpha and induce differentiation in murine keratinocytes. *Cell Growth Differ* 11, 447-454
- Neau, D. B., Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Boeglin, W., Brash, A. R., and Newcomer, M. E. (2009) The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity. *Biochemistry* 48, 7906-7915
- Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., Tang, K., Chen, Y., Qiao, Y., Zacharek, A., Guo, Y., Milanini, J., Pages, G., and Honn, K. V. (2006) Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 281, 18601-18609
- Nie, D., Tang, K., Diglio, C., and Honn, K. V. (2000) Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 95, 2304-2311
- Nithipatikom, K., Isbell, M. A., See, W. A., and Campbell, W. B. (2006) Elevated 12- and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in urine of patients with prostatic diseases. *Cancer Lett* 233, 219-225
- Nixon, J. B., Kim, K. S., Lamb, P. W., Bottone, F. G., and Eling, T. E. (2004) 15-Lipoxygenase-1 has anti-tumorigenic effects in colorectal cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 7-15
- O'Donnell, V. B. (2003) Free radicals and lipid signaling in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 5, 195-203
- Oliw, E. H., Jernerén, F., Hoffmann, I., Sahlin, M., and Garscha, U. (2011) Manganese lipoxygenase oxidizes bis-allylic hydroperoxides and octadecenoic acids by different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1811, 138-147
- Paré, G., Chasman, D. I., Parker, A. N., Zee, R. R., Mälarstig, A., Seedorf, U., Collins, R., Watkins, H., Hamsten, A., Miletich, J. P., and Ridker, P. M. (2009) Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13 974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 142-150
- Pedersen, C. B., Bross, P., Winter, V. S., Corydon, T. J., Bolund, L., Bartlett, K., Vockley, J., and Gregersen, N. (2003) Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins. The molecular pathogenesis of short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency. *J Biol Chem* 278, 47449-47458
- Pedersen, K. S., Bamlet, W. R., Oberg, A. L., de Andrade, M., Matsumoto, M. E., Tang, H., Thibodeau, S. N., Petersen, G. M., and Wang, L. (2011) Leukocyte DNA methylation signature differentiates pancreatic cancer patients from healthy controls. *PLoS One* 6, e18223
- Pemberton, T. J., Mehta, N. U., Witonsky, D., Di Rienzo, A., Allayee, H., Conti, D. V., and Patel, P. I. (2008) Prevalence of common disease-associated variants in Asian

- Indians. *BMC Genet* 9, 13
- Peters-Golden, M., and Brock, T. G. (2003) 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69, 99-109
- Pidgeon, G. P., Kandouz, M., Meram, A., and Honn, K. V. (2002) Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 2721-2727
- Pidgeon, G. P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O'Byrne, K., Nie, D., and Honn, K. V. (2007) Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 26, 503-524
- Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2001) Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology* 147, 3199-3200
- Pozzi, A., and Capdevila, J. H. (2008) PPARalpha Ligands as Antitumorogenic and Antiangiogenic Agents. *PPAR Res* 2008, 906542
- Prakash, J., Srivastava, N., Awasthi, S., Agarwal, C., Natu, S., Rajpal, N., and Mittal, B. (2012) Association of PPAR- γ gene polymorphisms with obesity and obesity-associated phenotypes in North Indian population. *Am J Hum Biol* 24, 454-459
- Prasad, V. V., Kolli, P., and Moganti, D. (2011) Association of a functional polymorphism (Gln261Arg) in 12-lipoxygenase with breast cancer. *Exp Ther Med* 2, 317-323
- Prigge, S. T., Boyington, J. C., Faig, M., Doctor, K. S., Gaffney, B. J., and Amzel, L. M. (1997) Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 79, 629-636
- Putnam, N. H., Butts, T., Ferrier, D. E., Furlong, R. F., Hellsten, U., Kawashima, T., Robinson-Rechavi, M., Shoguchi, E., Terry, A., Yu, J. K., Benito-Gutiérrez, E. L., Dubchak, I., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J. J., Grigoriev, I. V., Horton, A. C., de Jong, P. J., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kohara, Y., Kuroki, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Osoegawa, K., Pennacchio, L. A., Salamov, A. A., Satou, Y., Sauka-Spengler, T., Schmutz, J., Shin-I, T., Toyoda, A., Bronner-Fraser, M., Fujiyama, A., Holland, L. Z., Holland, P. W., Satoh, N., and Rokhsar, D. S. (2008) The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453, 1064-1071
- Resnick, D., Chatterton, J. E., Schwartz, K., Slayter, H., and Krieger, M. (1996) Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 271, 26924-26930
- Riccioni, G., and Bäck, M. (2012) Leukotrienes as modifiers of preclinical atherosclerosis? *ScientificWorldJournal* 2012, 490968
- Ross, R., and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295, 369-377
- Ross, R., and Glomset, J. A. (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (second of two

- parts). *N Engl J Med* 295, 420-425
- Ross, R., and Harker, L. (1976) Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 193, 1094-1100
- Saam, J., Ivanov, I., Walther, M., Holzhütter, H. G., and Kuhn, H. (2007) Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13319-13324
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Band 1*,
- Samuelsson, B. (2000) The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 161, S2-6
- Sayers, I., Barton, S., Rorke, S., Sawyer, J., Peng, Q., Beghé, B., Ye, S., Keith, T., Clough, J. B., Holloway, J. W., Sampson, A. P., and Holgate, S. T. (2003) Promoter polymorphism in the 5-lipoxygenase (ALOX5) and 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) genes and asthma susceptibility in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy* 33, 1103-1110
- Schilstra, M. J., Veldink, G. A., Verhagen, J., and Vliegenthart, J. F. (1992) Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics. *Biochemistry* 31, 7692-7699
- Schneider, C., and Pozzi, A. (2011) Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30, 277-294
- Schurmann, K., Anton, M., Ivanov, I., Richter, C., Kuhn, H., and Walther, M. (2011) Molecular basis for the reduced catalytic activity of the naturally occurring T560M mutant of human 12/15-lipoxygenase that has been implicated in coronary artery disease. *J Biol Chem* 286, 23920-23927
- Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874
- Schweiger, D., Fürstenberger, G., and Krieg, P. (2007) Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. *J Lipid Res* 48, 553-564
- Serhan, C. N. (2008) Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79, 157-163
- Serhan, C. N., Chiang, N., and Van Dyke, T. E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8, 349-361
- Serhan, C. N., and Petasis, N. A. (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* 111, 5922-5943
- Serhan, C. N., Yacoubian, S., and Yang, R. (2008) Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol* 3, 279-312
- Shang, W., Ivanov, I., Svergun, D. I., Borbulevych, O. Y., Aleem, A. M., Stehling, S., Jankun, J., Kühn, H., and Skrzypczak-Jankun, E. (2011) Probing dimerization and structural

- flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* 409, 654-668
- Shen, J., Herderick, E., Cornhill, J. F., Zsigmond, E., Kim, H. S., Kühn, H., Guevara, N. V., and Chan, L. (1996) Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest* 98, 2201-2208
- Shu, D.-G., Luo, H.-L., Conway Morris, S., Zhang, X.-L., Hu, S.-X., Chen, L., Han, J., Zhu, M., Li, Y., and Chen, L.-Z. (1999) Lower Cambrian vertebrates from south China. *Nature* 402, 42-46
- Shu, D. G., Morris, S. C., Han, J., Zhang, Z. F., Yasui, K., Janvier, P., Chen, L., Zhang, X. L., Liu, J. N., Li, Y., and Liu, H. Q. (2003) Head and backbone of the Early Cambrian vertebrate Haikouichthys. *Nature* 421, 526-529
- Sloane, D. L., Leung, R., Barnett, J., Craik, C. S., and Sigal, E. (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, 275-282
- Sloane, D. L., Leung, R., Craik, C. S., and Sigal, E. (1991) A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* 354, 149-152
- Smith, M. P., Sansom, I. J., and Repetski, J. E. (1996) Histology of the first fish. *Nature* 380, 702-704
- Spanbroek, R., Grabner, R., Lotzer, K., Hildner, M., Urbach, A., Ruhling, K., Moos, M. P., Kaiser, B., Cohnert, T. U., Wahlers, T., Zieske, A., Plenz, G., Robenek, H., Salbach, P., Kuhn, H., Radmark, O., Samuelsson, B., and Habenicht, A. J. (2003) Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1238-1243
- Spanbroek, R., and Habenicht, A. J. (2003) The potential role of antileukotriene drugs in atherosclerosis. *Drug News Perspect* 16, 485-489
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., and Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915-924
- Steinhilber, D., Rådmark, O., and Samuelsson, B. (1993) Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5984-5988
- Sudharshan, E., and Rao, A. G. (1999) Involvement of cysteine residues and domain interactions in the reversible unfolding of lipoxygenase-1. *J Biol Chem* 274, 35351-35358
- Sun, D., Elsea, S. H., Patel, P. I., and Funk, C. D. (1998) Cloning of a human "epidermal-type" 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13. *Cytogenet Cell Genet* 81, 79-82

- Sun, H., Zhang, J., Wang, J., Sun, T., Xiao, H., and Zhang, J. S. (2013) Association between genetic variants of the leukotriene biosynthesis pathway and the risk of stroke: a case-control study in the Chinese Han population. *Chin Med J (Engl)* 126, 254-259
- Suraneni, M. V., Schneider-Broussard, R., Moore, J. R., Davis, T. C., Maldonado, C. J., Li, H., Newman, R. A., Kusewitt, D., Hu, J., Yang, P., and Tang, D. G. (2010) Transgenic expression of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) in mouse prostate leads to hyperplasia and cell senescence. *Oncogene* 29, 4261-4275
- Takahashi, Y., Zhu, H., and Yoshimoto, T. (2005) Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 7, 425-431
- Takano, T., and Mineo, C. (1990) Atherosclerosis and molecular pathology: mechanisms of cholesteryl ester accumulation in foam cells and extracellular space of atherosclerotic lesions. *J Pharmacobiodyn* 13, 385-413
- Tang, D. G., Bhatia, B., Tang, S., and Schneider-Broussard, R. (2007) 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82, 135-146
- Tang, D. G., Grossi, I. M., Chen, Y. Q., Diglio, C. A., and Honn, K. V. (1993) 12(S)-HETE promotes tumor-cell adhesion by increasing surface expression of alpha V beta 3 integrins on endothelial cells. *Int J Cancer* 54, 102-111
- Tang, D. G., Timar, J., Grossi, I. M., Renaud, C., Kimler, V. A., Diglio, C. A., Taylor, J. D., and Honn, K. V. (1993) The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 207, 361-375
- Teng, S., Madej, T., Panchenko, A., and Alexov, E. (2009) Modeling effects of human single nucleotide polymorphisms on protein-protein interactions. *Biophys J* 96, 2178-2188
- Thunnissen, M. M., Nordlund, P., and Haeggström, J. Z. (2001) Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol* 8, 131-135
- Toledo, L., Masgrau, L., Lluch, J. M., and González-Lafont, À. (2011) Substrate binding to mammalian 15-lipoxygenase. *J Comput Aided Mol Des* 25, 825-835
- Toledo, L., Masgrau, L., Maréchal, J. D., Lluch, J. M., and González-Lafont, A. (2010) Insights into the mechanism of binding of arachidonic acid to mammalian 15-lipoxygenases. *J Phys Chem B* 114, 7037-7046
- Tumbula, D. L., and Whitman, W. B. (1999) Genetics of Methanococcus: possibilities for functional genomics in Archaea. *Mol Microbiol* 33, 1-7
- Uciechowski, P., Imhoff, H., Lange, C., Meyer, C. G., Browne, E. N., Kirsten, D. K., Schröder, A. K., Schaaf, B., Al-Lahham, A., Reinert, R. R., Reiling, N., Haase, H., Hatzmann, A.,

- Fleischer, D., Heussen, N., Kleines, M., and Rink, L. (2011) Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J Leukoc Biol* 90, 377-388
- Uzzaman, A., and Story, R. (2012) Chapter 5: Allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 33 Suppl 1, S15-18
- Vogel, R., Jansen, C., Roffeis, J., Reddanna, P., Forsell, P., Claesson, H. E., Kuhn, H., and Walther, M. (2010) Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* 285, 5369-5376
- Walch, L., Norel, X., Gascard, J. P., and Brink, C. (2000) Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 161, S107-111
- Walther, M., Hofheinz, K., Vogel, R., Roffeis, J., and Kühn, H. (2011) The N-terminal β -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, 1-9
- Walther, M., Ivanov, I., Myagkova, G., and Kuhn, H. (2001) Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *Chem Biol* 8, 779-790
- Walther, M., Wiesner, R., and Kuhn, H. (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, 3717-3725
- Wang, J., John, E. M., and Ingles, S. A. (2008) 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein gene polymorphisms, dietary linoleic acid, and risk for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 2748-2754
- Wasilewicz, M. P., Kołodziej, B., Bojułko, T., Kaczmarczyk, M., Sulzyc-Bielicka, V., Bielicki, D., and Ciepiela, K. (2010) Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int J Colorectal Dis* 25, 1079-1085
- Wecksler, A. T., Garcia, N. K., and Holman, T. R. (2009) Substrate specificity effects of lipoxygenase products and inhibitors on soybean lipoxygenase-1. *Bioorg Med Chem* 17, 6534-6539
- Wennman, A., and Oliw, E. H. (2013) Secretion of two novel enzymes, manganese 9S-lipoxygenase and epoxy alcohol synthase, by the rice pathogen *Magnaporthe salvinii*. *J Lipid Res* 54, 762-775
- Werz, O., Bürkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., Rådmark, O., and Steinhilber, D. (2003) 5-Lipoxygenase activation by MAPKAPK-2 and ERKs. *Adv Exp Med Biol* 525, 129-132
- Werz, O., Szellas, D., Steinhilber, D., and Rådmark, O. (2002) Arachidonic acid promotes

- phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* 277, 14793-14800
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579
- Wuest, S. J., Cruet, M., Gemperle, C., Loretz, C., and Hersberger, M. (2012) Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. *Atherosclerosis* 225, 121-127
- Xu, S., Mueser, T. C., Marnett, L. J., and Funk, M. O. (2012) Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. *Structure* 20, 1490-1497
- Yamamoto, S. (1989) Mammalian lipoxygenases: molecular and catalytic properties. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 35, 219-229
- Yanase, K., Tsukahara, S., Mitsuhashi, J., and Sugimoto, Y. (2006) Functional SNPs of the breast cancer resistance protein-therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett* 234, 73-80
- Yates, C. M., and Sternberg, M. J. (2013) The Effects of Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (nsSNPs) on Protein-Protein Interactions. *J Mol Biol*
- Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Glass, C. K., Sigal, E., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1990) Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6959-6963
- Ylä-Herttuala, S., Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Sigal, E., Särkioja, T., Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest* 87, 1146-1152
- Yoshida, H., and Kisugi, R. (2010) Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411, 1875-1882
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M., and Lazar, M. A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270, 23975-23983
- Yuan, H., Li, M. Y., Ma, L. T., Hsin, M. K., Mok, T. S., Underwood, M. J., and Chen, G. G. (2010) 15-Lipoxygenases and its metabolites 15(S)-HETE and 13(S)-HODE in the development of non-small cell lung cancer. *Thorax* 65, 321-326
- Zhang, K., Wang, Y. Y., Liu, Q. J., Wang, H., Liu, F. F., Ma, Z. Y., Gong, Y. Q., and Li, L. (2010) Two single nucleotide polymorphisms in ALOX15 are associated with risk of coronary artery disease in a Chinese Han population. *Heart Vessels* 25, 368-373

- Zheng, Y., and Brash, A. R. (2010) Dioxygenase activity of epidermal lipoxygenase-3 unveiled: typical and atypical features of its catalytic activity with natural and synthetic polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 285, 39866-39875
- Zheng, Y., Yin, H., Boeglin, W. E., Elias, P. M., Crumrine, D., Beier, D. R., and Brash, A. R. (2011) Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem* 286, 24046-24056
- Zhu, M., Yu, X., Ahlberg, P. E., Choo, B., Lu, J., Qiao, T., Qu, Q., Zhao, W., Jia, L., Blom, H., and Zhu, Y. (2013) A Silurian placoderm with osteichthyan-like marginal jaw bones. *Nature* 502, 188-193
- Zhu, M., Zhao, W., Jia, L., Lu, J., Qiao, T., and Qu, Q. (2009) The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters. *Nature* 458, 469-474
- Zouk, H., Marchand, L., Li, Q., and Polychronakos, C. (2013) Functional characterization of the Thr946Ala SNP at the type 1 diabetes IFIH1 locus. *Autoimmunity*

7 Publikationsliste

Artikel/Reviews

- Chaitidis, P., Adel, S., Anton, M., Heydeck, D., Kuhn, H., and **Horn, T.** (2013) Lipoxygenase pathways in Homo neanderthalensis: functional comparison with Homo sapiens isoforms. *J Lipid Res* **54**, 1397-1409
- Di Venere, A., **Horn, T.**, Stehling, S., Mei, G., Masgrau, L., González-Lafont, A., Kühn, H., and Ivanov, I. (2013) Role of Arg403 for thermostability and catalytic activity of rabbit 12/15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1079-1088
- Hofheinz, K., Kakularam, K. R., Adel, S., Anton, M., Polymarasetty, A., Reddanna, P., Kuhn, H., and **Horn, T.** (2013) Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. *Arch Biochem Biophys* **530**, 40-47
- Horn, T.**, Ivanov, I., Di Venere, A., Kakularam, K. R., Reddanna, P., Conrad, M. L., Richter, C., Scheerer, P., and Kuhn, H. (2013) Molecular basis for the catalytic inactivity of a naturally occurring near-null variant of human ALOX15. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1702-1713
- Horn, T.**, Reddy Kakularam, K., Anton, M., Richter, C., Reddanna, P., and Kuhn, H. (2013) Functional characterization of genetic enzyme variations in human lipoxygenases. *Redox Biol* **1**, 566-577
- Ivanov, I., Di Venere, A., **Horn, T.**, Scheerer, P., Nicolai, E., Stehling, S., Richter, C., Skrzypczak-Jankun, E., Mei, G., Maccarrone, M., and Kühn, H. (2011) Tight association of N-terminal and catalytic subunits of rabbit 12/15-lipoxygenase is important for protein stability and catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* **1811**, 1001-1010
- Wuest, S. J., **Horn, T.**, Marti-Jaun, J., Kühn, H., and Hersberger, M. (2013) Association of polymorphisms in the ALOX15B gene with coronary artery disease. *Clin Biochem*

Poster

Biochemical and Biophysical characterization of SNPs in eicosanoid synthesizing enzymes.

Horn, T., Ivanov, I., Di Venere, A., Conrad, M. L., Kakularam, K. R., Anton, M., Niewenda, A., Richter, C., Scheerer, P., Reddanna, P. and Kuhn, H. (ZIBI Summer Symposium, Juni 2012, Berlin, Germany)

Biochemical and Biophysical characterization of SNPs in eicosanoid synthesizing enzymes.

Horn, T., Ivanov, I., Di Venere, A., Conrad, M. L., Kakularam, K. R., Anton, M., Niewenda,

A., Richter, C., Scheerer, P., Reddanna, P., and Kuhn, H. (9th Horizons in Molecular Biology, Oktober 2012, Göttingen, Germany)

Functional characterization of genetic variations (SNPs, Mutations) in human lipoxygenases.
Horn, T., Kakularam, K. R., Anton, M., Reddanna, P., and Kuhn, H. (Molecular Life Sciences, GBM Fall Meeting, Oktober 2013, Frankfurt a. Main, Germany)

8 Lebenslauf

Aus datenrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf aus der Online-Version der Dissertation entfernt.

Aus datenrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf aus der Online-Version der Dissertation entfernt.

9 Anhang

Primer

humane ALOX15

Cys96Tyr up GTC AGG TTC CCT **TAC** TAC CGC TGG GTG

Cys96Tyr dw CAC CCA GCG GTA **GTA** AGG GAA CCT GAC

Arg205Gln up GAT GAC TTC AAC **CAG** ATT TTC TGG TGT

Arg205Gln dw ACA CCA GAA AAT **CTG** GTT GAA GTC ATC

Pro617Ser up TAT TTT TCG GGC **TCT** GAG CCT AAG GCT

Pro617Ser dw AGC CTT AGG CTC **AGA** GCC CGA AAA ATA

Gly422Glu up ATG AGC ACT GGT **GAG** GGA GGC CAG

Gly422Glu dw GTG GCC TCC **CTC** ACC AGT GCT CAT

Gly422Arg up ATA ATG AGC ACT GGT **CGT** GGA GGC CAC GTG CAG

Gly422Arg dw CTG CAC GTG GCC TCC **ACG** ACC AGT GCT CAT TAT

Arg402Trp up GAA ATT AAC GTC **TGG** GCC AGG ACT GGG

Arg402Trp dw CCC AGT CCT GGC **CCA** GAC GTT AAT TTC

Asp415Val up ATG GGA ATT TTC **GTC** CAG ATA ATG AGC

Asp415Val dw GCT CAT TAT CTG **GAC** GAA AAT TCC CAT

Gly422Leu up ATA ATG AGC ACT GGT **CTG** GGA GGC CAC GTG CAG

Gly422Leu dw CTG CAC GTG GCC TCC **CAG** ACC AGT GCT CAT TAT

Gly422Asp up ATA ATG AGC ACT GGT **GAC** GGA GGC CAC GTG CAG

Gly422Asp dw CTG CAC GTG GCC TCC **GTC** ACC AGT GCT CAT TAT

Gly422Ser up ATG AGC ACT GGT TCT GGA GGC CAC GTG

Gly422Ser dw CAC GTG GCC TCC AGA ACC AGT GCT CAT

humane ALOX5

Glu254Lys up ACA GAG CTG CCC **AAA** AAG CTC CCG GTG

Glu254Lys dw CAC CGG GAG CTT **TTT** GGG CAG CTC TGT

Pro337Ser up GGA GAT GAG AAC **TCT** ATT TTC CTC CCT

Pro337Ser dw AGG GAG GAA AAT **AGA** GTT CTC ATC TCC

Ala447Ser up GAC CTG ACC TAT **TCT** TCC CTG TGC TTT

Ala447Ser dw AAA GCA CAG GGA **AGA** ATA GGT CAG GTC

Ala549Val up TTC ACC GCC TCC **GTT** CAG CAC GCC GCG

Ala549Val dw CGC GGC GTG CTG **AAC** GGA GGC GGT GAA

Pro577Leu up CGA GCC CCG CCA **CTG** ACT GCC AAG GGC

Pro577Leu dw GCC CTT GGC AGT **CAG** TGG CGG GGC TCG

Thr591Met up CAG ATC GTG GAC **ATG** CTG CCC GAC CGC

Thr591Met dw GCG GTC GGG CAG **CAT** GTC CAC GAT CTG

Lys656Gln up CGC AAC AAG AAG **CAG** CAG CTG CCA TAT

Lys656Gln dw ATA TGG CAG CTG **CTG** CTT CTT GTT GCG

Gly429Glu up AAC GCC ACA GGG **GAA** GGT GGG CAC GTG

Gly429Glu dw CAC GTG CCC ACC **TTC** CCC TGT GGC GTT

humane ALOX12

Asp134His up AAG GAA CTG AAA **CAC** AGA CAG CAG ATC

Asp134His dw GAT CTG CTG TCT **GTG** TTT CAG TTC CTT

Glu259Lys up TCG GGG ATG GAA **AAG** CTT CAG GCT CAA CTG

Glu259Lys dw CAG TTG AGC CTG AAG **CTT** TTC CAT CCC CGA

Gln261Arg up ATG GAA GAG CTT **CGT** GCT CAA CTG GAG

Gln261Arg dw CTC CAG TTG AGC **ACG** AAG CTC TTC CAT

Asn322Ser up ATT CAG CCT CCC **TCT** CCC AGC TCT CCA

Asn322Ser dw TGG AGA GCT GGG **AGA** GGG AGG CTG AAT

Gly422Glu up GTG AGC ACA GGT **GAA** GGG GGC CAT GTA

Gly422Glu dw TAC ATG GCC CCC **TTC** ACC TGT GCT CAC

humane ALOX15B

Arg486His up GGT GCA GTG GAA **CAC** TTT GTC TCT GAA

Arg486His dw TTC AGA GAC AAA **GTG** TTC CAC TGC ACC

Arg656Gln up ATC CAG GAG CGG AAC **CAG** GGC CTG GTG CTG CCC

Arg656Gln dw GGG CAG CAC CAG GCC **CTG** GTT CCG CTC CTG CAT

Ile676Val up AAC AGC GTC TCC **GTT** TAA ATC CCA GGG

Ile676Val dw CCC TGG GAT TTA **AAC** GGA GAC GCT GTT

Ala416Asp up ATC AAC ACA CTC **GAC** CGG GAG CTG CTT

Ala416Asp dw AAG CAG CTC CCG **GTC** GAG TGT GTT GAT

Ile435Glu up ACA GGC ATC GGC **GAA** GAA GGC TTC TCT

Ile435Glu dw AGA GAA GCC TTC **TTC** GCC GAT GCC TGT

Bioinformatische Analyse der Verteilung und Häufigkeit von kodierenden nicht-synonymen Variationen in Enzymen und Rezeptoren des LOX-Stoffwechsel

Gen	AA	Variationen (Gesamt)	SNPs (Allelfrequenz > 1 %)	nonsense Mutationen	funktionell wichtige Aminosäurereste
ALOX15	662	94	Thr560Met (rs34210653) 1,5 %	Trp197stop (rs11870258) < 0,1 %	<u>Eisenkoordination</u> (His360,His365, His540, His544, Ile662)
			Pro617Ser (rs41432647) 1,0 %	Gln317stop (COSM139038) < 0,1 %	keine Variation
				Trp340stop (TMP_ESP_17_4539195) < 0,1 %	<u>Positionsdeterminanten</u> (Phe352, Ile417, Ile592)
				Trp358stop (COSM30435) < 0,1 %	Phe352Leu (rs143365387) < 0,1 %
				Trp431stop (rs140549513) < 0,1 %	<u>Substratbindung</u> (Arg402, Phe414)
				Arg511stop (rs201039064) < 0,1 %	Arg402Gln (rs376212812) < 0,1 %
				Arg513stop (rs146693201) < 0,1 %	Arg402Trp (rs144038526) 0,05 %
				Trp550stop (COSM30435) < 0,1 %	<u>Enantioselektivität (Coffa)</u> (Ala403 S-LOX)
					keine Variation
					<u>Membranbindung</u> (Tyr15, Leu70, Leu71, Lys180, Leu194)
					Tyr15His (rs13306168) 0,6 %
					Leu194Pro (rs11867874) < 0,1 %

ALOX5	674	69	Glu254Lys (rs2228065) 7,5 %	-	<u>Eisenkoordination</u> (His368, His373, His551, Asn555, Ile674) keine Variation <u>Positionsdeterminanten</u> (Phe359, Ala424, Asn425, Ala603) keine Variation <u>Substratbindung</u> (Phe178, Tyr182, Trp148) keine Variation <u>Enantioselektivität (Coffa)</u> (Ala411 S-LOX) keine Variation <u>Ca²⁺-Bindung</u> (Asn44, Asp45, Glu47) keine Variation <u>Membranbindung</u> (Trp13, Trp75, Trp102) keine Variation <u>Phosphorylierung</u> (Ser271, Ser523, Ser663) Ser271Ile (rs376649785) < 0,1 %
ALOX12	662	67	Gln261Arg (rs28395860) 38,8 % Asn322Ser (rs434473) 34,4 %	Arg348stop (rs141346813) < 0,1 %	<u>Eisenkoordination</u> (His360, His365, His540, Asn544, Ile663) keine Variation <u>Positionsdeterminanten</u> (Phe353, Ala417, Ile593)

					keine Variation
					<u>Enantioselektivität (Coffa)</u> (Ala403 S-LOX)
					keine Variation
					<u>Substratbindung</u> (Arg402, Phe414)
					Arg402Gln (rs143539715) < 0,1 %
ALOX15B	676	86	Pro77Ala (rs78230493) 3,2 %	Y318stop (rs191493127) < 0,1 %	<u>Eisenkoordination</u> (His373, His378, His553, Ser557, Ile676)
			Ala311Val (rs148602477) 1,0 %	R463stop (rs139880289) < 0,1 %	Ile676Val (rs7225107) 9,6 %
			Arg486His (rs9895916) 7,4 %	Q509stop (rs199941734) < 0,1 %	<u>Positionsdeterminanten (Jisaka)</u> (Asp603, Val604)
			Arg635Gln (rs61730298) 1,9 %	Q656stop (rs200104058) < 0,1 %	Val603Ile (rs192653434) 0,1 %
			Gln656Arg (rs4792147) 40,3 %		<u>Enantioselektivität (Coffa)</u> (Ala416 S-LOX)
			Ile676Val (rs7225107) 9,6 %		Ala416Asp (rs140152561) 0,1 %
ALOX12B	701	69	Pro127Ser (rs72842957) 1,1 %	-	<u>Eisenkoordination</u> (His398, His403, His578, Asn582, Ile701)
					His398Tyr (rs140063508) < 0,1 %
					<u>Positionsdeterminanten</u> (Val603)
					keine Variation

					<u>Enantioselektivität</u> (Gly441 R-LOX)
					keine Variation
ALOXE3	711	83	Ile515Val (rs3027205) 3,0 %	Glu91stop (TMP_17_8020175) < 0,1 %	<u>Eisenkoordination</u> (His408, His413, His588, Asn592, Ile711)
			Arg678Cys (rs143246503) 1,9 %	Arg140stop (TMP_ESP_17_8018941) < 0,1 %	keine Variation
				Gln141stop (TMP_ESP_17_8018938) < 0,1 %	<u>Enantioselektivität</u> (Ala451)
				Arg211stop (rs141310759) < 0,1 %	keine Variation
				Arg234stop (rs121434233) < 0,1 %	
				Tyr506stop (COSM272256) < 0,1 %	
PLA2G4	749	54	Arg651Lys (rs2307198) 1,5 %	Gly369stop (rs77939449) < 0,1 %	<u>aktives Zentrum</u> (Arg200, Ser228, Asp549)
					keine Variation
					<u>Ca²⁺-Bindung</u> (Asp40, Thr41, Asp43, Asn65, Asp93, Ala94, Asn95)
					keine Variation
					<u>C1P-binding</u> (Arg57, Lys58, Lys59)
					keine Variation
ALOX5AP	161	25	-	Gly103stop (rs202205227) 0,1 %	-
COTL1	142	14	-	Gln90stop (TMP_ESP_16_84623761) < 0,1 %	-

LTA4H	610	42	Glu481Asp (rs45630739) 1,6 %	Gln499stop (rs200830508) < 0,1 % Gln509stop (rs1140589) < 0,1 %	<u>Zn²⁺-Bindung</u> (His295, His299 and Glu318) keine Variation <u>aktives Zentrum (Peptidase- and Hydrolaseaktivität)</u> (Gln136, Glu271, Glu296, Asp375, Tyr383, Arg563, Lys565) keine Variation <u>Selbstmordinaktivierung</u> (Tyr378) keine Variation
LTC4S	150	10	-	-	<u>aktives Zentrum</u> (Arg104) Arg104Lys (rs13162195) <0,1 % <u>Substratbindung</u> (Trp116) keine Variation <u>Phosphorylierung</u> (Ser28, Ser111) Ser28Leu (rs368527006) < 0,1 %
GGT1	569	73	Gly87Val (rs2330842) 3,1 % Arg257Cys (rs113647199) 2,2 % Asp361Asn (rs138813205) 2,0 %	-	<u>autocleavage/maturation</u> (Cys50/Cys74, Cys192/Cys196) keine Variation <u>N-Glycosylation sites</u> (Asn95, Asn120, Asn266, Asn297, Asn344, Asn511) Asn344Ser (rs377589316) < 0,1 %

					<p><u>lid loop</u> (Pro427, Ser438)</p> <p>Pro427Ser (rs372750547) < 0,1 %</p> <p><u>aktives Zentrum (Substratbindung, Stabilisierung, Oxyanion-Höhle etc.)</u> (Asp46, Arg107, Thr381, His383, Thr399, Glu420, Asp423, Ser451, Ser452, Gly473, Gly474, Thr475, Lys562)</p> <p>Arg107Cys (rs142987478) < 0,1 %</p>
GGT5	586	72	Ser10Gly (rs78246933) 5,0 %	Arg171stop (rs200511850) 0,1 %	<p><u>Autokatalyse/Reifung</u> (Cys50/Cys74)</p> <p>keine Variation</p> <p><u>N-Glykosylierung</u> (Asn98, Asn204, Asn303, Asn347, Asn535, Asn550)</p> <p>Asn535Ser (rs372732410) < 0,1 %</p> <p><u>lid loop</u> (Pro443, Ser454)</p> <p>Pro443Leu (rs148922656) < 0,1 %</p> <p><u>aktives Zentrum (Substratbindung, Stabilisierung, Oxyanion-Höhle etc.)</u> (Asp49, Arg110, Thr388, His390, Thr406, Glu427, Asp430, Ser469, Ser470, Gly491, Gly492, Glu493, Lys579)</p> <p>keine Variation</p>
			Ala160Val (rs117249571) 1,6 %	Glu355stop (rs144862235) < 0,1 %	
			Lys330Arg (rs2275984) 31,6 %		
			Ile475Val (rs7288201) 2,0 %		
DPEP1	411	77	Val104Met (rs73265359) 1,2 %	Gln355stop (rs200857045) < 0,1 %	<p><u>Zn²⁺-Bindung</u> (His36, Asp38, Glu141, His214, His235)</p> <p>His36Tyr (rs201263684) < 0,1 %</p>
			Glu351Lys (rs1126464) 24,3 %	Tyr383stop (rs199966060) < 0,1 %	

Substratbindung
(His168, Arg246, Asp304)

keine Variation

GPI-Anker
(Ser385)

keine Variation

N-Glykosylierung
(Asn57,Asn279, Asn332, Asn358)

Asn279Asp (rs372554004)
< 0,1 %

Disulfidbrückenbindung
(Cys87/Cys170, Cys242/Cys274)

keine Variation

DPEP2	486	68	Asp106Ala (rs7689487) 1,6 %	Tyr163stop (rs144339907) 0,1 %	<u>Zn²⁺-Bindung</u> (His89, Asp91, Glu188, His261, His282)
			His468Asp (rs1133090) 6,9 %	Tyr210stop (rs202183776) 0,1 %	Asp91Asn (rs144507252) < 0,1 %
					Glu188Ala (rs146393703) < 0,1 %
					<u>Substratbindung</u> (His215, Arg293, Asp351)
					Arg293Trp (TMP_16_68024756) < 0,1 %
					Arg293Gln (rs200429288) 0,1 %
					<u>GPI-Anker</u> (Ser463)

Ser463Thr (rs143876744)
< 0,1 %

N-Glykosylierung
(Asn111, Asn176, Asn235)

keine Variation

Disulfidbrückenbindung
(Cys138/Cys217, Cys289/Cys321)

keine Variation

GPX4	197	2	Ser2Asn (rs8178967) 2,8 %	Arg89stop (TMP_ESP_19_1105450) < 0,1 %	aktives Zentrum (Selenocystein73)
			Ser131Gly (rs73507255) 2,9 %		keine Variation
LTB4R	352	16	-	-	-
LTB4R2	389	43	Arg80Gln (rs150416614) 1,1 %	-	-
			Asp196Gly (rs1950504) 3,9 %		
CYSLTR1	337	49	-	-	-
CYSLTR2	346	71	Ser236Leu (rs61735175) 2,1 %	Trp104stop (COSM139999) < 0,1 %	-
GPR17	367	67	-	Trp6stop (rs61742898) < 0,1 %	-
P2RY12	342	35	Glu330Gly (rs16846673) 2,1 %	-	-
PPARG	505	53	Pro12Ala (rs1801282) 6,6 %	Lys347stop (rs121909243) < 0,1 %	<u>Phosphorylierung</u> (Thr84)
					Thr84Pro (TMP_ESP_3_12421370) < 0,1 %

Tab. A1.: Vorkommen und Verteilung von kodierenden nicht synonymen Variationen (SNPs, Mutationen) in verschiedenen Enzymen und Rezeptoren des Leukotrienstoffwechsel (www.1000genomes.org; PubMed; UniProt).

Ergebnisse der klinischen Studie (Sophia Wuest, AG Prof. Hersberger; Universität Zürich)

Klinische Parameter	Kontrollgruppe (n=238)	Fallgruppe (n=258)	p-Wert
Alter (Jahre)	59,0 (53,0 – 66,0)	64,0 (57,0 – 71,0)	< 0,0001
Geschlecht männlich (%)	58,0	78,4	< 0,0001
Bluthochdruck (%)	29,1	46,3	< 0,0001
Diabetes (%)	3,6	20,8	< 0,0001
Hypercholesterinämie (%)	19,8	51,0	< 0,0001
Rauchen (%)	47,3	73,4	< 0,0001
body mass index (BMI) (kg/m ²)	25,7 (23,0 – 28,4)	26,8 (24,4 – 30,0)	< 0,0001
Kreatinin (µmol/L)	90,0 (83,0 – 99,0)	89,0 (80,0 – 99,0)	0,45
hsCRP (mg/L)	1,3 (0,6 – 2,7)	1,8 (0,9 – 4,0)	<0,0001
Cholesterol (mmol/L)	5,9 (5,1 – 6,5)	5,1 (4,4 – 5,9)	< 0,0001
HDL, mmol/L	1,6 (1,3 – 2,0)	1,3 (1,1 – 1,5)	< 0,0001
LDL, mmol/L	3,5 (2,8 – 4,0)	3,2 (2,5 – 3,9)	0,001
Triglyceride (mmol/L)	1,4 (0,9 – 2,0)	1,3 (1,0 – 1,8)	0,77

Tab. A2.: Vergleich der allgemeinen klinischen Parameter für kardiovaskuläre Erkrankungen zwischen der Kontrollgruppe und der Fallgruppe (modifiziert nach Sophia Wuest, AG Hersberger, Universität Zürich).

hALOX15B Gen (NM_001141.2)	Genotyp Kontrollgruppe (WT/WT; WT/SNP; SNP/SNP) %	Genotyp Fallgruppe (WT/WT; WT/SNP; SNP/SNP) %	odds ratio (OR)	95 % CI	p-Wert
c.-1106A>G (rs79235239)	97,5/2,5/0,0	96,5/3,5/0,0	1,51	0,50-4,53	0,47
c.- 537A>G (rs8075588)	34,0/45,8/20,2	32,9/49,6/17,4	0,94	0,73-1,23	0,67
c.-431delAAAT (rs59119570)	62,2/31,5/6,3	55,4/38,4/6,2	1,21	0,89-1,63	0,23
c.-40A>G (rs73972649)	50,4/40,3/9,2	49,6/41,5/8,9	1,06	0,80-1,40	0,70
c.345C>G (rs76589243)	44,1/41,6/14,3	42,6/43,8/13,6	1,03	0,79-1,34	0,83
c.705C>T (rs6503070)	30,3/48,7/21,0	37,2/45,0/17,8	0,80	0,62-1,03	0,09
c.1440C>T (rs11541083)	46,2/41,2/12,6	48,4/38,8/12,8	0,95	0,73-1,24	0,71
c.1457G>A p.Arg486His (rs9895916)	94,1/5,9/0,0	95,3/4,7/0,0	0,96	0,41-2,23	0,92
c.1458-38G>C (rs11870212)					
c.1579+71C>T (rs60050159)	89,5/9,7/0,8	92,6/7,4/0,0	0,51	0,27-0,94	0,03
c.1656G>A (rs61312861)					
c.1650 C>A (rs9898751)	34,9/48,3/16,8	40,3/43,8/15,9	0,84	0,64-1,09	0,18
c.1767C>T (rs9904554)					
c.2026A>G p.Ile676Val (rs7225107)	96,2/3,8/0,0	95,7/4,3/0,0	1,22	0,47-3,13	0,68
c.*122C>A (rs1804772)					
c.1967A>G p.Gln656Arg (rs4792147)	23,5/48,7/27,7	28,7/47,3/24,0	0,81	0,62-1,04	0,10
c.*226A>T (rs117777987)	93,7/6,3/0,0	93,8/6,2/0,0	0,98	0,46-2,11	0,96
c.*348A>G (rs1132934)	81,5/17,2/1,3	82,6/15,1/2,3	0,95	0,63-1,45	0,82

Tab. A3.: Zusammenfassung von SNP Variationen (Allelfrequenz > 1%) die in einer europäischen Population (n=496) gefunden wurden.

Evolution des LOX-und Leukotrienstoffwechsel

<u>Lipoxygenasen in Vertebraten</u>							
<u>Vertebraten</u>	<u>ALOX15</u>	<u>ALOX5</u>	<u>ALOX12</u>	<u>ALOXe12</u>	<u>ALOX15B</u>	<u>ALOX12B</u>	<u>ALOXE3</u>
<u>frühe Fische</u>							
Lanzettfischchen (Branchiostoma floridae)	-	XP_002601197.1	-	-	-	-	-
<u>Knochenfische</u>							
<u>Strahlenflosser</u>							
Zebrafisch (Danio rerio)	-	NP_001243676.1 XP_001923685.4	NP_955912.1 NP_001070178.2	-	-	-	XP_001334034.2
Niltlapia (Oreochromis Niloticus)	-	XP_003451976.1 XP_003451975.1 XP_003458447.1	-	-	XP_005462994.1 XP_005462995.1	XP_005462992.1	XP_005462992.1 XP_003452279.1 XP_003449933.2
Malawibuntbarsch (Maylandia zebra)	-	XP_004574382.1 XP_004574383.1 XP_004551797.1	-	-	XP_004549616.1	XP_004576223.1 XP_004576224.1 XP_004576225.1	XP_004565728.1 XP_004557030.1 XP_004549481.1
Japanischer Reisfisch (Oryzias latipes)	-	XP_004077181.1 XP_004077182.1 XP_004077183.1	-	-	XP_004076808.1 XP_004072994.1 XP_004072858.1	XP_004085216.1	XP_004085156.1 XP_004083646.1
<u>Fleischflosser</u>							
Quastenflosser (Latimeria chamalumnae)	-	XP_006009318.1 XP_006013168.1	-	-	XP_006013168.1	XP_006013168.1	XP_006013168.1
<u>Amphibien</u>							
Krallenfrosch (Xenopus silurana tropicalis)	-	XP_004915982.1	-	-	XP_002943034.2	NP_001015741.1	XP_002943031.1

<u>Reptilien</u>							
Rotkehlantil (Anolis carolinensis)	-	XP_003219928.1	-	-	-	-	XP_003226725.1
China-Alligator (Alligator sinensis)	-	XP_006014893.1	-	-	-	XP_006038094.1	XP_006031807.1 XP_006038094.1
Suppenschildkröte (Chelonia mydas)	-	EMP41802.1	-	-	-	EMP29688.1	EMP29684.1 EMP29686.1
<u>Vögel</u>							
Huhn (Gallus gallus)	-	XP_003641560.1	-	-	-	-	XP_423676.4
Truthahn (Meleagris gallopavo)	-	XP_003208017.1	-	-	-	-	-
Zebrafink (Taeniopygia guttata)	-	XP_004174857.1	-	-	-	-	XP_002198210.1
Wellensittich (Melopsittacus undulatus)	-	XP_005153951.1	-	-	-	-	-
<u>Säugetiere</u>							
<u>andere</u>							
Schwein (Sus crofa)	NP_999096.1	XP_001927706.1	XP_003483140.1	-	XP_003132014.2	XP_003132016.1	XP_005657096.1
Rind (Bos taurus)	NP_776926.1	NP_001179721.1	XP_005220251.1	-	NP_001192632.1	NP_001178967.1	XP_003583619.2
<u>Beuteltiere</u>							
tasmanian devil (Sarcophilus harrisii)	-	XP_003754976.1	XP_003770798.1	-	XP_003768805.1	XP_003768776.1	XP_003768775.1

<u>Nagetiere</u>							
Maus (Mus musculus)	NP_033790.3	NP_033792.1	NP_031466.2	NP_663717.1	NP_033791.1	NP_033789.1	NP_035916.2
Ratte (Rattus norvegicus)	NP_112272.2	P12527.3	NP_001099268.1	NP_001100484.1	NP_695213.1	NP_001034466.1	NP_001099263.1
<u>Primaten</u>							
Weißbüschelaffe (Callithrix jacchus)	JAB04218.1	JAB22404.1	XP_002806856.1	-	XP_003732943.1	XP_002748009.1	XP_002806846.1
Galago (Otolemur garnetti)	XP_003791237.1	XP_003803539.1	XP_003791235.1	-	XP_003791168.1	XP_003791167.1	XP_003791166.1
Gibbon (Nomascus leucogenys)	XP_003277902.1	XP_003271234.2	XP_003274578.1	XP_003274643.2	-	XP_003274594.2	
Pavian (Papio anubis)	XP_003912178.1	XP_003903645.1	XP_003912258.1	XP_003912257.1	XP_003912350.1	XP_003912343.1	XP_003912344.1
Rhesusaffe (Macaca mulatta)	EHH24392.1	XP_001102354.1	XP_001104192.1	XP_002800308.1	XP_001111890.1	EHH24497.1	XP_002808161.1
Totenkopffäffchen (Saimiri boliviensis)	XP_003933098.1	XP_003930297.1	XP_003929174.1	XP_003929172.1	XP_003929250.1	XP_003929255.1	XP_003929254.1
Schimpanse (Pan troglodytes)	XP_003315361.1	XP_507763.3	XP_511984.3	XP_003315386.2	XP_511865.2	XP_511864.2	XP_003315697.1
Bonobo (Pan Paniscus)	XP_003810259.1	XP_003816801.1	XP_003810174.1	XP_003810177.1	XP_003818095.1	XP_003818099.1	XP_003818101.1
Gorilla (Gorilla gorilla)	AGZ95149.1	XP_004049388.1	XP_004058489.1	XP_004058485.1	XP_004058580.1	XP_004058584.1	XP_004058586.1
Orang Utan (Pongo abelii)	NP_001127349.1	XP_002820730.2	XP_003780533.1	-	XP_002827038.1	XP_003778782.1	-
Mensch (Homo sapiens)	NP_001131.3	NP_000689.1	NP_000688.2	-	NP_001132.2	NP_001130.1	NP_067641.2

Tab. A4.: Vorkommen von Lipoxygenasen in verschiedenen Wirbeltieren (mit NCBI Accession Nummer)

Säugetier- LOXn	Zebrafisch (NP_001243676.1)	5-LOX	Zebrafisch (XP_001923685.4)	5-LOX	Zebrafisch 12- LOX (NP_955912.1)	Zebrafisch (NP_001070178.2)	12-LOX
hALOX15	37 %		37 %		45 %	35 %	
hALOX12	39 %		39 %		46 %	37 %	
hALOX5	75 %		58 %		45 %	38 %	
hALOX15B	40 %		40 %		43 %	40 %	
hALOX12B	40 %		40 %		42 %	38 %	
hAOXE3	42 %		41 %		42 %	39 %	
mAlox15	38 %		38 %		44 %	36 %	
mAlox12	39 %		40 %		47 %	38 %	
mAlox5	74 %		58 %		44 %	38 %	
mAlox15b	42 %		40 %		42 %	40 %	
mAlox12b	40 %		40 %		41 %	37 %	
mAloxe3	43 %		42 %		42 %	39 %	
mAloxe12	37 %		37 %		43 %	35 %	

Tab. A5.: Ergebnisse des Sequenzvergleichs von Primärsequenzen von humanen, Maus und vier Zebrafisch Lipoxygenasen.

<u>Leukotrienrezeptoren in Vertebraten</u>							
Vertebraten	LTB4R	LTB4R2	CYSLTR1	CYSLTR2	GPR17	P2RY12	PPARγ
<u>frühe Fische</u>							
Lanzettfischchen (Branchiostoma floridae)	-	-	-	-	-	-	XP_002598634.1
<u>Knochenfische</u>							
<u>Strahlenflosser</u>							
Zebrafisch (Danio rerio)	XP_005169065.1	-	NP_001018484.1	XP_005167850.1	XP_005166015.1	XP_005996536.1	NP_571542.1
Niltilapia (Oreochromis Niloticus)	XP_003440808.2	-	XP_003459463.2	XP_005449973.1	XP_005451270.1	-	XP_005459080.1
Malawibuntbarsch (Maylandia zebra)	XP_004576467.1	-	XP_004574940.1	-	XP_004552899.1	-	XP_004548622.1
Japanischer Reisfisch (Oryzias latipes)	XP_004067442.1	-	XP_004073698.1	-	XP_004068254.1	-	-
<u>Fleischflosser</u>							
Quastenflosser (Latimeria chalumnae)	XP_006005740.1	XP_006009886.1	XP_006005740.1	XP_006009886.1	XP_006001386.1	XP_006014637.1	XP_006004474.1
<u>Amphibien</u>							
Krallenfrosch (Xenopus silurana tropicalis)	XP_004910802.1	XP_002934370.2	XP_004916956.1	-	XP_004917917.1	XP_002941149.1	XP_004920419.1
<u>Reptilien</u>							
Rotkehlantilope (Anolis carolinensis)	XP_003222992.1	XP_003223893.1	XP_003218435.1	-	XM_003218387.1	-	(XP_003217721.1)
China-Alligator (Alligator sinensis)	XP_006037964.1	XP_006037965.1	-	XP_006030241.1	XP_006016076.1	XP_006037865.1	XP_006023962.1
Suppenschildkröte (Chelonia mydas)	EMP26817.1	EMP26816.1	EMP40036.1	-	EMP42625.1	-	EMP38864.1
<u>Vögel</u>							
Huhn	BAF63011.1	-	XP_004940618.1	XP_004938765.1	-	-	NP_001001460.1

(Gallus gallus)

Truthahn (Meleagris gallopavo)	-	-	XP_003208339.1	XP_003203402.1	-	-	-
Zebrafink (Taeniopygia guttata)		-	XP_002188785.1	XP_002195588.2	XP_004176488.1	-	XP_002187946.1
Wellensittich (Melopsittacus undulatus)	XP_005152451.1	-	XP_005144591.1	XP_005147763.1	XP_005154024.1	XP_005141220.1	XP_005149431.1

Säugetiereandere

Schwein (Sus crofa)	XP_005666307.1	XP_001927768.3	XP_005673791.1	NP_999295.2	XP_005671890.1	XP_005669983.1	XP_005669847.1
Rind (Bos taurus)	NP_001029910.1	NP_001178216.1	NP_001093196.1	NP_001095710.1	NP_001075939.1	NP_001001174.2	NP_851367.1

Beuteltier

tasmanian devil (Sarcophilus harrisi)	XP_003755949.1	XP_003755948.1	XP_003775409.1	XP_003764627.1	XP_003763809.1	XP_003766104.1	XP_003762492.1
------------------------------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

Nagetiere

Maus (Mus musculus)	NP_032545.1	NP_065236.1	NP_001268791.1	NP_598481.2	NP_001020552.1	NP_081847.3	NP_035276.2
Ratte (Rattus norvegicus)	NP_067688.1	NP_446092.1	NP_446093.1	NP_596904.1	NP_001065245.1	NP_073637.1	NP_037256.1

Primaten

Weißbüschelaffe (Callithrix jacchus)	XP_002753805.2	XP_002753724.1	XP_002763076.1	XP_002742713.2	-	-	XP_002758685.1
Galago (Otolemur garnetti)	XP_003802045.1	XP_003802017.1	XP_003800498.1	XP_003802017.1	XP_003800384.1	XP_003802235.1	XP_003796291
Gibbon (Nomascus leucogenys)	XP_004091940.1	XP_003260746.1	XP_003269041.1	XP_004088180.1	XP_004091670.1	XP_003256351.1	XP_003265037.1
Pavian (Papio anubis)	XP_003901697.1	XP_003901698.1	XP_003917965.1	XP_003913920.1	XP_003909315.1	XP_003895000.1	XP_003894131.1
Rhesusaffe (Macaca mulatta)	XP_001114016.2	XP_001113942.1	XP_001100982.1	XP_001113942.1	NP_001253036.1	NP_001181299.1	NP_001028032.1
Totenkopffäffchen (Saimiri boliviensis)	XP_003924316.1	XP_003924314.1	XP_003936892.1	XP_003942272.1	XP_003931645.1	XP_003925085.1	XP_003927098.1

Schimpanse (Pan troglodytes)	XP_001169901.1	XP_003314321.1	XP_003954484.1	XP_003949942.1	XP_003309281.1	XP_003310102.1	XP_001153669.1
Bonobo (Pan Paniscus)	XP_003809141.1	XP_003809144.1	XP_003824461.1	XP_003811477.1	XP_003828304.1	XP_003826515.1	XP_003826306.1
Gorilla (Gorilla gorilla)	XP_004055056.1	XP_004055052.1	XP_004064481.1	XP_004054557.1	XP_004032568.1	XP_004037907.1	XP_004033681.1
Orang Utan (Pongo abelii)	XP_003778323.1	XP_003778324.1	XP_003780588.1	XP_002824313.1	XP_003776041.1	XP_002814235.1	NP_001124655.1
Mensch (Homo sapiens)	NP_001137391.1	NP_062813.2	NP_001269117.1	NP_065110.1	NP_001154889.1	NP_795345.1	NP_056953.2

Tab. A6.: Vorkommen von Leukotrienrezeptoren in verschiedenen Wirbeltieren (mit NCBI Accession Nummer)