

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur strukturellen Basis der Positionsspezifität der
humanen 15-Lipoxygenase-2 sowie zur Expression des Enzyms beim
Ovarialkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Roffeis

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. s.c. med. H. Kühn
 2. Prof. Dr. D. Steinhilber
 3. Prof. Dr. O. Werz

Datum der Promotion: 18.11.2011

**Aus tiefstem Herzen
meiner Familie**

Abstract

Die konventionelle Klassifizierung tierischer Lipoxygenasen (LOXn), die eine heterogene Enzymfamilie bilden, erfolgt entsprechend ihrer Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung. Aufgrund der steigenden Anzahl an Isoenzymen der einzelnen Spezies sowie der großen funktionellen Heterogenität erwies sich diese Einteilung zunehmend als unzureichend. Die strukturelle Grundlage für die Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Dabei konnten verschiedene kritische Aminosäuren, die sogenannten Sequenzdeterminanten, für ausgewählte Lipoxygenaseisoformen identifiziert werden. Bisher gelang es jedoch nicht, ein für alle Isoformen anwendbares allgemeines Konzept für die strukturellen Ursachen der Reaktionsspezifität zu entwickeln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Bedeutung der bisher bei anderen LOX-Isoformen identifizierten Sequenzdeterminanten für die Reaktionsspezifität der humanen 15-LOX-2 getestet. Dazu wurde das Enzym als rekombinantes N-terminales His-tag Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, die potentiellen Sequenzdeterminanten mittels ortgerichteter Mutagenese verändert und anschließend die Spezifität der Arachidonsäureoxygenierung mittels HPLC-Analysen quantifiziert. Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse kann die Anwendbarkeit des Triadenkonzepts, das für 12/15-LOXn verschiedener Spezies entwickelt wurde, auf die humane 15-LOX-2 ausgeschlossen werden (**Publikation 3**).

Da die Reaktionsspezifität von LOXn wesentlich von der Enzym-Substrat-Wechselwirkung abhängt und diese Interaktion pH-abhängig sein sollte, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Auswirkungen von Veränderungen des pH-Wertes auf die Positionsspezifität der humanen 15-LOX-2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich die Reaktionsspezifität des Enzyms im pH-Bereich zwischen 6 und 8,5 kaum veränderte. Ortsgerichtete Mutagenese von ausgewählten Aminosäureresten induzierte jedoch eine deutliche pH-Abhängigkeit der Reaktionsspezifität. Die diesem Phänomen zugrunde liegenden molekularen Ursachen wurden diskutiert und die entscheidende Rolle eines Histidin-Restes aufgeklärt (**Publikation 2**).

In verschiedenen Studien wurde die Beteiligung Eikosanoid-synthetisierender Enzyme bei der Karzinogenese in verschiedenen Organen nachgewiesen. Bisher gab es jedoch keine Untersuchungen der Bedeutung von LOX-Isoformen beim Ovarialkarzinom, das neben dem Mammakarzinom eine Hauptursache für die Letalität an gynäkologischen Malignomen ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der 15-LOX-2 im maligne entarteten Gewebe (Primärtumor und Metastasen) mehr als 20-fach höher ist als im

Normalgewebe (**Publikation 1**). Obwohl der molekulare Mechanismus der erhöhten 15-LOX-2 Expression bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, weisen diese Daten auf eine pathophysiologische Rolle des Enzyms bei der malignen Entartung von Ovarialzellen hin. Weiterhin stellt die 15-LOX-2 aufgrund des drastisch hochregulierten Expressionsniveaus einen potentiellen Tumormarker dar.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäurenverzeichnis

1.1 Einleitung	1
1.2 Zielstellung	3
1.3 Materialien und Methoden	4
1.4 Ergebnisse und Diskussion	8
1.5 Literaturverzeichnis	14

2. Ausgewählte Publikationen 16

2.1 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary	16
2.2 Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms	26
2.3 Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases	36

3. Curriculum Vitae 47

4. Publikationsliste 49

5. Selbständigkeitserklärung 51

Danksagung 53

Abkürzungsverzeichnis

15S-H(p)ETE	(15S,5Z,8Z,11Z,13E)-15-Hydro(pero)xyeicosa-5,8,11,13-tetraensäure
12S-H(p)ETE	(12S,5Z,8Z,10E,14Z)-12-Hydro(pero)xyeicosa-5,8,10,14-tetraensäure
11R-H(p)ETE	(5Z,8Z,11R,12E,14Z)-11-Hydro(pero)xyeicosa-5,8,12,14-tetraensäure
8S-H(p)ETE	(8S,5Z,9E,11Z,14Z)-8-Hydro(pero)xyeicosa-5,9,11,14-tetraensäure
Abb.	Abbildung
CA125	Cancer Antigen 125
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (Complementary desoxyribonucleic acid)
COX	Cyclooxygenase
CP-HPLC	Chiralphasen-HPLC
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
E. coli	Escherichia coli bacterium
FE	Flächeneinheit
FPLC	Hochleistungsflüssigkeitsproteinchromatographie (Fast protein liquid chromatography)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HEK-293	Zelllinie humaner embryonaler Nierenzellen (Human embryonic kidney)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LOX	Lipoxygenase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (Reverse phase HPLC)
RPM	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
SP-HPLC	Normalphasen-HPLC (Straight phase HPLC)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese_

Aminosäure-Verzeichnis

Abkürzung	Code	Name
Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Ser	S	Serin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

1.1 Einleitung

Lipoxygenasen bilden eine heterogene Enzymfamilie von nichthämeisenhaltigen Dioxygenasen, welche die stereospezifische Bildung von Hydroperoxiden aus freien oder veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren und molekularem Sauerstoff katalysieren (Brash, 1999; Kuhn et al., 2005; Schneider et al., 2007). Damit tragen sie zur Biosynthese von Eikosanoiden bei, die als Lipidmediatoren bei extra- und intrazellulären Signalprozessen bedeutsam sind (Funk, 2001; O'Donnell et al., 2009; Wymann und Schneiter, 2008).

Gemäß der konventionellen Nomenklatur werden tierische LOXn entsprechend ihrer Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung klassifiziert. Dieses Konzept erwies sich in den letzten Jahren zunehmend als verwirrend, da immer mehr Enzyme charakterisiert und die Heterogenität ihrer Eigenschaften immer größer wurde. So können orthologe Enzyme in verschiedenen Spezies unterschiedliche Reaktionsspezifitäten aufweisen (z. B. humane 15-LOX-1/murine 12-LOX oder humane 15-LOX-2/murine 8-LOX), während Enzyme mit unterschiedlicher biologischer Funktion und Gewebeverteilung das gleiche Produktmuster produzieren (z. B. 12-LOXn vom Plättchen- und Leukozyten-Typ).

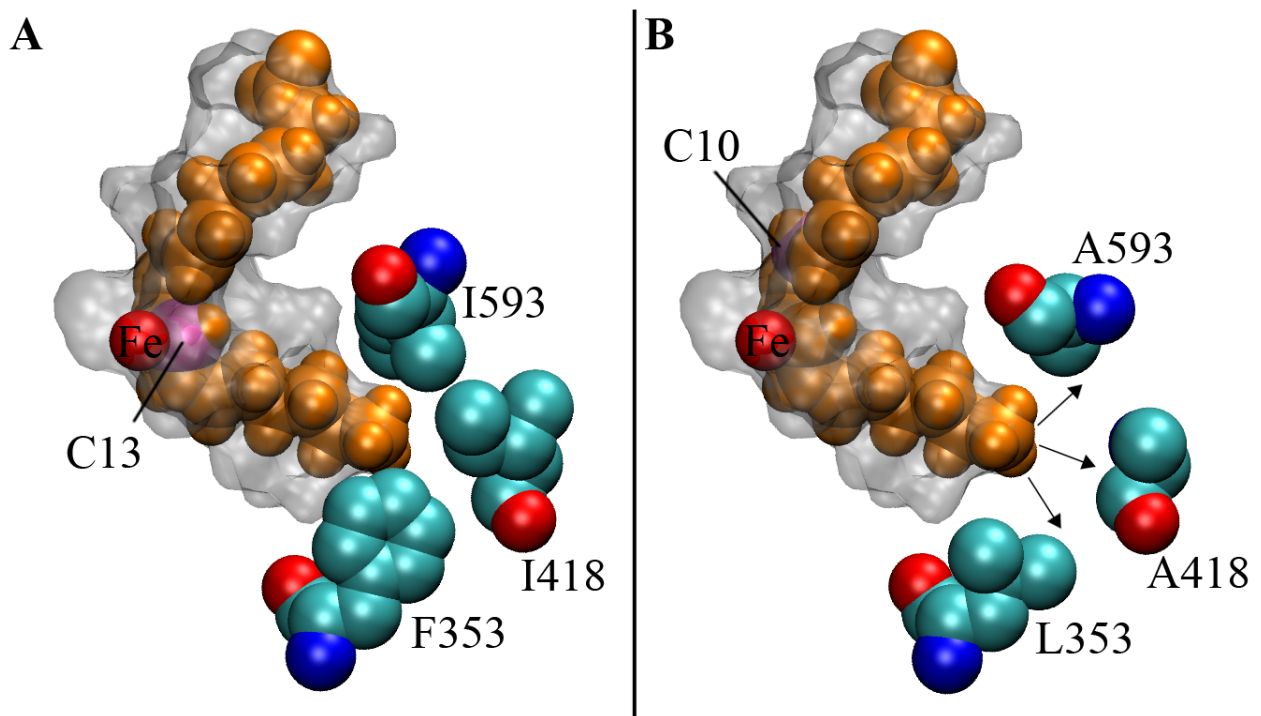
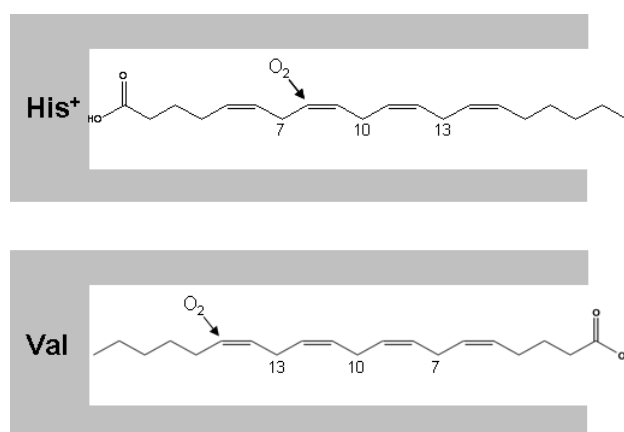


Abb. 1: Triaden-Modell für die Kaninchen-12/15 LOX. Verschiedene Aminosäurereste wurden als Positionsdeterminanten identifiziert. Das Volumen dieser Reste, Phe353 (Borngräber I), Ile418 (Sloane) und Ile593 (Borngräber II), bestimmt die Eintauchtiefe des Substrats ins aktive Zentrum. Große Reste bewirken wegen der geringen Eintauchtiefe eine 15-Lipoxygenierung (A), kleinere Reste an einer oder mehrerer dieser Positionen (Ala, Leu) führen aufgrund eines tieferen Eintauchens des Substrates zu hauptsächlich 12-Lipoxygenierung (B).

Die meisten LOXn zeigen eine bemerkenswerte Spezifität der Fettsäureoxidation und oxygenieren Substrate selektiv zu einem einzigen chiralen Produktisomer (singuläre Positionsspezifität). Andere LOX-Isoformen (12/15-LOXn) besitzen mit der Synthese zweier chiraler Produkte eine duale Positionsspezifität (Bryant et al., 1982; Kuhn et al., 1983). Die strukturelle Basis für unterschiedliche Produktmuster wurde in der Vergangenheit mehrfach untersucht. Dabei wurden einige Sequenzdeterminanten der Positionsspezifität identifiziert, deren Seitenkettengeometrie die Substratbindung am aktiven Zentrum beeinflussen (Borngraber et al., 1999; Borngraber et al., 1996; Sloane et al., 1991). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde das Triaden-Modell für die Kaninchen 12/15-LOX entwickelt (Borngraber et al., 1999) (Abb. 1).

Ein weiteres Konzept zur Erklärung der Positionsspezifität von LOXn ergab sich aus der multiplen Sequenzanalyse einer großen Anzahl von S- und R-LOXn. R-LOXn scheinen einen Gly-Rest im aktiven Zentrum zu besitzen, wohingegen bei den S-LOXn ein Ala-Rest an dieser Position zu finden ist (Coffa und Brash, 2004; Schneider et al., 2007). Mutagenese-Experimente mit einigen LOX-Isoformen bestätigten dieses Konzept.

Für die unterschiedliche Positionsspezifität von Maus-8S-LOX und humaner 15-LOX-2 wurden wieder andere Aminosäurereste identifiziert (Jisaka et al., 2000). Im Gegensatz zum humanen Enzym besitzt das Maus-Enzym einen Histidin-Rest im aktiven Zentrum. Das protonierte Histidin könnte mit der Carboxylgruppe der Fettsäure interagieren und so eine inverse Substratorientierung (Carboxylgruppe der Fettsäure befindet sich in der Bindungstasche) favorisieren. Aus dieser umgekehrten Orientierung sollte die 8S-Lipoxygenierung resultieren (Schema 1).



Schema 1: Orientierung der Arachidonsäure im aktiven Zentrum. Bei Vorhandensein eines Histidins im aktiven Zentrum (oben, Maus-8S-LOX) wird eine inverse Substratbindung favorisiert (8-HETE-Bildung). Fehlt dieses Histidin (unten, 15-LOX-2), ist eine Substratbindung mit dem hydrophoben Methylende in der ebenfalls hydrophoben Bindungstasche energetisch günstiger (15-HETE-Bildung).

Wenn diese Hypothese richtig wäre, sollte die Positionsspezifität bei Histidin-beihaltenden Enzymen durch die Protonierbarkeit der Seitenkette sensibel auf pH-Veränderungen reagieren. Solche Veränderungen der Positionsspezifität wurden bisher nur bei pflanzlichen LOXn untersucht (Gardner, 1989; Hornung et al., 2008; Veldink et al., 1972). Diese Informationen

weisen darauf hin, dass neben den oben beschriebenen strukturellen Parametern auch die Reaktionsbedingungen einen Einfluss auf die Positionsspezifität haben können. Auch im tierischen Organismus können pH-Schwankungen infolge metabolischer Veränderungen, Entzündungen und Karzinogenese auftreten, zusätzlich gibt es starke pH-Unterschiede zwischen verschiedenen Kompartimenten.

Eine Reihe von Untersuchungen deuten darauf hin, dass Eikosanoide eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese verschiedener Organsysteme (z.B. GI-Trakt, Prostata, Haut) spielen, wobei sowohl pro- als auch anti-karzinogene Effekte der Enzyme beschrieben wurden. Aufgrund dieser Daten (Furstenberger et al., 2006; Mazhar et al., 2005; Melstrom et al., 2008; Nie et al., 2006; Shureiqi et al., 2003) können die beiden Schlüsselenzyme der Eikosanoidbiosynthese, die Cyclooxygenase (COX) und die LOX, als molekulare Ziele für pharmakologische Interventionen im Sinne von Chemotherapie bzw. Chemoprävention betrachtet werden (Fujimura et al., 2007; Nie, 2007; Werz und Steinhilber, 2006). Dabei wurde bisher jedoch kaum untersucht, ob Eikosanoid-produzierenden Enzyme bei der Entstehung von gynäkologischen Malignomen bedeutsam sind. Unter diesen Erkrankungen nimmt das Ovarialkarzinom eine der führenden Positionen in der Todesursachenstatistik ein (Jemal et al., 2009). Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen, die im Stadium I diagnostiziert wurden, ist höher als 90%, die Rate fällt jedoch rapide auf weniger als 30% ab, wenn die Diagnose im Stadium III oder IV gestellt wird (Jemal et al., 2009). Die hohe Mortalität ist hauptsächlich auf den Mangel an zuverlässigen diagnostischen Parametern in einem frühen Erkrankungsstadium zurückzuführen (Nasi und Castiglione, 2002; Wenham et al., 2002). Damit ist die Früherkennung also von entscheidender Bedeutung. Häufige Anwendung in der klinischen Praxis findet das Protein Cancer Antigen-125 (CA125). Leider ist die Zuverlässigkeit dieses Tumormarkers im frühen Stadium limitiert (Skates et al., 2003).

1.2 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten drei Fragen zur Struktur und Funktion der humanen 15-LOX-2 beantwortet werden. i) Welche Rolle spielen die Primärdeterminanten für die Reaktionsspezifität anderer LOXn für den Mechanismus der Arachidonsäureoxygenierung durch die humane 15-LOX-2? ii) Ist die Produktspezifität der humanen 15-LOX-2 vom pH-Wert abhängig und welche Mechanismen könnten einer solchen Abhängigkeit zugrunde liegen? iii) Im Rahmen einer Pilotstudie sollte untersucht werden, ob eine statistische Beziehung zwischen der Expression von Eikosanoid-synthetisierenden Enzymen (15-LOX-1, 15-LOX-2, 5-LOX, COX1 und COX2) und der Pathogenese des Ovarialkarzinoms besteht.

1.3 Materialien und Methoden

Humane Gewebeproben

Die humanen Gewebeproben wurden von Frau Prof. Hornung (Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) zur Verfügung gestellt. Diese wurden während chirurgischer Interventionen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es standen 22 Gewebeproben zur Verfügung, die in primäres Ovarialkarzinom (10 Patientinnen), Metastasen eines primären Ovarialkarzinoms (6 Patientinnen) und gesundes Ovarialgewebe (6 Patientinnen) unterteilt wurden. Die Gewebeproben wurden in Übereinstimmung mit dem Votum der Ethikkommission der Universität Kiel gesammelt und auf Trockeneis nach Berlin versandt.

RNA-Präparation aus humanen Gewebeproben und reverse Transkription

Die gefrorenen Gewebeproben wurden in einem Lysepuffer (Qiagen, Hilden) mit Hilfe des Ultraturax T25 Rotormesser-Homogenisator (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde dann mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) präpariert und anschließend mit DNase (Turbo DNA-free, Ambion, Huntingdon, Großbritannien oder RNase-freie DNase Set, Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitungen behandelt.

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe der Superscript II- (Invitrogen, Karlsruhe) oder der M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) aus 2–3 µg der Total-RNA entsprechend der Herstelleranweisungen.

Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit Hilfe des Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australien) und dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Das Standardprotokoll umfasste folgende Schritte: 15 min Heißstart bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen Denaturierung (60 sec bei 95°C), Anlagerung (60 sec bei 65°C) und Synthese (60 sec bei 72°C) in einem Ansatzvolumen von 10 µl. Die Homogenität der amplifizierten PCR-Produkte wurde mittels anschließend aufgenommener Schmelzkurve überprüft. Für die exakte Quantifizierung der Genexpressionshöhen der Zielgene (15-LOX-1, 15-LOX-2, 5-LOX, COX1, COX2, CA125, Hepsin, GAPDH) wurden jeweils externe Standardkurven mit spezifischen Amplikons aufgenommen. Die initiale Amplikon-Konzentration variierte zwischen 5×10^3 und 5×10^6 Kopien. Als interner Standard, auf den die anderen untersuchten Gene bezogen wurden, diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Von allen RNA-Präparationen wurden mindestens 3 Analysen durchgeführt.

Präparation der bakteriellen Expressionsplasmide

Die komplette cDNA der humanen 15-LOX-2 war eine freundliche Gabe von Dr. A. Brash (Vanderbilt, Nashville, USA) und wurde in das pQE-9 Expressionsplasmid (Qiagen, Hilden) zwischen den Restriktionsorten für BamH I und Hind III einkloniert. Für diesen Zweck wurde das Start-Methionin zu Valin mutiert und eine Restriktionsschnittstelle für Hind III direkt hinter dem Stopcodon eingeführt. Dadurch verlängerte sich der N-Terminus der rekombinanten His-tag humanen 15-LOX-2 und liest sich wie folgt: MRGSHHHHHHGSSV-15-LOX-2.

Expression der 15-LOX-2 in E. coli und Enzymreinigung

Die rekombinante humane 15-LOX-2 und ihre verschiedenen Mutanten wurden in E. coli exprimiert. Als Ergebnis zahlreicher Voruntersuchungen ergab sich folgende Standardpräparationsprozedur: 2 l LB-Medium wurden mit einer Vorkultur angeimpft, über Nacht bei 37°C und 180 rpm wachsen lassen und nach Abkühlen und Zugabe von 1 mM IPTG für 2 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und nach Resuspendieren mit Hilfe des Emulsiflex- C5 Hochdruckzellhomogenisators (Avestin, Ottawa, Kanada) aufgeschlossen. Nach hochtouriger Zentrifugation wurde der klare Überstand für Aktivitätsassays verwendet. Der Überstand ließ sich aber auch über Nickel-Agarose weiter aufreinigen. Nach Entsalzung konnten in einem weiteren Reinigungsschritt über Anionenaustauschchromatographie (Resource-Q-Säule, FPLC) alle Fremdproteine entfernt werden, so dass eine elektrophoretisch saubere 15-LOX-2-Präparation gewonnen wurde.

Expression der 15-LOX-2 in HEK-293-Zellen

Die 15-LOX-2 cDNA wurde in den pcDNA 3.1 Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und mit Hilfe des Fugene Reagenz (Roche, Mannheim) entsprechend den Anbieteranleitungen transient in die HEK-293-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und für die Proteinbestimmung bzw. Aktivitätsassays sowie für die RNA-Präparation (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) verwendet.

Western blot und LOX-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der LOX-Expression im bakteriellen Lysat wurden Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe der SemiDry Technik geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-RGS-His-tag-Antikörper (Qiagen, Hilden, Verdünnung 1:5000) und dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper gegen Maus-IgG (Sigma, Deisenhofen, Verdünnung 1:5000). Die Blots wurden mit dem Western

Lightning Chemiluminescence Plus Reagent (Perkin Elmer, Boston, USA) inkubiert und anschließend ein Röntgenfilm exponiert. Die Intensität der immunreaktiven Banden wurde densitometrisch mit der Total-Lab Software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Großbritannien) quantifiziert. Zur Kalibrierung diente eine bekannte Menge gereinigter rekombinanter 15-LOX-1 (His-tag Konstrukt) auf jedem Blot.

Zur Expressionsanalyse der 15-LOX-2 in humanen Ovarialgeweben wurden Proteinextrakte verschiedener Proben mittels Immunoblotting untersucht. Da die endogene 15-LOX-2 kein His-tag Epitop trägt, wurde für diese Untersuchungen ein spezifischer 15-LOX-2-Antikörper eingesetzt, der speziell für diesen Nachweis hergestellt wurde. Dazu wurden Hühner mit der gereinigten rekombinanten humanen 15-LOX-2 immunisiert und der polyklonale Antikörper mittels Affinitäts-Chromatographie an immobilisiertem Antigen gereinigt. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Anti-Huhn-IgG Antikörper (Sigma, Verdünnung 1:100.000) verwendet. Als Positivkontrolle diente der Proteinextrakt aus den 15-LOX-2-transfizierten HEK-293-Zellen.

Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese zur gezielten Einführung von Punktmutationen wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und den entsprechend der gewünschten Punktmutation generierten Mismatch-Oligonukleotiden durchgeführt. Für jede Mutante wurden 5-10 Klone ausgewählt und mittels Restriktionskontrolle und Aktivitätsassay untersucht, um katalytisch aktive LOX-exprimierende Klone zu identifizieren. Die Verifizierung der Primärstruktur erfolgte mittels DNA-Sequenzierung.

Aktivitätsassays

Der Standardansatz für Aktivitätsuntersuchungen erfolgte in PBS (pH 7,4) mit 100 μ M Arachidonsäure in einem Reaktionsvolumen von 500 μ l. 15-LOX-2 bzw. Mutanten wurden als gereinigtes Enzym oder als Überstand der Standardpräparation (maximal 50 μ l) eingesetzt. Die gebildeten Hydroperoxyde (Hydroperoxyeicosatetraensäuren, HpETE) wurden im Anschluss mit Natriumborhydrid reduziert, der pH-Wert mit konzentrierter Essigsäure auf pH 3 – 4 erniedrigt und schließlich noch 500 μ l Methanol zugegeben. Der nach Zentrifugation gewonnene Überstand wurde direkt für die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) eingesetzt.

Für die Untersuchung zur pH-Abhängigkeit der Reaktionsspezifität wurde anstelle des PBS ein Phosphat/Boratpuffergemisch (pH 6 bis 9) oder ein Borat/NaOH-Puffer (pH über 9) für den Aktivitätsassay verwendet.

RP-HPLC wurde an einer HP-Chemstation mit einem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Nucleosil C-18 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einer entsprechenden Vorsäule (30 x 4 mm). Das Laufmittel bestand aus Methanol/Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen, meist 80/20, und 0,1% Essigsäure, die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 235 nm. Die Reaktionsprodukte konnten häufig bereits in der RP-HPLC über den Vergleich der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren mit denen von Standardsubstanzen identifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden einzelne Produkte aufgefangen und der Normalphasen-HPLC (SP-HPLC), Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) oder der Massenspektrometrie (GC-MS) zugeführt.

Photometrischer Aktivitätsassay

Für die Bestimmung der LOX-Aktivität von gereinigten Enzympräparationen wurde die zeitabhängige Absorptionzunahme beim Absorptionsmaximum des Reaktionsprodukts (235 nm) mit dem Spektrophotometer UV-2100 der Firma Shimadzu gemessen.

Sonstige Methoden

Die benötigten Oligonukleotide wurden von Biotex (Berlin, Deutschland) synthetisiert, DNA-Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Roti-Quant Kits (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), basierend auf der Bradford-Methode, bestimmt. Statistische Auswertungen wurden mit dem SPSS-Software Paket (SPSS GmbH, München, Version 12.0) durchgeführt, Untersuchung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test.

1.4 Ergebnisse und Diskussion

Untersuchungen zu Positionsdeterminanten

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zunächst herauszufinden, ob die bekannten Positionsdeterminanten anderer LOX-Isoformen auch für die humane 15-LOX-2 von Bedeutung sind. Vor allem die Anwendbarkeit des für 12/15-Lipoxygenasen entwickelten Triaden-Konzeptes (Borngraber et al., 1999) sollte hierbei überprüft werden. Dazu wurde zunächst eine Expressionsstrategie entwickelt und das Enzym als N-terminales His-tag-Fusionsprotein exprimiert. Nach Reinigung über Nickel-Agarose und FPLC-Anionenaustausch-Chromatographie konnte ein elektrophoretisch sauberes Protein gewonnen werden (Abb. 2). Dieses wurde sowohl für Aktivitätsmessungen als auch für die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen die humane 15-LOX-2 eingesetzt.

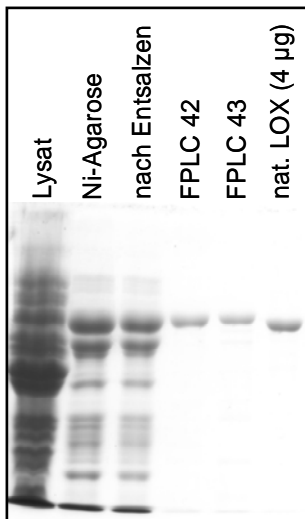


Abb. 2: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Reinigung der rekombinanten His-tag 15-LOX-2 über Nickel-Agarose und Resource Q bis zur elektrophoretischen Homogenität. FPLC 42 und 43: Fraktionen aus der Aufreinigung über FPLC. Als Marker diente native 12/15-LOX-1 aus Kaninchen-Retikulozyten.

Auch die verschiedenen Mutanten wurden als N-terminale His-tag-Fusionsproteine exprimiert und anschließend deren Produktspektrum des Arachidonsäureumsatzes analysiert. Der Wildtyp der humanen 15-LOX-2 wandelt das Substrat Arachidonsäure fast vollständig in 15S-H(p)ETE um, Nebenprodukte sind nahezu nicht detektierbar ($< 1\%$) (Abb. 3). Wird das Analogon zur Positionsdeterminante Phe353 der Kaninchen Retikulozyten 15-LOX (Borngraber et al., 1996) (Borngräber I, Abb. 1) zu Leucin umgewandelt (F365L), wurde ein kleiner aber signifikanter Anstieg der 12-H(p)ETE-Bildung ($5,0 \pm 1.0\%$, $p < 0.01$) beobachtet. Gleichzeitig fällt jedoch die katalytische Aktivität auf etwa 8% der Wildtyp-Aktivität ab. Die Sloane-Determinante Ile418 (Abb. 1) in der humanen 15-LOX-1 (Sloane et al., 1991) entspricht Ser430 in der 15-LOX-2. Das Serin wurde durch ein kleineres Alanin ersetzt (S430A), es konnte jedoch wieder nur eine sehr kleine Menge 12-H(p)ETE ($2.0 \pm 0.1\%$) nachgewiesen werden. Die dritte Position des Triaden-Konzeptes (Borngräber-II-Determinante, Abb. 1) (Borngraber et al., 1999) entspricht

dem Ala606 in der humanen 15-LOX-2. Auch hier führte der Austausch gegen ein kleineres Gly (A606G) nicht zu großen Veränderungen der Positionsspezifität (2.0 +/- 0.2% 12-H(p)ETE).

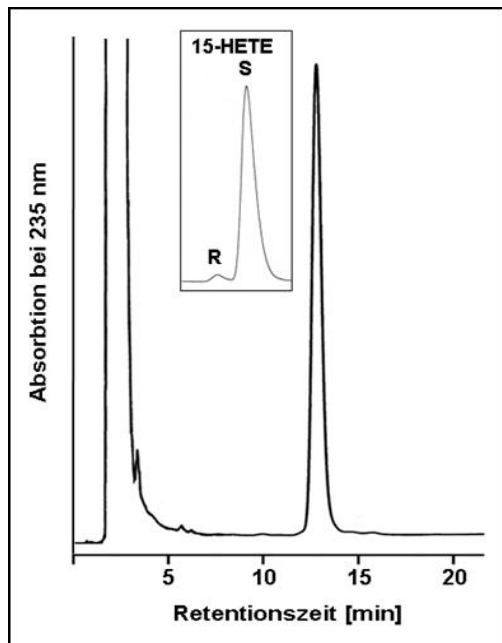


Abb. 3: HPLC-Chromatogramme der Wildtyp 15-LOX-2. Es wurde zu mehr als 99% 15S-HETE gebildet. Inset: Trennung der optischen Isomere über CP-HPLC.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäurereste Phe365, Ser430 und Ala606 keine bedeutsamen Sequenzdeterminanten für die Reaktionsspezifität der humanen 15-LOX-2 darstellen. Deshalb kann geschlussfolgert werden, dass das für 12/15-LOXn entwickelte Triadenkonzept nicht für die humane 15-LOX-2 angewendet werden kann. (Publikation 3) Damit scheint für die 15-LOX-2 das Volumen der Substratbindungstasche keine entscheidende Rolle für deren Positionsspezifität zu spielen.

Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der humanen 15-LOX-2 und deren Mutanten (Publikation 2)

Veränderungen des pH-Wertes beeinflussen den Dissoziationszustand von Aminosäureseitenketten und wirken sich in der Regel auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkung aus. Im Falle von Lipoxygenasen könnten pH-Veränderungen damit die Reaktionsspezifität beeinflussen und Untersuchungen an pflanzlichen LOXn scheinen diese Hypothese zu bestätigen (Gardner, 1989; Hornung et al., 2008). Die humane 15-LOX-2 zeigte im physiologischen Bereich eine pH-Abhängigkeit mit einem Optimum für die Arachidonsäureoxygenierung zwischen pH 8 und 9 liegt (Abb. 4A). Die Aminosäuren D602 und V603 in der humanen 15-LOX-2 (Tyr603 bzw.

His604 in der Maus 8S-LOX) wurden als wichtige Sequenzdeterminanten der unterschiedlichen Positionsspezifität der beiden orthologen Enzyme identifiziert (Jisaka et al., 2000). Die D602Y-Mutante der 15-LOX-2 zeigte ein ähnliches pH-Profil wie der Wildtyp (Abb. 4B). Im Gegensatz dazu wurde bei der V603H-Mutante eine starke Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich beobachtet (Abb. 4C) und ähnliche Ergebnisse wurden für die Doppelmutante D602Y+V603H gefunden (Abb. 4D).

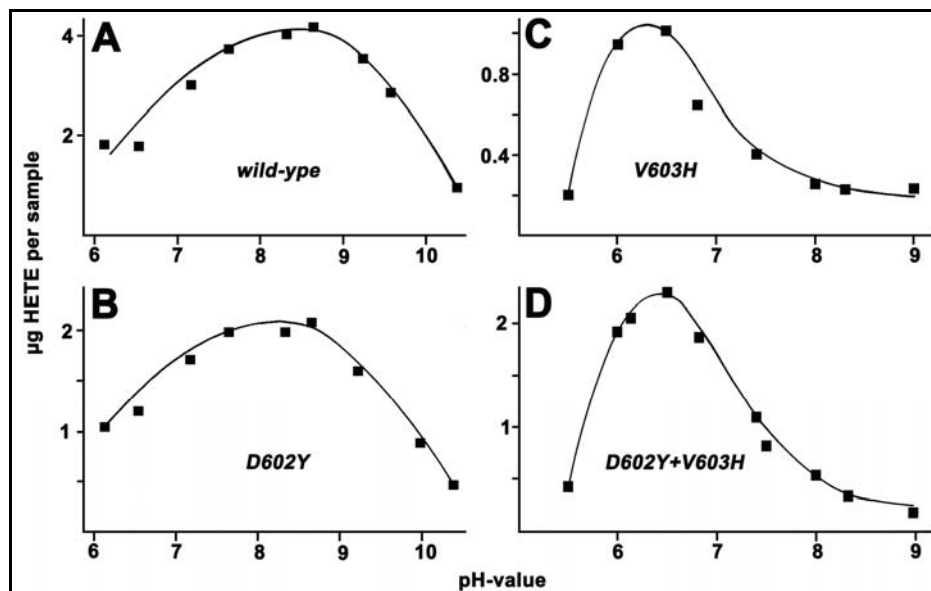


Abb. 4: Aktivität der humanen 15-LOX-2 und einiger Mutanten bei unterschiedlichen pH-Werten (aus Publikation 2).

Für die 8S-Lipoxygenierung von Arachidonsäure durch das Mausenzym wurde eine inverse Substratbindung am aktiven Zentrum diskutiert, bei der sich die Carboxylgruppe in der hydrophoben Bindungstasche befinden sollte. Durch die pH-abhängigen Veränderungen des Protonierungsgrades der Fettsäurecarboxylgruppe ließe sich eine pH-Abhängigkeit der Positionsspezifität erklären. Als nächstes wurde daher untersucht, ob die gefundenen pH-abhängigen Veränderungen im Aktivitätsprofil mit Veränderungen in der Positionsspezifität einhergehen. Der Wildtyp bildet unabhängig vom pH-Wert fast ausschließlich das Hauptprodukt 15S-H(p)ETE (Abb. 5) und ähnliche Ergebnisse wurden für die D602Y-Mutante der humanen 15-LOX-2 erhalten (nicht dargestellt). Die His-enthaltenden Enzymmutanten zeigten jedoch eine klare pH-Abhängigkeit der Positionsspezifität. Es wurde ein fast linearer Anstieg des relativen Anteils der 15-H(p)ETE Bildung durch die V603H-Mutante und die D602Y+V603H-Doppelmutante beobachtet (Abb. 5). Nach Entfernen des His (D602Y+V603F) wurde die pH-Abhängigkeit fast vollständig aufgehoben (Abb. 5), da das eingeführte Phe zwar ein ähnliches Volumen wie das His aufweist, aber unter den gegebenen Bedingungen nicht protoniert werden kann.

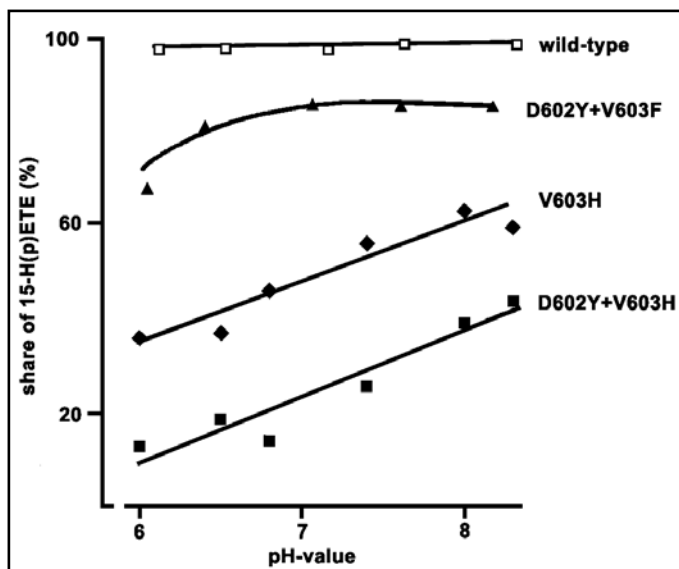


Abb. 5: 15-HETE-Anteil des Produktspektrums von 15-LOX-2 und verschiedenen Mutanten in Abhängigkeit vom pH-Wert. Nur das Vorhandensein eines Histidins induziert eine starke pH-Abhängigkeit der Positionsspezifität (aus Publikation 2).

In allen Fällen ist neben 15-HETE vor allem 8-HETE ein Produkt. Die Untersuchungen mit der Chiralphasen-HPLC ergaben, dass für beide Positionsisomere das S-Enantiomer unter allen Reaktionsbedingungen das bei weitem vorherrschende Produkt ist. Diese Daten weisen auf eine inverse Substratbindung bei der 8S-Lipoxygenierung hin. Konsistent mit der Annahme, dass die Substrat-Carboxylgruppe bei sauren pH-Werten protoniert ist, ist das Hauptprodukt bei den Histidin-beihaltenden Mutanten 8S-HETE. Dessen Anteil fällt mit zunehmendem pH jedoch immer weiter ab. Für die Wechselwirkung mit der Carboxylgruppe ist dieses Histidin von entscheidender Bedeutung. Fehlt es, (Wildtyp-Enzym, Phe-Mutante um Volumeneffekte auszuschließen) findet so gut wie keine inverse Substratbindung mehr statt.

Um die intrazellulären Bedingungen adäquater wiederzugeben, wurden ähnliche Untersuchungen zu pH-abhängigen Veränderungen des Produktmusters bei niedrigeren Substratkonzentrationen durchgeführt. Das Produktmuster des Wildtyps war auch hier pH-unempfindlich, bei der V603H-Mutante zeigte sich jedoch eine deutlich stärkere pH-Abhängigkeit. Interessanterweise konnte durch die Zugabe eines Detergenz (0,2% Natriumcholat) die Abhängigkeit der Reaktionsspezifität von der Substratkonzentration weitgehend aufgehoben werden. Möglicherweise spielt dabei der physiko-chemische Zustand des Substrats und damit dessen Wasserlöslichkeit eine wesentliche Rolle. Bei niedrigen Substratkonzentrationen sind vermehrt Fettsäuremonomere vorhanden, wodurch die Bindung der Arachidonsäure mit dem hydrophoben Methylen im aktiven Zentrum des Enzyms bevorzugt sein sollte. Daraus sollte eine Substratoxygenierung am C15- der Arachidonsäure (15-HETE-Bildung) folgen. Bei höherer Substratkonzentration entstehen verstärkt Mizellen. So wurde intrazellulär für Arachidonsäure eine kritische Konzentration für Mizellenbildung von 10 μ M

beschrieben. Diese Mizellen formieren sich mit dem polaren Carboxylende nach außen, was eine inverse Bindung (Carboxylende in der Bindungstasche und damit 8-HETE-Bildung) verstärken sollte.

Zusammenfassend kann die pH-Abhängigkeit der humanen 15-LOX-2 dahingehend charakterisiert werden, dass der Wildtyp bemerkenswert stabil gegen pH-induzierte Veränderungen der Positionsspezifität ist. Mutation bestimmter Aminosäurereste, vor allem das Einführen eines pH-sensitiven Histidin-Restes, und Veränderungen der Substratkonzentration können die pH-Abhängigkeit der Positionsspezifität jedoch induzieren (Publikation 2), was auf eine Veränderung der Substratorientierung im aktiven Zentrum zurückzugehen scheint.

Untersuchung zur Expression von Eikosanoid-produzierenden Enzymen in gesunden und malignen Ovarialgewebeproben (Publikation 1)

Nach semiquantitativer PCR gab es Hinweise auf unterschiedliche Expressionshöhen einiger Eikosanoid-synthetisierender Enzyme in gesunden bzw. malignen Ovargewebe. Zur genauen Quantifizierung der Expressionshöhen der gewählten Gene wurden Realtime-PCR-Experimente durchgeführt. In malignen Geweben ist die 15-LOX-2 Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe 22-fach erhöht ($p=0,001$) (Abb. 6). Ein ähnliches Ergebnis wurde für Metastasen primärer Ovarialkarzinome ermittelt (20-fache Erhöhung, $p=0,004$). Die Auswertung der Expression von COX1 und 5-LOX in den Ovarialkarzinomproben ergab ebenfalls eine Hochregulation (13-fach bzw. 4-fach), diese Unterschiede sind in beiden Fällen jedoch nicht signifikant ($p=0,1$). Bei der Untersuchung von COX2 und 15-LOX-1 konnte ebenfalls kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen gesunden und malignen Geweben festgestellt werden.

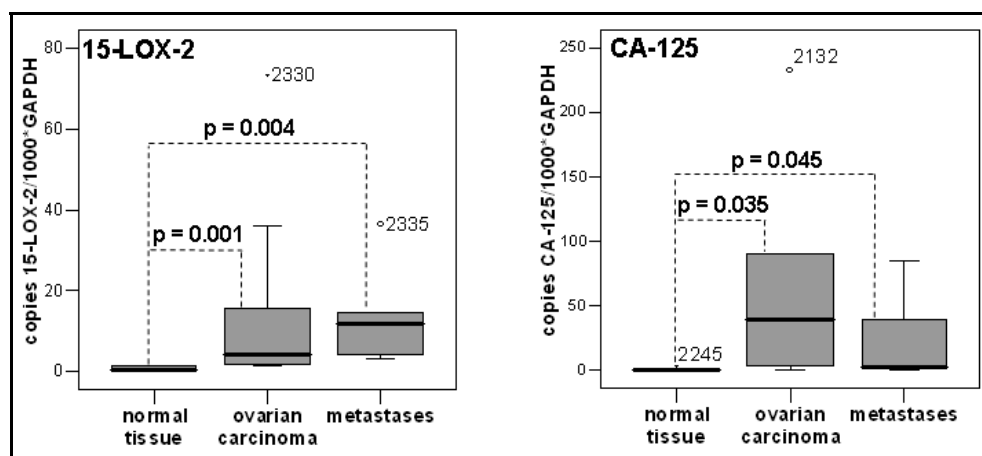


Abb. 6: Boxplots der statistischen Auswertung der Expressionsunterschiede in gesundem und malignen Ovargewebe bzw. Metastasen. Die Expressionshöhe wurde mit Realtime-PCR ermittelt und auf GAPDH-Expression bezogen. Balken: Median-Werte (aus Publikation 1).

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass unter den hier untersuchten Eikosanoid-synthetisierenden Enzymen nur die 15-LOX-2 deutlich signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich von gesundem und malignem Gewebe des Ovars bzw. Metastasen zeigte (Publikation 1). Die 15-LOX-2 könnte somit eine Rolle bei der malignen Entartung von Ovarzellen spielen. Die genaue patho-physiologische Bedeutung sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind zurzeit jedoch noch unbekannt.

Um den potentiellen diagnostischen Wert der erhöhten 15-LOX-2 Expression im malignen Ovarialgewebe mit bekannten Tumormarkern zu vergleichen, wurden die Expression von CA125, ein auch im klinischen Alltag verwendeter Tumormarker (Moore et al., 2010), und Hepsin unter identischen Bedingungen quantifiziert und mit der 15-LOX-2 verglichen. Dabei konnte für CA125 ein signifikanter Unterschied ($p=0,035$ für Primärtumoren, $p=0,045$ für Metastasen) zwischen malignem und gesundem Gewebe festgestellt werden, dessen Ausmaß aber nicht an das Niveau der 15-LOX heranreichte (Abb. 6). Aufgrund des drastisch hochregulierten Expressionsniveaus in malignem Ovargewebe könnte die 15-LOX-2 einen potentiellen Tumormarker darstellen. Hierzu sind jedoch weitere Studien mit deutlich mehr Gewebeproben notwendig.

1.5 Literaturverzeichnis

- Borngraber, S.; Browner, M.; Gillmor, S.; Gerth, C.; Anton, M.; Fletterick, R. und Kuhn, 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 [52], Seite 37345-50.
- Borngraber, S.; Kuban, R. J.; Anton, M. und Kuhn, H. (1996): Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases, *J Mol Biol* 264 [5], Seite 1145-53.
- Brash, A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *J Biol Chem* 274 [34], Seite 23679-82.
- Bryant, R. W.; Bailey, J. M.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1982): Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid, *J Biol Chem* 257 [11], Seite 6050-5.
- Coffa, G. und Brash, A. R. (2004): A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [44], Seite 15579-84.
- Fujimura, T.; Ohta, T.; Oyama, K.; Miyashita, T. und Miwa, K. (2007): Cyclooxygenase-2 (COX-2) in carcinogenesis and selective COX-2 inhibitors for chemoprevention in gastrointestinal cancers, *J Gastrointest Cancer* 38 [2-4], Seite 78-82.
- Funk, C. D. (2001): Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294 [5548], Seite 1871-5.
- Furstenberger, G.; Krieg, P.; Muller-Decker, K. und Habenicht, A. J. (2006): What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?, *Int J Cancer* 119 [10], Seite 2247-54.
- Gardner, H. W. (1989): Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism, *Biochim Biophys Acta* 1001 [3], Seite 274-81.
- Hornung, E.; Kunze, S.; Liavonchanka, A.; Zimmermann, G.; Kuhn, D.; Fritsche, K.; Renz, A.; Kuhn, H. und Feussner, I. (2008): Identification of an amino acid determinant of pH regiospecificity in a seed lipoxygenase from *Momordica charantia*, *Phytochemistry* 69 [16], Seite 2774-80.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J. und Thun, M. J. (2009): Cancer statistics, 2009, *CA Cancer J Clin* 59 [4], Seite 225-49.
- Jisaka, M.; Kim, R. B.; Boeglin, W. E. und 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 [2], Seite 1287-93.
- Kuhn, H.; Saam, J.; Eibach, S.; Holzhutter, H. G.; Ivanov, I. und Walther, M. (2005): Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure, *Biochem Biophys Res Commun* 338 [1], Seite 93-101.
- Kuhn, H.; Wiesner, R.; Schewe, T. und Rapoport, S. M. (1983): Reticulocyte lipoxygenase exhibits both n-6 and n-9 activities, *FEBS Lett* 153 [2], Seite 353-6.
- Mazhar, D.; Gillmore, R. und Waxman, J. (2005): COX and cancer, *Qjm* 98 [10], Seite 711-8.
- 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. und 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 [20], Seite 6525-30.
- Moore, R. G.; MacLaughlan, S. und Bast, R. C., Jr. (2010): Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer, *Gynecol Oncol* 116 [2], Seite 240-5.

- Nasi, M. L. und Castiglione, M. (2002): Cyclooxygenase-2 (COX-2) a new prognostic and predictive factor for ovarian cancer? Are all the criteria fulfilled?, *Ann Oncol* 13 [8], Seite 1169-71.
- Nie, D. (2007): Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers, *Front Biosci* 12, Seite 1574-85.
- Nie, D.; Krishnamoorthy, S.; Jin, R.; Tang, K.; Chen, Y.; Qiao, Y.; Zacharek, A.; Guo, Y.; Milanini, J.; Pages, G. und Honn, K. V. (2006): Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells, *J Biol Chem* 281 [27], Seite 18601-9.
- O'Donnell, V. B.; Maskrey, B. und Taylor, G. W. (2009): Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells, *Methods Mol Biol* 462, Seite 5-23.
- Schneider, C.; Pratt, D. A.; Porter, N. A. und Brash, A. R. (2007): Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis, *Chem Biol* 14 [5], Seite 473-88.
- Shureiqi, I.; Jiang, W.; Zuo, X.; Wu, Y.; Stimmel, J. B.; Leesnitzer, L. M.; Morris, J. S.; Fan, H. Z.; Fischer, S. M. und Lippman, S. M. (2003): The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [17], Seite 9968-73.
- Skates, S. J.; Menon, U.; MacDonald, N.; Rosenthal, A. N.; Oram, D. H.; Knapp, R. C. und Jacobs, I. J. (2003): Calculation of the risk of ovarian cancer from serial CA-125 values for preclinical detection in postmenopausal women, *J Clin Oncol* 21 [10 Suppl], Seite 206s-210s.
- Sloane, D. L.; Leung, R.; Craik, C. S. und Sigal, E. (1991): A primary determinant for lipoxygenase positional specificity, *Nature* 354 [6349], Seite 149-52.
- Veldink, G. A.; Garssen, G. J.; Vliegthart, J. F. und Boldingh, J. (1972): Positional specificity of corn germ lipoxygenase as a function of pH, *Biochem Biophys Res Commun* 47 [1], Seite 22-6.
- Wenham, R. M.; Lancaster, J. M. und Berchuck, A. (2002): Molecular aspects of ovarian cancer, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16 [4], Seite 483-97.
- Werz, O. und Steinhilber, D. (2006): Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors, *Pharmacol Ther* 112 [3], Seite 701-18.
- Wymann, M. P. und Schneider, R. (2008): Lipid signalling in disease, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 [2], Seite 162-76.

2. Ausgewählte Publikationen

2.1

Roffeis, J.; Hornung, D.; Kuhn, H.; Walther, M. (2007): 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary, *Eur J Cancer Prev.* 16 [6], Seite 568-75.

2.2

Walther, M.; **Roffeis, J.**; Jansen, C.; Anton, M.; Ivanov, I.; Kuhn, H. (2009): Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms, *Biochim Biophys Acta.* 1791[8], Seite 827-35.

2.3

Vogel, R.; Jansen, C.; **Roffeis, J.**; Reddanna, P.; Forsell, P.; Claesson, H. E.; Kuhn, H.; Walther, M. (2010): Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases, *J Biol Chem.* 285[8], Seite 5369-76.

3. Curriculum Vitae

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

4. Publikationsliste

Roffeis, J.; Hornung, D.; Kuhn, H.; Walther, M. (2007): 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary, *Eur J Cancer Prev.* 16 [6], Seite 568-75.

Kuhn, H.; Chaitidis, P.; **Roffeis, J.**; Walther, M. (2007): Arachidonic Acid metabolites in the cardiovascular system: the role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis with particular emphasis on vascular remodelling, *J Cardiovasc Pharmacol.* 50[6], Seite 609-20.

Walther, M.; **Roffeis, J.**; Jansen, C.; Anton, M.; Ivanov, I.; Kuhn, H. (2009): Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms, *Biochim Biophys Acta.* 1791[8], Seite 827-35.

Vogel, R.; Jansen, C.; **Roffeis, J.**; Reddanna, P.; Forsell, P.; Claesson, H. E.; Kuhn, H.; Walther, M. (2010): Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases, *J Biol Chem.* 285[8], Seite 5369-76.

Ivanov, I.; Heydeck, D.; Hofheinz, K.; **Roffeis, J.**; O'Donnell, V.B.; Kuhn, H.; Walther, M.(2010): Molecular enzymology of lipoxygenases, *Arch Biochem Biophys.* Seite 503, 161–174.

Jansen, C.; Hofheinz, K.; Vogel, R.; **Roffeis, J.**; Anton, M.; Reddanna, P.; Kuhn, H.; Walther, M.(2011): Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases, *J Biol Chem.* 286, doi/10.1074/jbc.M111.259242.

Walther, M.; Hofheinz, K.; Vogel, R.; **Roffeis, J.**; Kuhn, 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.*, in press. doi:10.1016/j.abb.2011.09.004.

5. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Jana Roffeis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur strukturellen Basis der Positionsspezifität der humanen 15-Lipoxygenase-2 sowie zur Expression des Enzyms beim Ovarialkarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

30.09.2011

J. Roffeis

Danksagung

Ich danke zuerst Herrn Prof. Dr. sc. med. H. Kühn für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die jederzeit gewährte, ausdauernde und exzellente Unterstützung bei der Projektgestaltung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. A. Brash für die freundliche Bereitstellung der kompletten cDNA der humanen 15-LOX-2, sowie Frau Prof. Hornung für die Überlassung der humanen Gewebeproben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. M. Walther für seine umfangreiche wissenschaftliche und moralische Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie die Durchsicht meiner Doktorarbeit. Über viele Jahre hat er durch seine wertvolle Anregungen, seine ausdauernde Motivation und ständige Diskussionsbereitschaft maßgeblich zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kühn für die tatkräftige Unterstützung, die fundierte Vermittlung molekularbiologischer Arbeitstechniken und die freundliche Atmosphäre bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Frau M. Anton, Frau C. Gerth und Frau H. Stender sowie Frau H. Schiebel für die geduldige Einführung in praktische Vorgehensweisen,

Frau Dr. rer. nat. J. Belkner, Frau Dr. rer. nat. A. Borchert, Herrn Dr. rer. nat. I. Ivanov, Herrn Dr. rer. nat. P. Chaitidis, Herrn Dr. rer. nat. C. Ufer für die kontinuierliche Unterstützung bei inhaltlichen und methodischen Fragen.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meiner Familie und meinem Lebensgefährten, die mich mit ihrem unermüdlichen Beistand unentwegt unterstützt und in den schwierigen Phasen der Arbeit stets motiviert haben.