

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Veränderung der Reaktionsspezifität der
15-Lipoxygenase (ALOX15) im Rahmen der späten
Säugetierevolution und zur Wirkung von Hemmstoffen auf die
ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Wilhelm Karst

aus Saarbrücken

Datum der Promotion:
16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1 Einleitung | 12 |
| 1.1 Definition der Lipoxygenasen..... | 12 |
| 1.2 Klassifizierung der Lipoxygenasen..... | 12 |
| 1.3 Lipoxygenasereaktion..... | 15 |
| 1.4 Struktur der Lipoxygenasen | 16 |
| 1.5 Biologische Rolle der Lipoxygenasen | 18 |
| 1.6 Evolution der Lipoxygenasen..... | 20 |
| 1.7 Substratspezifität der Lipoxygenasen | 24 |
| 1.8 Membranbindung der Lipoxygenasen | 25 |
| 1.9 Lipoxine..... | 27 |
| 1.9.1 Lipoxinsynthese | 28 |
| 1.10 Hemmstoffe der Lipoxygenasen..... | 30 |
| 1.10.1 Nordihydroguaiarsäure (NDGA)..... | 31 |
| 1.10.2 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA)..... | 32 |
| 1.10.3 Baicalein | 33 |
| 1.10.4 Epigallocatechingallat (EGCG)..... | 33 |
| 1.10.5 4-Nitrocatechol (4-NC)..... | 34 |
| 1.10.6 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1 (LI-1) | 35 |
| 1.10.7 4-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698) | 35 |
| 1.10.8 Salicylhydroxamsäure (SHAM) | 36 |
| 1.10.9 Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA)..... | 36 |
| 1.11 Fragestellung | 37 |
| 2 Materialien..... | 39 |
| 2.1 Chemikalien | 39 |
| 2.2 Hemmstoffe..... | 40 |
| 2.3 Pufferzusammensetzungen und Lösungen..... | 40 |
| 2.4 Geräte und Zubehör | 41 |
| 2.5 Software | 42 |
| 2.6 Enzyme und Kits..... | 42 |
| 2.7 Plasmide und Oligonukleotide..... | 43 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3 | Methoden..... | 44 |
| 3.1 | Klonierung der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies | 44 |
| 3.1.1 | Klonierung der humanen ALOX15 | 44 |
| 3.1.1.1 | RNA-Extraktion..... | 44 |
| 3.1.1.2 | Reverse Transkription..... | 44 |
| 3.1.1.3 | PCR | 44 |
| 3.1.1.4 | TOPO-Cloning | 45 |
| 3.1.1.5 | Kontrollspaltung | 46 |
| 3.1.1.6 | Umklonierung in einen prokaryotischen Expressionsvektor | 46 |
| 3.1.2 | Klonierung der ALOX15 des Schimpansen | 47 |
| 3.1.3 | Klonierung der ALOX15 des <i>Pongo pygmaeus</i> (Orang-Utan) | 47 |
| 3.1.4 | Klonierung der ALOX15 des Kaninchens | 47 |
| 3.1.5 | Klonierung der ALOX15 des <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe) | 47 |
| 3.1.6 | Klonierung der ALOX15 des Schweins | 48 |
| 3.1.7 | Klonierung der ALOX15 der Ratte..... | 48 |
| 3.1.8 | Klonierung der ALOX15 der Maus | 48 |
| 3.1.9 | Klonierung der Leu353Phe Mutante der mouALOX15 | 49 |
| 3.1.10 | Klonierung der Leu353Phe Mutante der ratALOX15 | 49 |
| 3.1.11 | Klonierung der Ile418Ala Mutante der humALOX15..... | 50 |
| 3.1.12 | Präparation der nativen 15-Lipoxygenase des Kaninchens aus Retikulozyten | 50 |
| 3.2 | Proteinexpression | 50 |
| 3.3 | Westernblot..... | 51 |
| 3.4 | Aktivitätsassay zur Bestimmung der Arachidonsäureoxygenierungskapazität ... | 52 |
| 3.5 | Substratspezifitätstestung..... | 53 |
| 3.6 | Membranoxygenierungsassay..... | 54 |
| 3.7 | Lipoxinsynthese | 55 |
| 3.8 | Einfluss von Hemmstoffen auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität..... | 56 |
| 3.9 | High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) | 57 |
| 3.10 | Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC₅₀..... | 58 |
| 4 | Ergebnisse | 59 |
| 4.1 | Expression der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere..... | 59 |
| 4.1.1 | Etablierung eines HPLC Systems zur Analyse der ALOX15-Positionsspezifität | 59 |
| 4.2 | Enzymatische Charakterisierung | 61 |
| 4.2.1 | Positionsspezifität..... | 61 |
| 4.3 | Substratspezifitätstestung..... | 64 |
| 4.4 | Membranoxygenierung | 66 |
| 4.5 | Lipoxinsynthese | 69 |

| | |
|---|------------|
| 4.6 Wirkung beschriebener LOX-Hemmstoffe auf ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere | 73 |
| 4.6.1 Isoform- und Orthologspezifität von LOX-Hemmstoffen | 73 |
| 4.6.2 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Nordihydroguaiaretsäure (NDGA)..... | 75 |
| 4.6.3 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA) | 77 |
| 4.6.4 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Baicalein (BCC) | 79 |
| 4.6.5 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Epigallocatechingallat (EGCG)..... | 81 |
| 4.6.6 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-Nitrocatechol (4-NC) | 82 |
| 4.6.7 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1..... | 83 |
| 4.6.8 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698)..... | 84 |
| 4.6.9 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Salicylhydroxamsäure | 85 |
| 4.6.10 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure | 86 |
| 5 Diskussion | 88 |
| 5.1 Expression von Lipoxygenasen und Positionsspezifitätstestung | 88 |
| 5.2 Substratspezifität von ALOX15-Orthologen | 92 |
| 5.3 Membranoxygenierungskapazität von ALOX15-Orthologen | 94 |
| 5.4 Lipoxinsynthaseaktivität von ALOX15-Orthologen | 95 |
| 5.5 Differentielle Wirkung von Hemmstoffen auf ausgewählte 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere | 97 |
| 5.5.1 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Nordihydroguaiaretsäure (NDGA)..... | 99 |
| 5.5.2 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 5,8,11,14-Eicosatetraensäure | 101 |
| 5.5.3 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Baicalein | 102 |
| 5.5.4 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Epigallocatechingallat (EGCG)..... | 104 |
| 5.5.5 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-Nitrocatechol..... | 105 |
| 5.5.6 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch den 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1..... | 106 |
| 5.5.7 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698)..... | 106 |
| 5.5.8 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Salicylhydroxamsäure | 107 |
| 5.5.9 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure | 108 |
| 6 Zukünftige weiterführende Experimente | 109 |
| 7 Literaturverzeichnis | 111 |
| 8 Abbildungsverzeichnis | 119 |
| 9 Tabellenverzeichnis | 120 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 10 | Lebenslauf..... | 121 |
| 11 | Publikationsliste | 123 |
| 12 | Eidesstattliche Erklärung und Anteilserklärung..... | 124 |

Zusammenfassung

Einleitung: Die 15-Lipoxygenase (ALOX15) ist eine Nichthäm-eisen enthaltende Dioxygenase, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Hydroperoxyfettsäuren oxygeniert. Sie ist an der Synthese von bioaktiven Botenstoffen (Leukotriene, Lipoxine) sowie am Lipoproteinstoffwechsel beteiligt und spielt damit eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. ALOX15-Orthologe werden von fast allen Säugetierspezies exprimiert. Phylogenetisch ältere Säugetiere (Maus, Ratte, Schwein) besitzen 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe, während höher entwickelte Säugetiere (Schimpansen, Mensch) 15-lipoxygenierende Enzyme exprimieren. Um mögliche Triebkräfte für diese evolutionäre Veränderung der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit vier Arbeitshypothesen getestet: i) 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe besitzen eine höhere Linolsäureoxygenierungsaktivität und sind damit effektivere Enzyme. ii) 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe verfügen über eine höhere Membranoxygenaseaktivität. iii) 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe weisen eine höhere Syntheseaktivität für antiinflammatorische Lipoxine auf. iv) Die Sensitivität gegenüber LOX-Hemmstoffen korreliert mit der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen.

Methodik: Um diese Hypothesen zu testen, wurden ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere rekombinant exprimiert und deren Fähigkeit zur Linolsäureoxygenierung, zur Membranoxygenierung und zur Lipoxinsynthese miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Hemmbarkeit der Enzymorthologen durch ausgewählte Lipoxygenasehemmstoffe getestet.

Ergebnisse: Es konnten keine systematischen Unterschiede zwischen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Oxygenierung von Linolsäure und von Biomembranen nachgewiesen werden. Unter Verwendung verschiedener Substrate wurde gezeigt, dass die Lipoxinsynthaseaktivitäten von 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen signifikant ($p < 0.01$) höher lagen als die von 12-lipoxygenierenden Enzymen. Die Hemmwirkung ausgewählter Standardhemmstoffe korrelierte nicht mit der Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung.

Schlussfolgerung: 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe haben eine höhere Synthaseaktivität für antiinflammatorische Lipoxine als 12-lipoxygenierende Enzyme. Diese Daten können dahingehend interpretiert werden, dass höher entwickelte

Säugetiere die Entzündungsreaktion besser kontrollieren können. Die veränderte Reaktionsspezifität der ALOX15 wäre damit Bestandteil einer evolutionären Optimierungsstrategie des Immunsystems. Da die Effektivität der Hemmung von ALOX15 durch Standardhemmstoffe nicht mit der Reaktionsspezifität korreliert und da sich ALOX15-Orthologe hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Hemmstoffen teils drastisch voneinander unterscheiden, kann *a priori* nicht davon ausgegangen werden, dass effektive Hemmstoffe der humanen ALOX15 (15-lipoxygenierend) auch die murinen ALOX15-Orthologen (12-lipoxygenierend) hemmen.

Abstract

Introduction: 15-lipoxygenase (ALOX15) is a nonheme-iron containing dioxygenase that catalyzes the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids to hydroperoxy derivatives. It has been implicated in the biosynthesis of lipid mediators such as leukotriens and lipoxins but also in lipoprotein metabolism and thus, it plays an important role in physiological and pathophysiological processes. ALOX15 genes occur in most mammalian genomes and the ALOX15-orthologs of lower mammals (mouse, rat, pig) exhibit arachidonic acid 12-lipoxygenating activities. In contrast, higher mammals (human, chimpanzee) express arachidonic acid 15-lipoxygenating enzymes. To explore the potential driving forces for these evolutionary alterations the following hypotheses were tested in this dissertation: i) 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs exhibit a higher linoleic acid oxygenase activity than 12-lipoxygenating orthologs and thus, are more effective lipid peroxidizing enzymes. ii) 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs exhibit a higher membrane oxygenase activity. iii) 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs exhibit a higher biosynthetic capacity for anti-inflammatory lipoxins. iv) The sensitivity of ALOX15-orthologs for standard LOX-inhibitors correlates with the reaction specificity of the enzymes.

Methodology: To test these working hypotheses we expressed several 12- and 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs as recombinant proteins in *E. coli* and quantified their oxygenase activities of linoleic acid and biomembranes. We also measured their synthetic capacity for anti-inflammatory lipoxins and tested their sensitivity for standard LOX inhibitors.

Results: We did not detect significant differences between 12- and 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs when we quantified the linoleic acid and membrane oxygenase activity of the enzymes. In contrast, the biosynthetic capacity for anti-inflammatory lipoxins from different substrates was significantly ($p < 0.01$) higher for 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs when compared with their 12-lipoxygenating counterparts. The inhibitory potency of several standard LOX-inhibitors did not correlate with the reaction specificity of the ALOX15-orthologs.

Conclusions: When compared with 12-lipoxygenating ALOX15-orthologs 15-lipoxygenating enzymes exhibit an improved capacity for the biosynthesis of anti-inflammatory lipoxins. From this data it might be concluded that higher mammals, which express 15-lipoxygenating ALOX15-orthologs, have an improved capacity for controlling

inflammatory reactions. If this is the case the observed evolutionary switch in the reaction specificity of ALOX15-orthologs can be considered as part of a more comprehensive evolutionary program aimed at optimizing the mammalian immune system. Since the inhibitory potency of various standard LOX-inhibitors did not correlate with the reaction specificity and since the degree of inhibition was different for ALOX15-orthologs of different species one cannot conclude that effective inhibitors of human ALOX15 do also inhibit murine or porcine ALOX15-orthologs.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| 12-HETE | 12-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraensäure |
| 12-HpETE | 12-Hydroperoxyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraensäure |
| 15-HETE | 15-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,11Z,14E-tetraensäure |
| 15-HpETE | 15-Hydroperoxyeicosa-5Z,8Z,11Z,14E-tetraensäure |
| 4-NC | 4-Nitrocatechol |
| 5-HETE | 5-Hydroxyeicosa-6E,8Z,11Z,14Z-tetraensäure |
| AA | Arachidonsäure |
| ALOX15 | Arachidonsäure Lipoxygenase15-1; 12/15-Lipoxygenase |
| Amp | Ampicillin |
| BCC | Baicalein |
| CA | Chloramphenicol |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CHCA | Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure |
| chiALOX15 | Lipoxygenase15 des <i>Pongo pygmaeus</i> (Schimpanse) |
| dNTPs | 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate |
| EGCG | Epigallocatechingallat |
| ETYA | 5-,8-,11-,14-Eicosatetraensäure |
| HEPES-Puffer | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HETE | Hydroxyeicosatetraensäure |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“) |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| humALOX15 | Humane Lipoxygenase15 |
| humI418AALOX15 | Lipoxygenase15 der Isoleucin 418 Alanin Mutante des Menschen |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| IPTG | Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| LB-Medium | Lysogeny Broth Medium |

| | |
|-------------------|--|
| LI-1 | 15-Lipoxygenase Inhibitor 1 |
| LOX | Lipoxygenase |
| macALOX15 | Lipoxygenase15 des <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe) |
| mAU | Milli Absorbance Units |
| mouALOX15 | Lipoxygenase15 der Maus |
| mouL353FALOX15 | Lipoxygenase15 der Leucin 353 Phenylalanin Mutante der Maus |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pigALOX15 | Lipoxygenase15 des Schweins |
| ponALOX15 | Lipoxygenase15 des Orang-Utan |
| PUFA | Polyunsaturated fatty acids (mehrfach ungesättigte Fettsäuren) |
| Rab-conALOX15 | Aus Retikulozyten aufgereinigte Lipoxygenase15 des Kaninchens |
| rabALOX15 | Lipoxygenase15 des Kaninchens |
| ratALOX15 | Lipoxygenase15 der Ratte |
| ratL353FALOX15 | Lipoxygenase15 der Leucin 353 Phenylalanin Mutante der Ratte |
| RCF | Relative centrifugal force |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SHAM | Salicylhydroxamsäure |
| SMP | Submitochondriale Partikel |
| SOC-Medium | Super-Optimal-Broth Medium |
| SPM | Specialized pro-resolving mediators |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |

Nukleinsäurebasen-Abkürzungen

| | |
|---|----------------|
| A | <i>Adenin</i> |
| C | <i>Cytosin</i> |
| G | <i>Guanin</i> |
| T | <i>Thymin</i> |

Aminosäure-Abkürzungen (one and three letter code)

| | | |
|-----|---|---------------------|
| Ala | A | <i>Alanin</i> |
| Arg | R | <i>Arginin</i> |
| Asn | N | <i>Asparagin</i> |
| Asp | D | <i>Aspartat</i> |
| Cys | C | <i>Cystein</i> |
| Glu | E | <i>Glutamat</i> |
| Gln | Q | <i>Glutamin</i> |
| Gly | G | <i>Glycin</i> |
| His | H | <i>Histidin</i> |
| Ile | I | <i>Isoleucin</i> |
| Leu | L | <i>Leucin</i> |
| Lys | K | <i>Lysin</i> |
| Met | M | <i>Methionin</i> |
| Phe | F | <i>Phenylalanin</i> |
| Pro | P | <i>Prolin</i> |
| Ser | S | <i>Serin</i> |
| Thr | T | <i>Threonin</i> |
| Trp | W | <i>Tryptophan</i> |
| Tyr | Y | <i>Tyrosin</i> |
| Val | V | <i>Valin</i> |

1 Einleitung

1.1 Definition der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen gehören zur Familie der Nichthämeisen enthaltenden Dioxygenasen (1). Ihre katalytische Aktivität besteht in der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs), die durch die Einführung von molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren umgewandelt werden (2). Lipoxygenasen kommen sowohl in Eukaryonten als auch Prokaryonten vor, wobei bisher noch keine LOXs in Archaeen beschrieben worden sind. Auch bakterielle LOXs sind eher selten, da in den bisher sequenzierten bakteriellen Genomen nur bei weniger als 0.1 % LOX-like Sequenzen identifiziert werden konnten (3). Bei höher entwickelten Pflanzen und Tieren kommen LOXs jedoch weit verbreitet vor. Pflanzliche Lipoxygenasen bevorzugen Linolsäure ($C_{18}: \Delta^{9,12}, \omega 6$), gamma-Linolensäure ($C_{18}: \Delta^{6,9,12}, \omega 6$) und alpha-Linolensäure ($C_{18}: \Delta^{9,12,15}, \omega 3$) als Substrate. Bei Vertebraten hingegen dienen sowohl Linolsäure ($C_{18}: \Delta^{9,12}, \omega 6$) als auch Arachidonsäure (AA) ($C_{20}: \Delta^{5,8,11,14}, \omega 6$), Eicosapentaensäure (EPA) ($C_{20}: \Delta^{5,8,11,14,17}, \omega 3$) und Docosahexaensäure (DHA) ($C_{22}: \Delta^{4,7,10,13,16,19}, \omega 3$) als LOX-Substrate (4). Da freie Fettsäuren in Zellen jedoch nur in geringen Konzentrationen vorkommen, müssen sie bei Aktivierung der Lipoxygenasereaktion aus den Phospholipiden der Zellmembranen freigesetzt werden. Zuständig für diese Freisetzungsreaktion ist die zytosolische Phospholipase A_2 (5). Als Produkte der primären Lipoxygenasereaktion entstehen Hydroperoxyfettsäuren (HpETEs). Diese können entweder durch reduzierende Enzyme (z.B. Glutathionperoxidasen) zu Hydroxyfettsäuren (HETEs) reduziert werden oder in weiteren enzymatischen Reaktionen zu bioaktiven Lipidmediatoren wie Leukotrienen (6), Lipoxinen (7), Resolvinen (8), Eoxinen (9), Hepoxilinen (10), Protektinen (11) u.a.m. umgewandelt werden.

1.2 Klassifizierung der Lipoxygenasen

Es wurde mehrfach versucht, die heterogene Enzymfamilie der Lipoxygenasen sinnvoll zu subklassifizieren. Diese Aufgabe erwies sich jedoch als hoch problematisch und konnte bis heute nicht umfassend gelöst werden. Der erste Ansatz der Subklassifizierung von Lipoxygenasen erfolgte anhand ihrer Reaktionsspezifität mit dem Modellsubstrat Arachidonsäure. So wurden die Enzyme, die eine Oxidation des 15.

Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure katalysieren, als 15-LOXs klassifiziert. Enzyme, die hingegen eine Oxidation des 12. Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure katalysieren, wurden 12-LOXs genannt. Dieses Konzept war einleuchtend, leicht verständlich und in den frühen Phasen der LOX-Forschung auch durchaus hilfreich. Mit der zunehmenden Vielfalt der verfügbaren LOX-Sequenzen wurde die Anwendung dieses Konzeptes jedoch zunehmend problematischer, da bei diesem Klassifikationssystem die evolutionären Zusammenhänge der Lipoxygenasen außer Acht gelassen werden (3).

Beispielsweise produziert die humane ALOX15 vorrangig 15-H(p)ETE aus Arachidonsäure und müsste damit als 15-LOX klassifiziert werden. Die orthologe murine Variante des Enzyms bildet jedoch hauptsächlich 12-H(p)ETE aus Arachidonsäure und müsste nach dem Positionsspezifitätskonzept als 12-LOX eingestuft werden (12). Andererseits stellen diese orthologen Enzyme die funktionellen Äquivalente in den verschiedenen Säugetierspezies dar und besitzen ähnliche biologische Funktionen. Deshalb sollten sie nicht in verschiedene Enzymklassen eingeteilt werden. Dasselbe gilt für die humALOX15B, die fast ausschließlich 15-H(p)ETE aus Arachidonsäure produziert. Die murine Alox15b hingegen bildet vor allem 8-H(p)ETE. Damit unterscheiden sich die Reaktionsspezifitäten der beiden Enzyme deutlich voneinander, obwohl die beiden LOXs eine große evolutionäre Verwandtschaft aufweisen (orthologe Enzyme in zwei unterschiedlichen Säugetierspezies). Ein weiterer Nachteil des spezifitätsbasierten Klassifikationssystems ist, dass die Reaktionsspezifität von LOXs keine absolute Enzymeigenschaft ist, sondern von der Struktur der Substrate (13) und von den Reaktionsbedingungen (14, 15) abhängt. Das bedeutet, dass ein Enzym z.B. bei Oxygenierung eines Substrates auch verschiedene Produkte synthetisieren kann. So produziert die ALOX15 des Menschen zwar hauptsächlich 15-H(p)ETE aus Arachidonsäure, aber in geringen Mengen entsteht auch 12-H(p)ETE. Umgekehrt gilt für einige Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Lipoxygenasen, dass sie auch 15-H(p)ETE synthetisieren. Weiterhin nutzen vor allem Lipoxygenasen von Pflanzen andere Substrate als Arachidonsäure. Deshalb werden für pflanzliche Lipoxygenasen Linolsäure-basierte Klassifikationskonzepte genutzt (16, 17).

Um diese Schwachpunkte der LOX-Klassifizierung zu umgehen, wurde kürzlich für Säugetier-LOXs ein Klassifizierungskonzept vorgeschlagen, das auf den Verwandtschaftsbeziehungen der zugehörigen Gene beruht. In diesem Klassifikationssystem werden die Genbezeichnungen auch für die Enzymnamen verwendet. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden die Gennamen kursiv

geschrieben. Außerdem wird die Tierspezies kenntlich gemacht, indem sie in Form eines Codes aus 3 Buchstaben der Genbezeichnung vorangestellt wird. Das humane Genom enthält sechs funktionelle LOX-Gene (*ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *ALOX5*), die für sechs verschiedene Lipoxygenaseisoformen codieren (18). Abgesehen vom *ALOX5*-Gen, welches auf Chromosom 10 liegt, wurden alle anderen *ALOX*-codierenden Gene in einem gemeinsamen Gencluster lokalisiert, das sich auf Chromosom 17 befindet.

Das *ALOX15*-Gen kodiert für die *ALOX15*, die beim Menschen vor allem in eosinophilen Granulozyten (19), broncho-alveolären Epithelzellen (20) und Monozyten/Makrophagen (21) exprimiert wird. Das *ALOX15B*-Gen codiert für die *ALOX15B*, die sich u.a. in Epithelzellen finden lässt (22). Das *ALOX12*-Gen codiert für die Thrombozyten-*ALOX12*, die nicht nur in hohem Maße in Blutplättchen (23), sondern auch in der Haut exprimiert wird (24). Das *ALOX12B*-Gen (12R-lipoxygenierendes Enzym) und das *ALOXE3*-Gen (12S-lipoxygenierendes Enzym) codieren für zwei epidermale LOX-Isoformen, die beide vor allem in der Haut exprimiert werden. Diese Enzyme sollen für die Differenzierung von Keratinozyten und die epidermale Wasserbarriere verantwortlich sein (25). Die *ALOX5* ist das Schlüsselenzym der Leukotriensynthese (1) und wird vom *ALOX5*-Gen codiert.

Das Mausgenom hingegen enthält sieben funktionelle LOX-Gene (*Alox15*, *Alox15b*, *Alox12*, *Alox12b*, *Alox5*, *Aloxe3*, *Aloxe12*), wobei das murine *Aloxe12*-Gen im menschlichen Genom als funktionsloses Pseudogen vorkommt (18). Die mouALOX15 ist ein 12-lipoxygenierendes Enzym, das Arachidonsäure hauptsächlich zu 12-H(p)ETE verstoffwechselt (26), wohingegen das orthologe Enzym beim Menschen 15-H(p)ETE synthetisiert. Um Verwirrungen zu vermeiden, sollte das Mausezym als 12-lipoxygenierende ALOX15 bezeichnet werden.

Die strukturellen Ursachen für die unterschiedliche Reaktionsspezifität orthologer Enzyme in verschiedenen Tierspezies sind eingehend untersucht worden. So konnte durch ortsgerechte Mutagenese die 15-lipoxygenierende humane *ALOX15* in ein 12-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (27). Dazu wurde das Isoleucin, das sich an Stelle 418 der Aminosäuresequenz befindet, in ein Alanin umgewandelt. Dieser Wechsel führt entsprechend des Triadenkonzeptes (siehe Kap. 1.4) zu einer Vergrößerung der Substratbindungstasche und verursacht damit den 12-lipoxygenierenden Charakter dieser Lipoxygenasemutante. Ähnliche Veränderungen konnten für die *ALOX15* des Kaninchens (28) und die orthologen Enzyme

verschiedener Primaten (29) mit vergleichbaren Mutagenesestrategien induziert werden. Umgekehrt kann die 12-lipoxygenierende mouALOX15 durch eine Mutation des Leucins an Stelle 353 in ein Phenylalanin zu einer 15-lipoxygenierenden LOX umgewandelt werden (30).

1.3 Lipoxygenasereaktion

Der Mechanismus der Lipoxygenasereaktion kann formal in vier Elementarreaktionen unterteilt werden (1, 30) (siehe Abb. 1):

- 1) Schritt 1 ist die Abstraktion von Wasserstoff von einer doppelallylständigen Methylengruppe der Substratfettsäure. Das abgespaltene Wasserstoffatom besteht formal aus einem Proton und einem Elektron. Das Elektron wird auf das dreiwertige Nichthämeisen, das sich im aktiven Zentrum der Lipoxygenase befindet, übertragen und reduziert das Eisen zu Fe[II] (31). Durch die initiale Wasserstoffabstraktion entsteht aus der Substratfettsäure ein kohlenstoffzentriertes Fettsäureradikal.
- 2) Im zweiten Schritt der Reaktion kommt es zu einer Radikalverschiebung. Dabei wandert das ungepaarte Elektron des Fettsäureradikals, das bei der Wasserstoffabstraktion entstanden ist, entweder um zwei Kohlenstoffatome in Richtung Methylende (n+2-Radikalverschiebung) oder in Richtung Carboxylende (n-2-Radikalverschiebung) der Fettsäure. Die Richtung der Radikalverschiebung wird durch die Reaktionsspezifität des Enzyms vorgegeben (32).
- 3) Im dritten Schritt der Reaktion kommt es zur Sauerstoffinsertion. Dabei wird atmosphärischer Sauerstoff an das Fettsäureradikal gebunden und es entsteht ein sauerstoffzentriertes Peroxyradikal. Diese Teilreaktion verläuft ebenfalls positions- und stereospezifisch in Abhängigkeit von der Reaktionsspezifität des Enzyms.
- 4) Im vierten und letzten Schritt, der Radikalreduktion, wird das Fettsäureperoxyradikal zum Peroxyanion reduziert. Das dazu benötigte Elektron stammt vom zweiwertigen Nichthämeisen, das somit wieder in seine katalytisch aktive dreiwertige Form übergeht. Die entstandene Hydroperoxyfettsäure wird anschließend protoniert und dissoziiert vom aktiven Zentrum des Enzyms ab.

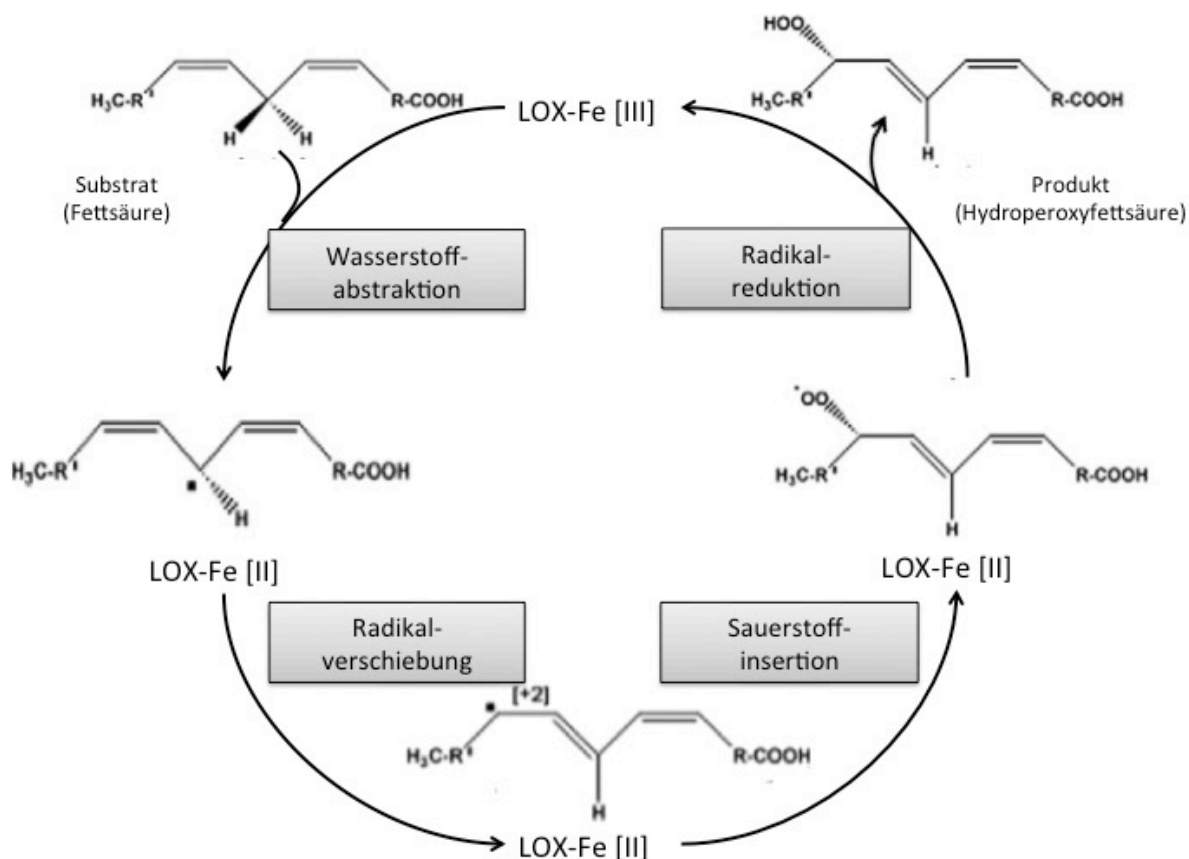


Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen (modifiziert nach Ivanov et al. (2010)): Die vier Elementarreaktionen sind durch die grau hinterlegten Kästen definiert und im Text näher beschrieben.

1.4 Struktur der Lipoxygenasen

Die meisten bisher strukturell aufgeklärten Lipoxygenasen besitzen zwei Domänen, von denen die eine katalytische, die andere hingegen regulatorische Funktionen erfüllt. Bei niederen Organismen ist diese Aufteilung in zwei Domänen teilweise nicht vorhanden (33) und bei einigen niederen eukaryotischen Organismen kommen Lipoxygenasen auch als Fusionsproteine vor, bei denen die katalytische LOX-Domäne mit anderen Proteindomänen fusioniert ist, die unterschiedliche katalytische Aktivitäten aufweisen (34-36).

Die kleinere N-Terminale Domäne, die vorrangig aus parallel bzw. anti-parallel angeordneten beta-Faltblättern besteht (37), hat regulatorische Bedeutung und ist in die Membranbindung der Enzyme involviert. Die das katalytische Nichthämeisen enthaltende C-terminale Domäne besteht dagegen hauptsächlich aus alpha-Helices (siehe Abb. 2).

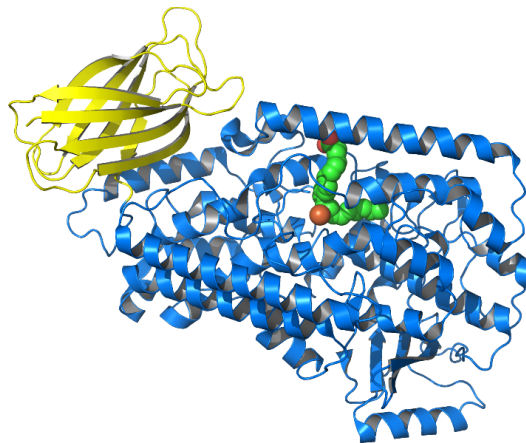


Abb. 2: Kristallstruktur der ALOX15 des Kaninchens. Die beta-Faltblätter der regulatorischen Domäne sind gelb dargestellt. In blau sind die alpha-Helices der katalytischen Domäne eingefärbt. Die orangefarbene Kugel repräsentiert das Nichthämeisen. Am aktiven Zentrum findet sich das in grün eingefärbte Substrat Arachidonsäure. Die Proteinstruktur wurde zur Verfügung gestellt von der AG Kühn.

Für die ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere dient das Triadenkonzept als Erklärungsansatz ihrer Reaktionsspezifität. Es beruht zum einen darauf, dass Lipoxygenasen eine Substratbindungstasche besitzen, in der sich das katalytisch aktive Nichthämeisen befindet und zum anderen, dass die PUFAs mit ihrem Methylenende voran in die Substratbindungstasche eintreten. Am Boden der Substratbindungstasche befinden sich drei Aminosäuren, die für die Reaktionsspezifität bedeutsam sind. Diese sind bei der Kaninchen-ALOX15 das Phe353, das Ile418 und das Ile593. Auf Basis von Mutageneseexperimenten wurden für diese und andere ALOX-Orthologen drei für die Positionsspezifität wichtige Regionen in der Primärstruktur der Enzyme beschrieben:

- i) Die Region um Ile418 und Met 419 (Sloane Determinante [SL]);
- ii) Die Region um Phe353 (Borngräber 1 Determinante [BGI]);
- iii) Die Region um Ile593 (Borngräber 2 Determinante [BGII]).

Die Seitenketten dieser Aminosäuren sind für die Tiefe der Substratbindungstasche verantwortlich und beeinflussen damit die Orientierung der PUFA am aktiven Zentrum. So können Fettsäuren tiefer in die Substratbindungstasche eindringen, wenn kleine Seitenketten an diesen Stellen vorhanden sind. Besitzen die Aminosäuren der Determinanten am Grunde der Substratbindungstasche sperrige Seitenketten, kann die Substratfettsäure weniger tief eintauchen. Nach den Vorstellungen des Triadenkonzeptes ist die Tiefe der Substratbindungstasche entscheidend dafür, an welchem Kohlenstoffatom der Arachidonsäure die Wasserstoffabstraktion stattfindet. Ist die Tasche tief, so erfolgt die Wasserstoffabstraktion eher am C10 (12-lipoxygenierend).

Größere Seitenketten verhindern ein zu tiefes Eindringen der Substrate, sodass Wasserstoff bevorzugt vom C13 (15-lipoxygenierend) abstrahiert wird (30). Angesichts dieser Befunde kann durch einfache Punktmutationen die Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen verändert werden. So führt die Mutation des Isoleucins an der 418. Stelle der 15-lipoxygenierenden ALOX15 des Menschen zu einem Alanin dazu, dass die Lipoxygenase einen vorrangig 12-lipoxygenierenden Charakter annimmt (27). Umgekehrt bewirkt eine Mutation des Phenylalanins an Stelle 353 zu einem Leucin bei der 12-lipoxygenierenden mouALOX15 eine Veränderung der Reaktionsspezifität, was durch den Wechsel des Hauptprodukts 12-H(p)ETE zu 15-H(p)ETE verdeutlicht wird. Für diese Veränderung ist lediglich eine Einführung des raumfordernden Phenylalanins an dieser Stelle nötig, die im 12-lipoxygenierenden Wildtypenzym von einem kleineren Leucin eingenommen wird. Dadurch wird das tiefere Eindringen der Substratfettsäure verhindert und die Wasserstoffabstraktion erfolgt am C13 (siehe Abb. 3).

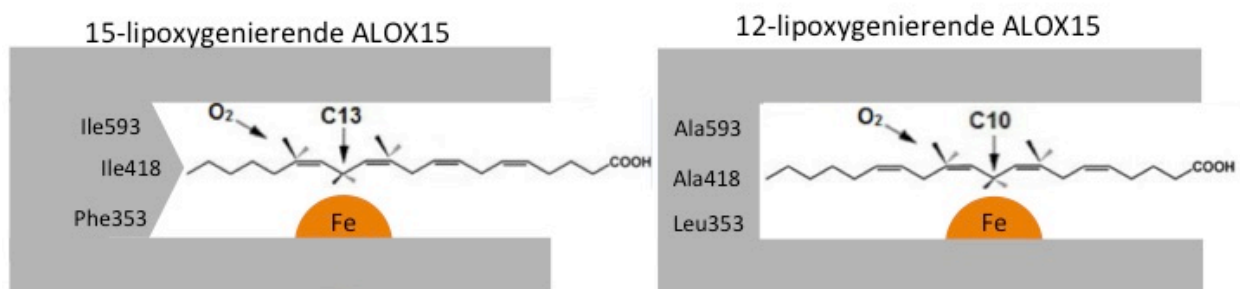


Abb. 3: Das Triadenkonzept der Positionsspezifität von ALOX15-Orthologen. Die Arachidonsäure taucht mit ihrem Methylende zuerst in die Substratbindungstasche ein. Die sperrigen Aminosäuren am Boden der Substratbindungstasche verhindern bei 15-lipoxygenierenden Orthologen das tiefere Eindringen des Substrates. Das 13. Kohlenstoffatom der Arachidonsäure kommt dadurch am Eisen im aktiven Zentrum zu liegen, was eine 15-Lipoxygenierung der Substratfettsäure bewirkt. Bei der durch die Anwesenheit kleinerer Aminosäuren vergrößerten Substratbindungstasche kommt es bei den 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen zum tieferen Eindringen der Arachidonsäure, was zur Wasserstoffabstraktion am C10 der Arachidonsäure und damit zur 12-Lipoxygenierung führt.

1.5 Biologische Rolle der Lipoxygenasen

Enzyme wie die ALOX5, COX1 und COX2 entfalten ihre biologische Funktion über die Synthese von bioaktiven Botenstoffen wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Lipoxinen. Dieses Wissen führte zu der Annahme, dass Ähnliches auch für die ALOX15 zutrifft. Obwohl eine Reihe von biologischen Aktivitäten für die Produkte der ALOX15 erforscht wurden (38), gibt es doch mindestens zwei weitere Möglichkeiten, wie die ALOX15-Orthologen ihre biologischen Funktionen ausüben können.

1. Als intrazelluläres lipidperoxidierendes Enzym ist die ALOX15 an der Regulation des zellulären Redoxgleichgewichtes beteiligt. Da die regulatorischen Aktivitäten verschiedener Transkriptionsfaktoren vom zellulären Redoxgleichgewicht abhängen, kann die ALOX15 als Regulator der Genexpression angesehen werden.
2. Durch ihre Fähigkeit PUFAs zu oxydieren, sogar wenn diese Bestandteil von Biomembranen und Lipoproteinen sind, scheint die ALOX15 am Umbau von Zellorganellen und am lokalen Lipoproteinstoffwechsel beteiligt zu sein.

Zur Rolle der ALOX15 bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen gibt es in der Literatur teils gegenläufige Befunde. In Prostatatumorzellen ist die Expression der ALOX15 um ein vielfaches höher als im angrenzenden gesunden Gewebe (39). Mit der Höhe der ALOX15-Expression steigt die Malignität der Erkrankung. Damit kann das *ALOX15*-Gen als Onkogen angesehen werden, welches die maligne Transformation unterstützt. Beim Kolonkarzinom fungiert das *ALOX15*-Gen jedoch eher als Tumorsuppressorgen. Die down-Regulation der ALOX15-Expression ist mit kolorektaler Tumorgenese verknüpft. Eine Erhöhung der ALOX15-Expression führt zur Hemmung der Expression antiapoptotischer Proteine und verhindert damit Zellproliferation und Tumorwachstum (40). Potenzielle therapeutische Einsatzmöglichkeiten von ALOX15-Inhibitoren umfassen Asthma bronchiale (41), koronare Herzerkrankung (42) und die Verringerung von Hirnschäden nach einem Schlaganfall (43) (siehe Abb. 4).

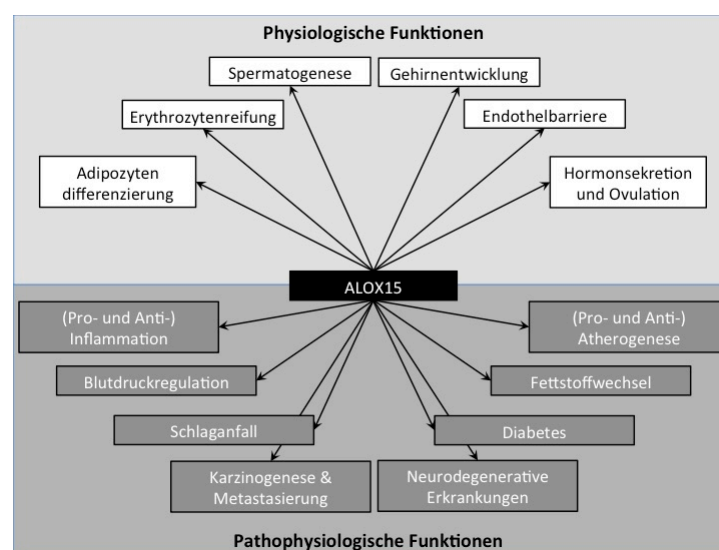


Abb. 4: Beteiligung der ALOX15 an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [modifiziert nach Ivanov et al., 2015 (44)]. Erläuterungen siehe Text.

1.6 Evolution der Lipoxygenasen

Seit ca. 25 Jahren wird das Dreidomänenmodell des irdischen Lebens angewandt, um die große Artenvielfalt, die in 4 Milliarden Jahren entstanden ist, zu systematisieren. Die drei Domänen, denen jedes irdische Lebewesen zugeteilt werden kann, sind Eubacteria, Archeabacteria und Eukaryonten. Dieses Klassifikationssystem beruht auf der Struktur der ribosomalen RNA. Die rRNA aller Eubacteria enthält beispielsweise als Erkennungsmerkmal eine Haarnadelstruktur zwischen den Positionen 500 und 545, was sie von den entsprechenden Molekülen aller Eukaryonten und Archaeae unterscheidet (45). Lipoxygenasen kommen in zwei (Eubacteria, Eukaryonten) der drei Domänen des Lebens vor. Obwohl LOX-ähnliche Sequenzen in den Genomen einiger Archeaspezies gefunden wurden, gibt es noch keine Berichte über funktionelle LOX-Isoformen in diesen Mikroorganismen (3). In Bakterien kommen Lipoxygenasen zwar vor (46), jedoch ist ihre Verbreitung eher gering (47). Auf Basis der derzeit verfügbaren Bakteriengenome ließ sich ableiten, dass Lipoxygenasen in weniger als 0,1 % aller Bakterienarten vorkommen (3). In hoch entwickelten Pflanzen und Tieren kommen Lipoxygenasen weit häufiger vor und die meisten Säugetierspezies exprimieren sogar mehrere LOX-Isoformen (47).

In Säugetieren können zwei Subtypen der ALOX15-Orthologen unterschieden werden. Phylogenetisch ältere, das heißt weniger hoch entwickelte Säugetierspezies, wie Mäuse (12), Ratten (48), Schweine (49) und Kühe (50) exprimieren 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Auch niedere Primaten wie Rhesusaffen (Makake) und Paviane verfügen über 12-lipoxygenierende ALOX15-Enzyme (51). Auf der anderen Seite kommen 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe bei höheren Primaten wie dem Orang-Utan (52), dem Gorilla (unpubliziert), dem Schimpansen (51), dem Bonobo (51) und dem Menschen (27) vor. Auch ausgestorbene Menschenarten, wie *H. neandertalensis* und *H. denisovan* (53) exprimieren 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe.

Tab. 1 zeigt die Determinanten des Triadenkonzeptes (Sloane Determinante [SL]), (Borngräber 1 Determinante [BGI]), (Borngräber 2 Determinante [BGII]) der ALOX15-Orthologen ausgewählter Säugetierspezies. Außerdem ist die dadurch zu erwartende und die experimentell bestätigte Positionsspezifität der Enzyme angegeben.

Tab. 1: Determinanten des Triadenkonzepts der ALOX15-Orthologen von Säugetieren. Die Informationen zu den Aminosäuren der Sequenzdeterminanten wurden Datenbanken entnommen. Es sind sowohl anhand der Aminosäuresequenzen zu erwartende als auch die experimentell festgestellten Reaktionsspezifitäten angegeben. Bisher noch nicht experimentell ermittelte bzw. nicht vorhersagbare Spezifitäten sind als n.a. gekennzeichnet. Modifiziert nach (51).

| Evolutionstufe | Spezies | BG1 | SL | BG2 | Zu erwartende Spezifität | Ermittelte Spezifität |
|----------------|--------------------------------|-----|----|---------|--------------------------|-----------------------|
| Primaten | H. Sapiens | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | H. neandertalensis | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | H. denisovan | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | Bonobo | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | Schimpanse | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | Gorilla | F | IM | IT | 15-HETE | n.a. |
| | Orang-Utan | F | IM | IT | 15-HETE | 15-HETE |
| | Gibbon | F | IM | IV | n.a. | 12/15-HETE |
| | Makake | F | VV | IT | 12-HETE | 12-HETE |
| | Grüne Meerkatze | F | VV | MT | 12-HETE | n.a. |
| | Drill | F | VV | MT | 12-HETE | n.a. |
| | Stummelaffe | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Rußmangabe | F | VV | MT | 12-HETE | n.a. |
| | Goldstumpfnase | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Pavian | F | VV | MT | 12-HETE | 12-HETE |
| | Weißbüschelaffe | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Totenkopffaffe | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Sifaka | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Nachtaffe | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Koboldmaki | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| Galago | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. | |
| Höhere Säuger | Eisbär | F | VV | IV | 12-HETE | n.a. |
| | Panda | F | VV | IV | 12-HETE | n.a. |
| | Walross | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Hund | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Katze | F | AV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Iltis | F | VV | IV | 12-HETE | n.a. |
| | Rind | F | VV | IT | 12-HETE | 12-HETE |
| | Wasserbüffel | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Bison | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Tibetische Antilope | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Schaf | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Mufflon | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Wildziege | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Schwertwal | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Pottwal | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Flussdelfin | F | VV | II | 12-HETE | n.a. |
| | Zwergwal | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Trampeltier | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Dromedar | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Schwein | F | VV | IT | 12-HETE | 12-HETE |
| | Rhinozeros | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Pferd | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Graumull | F | VV | IV | 12-HETE | n.a. |
| | Hamster | F | VV | FT | 12-HETE | n.a. |
| | Ochotona | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Eichhörnchen | F | VV | II | 12-HETE | n.a. |
| | Kaninchen (15-lipoxygenierend) | F | IM | IV | 15-HETE | 15-HETE |
| | Kaninchen (12-lipoxygenierend) | L | IM | IV | 12-HETE | 12-HETE |
| | Meerschweinchen | F | VV | II | 12-HETE | n.a. |
| | Maus | L | VM | VV | 12-HETE | 12-HETE |
| | Ratte | L | AM | VV | 12-HETE | 12-HETE |
| | Chinchilla | F | VV | FI | 12-HETE | n.a. |
| | Sternmull | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Igel | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Flughund | F | VV | IV | 12-HETE | n.a. |
| | Fledermaus | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Spitzmaus | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Galeopterus | F | VV | II | 12-HETE | n.a. |
| | Elefant | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| | Goldmull | F | VV | IT | 12-HETE | n.a. |
| Niedere Säuger | Wallaby | F | VV | IK | 12-HETE | n.a. |
| | Opossum | F | VV | LT | 12-HETE | 12-HETE |

Eine Erklärung für die variable Positionsspezifität der ALOX15 gibt das Triadenmodell, welches bereits in Kapitel 1.4 erläutert wurde. Das ALOX15-Ortholog des Gibbons, das evolutionär gesehen zwischen dem des Rhesusaffen (Makaken) und des Orang-Utans steht (siehe Abb. 6), stellt eine Übergansform von 12- zu 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen dar. Der Gibbon exprimiert ein ALOX15-Ortholog, das zu fast gleichen Teilen 12-H(p)ETE und 15-H(p)ETE produziert und daher eine ausgeprägte duale Positionsspezifität besitzt (51). Abb. 5 zeigt die Reaktionsspezifität der rekombinanten ALOX15-Orthologen von vier unterschiedlichen Primatenspezies. Dabei zeigte sich eine höhere Bildung von 12-HETE als 15-HETE beim phylogenetisch älteren Pavian. Die höheren Primaten *H. sapiens* (Mensch) und Schimpanse bilden hingegen 15-HETE als Hauptprodukt und besitzen daher eine 15-lipoxygenierende ALOX15. Die ALOX15 des Gibbons bildet unter unseren experimentellen Bedingungen ungefähr gleiche Mengen an 15- und 12-HETE und nimmt damit eine Zwischenstellung ein.

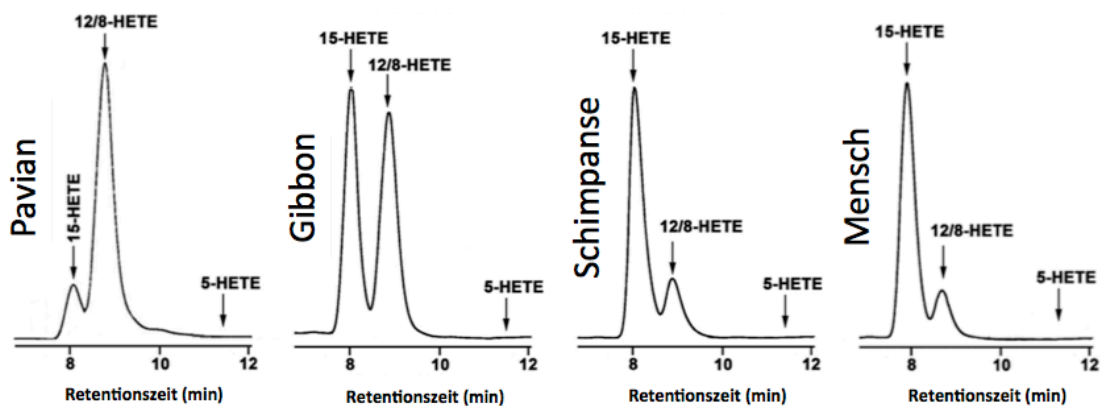


Abb. 5: Darstellung der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen der späten Primatenevolution. Modifiziert aus (51); Erläuterungen siehe Text.

Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass sich im Verlaufe der Säugetierevolution die Positionsspezifität der Lipoxygenase von einem 12-lipoxygenierenden zu einem 15-lipoxygenierenden Enzym gewandelt hat. Der Übergang von *Cercopithecoidea* (Meerkatzenähnliche) zu den *Hominoidea* (Menschenähnliche) scheint einen für die ALOX15 kritischen Entwicklungsschritt darzustellen. Die treibende Kraft hinter dieser evolutionären Drift soll in dieser Arbeit untersucht werden. Die einzige bisher bekannte Ausnahme von diesem Konzept der systematischen Evolution der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen stellt das Kaninchen dar. Obwohl diese Spezies nicht zu den Primaten gehört, deutet die Sequenz des Kaninchengenoms

darauf hin, dass das ALOX15-Ortholog des Kaninchens ein 15-lipoxygenierendes Enzym ist, und diese Daten konnten durch *in vitro* Aktivitätsassays bestätigt werden. Einschränkend muss hier allerdings gesagt werden, dass zwei unterschiedliche Isoformen der rabALOX15 funktionell nachgewiesen wurden (54). Die rabALOX15 ist entsprechend der Sequenz ihres Gens als 15-lipoxygenierendes Enzym einzustufen und Funktionsanalysen zur Reaktionsspezifität des Enzyms, das aus Kaninchenretikulozyten präpariert wurde, bestätigen diese Schlussfolgerung (55). Allerdings kommt dieses Protein in peripheren Monozyten des Kaninchens als 12-lipoxygenierendes Enzym vor, bei dem das große Phe353 durch ein kleineres Leu ersetzt ist (56). Die Ursachen für die gewebsabhängige Veränderung der Reaktionsspezifität und der Mechanismus der posttranskriptionellen Recodierungsreaktion sind derzeit noch unklar.

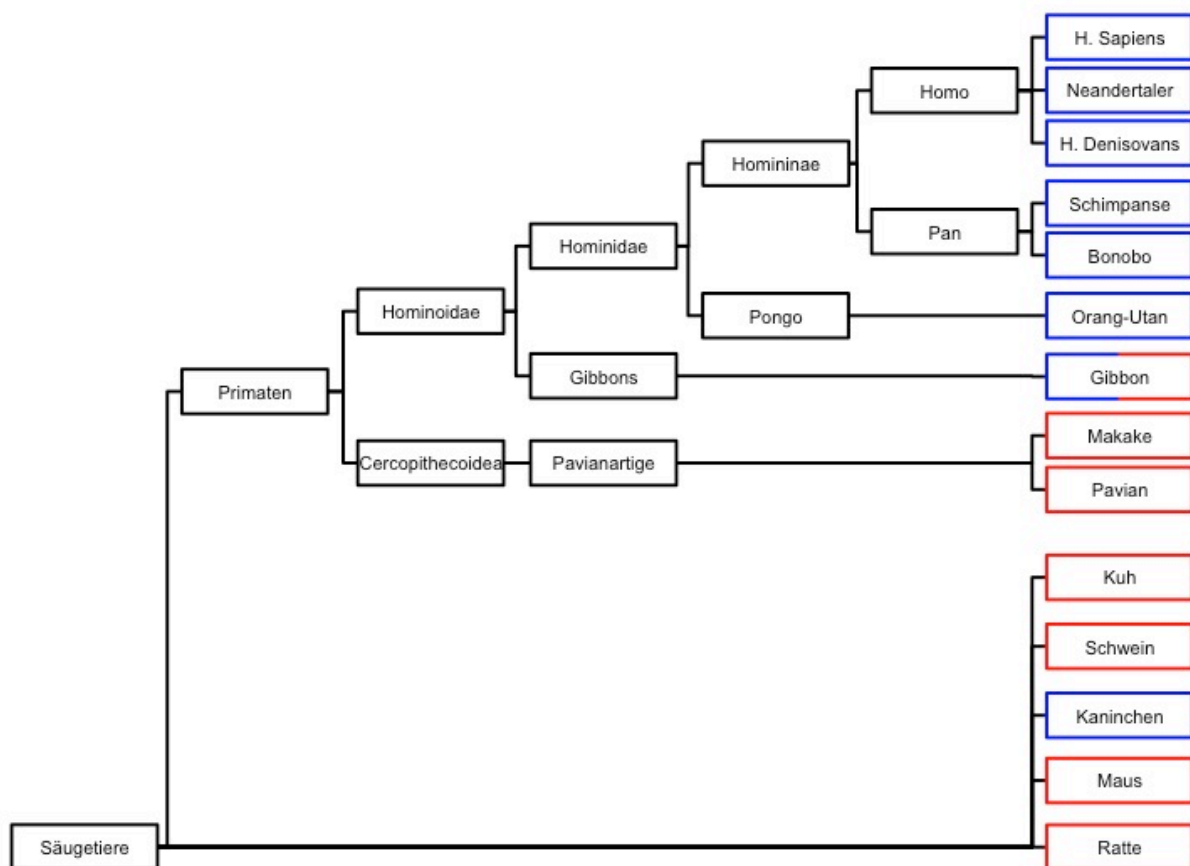


Abb. 6: Phylogenetische Systematik der Säugetierspezies mit bekannten ALOX15 Reaktionsspezifitäten. In dieser Abbildung sind die Verwandtschaftsverhältnisse der Primaten und anderer Säugetiere dargestellt. Farblich hervorgehoben sind hier die Reaktionsspezifitäten der ALOX15. Blau umrahmte Spezies bilden 15-lipoxygenierende, rot umrahmte Spezies bilden 12-lipoxygenierende ALOX15. Der zweifarbige Rahmen um den Gibbon zeigt dessen duale Reaktionsspezifität mit gleichen Produktmengen an 12- und 15-H(p)ETE an.

1.7 Substratspezifität der Lipoxygenasen

Die meisten Lipoxygenaseisoformen bevorzugen freie PUFAs als Substrat, was auch für die ALOX15-Orthologen der Fall ist. Unter den natürlich vorkommenden Polyenfettsäuren werden die in tierischen Geweben dominanten PUFAs Linolsäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure als Substrat verwendet. Monoenfettsäuren (einfach ungesättigte), wie Ölsäure und gesättigte Fettsäuren ähnlicher Länge (z.B. Stearinsäure, Arachinsäure), werden von der ALOX15 nicht oxygeniert (44). Andererseits wirken diese Fettsäuren als schwache kompetitive Inhibitoren, da sie einen ähnlichen Aufbau wie die eigentlichen Substrate haben und damit in der Substratbindungstasche binden können. Polyenfettsäuren, die eine hydrophile Gruppe nahe ihres Methylendes tragen, werden von der ALOX15 des Kaninchens weniger gut oxygeniert (57). Detaillierte Untersuchungen zur Substratspezifität der ALOX15 haben ergeben, dass Substratfettsäuren in die hydrophobe Tasche des Enzyms mit ihrem Methylende voran hineingleiten, sodass das zu abstrahierende Wasserstoffatom nahe des katalytischen Nichthämeisens zu liegen kommt (32). Linolsäure und Arachidonsäure besitzen dabei die gleiche allgemeine Orientierung am aktiven Zentrum. Die Arachidonsäure ist jedoch fester am Protein gebunden und hat damit eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit. Im Gegensatz dazu fluktuiert der Schwanz der Linolsäure am aktiven Zentrum und nimmt verschiedene energetisch ähnliche Konformationen ein (58).

Die ALOX15 ist außerdem in der Lage, bereits oxygenierte Fettsäuren, wie z.B. 5-H(p)ETE oder 15-H(p)ETE, sowie zweifach oxygenierte Fettsäuren, wie z.B. 5,15-DiHETE oder 5,6-DiHETE, zu oxygenieren. Diese Reaktionen stellen einen wichtigen Schritt in der Synthese von Lipoxinen dar (siehe Kapitel 1.9).

Die aufgereinigte native *rab*ALOX15 oxygeniert Phospholipide und Cholesterolester, die PUFAs enthalten. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass komplette Phospholipide und Cholesterolester zu groß sind, um in die Substratbindungstasche hinein zu passen. Diese Überlegungen führten zu der Annahme, dass nur der Polyenfettsäureschwanz komplexer Substrate in der Substratbindungstasche gebunden wird. Der Rest des Substratmoleküls verbleibt jedoch an der Proteinoberfläche.

Die ALOX15-Orthologen des Kaninchens (59), des Schweins (60) und des Menschen (61) sind in der Lage, komplexe Lipid-Protein Aggregate, wie Biomembranen und Lipoproteine, zu oxygenieren. Die durch die ALOX15 katalysierten Oxygenierung

von Membranlipiden spielt beim reifungsabhängigen Abbau von Mitochondrien während der Reifung von Retikulozyten zu mitochondrienlosen Erythrozyten eine wichtige Rolle. Diese und weitere experimentelle Daten zeigen, dass die katalytische Aktivität der ALOX15 gegenüber Biomembranen einen Mechanismus darstellt, der beim gezielten reifungsbedingten Abbau von Zellorganellen und bei der Restrukturierung von Biomembranen bedeutsam zu sein scheint (62).

Die oxidative Hypothese der Atherosklerose (63) sagt aus, dass eine oxidative Modifizierung von Lipoproteinen zur Pathogenese dieser Krankheit beiträgt. Nach diesem Szenario wird das low density lipoprotein (LDL) durch enzymatische und nicht enzymatische Reaktionen zu einer atherogenen Spezies oxidiert, die unkontrolliert von Makrophagen via Scavengerrezeptoren aufgenommen wird. Da die rezeptorvermittelte Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes nicht durch Rückkopplungsmechanismen reguliert wird, kommt es zur ungebremsten Aufnahme von oxidiertem LDL durch Monozyten/Makrophagen, die sich dadurch zu lipidbeladenen Schaumzellen entwickeln. Sammeln sich diese Schaumzellen im subendothelialen Raum der Arterien an, bilden sich fatty streaks, die als frühe Atheroskleroseläsionen angesehen werden (64).

Unser bisheriges Wissen zur Substratspezifität von Lipoxygenasen belegt, dass ALOX15-Orthologe viele verschiedene Lipide als Substrate akzeptieren. In dieser Arbeit soll u.a. der Frage nachgegangen werden, ob 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe andere Substrate bevorzugen als 15-lipoxygenierende Enzyme und ob der evolutionäre Switch von der 12- zur 15-Lipoxygenierung dabei einen evolutionären Vorteil bietet. Ein solcher Vorteil wäre gegeben, wenn die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen verglichen mit den 12-lipoxygenierenden Enzymen eine höhere Membranoxygenaseaktivität aufweisen sollten.

1.8 Membranbindung der Lipoxygenasen

Unter den Lipoxygenasen der Säugetiere sticht die ALOX15 durch ihre Fähigkeit hervor, komplexe Lipid-Protein-Verbände oxygenieren zu können. Dazu ist eine Bindung des Enzyms an die Biomembranen bzw. Lipoproteine nötig. *In vitro* Experimente haben ergeben, dass die ALOX15 des Kaninchens an verschiedene Arten von Biomembranen, wie Plasmamembranen, Membranen von Mitochondrien und Membranen des endoplasmatischen Retikulums binden kann (59).

Immunhistochemische Färbung erbrachten bisher keinerlei Beweis für eine Präferenz der Bindung an Membranen einer bestimmten Art. Die Membranbindung der ALOX15 erfolgt kalziumabhängig und verstärkt die spezifische Fettsäureoxygenaseaktivität des Enzyms, ohne seine Reaktionsspezifität zu beeinflussen (65). Obwohl die derzeit vorliegenden Erkenntnisse zum Mechanismus der Membranbindungsaktivität von Lipoxygenasen im Allgemeinen nur wenig untersucht wurden, scheinen elektrostatische Wechselwirkungen des Enzyms mit den polaren Kopfgruppen der Membranphospholipide und hydrophobe Wechselwirkungen von oberflächenexponierten apolaren Aminosäuren mit den Fettsäureresten der Lipiddoppelschicht für die Membranbindung bedeutsam zu sein. *In vitro* Membranbindungsassays und ortsgerichtete Mutagenese von oberflächlich gelegenen Aminosäuren, die sich sowohl in der N-terminalen beta-Barrel-Domäne als auch in der katalytischen Domäne befinden, zeigen die Bedeutung dieser Aminosäurereste für die reversible Membranbindung der Enzyme. Werden die apolaren Oberflächenaminosäuren durch negativ geladene Reste ersetzt, so ist die Membranbindungskapazität stark eingeschränkt (66).

Kalzium ist für eine effiziente Membranbindung von ALOX15-Orthologen essenziell, obwohl die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nicht wirklich verstanden sind. Da das Enzym im Gegensatz zur ALOX5 nicht über hochaffine Kalziumbindungsstellen verfügt, wurde postuliert, dass Kalzium die negativen Ladungen der Membranphospholipide neutralisiert und damit elektrostatische Abstoßungen zwischen den polaren Kopfgruppen der Membranlipide und negativ geladenen Aminosäuren auf der Enzymoberfläche verringert (66). Damit werden die hydrophoben Wechselwirkungen des Enzyms mit den Membranlipiden in Gegenwart von Kalzium weniger stark geschwächt.

Es wurde bisher nicht untersucht, ob die 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von weniger entwickelten Säugetieren andere Membranoxygenierungsaktivitäten aufweisen als die 15-lipoxygenierenden Enzyme höherer Primaten. Eine bessere Membranoxygenierungskapazität könnte jedoch einen evolutionären Vorteil bedeuten und den Wechsel von 12- zu 15-lipoxygenierenden Enzymen im Laufe der Evolution vorangetrieben haben. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Membranoxygenierungskapazitäten von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies miteinander verglichen.

1.9 Lipoxine

Die Ansicht, eine akute Entzündung sei ein schädlicher Prozess, welcher Schmerz, Schwellung und Funktionsverlust bedeutet und daher mit antiinflammatorischen Medikamenten schnellstmöglich beendet werden sollte, ist in der Bevölkerung weit verbreitet. Tatsächlich handelt es sich bei einer Entzündung jedoch um einen Prozess, der dem Wohl des Organismus dient, obwohl er zu temporären Funktionseinschränkungen führt. Im Verlaufe einer akuten Entzündungsreaktion kommt es zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität, zur Extravasation von Flüssigkeit und damit zur Ödembildung sowie zur Einwanderung von Leukozyten in das entzündete Gewebe (67). Eine überschießende Entzündungsreaktion, wie sie zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen vorkommt, stellt jedoch ein Problem dar, das die aktive Bekämpfung der Entzündung erforderlich macht. Ob es sich bei der Entzündungsreaktion nun um einen schädlichen oder nützlichen Prozess handelt, hängt in erster Linie davon ab, wie effektiv und schnell die Entzündung wieder beendet wird, wenn der entzündungserregende Reiz nicht mehr vorhanden ist.

Die Beendigung der Entzündungsreaktion ist von einer Vielzahl spezifischer endogener Mediatoren abhängig, die u.a. aus PUFAs synthetisiert werden können. Zu diesen sogenannten specialized pro-resolving lipid mediators (SPM), gehören Lipoxine (LX), Resolvine (Rv), Protectine (PD) und Maresine (MaR). Sie alle werden über den LOX-Weg der Arachidonsäurekaskade aus den Vorläuferfettsäuren Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure gebildet. Beim Menschen exprimieren sowohl Gewebszellen als auch bewegliche Blutzellen die benötigten Enzyme zur SPM-Synthese (68). Neutrophile Granulozyten spielen eine herausragende Rolle bei der angeborenen Immunreaktion. Lipoxine helfen dabei, neutrophile Granulozyten vom Ort der Entzündung zu entfernen und damit die Entzündung zu beenden (69). Im Verlaufe einer akuten Entzündungsreaktion werden proinflammatorische Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten aber auch M1-polarisierte Makrophagen durch Apoptose inaktiviert. Apoptotische Entzündungszellen müssen nach Beendigung der Entzündungsreaktion aus dem Gewebe entfernt werden, um die Geweberestrukturierung nicht zu behindern. Als Teil des Heilungsprozesses signalisieren deshalb Lipoxine M2-polarisierten Makrophagen den Weg zu den Zellresten der untergegangenen Zellen, sodass diese dann phagozytiert werden können. Im zeitlichen Verlauf der Heilung einer akuten entzündlichen Reaktion kommt es zu einem Wechsel im Mediatormuster im entzündeten Gewebe. Proinflammatorische

Mediatoren wie TNF-alpha und/oder IL-1-beta werden durch antiinflammatorische proresolutorische Mediatoren wie Lipoxine und/oder Resolvine ersetzt. Dieser Wechsel im Mediatormuster leitet die Resolutionsphase der Entzündung ein. Da diese grundlegenden Prozesse bei allen Entzündungsarten die gleichen sind, haben die proresolutorischen Eicosanoide klinische Relevanz bei einer großen Anzahl renaler, respiratorischer, onkologischer und neurodegenerativer Erkrankungen (69).

Lipoxine wurden in den 1980er Jahren von Serhan et al. als erste Klasse antiinflammatorischer Eicosanoide entdeckt. Es gibt zwei verschiedene Gruppen von Lipoxinen [Lipoxin A (LxA₄), Lipoxin B (LxB₄)], die ähnliche biologische Wirkungen haben. Beide Mediatoren sind Trihydroxyeicosanoide, die sich hinsichtlich der Stellung ihrer OH-Gruppen und der Geometrie ihrer Doppelbindungen voneinander unterscheiden.

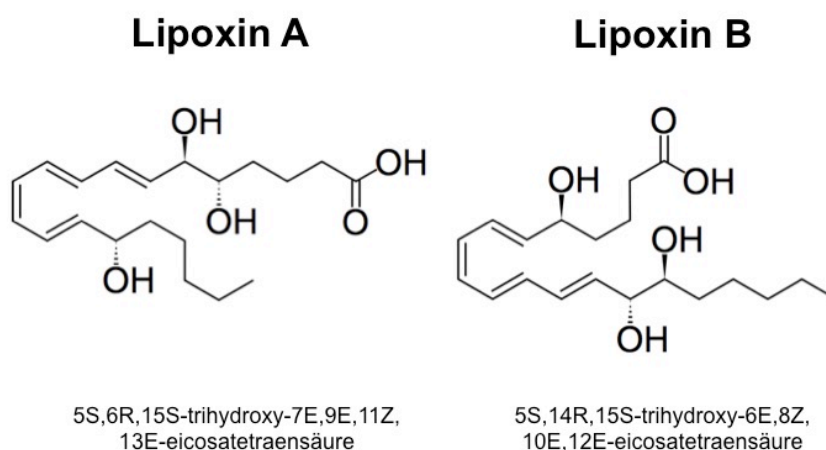


Abb. 7: Strukturformeln der beiden Lipoxinisomere LxA₄ und LxB₄.

So besitzt Lipoxin A je eine OH-Gruppe an den Kohlenstoffatomen 5, 6 und 15. Lipoxin B hingegen zeichnet sich durch OH-Gruppen an den C-Atomen 5, 14 und 15 aus. Die unterschiedliche Struktur des charakteristischen konjugierten Tetraensystems erklärt sich aus den unterschiedlichen Biosynthesemechanismen.

1.9.1 Lipoxinsynthese

Es gibt prinzipiell mehrere Synthesewege für Lipoxine, die jedoch alle mit der Oxygenierung des Ausgangssubstrates Arachidonsäure am C5 (5-Lipoxygenierung) oder C15 (15-Lipoxygenierung) beginnen (70). Für die Synthese ist die konsekutive

Wirkung verschiedener Lipoxygenasen notwendig, obwohl bisher nicht publizierte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe darauf hindeuten, dass auch einzelne ALOX-Isoformen zur Lipoxinsynthese fähig sind.

Ein möglicher Weg für die Lipoxinsynthese ist die sequenzielle Oxygenierung von Arachidonsäure durch ALOX5 und ALOX15 in Entzündungszellen. Dabei kommt es durch die ALOX5 zur Bildung von Leukotrien A₄, das durch Hydrolyse zu 5(S),6(R)-DiHETE umgewandelt wird. Dieses Zwischenprodukt kann durch Oxygenierung am C15 dann weiter zu LxA₄ (5(S),6(R),15(S)-TriHETE) umgewandelt werden, wobei diese 15-Lipoxygenierung sowohl von der ALOX15, der ALOX15B als auch von der ALOX12 katalysiert werden kann (71). Dass alle genannten Enzyme prinzipiell dazu fähig sind an der Lipoxinbiosynthese mitzuwirken, wurde bereits nachgewiesen. Unbeantwortet ist jedoch die Frage, welches der aufgeführten Enzyme unter identischen experimentellen Bedingungen die höchste Lipoxinsynthaseaktivität aufweist.

Einen alternativen Biosyntheseweg stellt die 15-Lipoxygenierung der Arachidonsäure zu 15-H(p)ETE und eine anschließende 5-Lipoxygenierung durch die ALOX5 von neutrophilen Granulozyten dar. Dieser Weg könnte die intermediäre Bildung eines 14,15-Epoxids enthalten oder die Bildung von 14,15-DiH(p)ETE als Doppeloxxygenierungsprodukt. Alternativ könnte auch ein 5,6-Epoxy,15-hydroxy Intermediat entstehen. Frühere Untersuchungen haben sogar gezeigt, dass die gereinigte rabALOX15 15S-HETE Methylester durch Doppeloxxygenierung zu LxB₄ Methylestern umwandeln kann, ohne dass dabei die ALOX5 benötigt wird (72). Diese experimentellen Befunde und theoretischen Überlegungen deuten darauf hin, dass die Lipoxine LxA₄ und LxB₄ prinzipiell über mehrere biosynthetische Wege gebildet werden können an denen verschiedene LOX-Isoformen beteiligt sind. Prinzipiell können nach einer konsekutiven Oxygenierung des C5 und des C15 der Arachidonsäure durch die ALOX5 und die ALOX15 (bzw. ALOX15B) alle LOXs, die zur Wasserstoffabstraktion am C10 fähig sind, Lipoxinisomere bilden. Als weiteres mechanistisches Szenario der Lipoxinbiosynthese besteht die Möglichkeit, dass Arachidonsäure durch die azetylierte COX2 zu 15R-HETE oxygeniert wird. Dieses Substrat kann dann durch die ALOX5 über das Zwischenprodukt 15R-hydroxy-LTA₄ zu 5S,6R/S,15R-Trihydroxyarachidonsäure (also LxA₄) umgewandelt werden. Dieses mechanistische Szenario kann die proresolutorische Wirkung einer Aspirinbehandlung erklären.

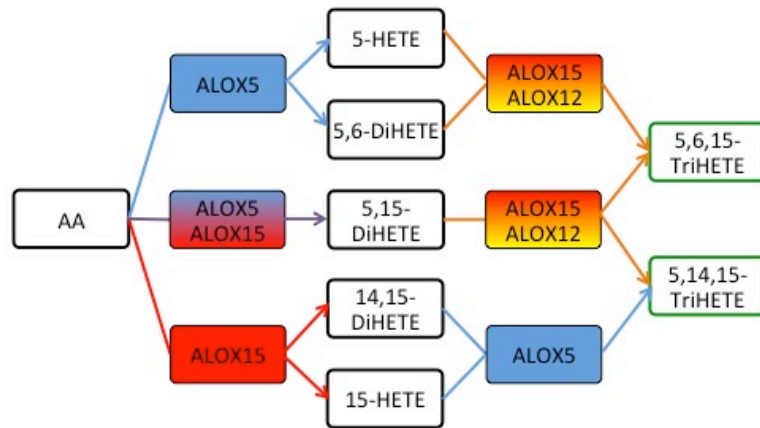


Abb. 8: Reaktionsweg der Lipoxinsynthese. Farblich gekennzeichnet sind die verschiedenen Lipoxygenasen, Kästen mit schwarzen Umrandungen stellen Substrate bzw. Zwischenprodukte dar. Die Produkte 5,6,15-TriHETE (Lipoxin A) und 5,14,15-TriHETE (Lipoxin B) sind durch grüne Umrandungen kenntlich gemacht. Die Rolle der ALOX15 kann prinzipiell durch die azetylierte COX2 übernommen werden.

Bis zur Aufnahme dieser Arbeit war nicht bekannt, ob 12-lipoxygenierende oder 15-lipoxygenierende Orthologe der ALOX15 besser zur Lipoxinsynthese geeignet sind. Sollte sich bei den geplanten Untersuchungen herausstellen, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe eine höhere Lipoxinsynthaseaktivität mit verschiedenen Substraten haben, könnten die erhaltenen Daten dahingehend interpretiert werden, dass die Evolution der ALOX15 von 12- zu 15-lipoxygenierenden Enzymen einen evolutionären Vorteil mit sich gebracht hätte. Damit wäre eine mögliche evolutionäre Triebkraft für die Veränderung der Reaktionsspezifität dieser Enzyme im Laufe der späteren Primatenentwicklung identifiziert.

1.10 Hemmstoffe der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen spielen bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten (z.B. Asthma bronchiale) eine wichtige Rolle. Glücklicherweise gibt es z.B. für das Asthma bronchiale bereits ein breites Spektrum an Therapeutika. Dennoch ist eine Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten wünschenswert, da die bereits erhältlichen Medikamente bei einigen Patienten nicht wirken oder starke Nebenwirkungen hervorrufen. So werden Leukotriensynthesehemmer (Zileuton, Hemmstoff der ALOX5) und Leukotrienrezeptorantagonisten (Montelukast, Antagonist des cysLTR1) als Medikamente für das Asthma bronchiale eingesetzt. Daneben stellen Isoform-spezifische Hemmstoffe für ausgewählte Lipoxygenasen wichtige Forschungswerkzeuge dar, mit denen die pathophysiologische Bedeutung

verschiedener LOX-Isoformen in zellulären Modellsystemen und im Ganztiermodell untersucht werden kann. In der Literatur sind mehrere LOX-Hemmer beschrieben worden (z.B. Nordihydroguaiaretsäure, Eicosatetraensäure, Salicylhydroxamsäure, 4-Nitrocatechol), deren Wirkmechanismen in der Vergangenheit an verschiedenen LOX-Isoformen untersucht wurden. Daneben existieren eine Reihe von Substanzen, die zwar als LOX-Hemmstoffe identifiziert wurden, deren Wirkmechanismen bisher jedoch noch nicht detailliert untersucht werden konnte.

Vor allem die Isoformspezifität der Hemmstoffe wurde in der Vergangenheit für die meisten Wirkstoffe nur unzureichend geprüft. Da die meisten LOX-Isoformen unterschiedliche biologische Aktivitäten entfalten, ist es von pharmakologischem Interesse herauszufinden, ob ein bestimmter Wirkstoff z.B. die ALOX15 hemmt, die ALOX5 bzw. ALOX12 aber nicht beeinflusst.

Darüber hinaus ist die Orthologspezifität von LOX-Hemmstoffen von großer Bedeutung. Dabei kommt es z.B. darauf an zu überprüfen, ob ein Hemmstoff der humanen ALOX15 auch das entsprechenden Maus- bzw. Rattenenzym hemmt. Obwohl die ALOX15-Orthologen dieser Spezies eine große Ähnlichkeit aufweisen, sind ihre Reaktionsspezifitäten unterschiedlich und dieser Unterschied könnte sich auch auf das Hemmstoffverhalten der Enzymorthologen auswirken. In der Vergangenheit wurden mehrfach Hemmstoffe der humALOX15 unkritisch als Werkzeuge in murinen Systemen eingesetzt, obwohl experimentelle Daten darauf hindeuteten, dass z.B. die ratALOX15 durch diese Substanzen nicht gehemmt wurde. Das Hauptproblem bei der Verwendung von LOX-Hemmstoffen als mechanistische Werkzeuge besteht u.a. darin, dass für die meisten Wirkstoffe weder die Isoform- noch die Orthologspezifität in site-by-site Experimenten untersucht worden sind. Um die Orthologspezifität existierender LOX-Hemmstoffe zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit die Wirkung bekannter Hemmstoffe auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität verschiedener ALOX15-Orthologen getestet.

1.10.1 Nordihydroguaiaretsäure (NDGA)

NDGA ist ein natürliches Produkt, das aus dem Kresotbusch *Larrea tridentata* gewonnen werden kann (3). Es wurde als Hemmstoff der Sojabohnen-LOX1 identifiziert (73), hemmt aber auch die humane ALOX5 und die humane ALOX15 (74). Whitman et al. bestimmten für die humane ALOX15 eine IC_{50} von 0,11 μ M, für die humALOX12 eine IC_{50} von 5,1 μ M. Aufgrund der 50-fach geringeren IC_{50} für die ALOX15 wurde

geschlussfolgert, dass NDGA ein spezifischer ALOX15-Hemmstoff ist. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Messsysteme für beide Enzyme nicht identisch waren, sodass die IC₅₀-Werte nicht direkt verglichen werden können. Die Fähigkeit zur ALOX-Hemmung kommt durch die Eigenschaft des NDGA zustande, das dreiwertige Nichthämeisen katalytisch aktiver LOX-Isoformen reduzieren zu können und die Enzyme damit in die katalytisch inaktive Form zu überführen (Redoxhemmstoff) (75).

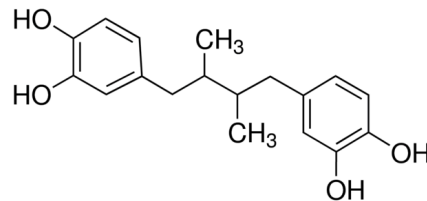


Abb. 9: Strukturformel von NDGA

1.10.2 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA)

Acetylenfettsäuren wie die 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA) sind seit langem als Lipoxygenasehemmer bekannt. ETYA wirkt durch Strukturanalogie zur Arachidonsäure als Suizidsubstrat und hemmt sowohl Cyclooxygenasen als auch Lipoxygenasen (76). Es wird von diesen Enzymen am aktiven Zentrum gebunden und zu reaktiven Zwischenprodukten oxygeniert, die ihrerseits in der Lage sind, die Enzyme chemisch zu modifizieren. Für die native ALOX12 und die COX1 des Menschen sind IC₅₀-Werte von 0,03 µM und 3,2 µM berechnet worden (77). Dazu wurde eine angereicherte Thrombozytensuspension aus menschlichem Blut verwendet und mit Arachidonsäure über 5 Minuten inkubiert. Prinzipiell sollte ETYA alle ALOX-Isoformen hemmen, die ungeachtet ihrer Positionsspezifität dazu fähig sind, Arachidonsäure zu oxygenieren. Praktisch wurden aber quantitative Unterschiede bei der Hemmung verschiedener ALOX-Isoformen festgestellt (78). Allerdings sind noch keine Studien vorgenommen worden, in denen die Hemmung von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies durch ETYA untersucht wurde.

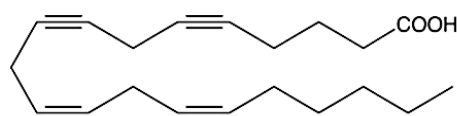


Abb. 10: Strukturformel von ETYA

1.10.3 Baicalein

Baicalein (5,6,7-Trihydroxyflavon) ist ein Flavon, das ursprünglich aus den Wurzeln der *Scutellaria baicalensis* isoliert wurde. Seine Hemmfähigkeit gegenüber Lipoxygenasen wurde bereits 1982 von Sekiya und Okuda belegt (79). Die Wirkung des Baicaleins auf die ALOX15 beruht auf einer Reduktion des Nichthämeisens am aktiven Zentrum. Deschamps et al. ermittelten eine IC_{50} für Baicalein gegenüber der humanen ALOX15 von $1,6 \mu\text{M}$ (80). Dazu nutzten sie aufgereinigte rekombinante humane ALOX15. Schewe et al. maßen eine IC_{50} von Baicalein gegenüber der nativen gereinigten Kaninchen-ALOX15 von $1,0 \mu\text{M}$ (81). Die Selektivität von Baicalein auf verschiedene humane Lipoxygenaseisoformen wurde bereits untersucht (80). Dabei ergab sich eine höhere mittlere inhibitorische Konstante für die humane ALOX15 ($1,6 \mu\text{M}$) als für die humane Plättchen-ALOX ($0,5 \mu\text{M}$). Für diese Versuche wurden die humane ALOX12 und ALOX15 rekombinant als N-terminale his-tag Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Es liegen keine Daten zur Hemmung von ALOX-Orthologen anderer Säugetierspezies vor.

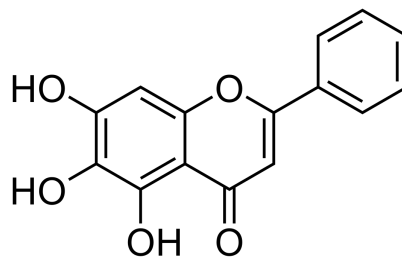


Abb. 11: Strukturformel von Baicalein

1.10.4 Epigallocatechingallat (EGCG)

Epigallocatechingallat ist ein Polyphenol, welches in großen Mengen in grünem Tee zu finden ist. Die Hypothese, dass Polyphenole das Risiko für koronare Herzerkrankungen, Schlaganfall, entzündlichen Krankheiten und Krebs senken, ist seit langem bekannt (82). Dass es sich beim EGCG jedoch um einen Hemmstoff der ALOX15 handelt, wurde erst 2001 von Schewe et al. herausgefunden (81). Die Hemmung beruht bei diesem Flavonol auf einer hochaffinen Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms.

Die mittleren inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}) von EGCG wurden für die ALOX15 des Kaninchens ($4 \mu\text{M}$) und die Sojabohnen-LOX1 bestimmt (1 mM). Dazu wurde natives aufgereinigtes Enzym verwendet. Für ALOX15-Orthologe anderer Säugetiere liegen bislang noch keine Daten vor.

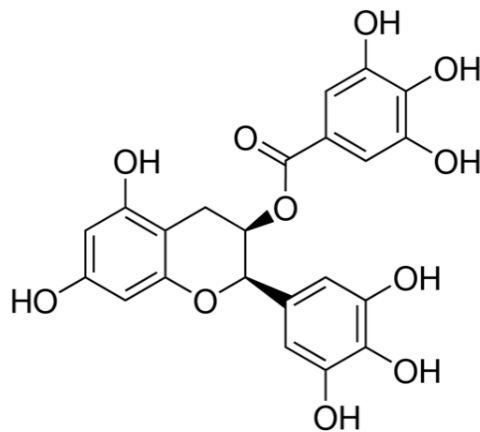


Abb. 12: Strukturformel von Epigallocatechingallat

1.10.5 4-Nitrocatechol (4-NC)

4-Nitrocatechol ist ein bekannter Hemmstoff der Sojabohnen-LOX1 (83). Es handelt sich um einen nicht kompetitiven Inhibitor mit einer mittleren inhibitorischen Konstante von $16,3 \mu\text{M}$. Obwohl der Mechanismus der Enzymhemmung noch nicht detailliert untersucht worden ist, können aus der Katecholstruktur zwei potentielle Mechanismen abgeleitet werden: i) Katechole sind redoxaktiv und können das Nichtthämeisen von LOXs zur katalytisch inaktiven Fe^{2+} -Form reduzieren (Redoxhemmstoff). ii) Gleichzeitig wirken Katechole aber auch als Eisenkomplexbildner. Sollte 4-NC an das aktive Zentrum von Lipoxygenasen binden, könnte es das Eisen komplexieren und damit den katalytisch essentiellen Redoxwechsel des Eisens verhindern.

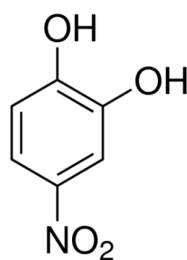


Abb. 13: Strukturformel von 4-NC

1.10.6 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1 (LI-1)

Der 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1 (4-methyl-2-(4-methylpiperazinyl) pyrimido[4,5-b]benzothiazin) wurde erstmalig von Bakavoli et al. beschrieben (84). Dabei handelt es sich um ein heterozyklisches Pyrimidobenzothiazin. Bisher wurden nur Studien zu seiner Fähigkeit zur Inhibition der Sojabohnen-ALOX1 durchgeführt. Dabei ergab sich eine mittlere Hemmkonzentration IC_{50} von 18 μ M. Der Inhibitor wirkt als Redoxhemmstoff, der den Redoxzyklus des Nichthämeisens blockiert.

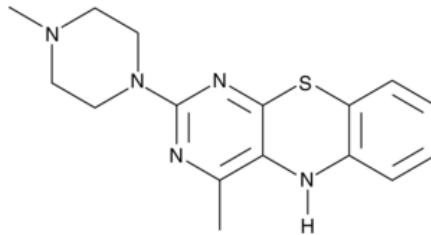


Abb. 14: Strukturformel von LI-1

1.10.7 4-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698)

Das CAY10698 genannte Thiazolderivat wurde 2014 von der Arbeitsgruppe um Luci synthetisiert und analysiert (85). Dieser Lipoxygenasehemmstoff interferiert mit dem Nichthämeisen von Lipoxygenasen, wobei nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, ob es sich dabei um eine reine Chelatorwirkung oder um eine Redoxaktivität handelt. CAY10698 weist eine hohe Isoformspezifität auf. Die gereinigte rekombinante humane ALOX12 wird mit einer IC_{50} von 5,1 μ M gehemmt. Für die gereinigten rekombinanten Enzyme der humanen ALOX15 und der humanen ALOX15B ergaben sich deutlich höhere IC_{50} -Werte (>50 μ M). Eine Testung des Hemmstoffs für ALOX15-Orthologe anderer Spezies wurde bisher noch nicht durchgeführt.

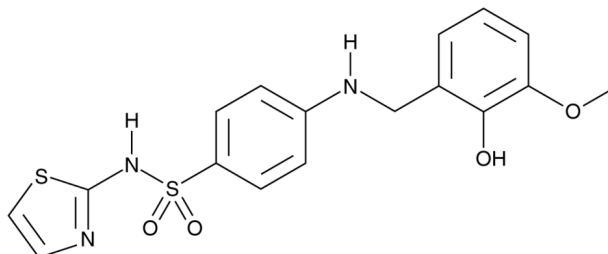


Abb. 15: Strukturformel von CAY10698

1.10.8 Salicylhydroxamsäure (SHAM)

Hydroxamsäuren sind relativ schwache LOX-Inhibitoren. Für Salicylhydroxamsäure wurde ein IC_{50} von 50 μM für die gereinigte Kaninchen ALOX15 ermittelt (86). Zur Wirkungsweise von SHAM gibt es zwei alternative Erklärungsansätze: i) Komplexierung des enzymgebundenen Eisens und ii) Reduktion des enzymatisch aktiven Fe^{3+} in seine inaktive zweiwertige Form. Für andere ALOX-Isoformen finden sich in der Literatur keine Daten zur Hemmung durch SHAM.

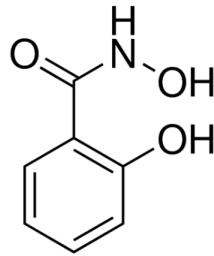


Abb. 16: Strukturformel von Salicylhydroxamsäure

1.10.9 Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA)

Hierbei handelt es sich um ein zu den Phenylpropanoiden gehörendes Derivat der Zimtsäure. Zimtsäuren werden antioxidative, antiinflammatorische aber auch zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben (87). Die Fähigkeit zur Hemmung der Sojabohnen-LOX1 wurde von Pontiki et al. festgestellt und auf die Reduktion des dreiwertigen Eisens im aktiven Zentrum der Lipoxygenase zurückgeführt (73). Allerdings zeigten die Experimente von Gutierrez-Lugo et al. keine Hemmung der humALOX15 und humALOX12 (88). Für diese Experimente wurden rekombinante Enzympräparationen verwendet (89).

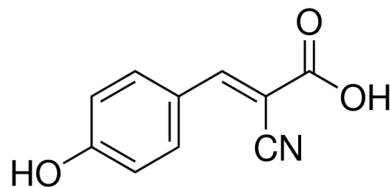


Abb. 17: Strukturformel von CHCA

1.11 Fragestellung

Die ALOX15 ist eine der sechs verschiedenen menschlichen Lipoxygenaseisoformen und wird vom *ALOX15*-Gen kodiert, welches sich im gemeinsamen LOX-Gencluster auf dem Chromosom 17 befindet. Das Enzym wird beim Menschen und den meisten anderen Säugetieren zellspezifisch exprimiert. Die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen änderte sich im Laufe der späten Säugetierevolution von Arachidonsäure-12- zu 15-Lipoxygenierung. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, warum eine 15-Lipoxygenierung dieser Fettsäure gegenüber einer 12-Lipoxygenierung einen evolutionären Vorteil bedeutet. Es wurden drei Arbeitshypothesen aufgestellt, die in der Dissertation überprüft werden sollten:

1. Erweiterung der Substratspezifität: Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Enzyme sollten eine verringerte Kapazität zur Oxidation von Linolsäure aufweisen, da dieses Substrat keine n-11 bisallylständige Methylengruppe enthält. Da Linolsäure in Säugetieren dominant vorkommt, sollte die evolutionäre 12-zu-15-Transition eine Verbreiterung der Substratspezifität der ALOX15-Orthologen zur Folge haben.

2. Verbesserung der Membranoxygenierung: Da Linolsäure ein wesentlicher Bestandteil eukaryotischer Biomembranen ist, besteht die Möglichkeit, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe Biomembranen besser oxygenieren können als 12-lipoxygenierenden Enzyme.

3. Effektivere Lipoxinsynthese: Lipoxine sind antiinflammatorische Mediatoren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe verglichen mit ihren 12-lipoxygenierenden Verwandten die effektiveren Produzenten von Lipoxinen sind. Sollte sich diese Vermutung experimentell bestätigen lassen, könnte die evolutionäre Veränderung der Reaktionsspezifität dahingehend interpretiert werden, dass Entzündungen bei hochentwickelten Primaten effektiver reguliert werden.

Isoformspezifische ALOX15-Hemmstoffe sind für die Erforschung der biologischen Rolle von Lipoxygenasen in tierischen Krankheitsmodellen von großer Bedeutung. Obwohl in der jüngsten Vergangenheit Hemmstoffe entwickelt worden sind, welche eine Isoformspezifität für humane LOX-Paraloge einer Spezies aufweisen (z.B. Hemmung der humALOX15, aber keine Hemmung der humALOX5 oder humALOX12), wurde die Orthologspezifität (hemmt ein Hemmstoff der humALOX15 die mouALOX15) bisher nur unzureichend untersucht. Da die meisten tierischen Krankheitsmodelle in Mäusen etabliert sind, stellte die Testung der Orthologspezifität bereits beschriebener ALOX-

Hemmstoffe den zweiten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Für beide Schwerpunkte wurden die ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies kloniert und in *E. coli* als rekombinante his-tag Fusionsproteine unter identischen Bedingungen exprimiert. Vor den eigentlichen Experimenten erfolgte eine Grundcharakterisierung der ALOX15-Orthologen hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

| <i>Chemikalie</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|---|--------------------------------------|
| Agarose | Promega, Mannheim, Deutschland |
| Ampicillin | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Antifoam 204 | Sigma, Deisenhofen, Deutschland |
| Antikörper Anti-His G-HRP | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| Arachidonsäure | Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA |
| Beta-Mercaptoethanol-Probenpuffer | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Chloramphenicol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dimethylsulphoxid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| HPLC-Standards: 15-HETE 12-HETE 5-HETE 5(S),6(S)-DiHETE 5(S),6(R)-DiHETE Lipoxin A Lipoxin B | Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA |
| Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumhydroxid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | VWR Chemicals, Radnor, PA, USA |
| Natriumborhydrid | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Ponceau | Sigma, Deisenhofen, Deutschland |
| Tetramethylethylenediamin (TEMED) | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Tris | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe, Deutschland |

Die verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität.

2.2 Hemmstoffe

| <i>Hemmstoff</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|-----------------------------|---|
| 15-Lipoxygenase Inhibitor-1 | Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA |
| 4-Nitrocatechol | Sigma, St. Louis, MO, USA |
| Baicalein | Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| CAY10698 | Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA |
| Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure | Sigma, Steinheim, Germany |
| Eicosatetraensäure | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Epigallocatechingallat | Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany |
| Nordihydroguaiarsäure | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA |
| Salicylhydroxamsäure | IFG, Bernburg, Germany |

2.3 Pufferzusammensetzungen und Lösungen

| <i>Puffer/Medium</i> | <i>Zusammensetzung</i> |
|----------------------|--|
| Elutionspuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8,0 |
| HEPES-Puffer A | HEPES (50mM; pH=7,4), NaCl (150 mM), CaCl ₂ (0,1 mM), DTT (0,1 M) |
| LB-Agar | Bacto-Agar (1,5 %), Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5%), Natronlauge (1 mM) |
| LB-Medium | Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5 %), Natronlauge (1 mM) |
| PBS | Natriumchlorid (150 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (8 mM), Kaliumchlorid (3 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (1,5 mM), pH=7,0 |
| RP-HPLC-Laufmittel | Methanol (85%), Wasser (15%), Essigsäure (0,05%) |

| | |
|----------------------------------|--|
| SDS-PAGE Stackinggel 4% | (37% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid) (14%), Stackinggelpuffer (0,5M Tris (30,285g/500 ml) pH 6,75; 0,4% SDS) (25%), Ammoniumpersulfatlösung 10% (1%), TEMED (0,2%), Wasser (60%) |
| SDS-PAGE Trenngel 10% | (37% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid) (33%), Trenngelpuffer (1,5M Tris (90,855g/500 ml) pH 8,8; 0,6% SDS) (25%), TEMED (0,2%), Ammoniumpersulfatlösung 10% (1%), Wasser (41%) |
| SDS-Puffer | Tris (24,93 mM), Glycin (192 mM), SDS (3,47 mM), pH=8,3 |
| SOC-Medium | Hefeextrakt (0,5 %), Trypton (2 %), Natriumchlorid (10 mM), Kaliumchlorid (2,5 mM), Magnesiumchlorid (10 mM), Magnesiumsulfat (10 mM), Glucose (20 mM) |
| TAE-Puffer (für Agarose-Gele) | Tris (40 mM), Natriumacetat (20 mM), Essigsäure (29,6 mM), EDTA (2 mM), pH=7,8 |
| Waschpuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH= 8,0 |

2.4 Geräte und Zubehör

| <i>Gerät</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|---|------------------------------------|
| 2050 MIDGET Electrophoresis Unit | Hofer, Sulzbach, Deutschland |
| Auto-Sampler SIL-20AC | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| Bandelin Sonorex Super Ultraschallbad | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| BioPhotometer plus | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Brutschrank | Binder, Tuttlingen, Deutschland |
| CC 250/4 Nucleodur C18 Gravity, 5µm Säule | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| CC 8/4 Nucleodur C18 Gravity, 5µm Vorsäule | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| Centrifuge 5417R (Rotorradius: 9,5 cm) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Column Oven CTO-20AC | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| Communication Bus Modul CBM-20A | Shimadzu, Kyoto, Japan |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Diode Array Detector SPD-M20A | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| Laminarflow-Sterilwerkbank | Hereaus, Berlin, Deutschland |
| Liquid-Chromatograph LC-20 AD | Shimadzu, Kyoto, Japan |
| Pipet-aid XL | Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA |
| Rotationsverdampfer | Van der Heyden, Dörentrup, Deutschland |
| Schüttler | Gallenkamp, Deutschland |
| Sonorex Super RK 512 H | Bandelin, Berlin, Deutschland |
| T3 Thermocycler | Biometra, Göttingen, Deutschland |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| W-3250 D sonifyer - Ultraschallsonde | Braun, Melsungen, Deutschland |

2.5 Software

| <i>Software</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Excel 2010 | Microsoft, Washington, USA |
| SigmaPlot | Systat Software GmbH, Chicago, USA |
| LabSolutions LCsolution Version 1.25 | Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan |

2.6 Enzyme und Kits

| <i>Enzym/Kit</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|--|--|
| Advantage PCR-Mix | Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich |
| Amersham cDNA synthesis kit | Amersham plc, Amersham, Großbritannien |
| Blut-RNA-Extraktions-Kit | Qiagen, Venlo, Niederlande |
| DNA Polymerase <i>Thermus aquaticus</i> (Taq) | Promega, Madison, USA |
| EnPresso Tablet Cultivation Set | BioSilta, St. Ives, Großbritannien |

| | |
|-------------------------------------|---|
| GeneJET Gel Extraction Kit | Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland |
| GeneJET Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland |
| LigaFast™ rapid DNA Ligation | Promega, Madison, USA |
| PfuUltra II Hotstart PCR Master Mix | Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland |
| Premium Reverse Transcriptase | Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland |
| Restriktionsendonukleasen | Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland |
| Western Lightning Plus ECL | PerkinElmer Inc., Boston, USA |

2.7 Plasmide und Oligonukleotide

| <i>Plasmide/ Oligonukleotide</i> | <i>Firma, Stadt, Land</i> |
|----------------------------------|--|
| Oligonukleotide/Primer | BioTez, Berlin, Deutschland |
| pET-28b | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| pRSET A | Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| TOPO 2.1 | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |

3 Methoden

3.1 Klonierung der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies

Die Klonierung der Lipoxygenasen wurde von Mitarbeitern der AG Kühn durchgeführt. Dafür wurde zunächst Gesamt-RNA aus den Blutzellen der entsprechenden Tiere extrahiert. Die verschiedenen RNA-Spezies wurden anschließend mittels reverser Transkriptase in cDNAs umgeschrieben und die ALOX15-cDNA wurde unter Verwendung ALOX15-spezifischer Primer, die für jede Tierspezies anhand der entsprechenden Datenbanksequenz konstruiert wurden, durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde präpariert, in einen Klonierungsvektor (TOPO2) ligiert und in Bakterien (*E. coli*) amplifiziert.

3.1.1 Klonierung der humanen ALOX15

Bei der humanen ALOX15 handelt es sich um ein Arachidonsäure-15-lipoxygenierendes Enzym, das erstmalig aus menschlichen eosinophilen Granulozyten isoliert wurde (19).

3.1.1.1 RNA-Extraktion

Für die Klonierung der humALOX15 wurde zunächst mithilfe des RNA Extraction Kits der Firma Qiagen eine RNA-Präparation aus den Zellen menschlichen Blutes durchgeführt. Dazu wurde aus den Zellen von 1 ml menschlichen Blutes die RNA extrahiert. Da Erythrozyten und Thrombozyten keine RNA besitzen, entspricht die RNA der Blutzellen im Wesentlichen der RNA von Leukozyten.

3.1.1.2 Reverse Transkription

Danach wurde die erhaltene total RNA per reverser Transkription in cDNA umgewandelt. Dazu wurde die Premium Reverse Transcriptase der Firma Thermo Scientific/Fermentas verwendet.

3.1.1.3 PCR

Um aus der gewonnen cDNA Mischung die spezifische für die ALOX15 codierende cDNA zu amplifizieren, wurden genspezifische Primer benötigt, die anhand

der humanen Datenbanksequenz konstruiert und durch BioTez (Berlin, Deutschland) synthetisiert wurden. Diese Primer enthielten Erkennungssequenzen für spezifische Restriktionsendonukleasen, welche für die Einklonierung der codierenden Sequenzen in die Expressionsvektoren genutzt werden konnten. Unter Verwendung dieser Primer konnte die cDNA mittels Advantage 2 Polymerase Kit in einer Polymerase Chain Reaction (PCR) vermehrt werden. Dazu wurden zu 1,0 µl der Template DNA die beiden Primer (Endkonzentration je 2,5 µM), 2,5 µl 10-fach konzentrierter Advantage 2 Puffer, 0,5 µl dNTPs und 0,3 µl der Advantage 2 Polymerase gegeben und der Ansatz nach folgendem Programm in einem Thermozykler erhitzt bzw. abgekühlt.

| Zeitintervall | Temperatur | |
|---------------|------------|---------------------|
| 1 min 30 s | 95° C | } 35 Wiederholungen |
| 30 s | 95° C | |
| 1 min | 68° C | |
| 3 min | 68° C | |

3.1.1.4 TOPO-Cloning

Die PCR-Mischung wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und das dominierende Produkt (ca. 2000 bp) wurde aus dem Gel extrahiert. Das auf diese Weise gereinigte PCR-Produkt, welches die codierende Sequenz der ALOX15 enthielt, wurde dann über 30 Minuten bei Raumtemperatur in den TOPO2-Klonierungsvektor ligiert. Danach wurden 100 µl kompetente XL-1-Blue Bakterien zum Ligationsansatz hinzugegeben. Nach 30 Minuten Lagerung auf Eis wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42° C inkubiert. Dieser Hitzeschock ermöglicht dem Plasmid, das neben der für die ALOX15 codierenden Sequenz auch eine für Ampicillinresistenz codierende Information enthält, den Eintritt in das Bakterium. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit 100 mg/ml Ampicillin (Amp) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da nur Bakterien, welche die Ampicillinresistenz von dem Plasmid aufgenommen hatten, auf den Agarplatten wachsen konnten, war sichergestellt, dass diese Klone das Plasmid enthielten. Die Klone wurden von der Agarplatte gepickt und in Flüssigkultur gegeben, die ebenfalls 100 mg/ml Ampicillin enthielt. Nach einer erneuten Inkubation von 20 h wurde aus den Bakterien die Plasmid-

DNA mit dem GeneJET DNA-Mini-Prep-Kit isoliert und mit der gewonnenen DNA eine Restriktionsspaltung durchgeführt.

3.1.1.5 Kontrollspaltung

Um zu kontrollieren, ob das rekombinante Plasmid die *ALOX15* codierende Sequenz auch wirklich enthielt, wurde versucht das präparierte Klonierungsplasmid mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen zu spalten. Die entsprechenden Erkennungssequenzen der zu verwendenden Restriktionsendonukleasen wurden in die Amplifizierungsprimer eingebaut (siehe 3.1.1.3). Damit wurde das *ALOX15* codierende Insert aus dem rekombinanten Klonierungsplasmid herausgespalten, sodass in der Agarosegelelektrophorese ein 2000 bp Fragment nachgewiesen werden konnte. War dieses Restriktionsfragment vorhanden, enthielt das rekombinante Klonierungsplasmid mit großer Wahrscheinlichkeit die *ALOX15*-cDNA Sequenz und konnte für die weiteren Arbeiten verwendet werden. War dies nicht der Fall, wurde der entsprechende Klon verworfen.

3.1.1.6 Umklonierung in einen prokaryotischen Expressionsvektor

Da Klonierungsvektoren wie der TOPO-Vektor nicht die strukturellen Eigenschaften für eine Expression rekombinanter Proteine aufweisen, sondern nur zur Vervielfachung der DNA in Bakterien geeignet sind, wurde die *ALOX15*-cDNA aus dem TOPO-Cloningvektor in den pET28b-Vektor (prokaryotischer Expressionsvektor) umkloniert. Dazu wurden die Restriktionsendonukleasen Sall und HindIII verwendet, die unter 3.1.1.3 in die Amplifizierungsprimer eingebaut wurden. Restriktionsendonukleasen ermöglichen das Spalten von DNA-Strängen an spezifischen Stellen, indem sie Erkennungssequenzen von Basen erkennen und dort spalten. Neben dem rekombinanten Klonierungsprodukt (*ALOX15*-cDNA) wurde auch der zirkuläre pET28b-Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen gespalten und damit linearisiert. Anschließend wurde das präparierte Insert (*ALOX15*-cDNA) in den linearisierten Expressionsvektor ligiert und kompetente Bakterien mit dem rekombinanten Expressionsplasmid transformiert. Ampicillinresistente Bakterienklone wurden selektiert, Plasmid-DNA wurde isoliert und das gesamte Konstrukt aus Vektor und Insert wurde von der Firma Eurofins MWF-Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

3.1.2 Klonierung der ALOX15 des Schimpansen

Vergleicht man die Aminosäuresequenz der ALOX15 des Schimpansen (chiALOX15) mit der des Menschen, so fällt eine Übereinstimmung der Determinanten des Triadenkonzeptes auf. Dementsprechend handelte es sich bei der chiALOX15 ebenfalls um ein Arachidonsäure-15-lipoxygenierendes Enzym, das bisher jedoch noch nicht charakterisiert worden ist. Die Klonierung der chiALOX15 erfolgte analog der Klonierung der humALOX15 aus Schimpansenblut.

3.1.3 Klonierung der ALOX15 des *Pongo pygmaeus* (Orang-Utan)

Bei der ALOX15 des Orang-Utans (ponALOX15) handelt es sich um ein Arachidonsäure-15-lipoxygenierendes Enzym, das zuerst von Vogel et al. (52) beschrieben wurde. Eine cDNA-Bibliothek aus dem Blut eines Orang-Utans wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin, Deutschland) bereitgestellt. Aus dieser cDNA-Bibliothek wurde die cDNA der ponALOX15 unter ähnlichen Bedingungen wie für die humALOX15 beschrieben, amplifiziert. Nach erfolgtem TOPO-Cloning wurde das Insert in den pET28-Vektor mithilfe von Sall und XhoI umkloniert.

3.1.4 Klonierung der ALOX15 des Kaninchens

Die Kaninchen-ALOX15 (rabALOX15) wurde als natives Enzym erstmalig aus Kaninchenretikulozyten isoliert und als ein Arachidonsäure-15-lipoxygenierendes Enzym charakterisiert (90). Für die vorliegende Arbeit wurde die mRNA der Kaninchen-ALOX15 aus Kaninchenretikulozyten isoliert und durch reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Aus der Summe der verschiedenen cDNA-Spezies wurde die ALOX15-cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pKK233 einkloniert. Danach erfolgte eine Umklonierung in den pET15b-Vektor unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen Sall und HindIII.

3.1.5 Klonierung der ALOX15 des *Macaca mulatta* (Rhesusaffe)

Bei der ALOX15 von *Macaca mullatta* (macALOX15) handelt es sich um ein von Vogel et al. beschriebenes Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes Enzym (52). Das Expressionsplasmid der *macALOX15* wurde freundlicherweise von Pontus Forsell

(Karolinska Institut, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die *ALOX15*-mRNA wurde dazu aus Lungengewebe toter Makaken gewonnen, per reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und per PCR vervielfältigt (91). Mit den Restriktionsendonukleasen Sall und XhoI gelang es, die kodierende *ALOX15*-Sequenz in den pET28b-Vektor einzuklonieren.

3.1.6 Klonierung der *ALOX15* des Schweins

Bei der Schweine-*ALOX15* (pig*ALOX15*) handelt es sich um ein Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes Enzym, das zuerst aus polymorphkernigen Leukozyten des Schweins isoliert wurde (92). Die Klonierung der pig*ALOX15* erfolgte analog zur Klonierung der hum*ALOX15*, allerdings wurde hier Schweineblut als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der entsprechenden cDNA verwendet. Das *ALOX15*-Insert wurde in das Expressionsplasmid pET28b zwischen die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen Sall und NotI einkloniert.

3.1.7 Klonierung der *ALOX15* der Ratte

1993 beschrieben Watanabe und Haeggström erstmals die *ALOX15* der Ratte (rat*ALOX15*) als ein Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes Enzym (93). Für die vorliegende Arbeit wurde die rat*ALOX15*-cDNA aus Rattenblut amplifiziert und wie die hum*ALOX15* kloniert. Die Insertion der entsprechenden cDNA erfolgte zwischen die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen Sall und NotI in den pET28b Expressionsvektor.

3.1.8 Klonierung der *ALOX15* der Maus

Bei der Maus-*ALOX15* (mou*ALOX15*) handelt es sich um ein Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes Enzym, das zuerst von Funk et al. (94) beschrieben wurde. Für die Klonierung des Enzyms wurde zunächst total RNA aus Mausperitonealmakrophagen gewonnen und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach PCR und TOPO-Cloning wurde das Insert in den pET28b Expressionsvektor einkloniert, wobei die Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen Sall und NotI verwendet wurden.

3.1.9 Klonierung der Leu353Phe Mutante der mouALOX15

Die murine ALOX15 ist ein Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes Enzym. Ihre Leu353Phe Mutante weist hingegen entsprechend des Triadenkonzeptes (30) 15-lipoxygenierende Eigenschaften auf. Zur Herstellung dieser 15-lipoxygenierenden Mutante wurde das rekombinante Expressionsplasmid der mouALOX15 im pET28b Vektor einer ortsgerichteten Mutagenese unterzogen. So können gezielt einzelne Nukleotide eines Genkonstrukts ausgetauscht werden. Für die ortsgerichtete Mutagenese werden spezifische Primer benötigt, die sich an das zu mutierende Codon anlagern. Diese Primer enthalten eine geringgradig abweichende Nukleotidsequenz und ihr Einbau in die cDNA mutiert die Sequenz des Expressionsplasmids. Diese Primer wurden nach unseren Vorgaben von der Firma BioTez (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die Mutagenese wurde mit dem PfuUltra II Hotstart PCR Master Mix durchgeführt. Nach der PCR enthielt der Ansatz sowohl DNA-Stränge maternalen Herkunft (nicht-mutierte Sequenz) als auch solche, die die Mutation enthielten. Die mutierte DNA ist allerdings im Gegensatz zur ursprünglichen rekombinanten DNA nicht methyliert. Mithilfe der DpnI Restriktionsendonuklease wurden die methylierten Einzelstränge des DNA-Doppelstrangs abgebaut, während die mutierten Einzelstränge nicht angegriffen wurden. Schlussendlich wurde der nicht abgebaute DNA-Einzelstrang (mit der Mutation) zum Doppelstrang vervollständigt, sodass beide Einzelstränge die angestrebte Mutation enthielten. Das mutierte Expressionsplasmid wurde vollständig sequenziert, um zu überprüfen, ob die angestrebte Mutation vorhanden ist und ob sich keine weiteren Veränderungen in der Basensequenz ergeben haben.

3.1.10 Klonierung der Leu353Phe Mutante der ratALOX15

Die ALOX15 der Ratte zählt zu den 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen. Durch ortsgerichtete Mutagenese des rekombinanten Expressionsplasmids konnte das Leucin an Stelle 353 des Enzyms durch ein größeres Phenylalanin ersetzt werden. Dadurch stellte sich ein 15-lipoxygenierender Charakter ein. Als Vorlage diente die ALOX15 der Ratte und es wurden Primer der Firma BioTez und der PfuUltra II Hotstart PCR Master Mix verwendet.

3.1.11 Klonierung der Ile418Ala Mutante der humALOX15

Die humane ALOX15 ist ein Arachidonsäure-15-lipoxygenierendes Enzym. Ihre Ile418Ala Mutante zeigt hingegen entsprechend des Triadenkonzeptes (30) einen 12-lipoxygenierenden Charakter. Um die Mutante der humanen ALOX15 zu erstellen, wurde analog zur murinen Mutante (s.o.) eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt. Als Vorlage diente die humane ALOX15. Zur Mutagenese wurden wiederum Primer der Firma BioTez und der PfuUltra II Hotstart PCR Master Mix verwendet. Zum Abbau der methylierten maternalen DNA wurde DpnI verwendet.

3.1.12 Präparation der nativen 15-Lipoxygenase des Kaninchens aus Retikulozyten

Als Ausgangsmaterial für die Präparation der Lipoxygenase wurde eine retikulozytenreiche Blutzellsuspension eines Kaninchens verwendet. Dazu wurde bei dem Tier durch mehrfache Blutentnahmen eine experimentelle Entblutungsanämie induziert. Die Lipoxygenase konnte aus dem Hämolysat der retikulozytenreichen Blutzellsuspension durch Salzfällung mit Ammoniumsulfat angereichert werden. Eine weitere Aufreinigung des Enzyms wurde durch Anion-Austausch-Chromatographie erreicht. Der Lipoxygenasepeak der Anion-Austausch-Chromatographie wurde durch isoelektrische Fokussierung im Saccharosegradienten und durch Gelfiltration weiter gereinigt (95). Das finale Präparat der nativen rabALOX15 besaß eine elektrophoretische Reinheit von >90%.

3.2 Proteinexpression

Zur bakteriellen Expression der Säugetier-ALOX15-Orthologen wurden kompetente Bakterien des Stamms BL21(DE3)pLysS, die zur Familie der *Escherichia Coli* Bakterien gehören, verwendet. Diese Bakterien enthalten von Natur aus ein Plasmid, das für eine Chloramphenicol-Resistenz codiert. Die Expression erfolgte mit dem EnPresso-Expression System der Firma BioSilta. Dazu wurde 1 mg Plasmid-DNA zu 100 µl einer Suspension von chemisch kompetenten BL21-Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42° C über 45 s und weiteren 2 Minuten auf Eis wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37° C mit 200 rpm geschüttelt. LB-Agarplatten wurden nun mit Ampicillin und

Chloramphenicol versetzt und je 300 µl des Transformationsansatzes darauf ausgestrichen. Über Nacht wurden die Platten im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

Zur Vorkultur wurde jeweils ein ausgewählter Bakterienklon von der Agarplatte aufgenommen und in 1 ml LB-Medium und je 10 µl der Antibiotika Chloramphenicol und Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37° C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,1-0,15 erreicht war.

Um die Hauptkultur der Bakterien anzusetzen, wurden zunächst zwei Tabletten aus dem Espresso Set in 50 ml sterilen MilliQ Wassers in 50 ml Plastikkolben vermischt, um das EnBase-Medium herzustellen, welches komplexe Nährstoffe, Spurenelemente und lösliche Polysaccharide für die Ernährung der Bakterien enthält. Weiterhin wurden je 50 µl der Antibiotikalösungen und 100 µl Antifoamreagenz zugegeben. Nach Zugabe der Vorkultur wurde 50 µl Enz l'm Lösung zugefügt, welche die Freisetzung von Glucose aus den Polysacchariden vermittelt. Die Kulturflasche wurde mit einem AirTop Seal verschlossen und im Schüttler bei 30° C und 200 rpm inkubiert.

Nachdem bei der Kontrolle des Kulturwachstums eine OD₆₀₀ von >5 gemessen wurde, konnte die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration im Expressionsansatz) induziert werden. Weiterhin wurden eine Booster-Tablette aus dem EnPresso-Kit und 250 µl Enz l'm zur Verbesserung der Nährstoffversorgung der Bakterien zugegeben. Dieses Gemisch wurde über 24 h bei 25° C und 200 rpm inkubiert, bis sich die OD₆₀₀ verdoppelt hatte.

Daraufhin wurden die Bakterien über 10 min bei 4° C und 4000 rpm (5000 RCF) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet, das sich bei der Zentrifugation bildete, wurde mit 10 ml PBS gewaschen und schließlich in 10 ml PBS resuspendiert. Um die rekombinanten Enzyme zu erhalten, wurden die Zellen mit einer Ultraschallsonde zerstört. Nach einer Zentrifugation über 20 min bei 4° C und 14.000 rpm (21.000 RCF) konnte der Überstand, der die ALOX15 enthielt, abpipettiert werden.

3.3 Westernblot

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den exprimierten ALOX15-Orthologen um N-terminale his-tag-Fusionsproteine. Diese Fusionsproteine lassen sich in komplexen Proteinmischungen (z.B. bakterielle Lysatüberstände) mit einem Antikörper spezifisch nachweisen, der gegen die Poly-His-Sequenz am N-terminalen Ende der

rekombinanten Proteine gerichtet ist. Dazu ist jedoch erst eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nötig, mit der die Proteine, die sich im Lysatüberstand befinden, nach ihrem Molekulargewicht voneinander aufgetrennt werden können.

Dazu wird zunächst ein bestimmtes Volumen des Lysatüberstandes mit vierfach konzentriertem Elektrophoreseladungspuffer der Firma Roth versetzt und 10 min bei 95° C inkubiert. Anschließend wurden ca. 100 µg Gesamtprotein auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und eine Spannung von ca. 100 V angelegt, sodass die Proteine anhand ihrer molekularen Masse voneinander getrennt werden konnten. Das Polyacrylamidgel konnte nach der Proteintrennung für den Westernblot verwendet werden. Dazu wurde ein elektrisches Feld mit 10 V senkrecht zum Gel angelegt, sodass die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Diese Membran wurde danach mit Ponceaulösung gefärbt, um das Muster der auf die Membran geblotteten Proteine kontrollieren zu können. Daraufhin wurde die Nitrozellulosemembran über eine Stunde mit Magermilchpulver in PBS und 0,1 % Tween20 blockiert. Die Blockierung mit dem für den Antikörper nicht erkennbaren Milchprotein ist notwendig, damit sich der Antikörper nicht unspezifisch an Membranen anheften kann, was zu einer unspezifischen Färbung des Blots führen würde. Nachdem die Magermilch und das Tween20 von der Membran entfernt worden waren, konnte der Anti-his-tag-Antikörper auf die Membran gegeben werden. Dieser Antikörper, der mit einer Peroxidase (HRP) kovalent verknüpft ist, wurde 1 : 5.000 mit 5 % Magermilch in PBS verdünnt. Die Peroxidase reagiert bei der anschließenden Inkubation mit dem Western Lightning Plus Reagenz und oxidiert dabei Luminol. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert, das sich bei 425 nm mit Hilfe eines Scanners nachweisen lässt. Die Intensität der Lichtemission ist dabei proportional zur Menge an produzierten Enzymen, wodurch genaue Rückschlüsse auf die Menge der Lipoxygenasen im Proteingemisch ermöglicht werden.

3.4 Aktivitätsassay zur Bestimmung der Arachidonsäureoxygenierungskapazität

Zunächst wurde die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der einzelnen ALOX15-Orthologen in Abwesenheit von LOX-Hemmstoffen getestet. Dazu wurden verschiedene Mengen des Lysatüberstandes eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die eingefrorenen Lysatüberstände zunächst im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Als Substrat diente eine 150 mM methanolische Lösung von Arachidonsäure, die unter Argonatmosphäre bei -20° C gelagert wurde. Für die Messungen wurden verschiedene

Volumina der Lysatüberstände (5-50 µl) zu 500 µl PBS gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 µl der Substratlösung (Endkonzentration an Arachidonsäure 150 µM) gestartet. Der Ansatz wurde 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde Natriumborhydrid zugegeben, was zur Reduktion der entstandenen Hydroperoxyfettsäuren zu den entsprechenden Alkoholen und zur Beendigung der Reaktion führt. Dann wurden 40 µl 100% Essigsäure zu dem Ansatz gegeben, um den pH-Wert auf 3-4 einzustellen. Anschließend wurden 500 µl Methanol zugefügt und der Ansatz für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm (21.000 RCF) über zehn Minuten wurde der Überstand in ein Glasvial überführt. Die Entstehung von LOX-Produkten während der dreiminütigen Inkubation wurde in der HPLC quantifiziert (96).

3.5 Substratspezifitätstestung

Die humane und die Kaninchen-ALOX15 akzeptieren fast alle natürlich vorkommenden Polyenfettsäuren (Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Dokosahexaensäure, Linolsäure, alpha- und gamma-Linolensäure) als Substrate. Um die Substratspezifität der präparierten ALOX15-Orthologen zu testen, wurden Aktivitätsassays mit den Substraten Arachidonsäure und Linolsäure in einem gemeinsamen Aktivitätsansatz durchgeführt. Da die Oxidation von Linolsäure 13-HODE, die Oxidation von Arachidonsäure hingegen 12- bzw. 15-HETE hervorbringt, konnte anhand des gebildeten Produktmusters auf die Substratspezifität der ALOX15-Orthologen geschlossen werden. Für die Messungen wurden die Konzentration von Linolsäure und Arachidonsäure im Assayansatz so dosiert, dass die Endkonzentrationen der beiden Fettsäuren im Messansatz jeweils 80 µM betragen. Dann wurde die Oxygenasereaktion durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von Lysatüberstand (Enzymquelle) zu 500 µl der Inkubationsmischung gestartet. Nach dreiminütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumborhydrid beendet und der Ansatz mit 50 µl 100% Essigsäure auf einen pH von 3,5 eingestellt. Nach Zugabe von 500 µl Methanol wurde der Ansatz über 10 Minuten zentrifugiert und der klare Überstand mit einer Kombination von RP- und SP-HPLC analysiert. Für die RP-HPLC, bei der die drei zu erwartenden Oxygenierungsprodukte nicht sicher voneinander getrennt werden konnten, wurde ein Laufmittel mit den Konzentrationen Methanol/Wasser/Essigsäure von 75/25/0,1 by vol. verwendet. Diese RP-HPLC diente

zur Präparation der gebildeten Hydroxyfettsäuren. Für die anschließende SP-HPLC, die wir zur separaten Quantifizierung der präparierten Hydroxyfettsäuren angewendet haben, wurde das Laufmittelsystem n-Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100:2:0.1, by vol.) verwendet. In beiden HPLC-Systemen wurde eine Flussrate von 1 ml/min eingestellt.

3.6 Membranoxygenierungsassay

Bestimmte LOX-Isoformen sind in der Lage Biomembranen zu oxygenieren (97). Um die Membranoxygenierungskapazitäten der verschiedenen ALOX15-Orthologen zu vergleichen, wurden die ALOX15-Orthologen mit biologischen Modellmembranen inkubiert und die Bildung spezifischer LOX-Produkte quantifiziert. Als Modellmembranen wurden submitochondriale Partikel (SMP) verwendet, die aus Mitochondrien von Rinderkardiomyozyten hergestellt wurden. Dazu wurden Aliquots der präparierten Lysatüberstände mit 50 µl SMP (20 mg/ml) in 1 ml PBS über 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bindet die Lipoxygenase an die Membran und oxidiert die darin enthaltenen ungesättigten Fettsäuren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumborhydrid beendet und die Ansätze mit 50 µl Essigsäure angesäuert. Danach erfolgte die Extraktion der Lipide aus den Reaktionsgemischen nach Bligh-Dyer (98). Dazu wurden 2,5 ml Methanol und 1,25 ml Chloroform auf die Proben gegeben und für 1 Minute auf dem Vortex geschüttelt (keine Phasentrennung). Danach wurden erneut 1,25 ml Chloroform zusammen mit 1,25 ml Wasser hinzugefügt und wieder eine Minute geschüttelt. Bei 4.000 rpm (5.000 RCF) wurden die Ansätze dann über 15 min zentrifugiert, wodurch sich zwei Phasen trennten. Die sich unten absetzende Phase enthielt die Membranlipide. Diese Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mithilfe eines Rotationsverdampfers konnte das Lösungsmittel aus den Proben entfernt werden. Daraufhin wurden die zurückbleibenden Lipide in 350 µl Methanol aufgelöst und 70 µl 40% Kaliumhydroxid (KOH) Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation bei 60° C im Wasserbad über 15 Minuten (alkalische Hydrolyse der Esterlipide) wurden 80 µl Essigsäure zugefügt, was den stark alkalischen pH-Wert der Proben neutralisierte und einen pH-Wert der Proben von 3-4 einstellte. Die in den Proben vorliegenden freien Fettsäuren wurden anschließend mittels RP-HPLC auf das Vorhandensein von konjugierten Dienen (Hydroxypolyenfettsäuren) analysiert.

3.7 Lipoxinsynthese

Lipoxine sind Entzündungsmediatoren mit antiinflammatorischer und proresolutorischer Wirkung, die in mehreren isomeren Formen vorkommen. Sie werden aus Arachidonsäure gebildet und stellen strukturell mehrfach hydroxylierte Fettsäuren dar. Es gibt zwei große Gruppen von Lipoxinen, die sich hinsichtlich der Stellungsisometrie ihrer OH-Gruppen, der Geometrie ihrer Doppelbindungen und der optischen Isomerie der chiralen Kohlenstoffatome in verschiedene Untergruppen einteilen lassen. Die beiden Hauptgruppen sind:

Lipoxin A-Isomere: 5-,6-,15-Tri-HETE

Lipoxin B-Isomere: 5-,14-,15-Tri-HETE

Lipoxine werden durch die konzertierte Aktion mehrerer LOX-Isoformen aus Arachidonsäure gebildet, wobei die ALOX5, die ALOX12 und die ALOX15 beteiligt sein können. Es gibt mehrere metabolische Wege, die zur Lipoxinbildung beitragen können. Initial wird dabei Arachidonsäure durch die ALOX5 zu 5-H(p)ETE oder 5,6-DiH(p)ETE umgewandelt. Die Umwandlung von 5-H(p)ETE in 5,6-DiH(p)ETE kann zum einen durch einen zweiten Oxygenierungsschritt oder über die intermediäre Bildung der 5,6-Epoxidarachidonsäure (5,6-LTA₄) verlaufen. Das 5,6-DiHETE fungiert dann als Substrat für die ALOX15 und/oder die ALOX12, die daraus 5,6,15-Tri-HETE (Lipoxin A) herstellen. Umgekehrt ist es aber auch möglich, dass die ALOX15 Arachidonsäure zu 15-HETE und/oder 14,15-DiHETE umsetzt, woraus durch die katalytische Aktivität der ALOX5 5,14,15-TriHETE (Lipoxin B) gebildet werden kann. Auch hier kann das intermediär entstehende 14,15-DiH(p)ETE entweder durch Doppeloxygenierung der Arachidonsäure oder über die Bildung der 14,15-Epoxyarachidonsäure gebildet werden. Die dritte Möglichkeit der Synthese ist die Umwandlung von Arachidonsäure in 5,15-DiHETE durch ALOX5 und ALOX15. 5,15-DiHETE kann letztendlich durch verschiedene LOX-Isoformen wie ALOX12 und ALOX15 zu 5,6,15-Tri-HETE (Lipoxin A) bzw. 5,14,15-Tri-HETE (Lipoxin B) oxygeniert werden (siehe Abb. 8). In dieser Arbeit wurde die Lipoxinsyntheseaktivität der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere mit 5S-HETE, 5S,6S/R-DiHETE und 5S,15S-DiHETE als Substrat untersucht. Dazu wurden die Substrate (30 µM Endkonzentration) mit den Lysatüberständen als Quelle der rekombinante ALOX Isoformen für 10 min inkubiert und die entstandenen Lipoxinisomere mittels RP-HPLC quantifiziert.

Hydroxyfettsäuren fungieren prinzipiell als LOX-Substrate solange sie ein bisallylständiges Kohlenstoffatom tragen. Ihre Produkte fungieren jedoch nicht als

Enzymaktivatoren. Deshalb wurde den Inkubationsansätzen eine geringe Menge (3 μM) an Linolsäure zugesetzt. Die Linolsäure wird sehr schnell zur Hydroperoxylinolsäure (13S-HpODE) oxygeniert und dieses Produkt fungiert als Aktivator der HETE-Oxidation. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Reaktion mit Natriumborhydrid gestoppt und 50 μl Essigsäure zugegeben. Durch die Zugabe von 500 μl Methanol wurde das Protein denaturiert und konnte für 10 min bei 14.000 rpm (21.000 RCF) abzentrifugiert werden. Der klare Überstand wurde zur Analyse des Ausmaßes der Lipoxinbildung mittels RP-HPLC verwendet.

3.8 Einfluss von Hemmstoffen auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität

Für die Bestimmung der Aktivität der ALOX15 unter dem Einfluss verschiedener Hemmstoffe wurden zunächst die Hemmstoffe abgewogen und in DMSO gelöst, sodass 10 mM Stammlösungen entstanden. Die getesteten Hemmstoffe repräsentieren eine Auswahl klassischer ALOX-Hemmer (i.e. NDGA, ETYA, SHAM, 4-NC), deren Wirkmechanismen zum Teil bereits detailliert untersucht worden waren. Weiterhin wurde eine Reihe von Substanzen mit einbezogen, die in der neueren Literatur als LOX-Hemmstoffe identifiziert wurden, über deren Spezifität jedoch noch relativ wenig bekannt ist. Folgende Hemmstoffe wurden in die Testung einbezogen:

- Nordihydroguaiaretsäure (NDGA) (3)
- Eicosatetraensäure (ETYA) (99)
- Baicalein (BCA) (100)
- Epigallocatechingallat (EGCG) (81)
- 4-Nitrocatechol (4-NC) (101)
- 15-Lipoxygenase Inhibitor 1 (LI-1) (84)
- CAY 10698 (CAY) (85)
- Salicylhydroxamsäure (SHAM) (102)
- Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (CHCA) (103)

Die Hemmstoffe wurden für jedes Experiment 1 : 100 mit PBS auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt (Hemmstoffgebrauchslösung). Es wurde für jedes Enzym ein Ansatz mit 250 μl PBS und 5 μl Lysatüberstand (ALOX15-Präparation) erstellt. Dieser PBS-Enzymmischung wurden drei verschiedene Mengen der

Hemmstoffgebrauchslösungen zugefügt, sodass Hemmstoffkonzentrationen von 0,2 μM , 1 μM und 10 μM im Inkubationsansatz eingestellt wurden. Die ALOX15-Orthologen wurde mit den Hemmstoffen in Abwesenheit von Substrat für fünf Minuten vorinkubiert. Die LOX-Reaktion wurde durch die Zugabe von 250 μl PBS gestartet, in der sich Arachidonsäure als Oxygenierungssubstrat in einer Konzentration von 300 μM und die gleiche Hemmstoffkonzentration wie im Vorinkubationsansatz befanden. Damit entsprach die Substratkonzentration im Reaktionsansatz 150 μM und die Hemmstoffkonzentrationen im Vorinkubations- und im Messansatz waren identisch. Die Reaktionszeit betrug drei Minuten. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumborhydrid beendet, welches gleichzeitig die Reduktion der Hydroperoxyfettsäuren zu Hydroxyfettsäuren bewirkte. Der Ansatz wurde mit 40 μl Essigsäure versetzt und 500 μl Methanol zugegeben. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 14.000 rpm (21.000 RCF) wurde der Überstand in Vials überführt und mittels RP-HPLC zur Quantifizierung von 12- und 15-HETE analysiert. Jeder Ansatz wurde zweifach analysiert. Außerdem wurden 3 Ansätze ohne Hemmstoff als Kontrolle mitgeführt, ebenso wie eine Kontrolle ohne Enzym.

3.9 High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

Die bei der Arachidonsäureoxygenierung entstandenen Hydroxyfettsäuren wurden mit der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysiert. Dazu wurden 300 μl des abzentrifugierten Überstandes der Proben in die Umkehrphasen-HPLC eingespritzt. Es wurde eine Vorsäule der Firma Macherey-Nagel (Deutschland) eingesetzt, um die Hauptsäule vor Verunreinigung zu schützen. Die Hauptsäule (Macherey-Nagel, Deutschland) enthält poröses Kieselgel mit einer Partikelgröße von 5 μm , an deren OH-Gruppen Octadecylsilanketten chemisch gebunden sind (Umkehrphase). Dadurch kehren sich die Polaritätseigenschaften des Kieselgels um. Das Laufmittel bestand aus einem Gemisch aus Methanol, H_2O und Essigsäure im Verhältnis (88/12/0,1). Der Fluss durch die HPLC wurde auf 1 ml/min eingestellt. Mit Hilfe eines Photodiodenarraydetektors konnten die Ergebnisse der HPLC-Analytik in einem dreidimensionalen Datensatz festgehalten werden, bei der die Retentionszeit (x-Achse), das Ausmaß der Lichtabsorption (y-Achse) und die jeweilige Wellenlänge (z-Achse) gespeichert wurden. Die Retentionszeit und das UV-Spektrum einer eluierten Substanz lassen Rückschlüsse auf die chemische Struktur dieser Substanz zu. Das

Ausmaß der Lichtabsorption zeigt im Gegensatz dazu die Menge der Substanz in der Analyseprobe an. Lipoxygenaseprodukte (HETE- und HODE-Isomere) enthalten konjugierte Diene, die durch charakteristische UV-Spektren mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm gekennzeichnet sind. Lipoxine hingegen enthalten konjugierte Tetraene, die ebenfalls charakteristische UV-Spektren mit lokalen Absorptionsmaxima bei 289 nm, 301 nm und 316 nm aufweisen (104). Die jeweilige Menge der Produkte wurde durch Integration der Flächen unter den Peaks der Chromatogramme berechnet. Da durch nichtenzymatische Oxygenierung der Substratlösungen bei der Lagerung Oxidationsprodukte entstehen, wurden die Werte der Nichtenzym-Kontrolle von allen Integrationsergebnissen subtrahiert.

3.10 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC_{50}

Die Effektivität eines Hemmstoffs lässt sich durch die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) quantifizieren. Lipoxygenasehemmstoffe, die eine IC_{50} im submikromolaren Bereich aufweisen ($< 1 \mu M$), stellen dabei effektive ALOX-Hemmstoffe dar. Zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}), wurden Restaktivitäten der Enzyme (in %, wobei die ungehemmte Reaktion gleich 100 % gesetzt wurde) auf der y-Achse und der dekadische Logarithmus der Hemmstoffkonzentrationen auf der x-Achse aufgetragen. Die einzelnen Punkte wurden durch eine Regressionskurve miteinander verbunden und durch die Gleichung der Funktion der Kurve konnte die Inhibitorkonzentration berechnet werden, bei der nur noch 50% Oxygenasekapazität der ALOX vorhanden waren.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere

Um die ALOX15-Orthologen von ausgewählten Säugetierspezies hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften miteinander zu vergleichen, wurden die Enzyme in *E. coli* exprimiert. Für die Konstruktion der prokaryotischen Expressionsvektoren wurde Gesamt-RNA aus den Blutzellen verschiedener Säugetiere extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die ALOX15-cDNA unter Verwendung spezifischer Primer aus der Gesamtheit aller cDNA Moleküle durch PCR amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment mit einer Größe von ca. 2000 bp wurde in einen Klonierungsvektor ligiert und vervielfältigt. Daraufhin erfolgte die Umklonierung in einen bakteriellen Expressionsvektor (pET28b bzw. pET15b). Anschließend konnte das rekombinante Protein exprimiert werden. Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Lysatüberstand wurde als Enzymquelle genutzt. Für unsere Untersuchungen wurden die Orthologen der humanen ALOX15 verschiedener Säugetiere als katalytisch aktive his-tag-Fusionsproteinen exprimiert.

Zusammenfassung: Die rekombinanten Wildtyp-ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Kaninchen, Makaken, Schwein, Ratte und Maus konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Weiterhin wurden die Leu353Phe Mutante des murinen Enzyms und die Ile418Ala Mutante des humanen Enzyms exprimiert.

4.1.1 Etablierung eines HPLC Systems zur Analyse der ALOX15-Positionsspezifität

Um die enzymatische Aktivität der verschiedenen ALOX15-Orthologen zu quantifizieren und um ihre Produktmuster vergleichen zu können, wurden mit Aliquots der Lysatüberstände Aktivitätsassays durchgeführt, bei denen Arachidonsäure als Substrat verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurde die Menge der LOX-Produkte mittels HPLC quantifiziert, die während einer festgelegten Inkubationsperiode (1 min, 2 min, 5 min) gebildet wurden. Um die Peaks in den HPLC-Chromatogrammen den LOX-Produkten zuordnen zu können, wurde das Messsystem zunächst durch die Chromatographie authentischer HPLC-Standards für 5-HETE, 15-HETE und 12-HETE geeicht. Dabei sind die Retentionszeiten der LOX-Produkte unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen charakteristisch, sodass ein Vergleich der

Retentionszeiten der Substanzen einer Analyseprobe mit denen der Standardmischung eine Identifizierung der chemischen Zusammensetzung des Produktmusters erlaubt. In Abb. 18 ist das Umkehrphasenchromatogramm der Standardmischung abgebildet. Jeder Peak steht dabei für eine Hydroxyfettsäure. Auf der X-Achse ist die Retentionszeit in Minuten und auf der Y-Achse die Absorption der Hydroxyfettsäuren bei 235nm in mAU aufgetragen. 15-HETE zeigte mit ca. 6,5 Minuten die kürzeste Retentionszeit, dicht gefolgt von 12-HETE mit 7,5 Minuten und 5-HETE bei 9 Minuten. Die Peaks wurden bei einer Wellenlänge von 235 nm erfasst.

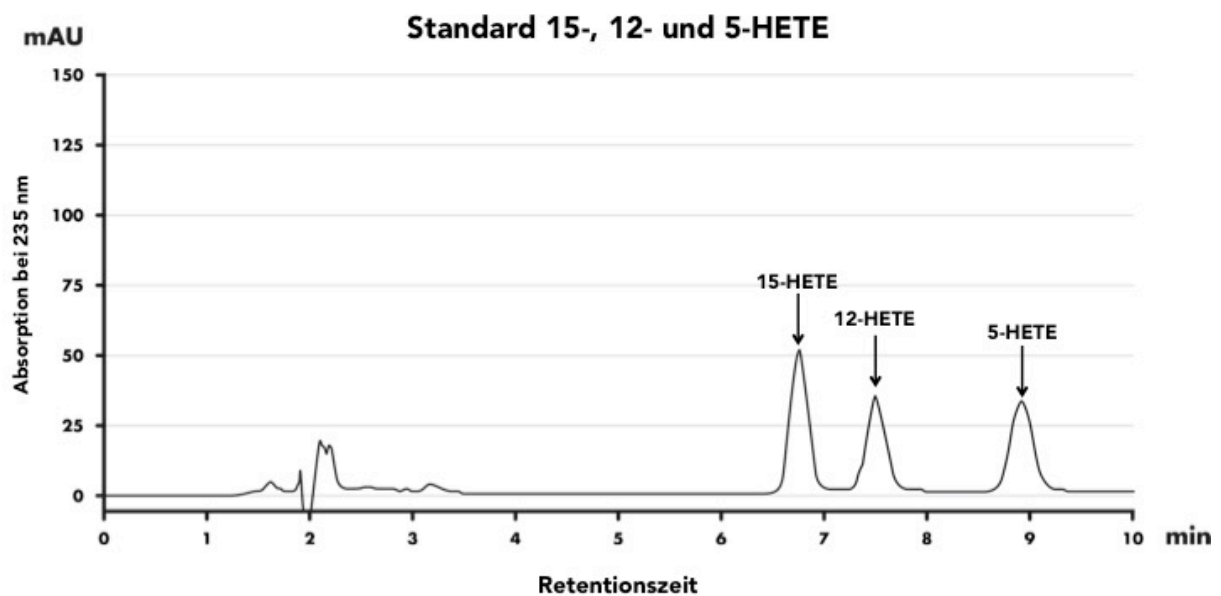


Abb. 18: RP-HPLC Chromatogramm der Standards von 15-, 12- und 5-HETE bei einer Wellenlänge von 235 nm. Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassung: Ein RP-HPLC System in dem die drei Projekt-relevanten HETE-Isomere (15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) getrennt voneinander quantifiziert werden können wurde nach Literaturangaben erarbeitet.

4.2 Enzymatische Charakterisierung

4.2.1 Positionsspezifität

Um die Positionsspezifität der ALOX15-Orthologen zu bestimmen, wurde ein Aktivitätsassay mit den Beispielenzymen humALOX15 und mouALOX15 durchgeführt, wobei Arachidonsäure als Substrat verwendet wurde. Für die 15-lipoxygenierende ALOX15 des Menschen wurde in der Produktmischung ca. 10 mal mehr 15-HETE als 12-HETE nachgewiesen (siehe Abb. 19). Im Chromatogramm der Reaktionsprodukte des humanen Enzyms zeigte sich nach ca. 7 Minuten ein großer Peak, der die Menge an 15-HETE repräsentiert. Dieser Peak wurde gefolgt von einem deutlich kleineren 12-HETE-Peak, der mit einer Retentionszeit von 7,5 min eluiert wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen zur Positionsspezifität der humanen ALOX15 überein (105).

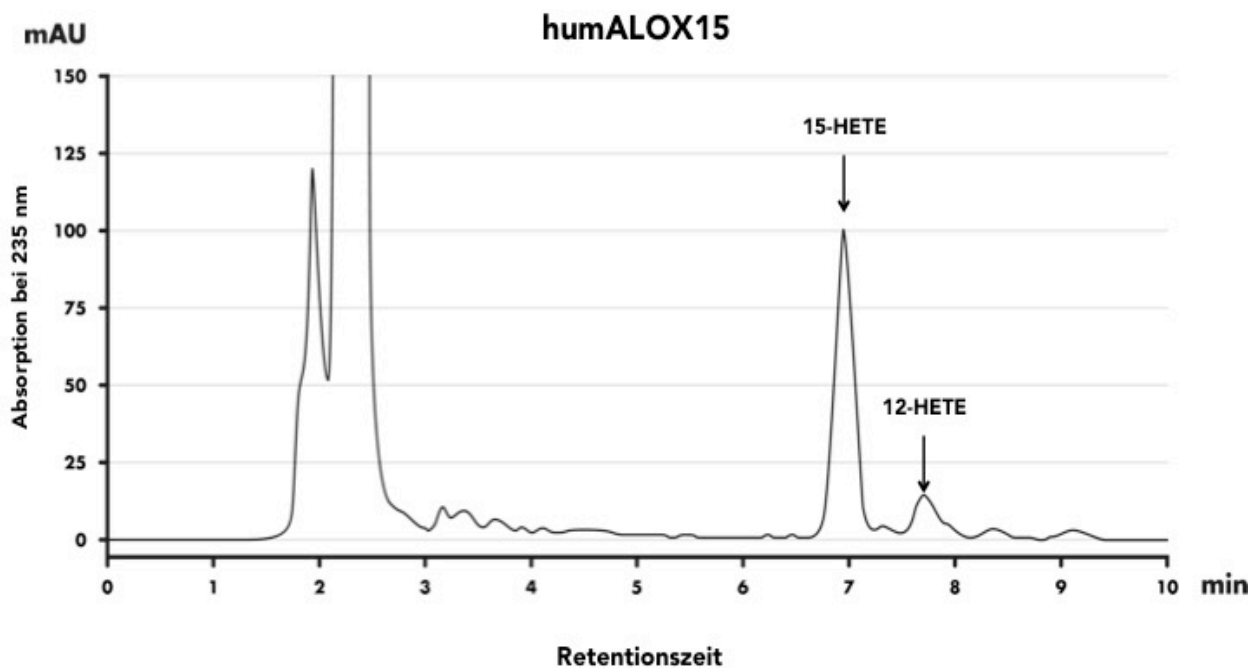


Abb. 19: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenasekapazität der humALOX15. 5 μ l des Lysatüberstandes der Expression der humanen ALOX15 wurde wie in den Methoden beschrieben zum Aktivitätstest eingesetzt. Die RP-HPLC Analyse wurde wie im Methodenteil angegeben durchgeführt.

Die ALOX15 der Maus gehört hingegen zu den 12-lipoxygenierenden Enzymen und produziert vorrangig 12-HETE. Dies lässt sich aus dem Chromatogramm in Abb. 20 ablesen, da der zweite Peak (7,5 Minuten) deutlich höher ist als der erste.

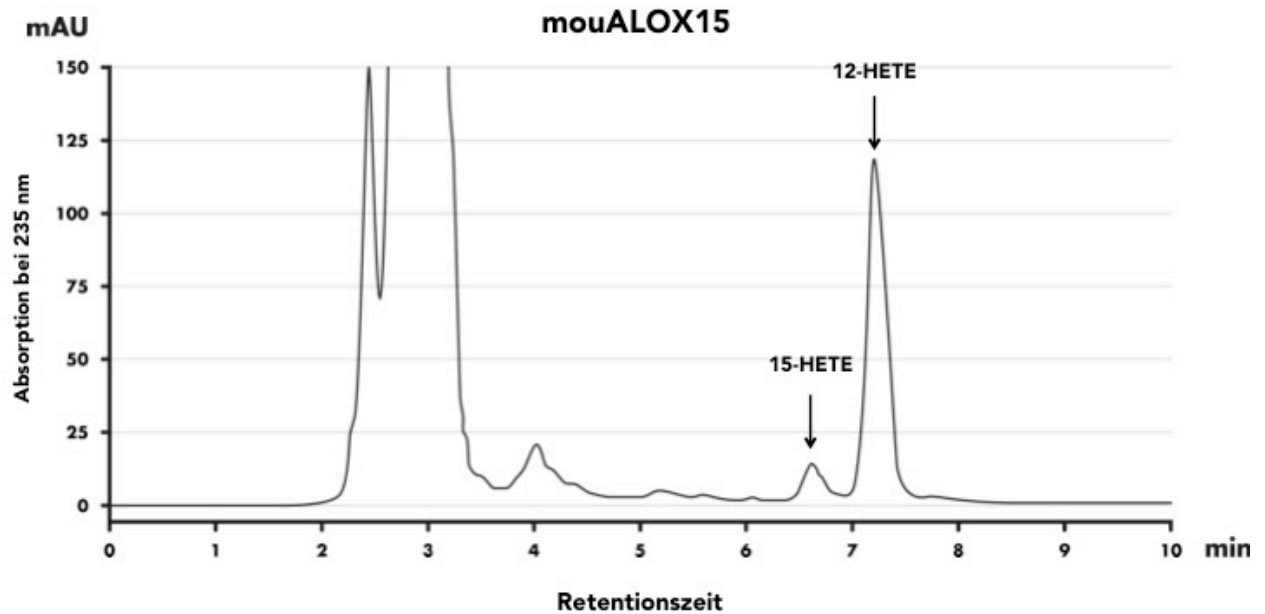


Abb. 20: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der mouALOX15. 5 µl des Lysatüberstandes der Expression der murinen ALOX15 wurde wie in den Methoden beschrieben zum Aktivitätstest eingesetzt. Die RP-HPLC Analyse wurde wie im Methodenteil angegeben durchgeführt.

In weiteren Aktivitätsassays wurden die Positionsspezifitäten der beiden Mutanten humALOX15-I418A und mouALOX15-L353F getestet. Entsprechend des Triadenkonzeptes der Positionsspezifität von ALOX15-Orthologen trägt die Ile418Ala Mutante der humALOX15 am Boden der Substratbindungstasche anstatt eines sperrigen Isoleucins ein kleines Alanin, was zu einer Vertiefung der Substratbindungstasche beim mutierten Enzym führen sollte. Deshalb kann das Substrat tiefer in die Tasche eintauchen und kommt mit seinem C10 dichter am Nichthämeisen zu liegen. Dadurch sollte sich die Positionsspezifität von einem 15-lipoxygenierenden zu einem 12-lipoxygenierenden Enzym ändern. Ebenso wandelt sich das 12-lipoxygenierende Mausezym durch Austausch des Leucins an der Stelle 353 gegen ein raumfüllendes Phenylalanin in ein 15-lipoxygenierendes Enzym um. Um diese Vorhersage zu bestätigen, wurde mit beiden mutierten Enzymen ein Aktivitätsassay mit Arachidonsäure als Substrat durchgeführt. Es zeigte sich für die I418A Mutante der humALOX15 eine vielfach höhere 12-HETE-Bildung als 15-HETE-Bildung. Die L353F Mutante hingegen produzierte mehr 15-HETE als 12-HETE (siehe Abb. 21 und Abb. 22). Diese Daten bestätigen die früher postulierten Veränderungen der Reaktionsspezifität des Enzyms durch die durchgeführte Mutation.

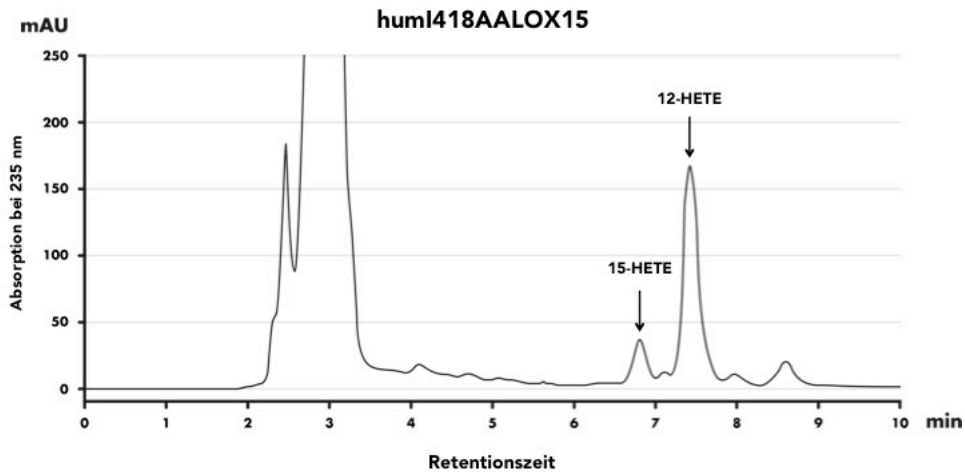


Abb. 21: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität huml418AALOX15. Aktivitätsassay und HPLC-Analyse wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. 5 μ l des Lysatüberstandes wurden als Enzymquelle eingesetzt.

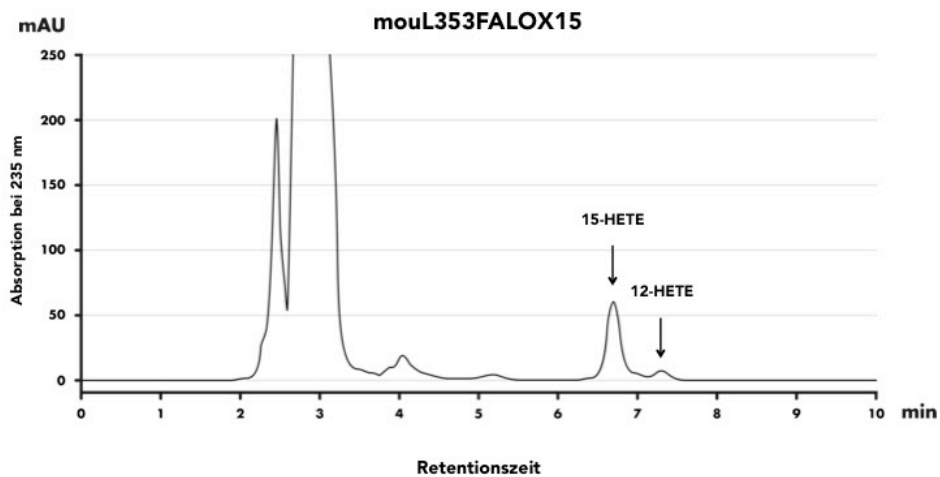


Abb. 22: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität mouL353FALOX15. Aktivitätsassay und HPLC Analyse wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. 5 μ l des Lysatüberstandes wurden als Enzymquelle eingesetzt.

Ähnliche Untersuchungen zur Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung wurden mit den ALOX15-Orthologen von acht verschiedenen Säugetierspezies durchgeführt (Tab. 2). Dazu wurden 5 μ l der Enzympräparationen (Lysatüberstände) mit 150 μ M Arachidonsäure in 0,5 ml PBS für 3 Minuten inkubiert. Die Mengen an gebildeten 12- und 15-H(p)ETE wurden mittels RP-HPLC ermittelt und sind hier tabellarisch zusammengestellt. Für jedes Enzym wurden je drei dieser Experimente durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Die Tabelle zeigt die Anteile der Hydroperoxyfettsäuren 15-HETE und 12-HETE an der Gesamtmenge oxidiertes Fettsäuren. Außerdem ist in der rechten Spalte das Verhältnis von 15-HETE zu 12-HETE angegeben. Aus der Tabelle wird die Positionsspezifität der rekombinanten

Proteine deutlich. Alle 15-lipoxygenierenden ALOX15-Spezies bilden weitaus mehr 15-HETE, die 12-lipoxygenierenden Orthologen bilden vor allem 12-HETE. Die exprimierten Enzyme zeigten die zu erwartenden Positionsspezifitäten.

Tab. 2: Arachidonsäureoxygenaseaktivität der ALOX15-Orthologen. Für die Aktivitätsassays wurden 5 µl des Lysatüberstandes der rekombinanten Expressionsansätze der ALOX15 Orthologen eingesetzt. In der Tabelle sind die relativen Anteile von 12-HETE und 15-HETE an den Gesamtproduktmengen und das Verhältnis von 15-HETE/12-HETE (Hauptprodukt und Nebenprodukt) angegeben.

| Spezies | Arachidonsäureoxygenaseaktivität in % | | |
|--------------------|---------------------------------------|------------|------------------------|
| | 15-HETE | 12-HETE | Verhältnis 15-/12-HETE |
| 15-lipoxygenierend | | | |
| Mensch | 90,5 ± 5,1 | 9,5 ± 1,1 | 9,5 |
| Schimpanse | 87,7 ± 5,9 | 12,2 ± 1,7 | 7,2 |
| Orang-Utan | 88,8 ± 2,3 | 11,2 ± 0,8 | 7,9 |
| Kaninchen | 95,5 ± 7,0 | 4,5 ± 0,6 | 22,8 |
| MausL353F | 90,3 ± 3,5 | 9,7 ± 0,6 | 9,3 |
| 12-lipoxygenierend | | | |
| Rhesusaffe | 2,3 ± 0,1 | 97,7 ± 3,2 | 0,02 |
| Schwein | 12,7 ± 0,5 | 87,3 ± 7,5 | 0,15 |
| Ratte | 19,9 ± 0,7 | 80,1 ± 3,5 | 0,25 |
| Maus | 10,1 ± 0,6 | 89,9 ± 2,4 | 0,11 |
| HumanI418A | 7,0 ± 1,3 | 93,0 ± 1,8 | 0,08 |

Zusammenfassung: Die rekombinant exprimierten ALOX15-Orthologen zeigen die Reaktionsspezifitäten, die aufgrund des Triadenkonzeptes aus ihrer Aminosäuresequenz abgeleitet werden konnte. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden für die getesteten ALOX15-Mutanten gezogen.

4.3 Substratspezifitätstestung

Lipoxygenasen sind in der Lage, verschiedene Polyenfettsäuren als Substrate zu verwenden. Die natürlicherweise in tierischen Geweben am häufigsten vorkommenden Polyenfettsäuren sind Linolsäure, Arachidonsäure, alpha- und gamma-Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Um die Substratspezifität der 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen zu vergleichen, wurden vier Enzyme mit gleichen Mengen Arachidonsäure und Linolsäure über drei Minuten inkubiert.

Tab. 3: Substratspezifitätstestung mit den Substraten Arachidonsäure und Linolsäure. Die relativen Anteile der beiden dominante Arachidonsäureoxygenierungsprodukte 12-HETE und 15-HETE sind dem dominanten Linolsäureoxygenierungsprodukt 13-HODE gegenübergestellt. Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Einzelwerte sind angegeben.

| Fettsäure Spezies | Produktbildung (%) | | |
|----------------------|--------------------|----------------|----------------|
| | AA | | LA |
| | 12-HETE | 15-HETE | 13-HODE |
| | 15-lipoxygenierend | | |
| Mensch | 6,4 \pm 1,6 | 55,1 \pm 8,7 | 38,5 \pm 0,8 |
| Schimpanse | 6,6 \pm 0,8 | 58,1 \pm 9,7 | 35,3 \pm 2,6 |
| | 12-lipoxygenierend | | |
| Rhesusaffe | 68,7 \pm 1,2 | 1,0 \pm 0,1 | 30,3 \pm 0,1 |
| Schwein | 54,8 \pm 0,1 | 2,4 \pm 0,1 | 42,8 \pm 0,1 |

Für die beide Subgruppen der ALOX15-Orthologen (15-lipoxygenierend vs. 12-lipoxygenierend) ergeben sich aus den in Tab. 3 zusammengestellten Daten folgende Schlussfolgerungen:

i) Linolsäure wird sowohl von 12- als auch von 15-lipoxygenierenden ALOX15 Orthologen zu 13-H(p)ODE oxygeniert. Es wurden nur Spuren an 9-H(p)ODE nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Linolsäureoxygenierungskapazität von 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen nachgewiesen werden.

ii) Wie aus den Voruntersuchungen erwartet werden konnte, produzieren die 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen vom Rhesusaffen und vom Schwein vor allem 12-H(p)ETE. Dies gilt entsprechend der hier ermittelten Daten auch dann, wenn eine andere Fettsäure (hier Linolsäure) im Aktivitätsassay anwesend ist. Im Gegensatz dazu bilden 15-lipoxygenierende Orthologe (Mensch und Schimpanse) mehr 15-H(p)ETE.

iii) Arachidonsäure wird unter diesen experimentellen Bedingungen gegenüber Linolsäure von allen ALOX15-Orthologen als Substrat bevorzugt. Diese Daten sind vor allem deshalb von biologischer Bedeutung, da unter physiologischen Bedingungen die selektive Erhöhung einer einzelnen Fettsäure bei Zellstimulation eher unwahrscheinlich ist. Bei Aktivierung der Phospholipase A2 kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen mehrerer freier Fettsäuren. Aus diesem Fettsäurepool können die ALOX15-Orthologen ihr bevorzugtes Substrat auswählen.

Zusammenfassung: ALOX15-Orthologen bevorzugen Arachidonsäure gegenüber Linolsäure als Substrat, wenn beide Fettsäuren in gleichen Mengen simultan zur Verfügung stehen. 15-lipoxygenierende ALOX15 Orthologe zeigen keine höhere Linolsäureoxygenaseaktivität als 12-lipoxygenierende Enzyme.

4.4 Membranoxygenierung

Für die ALOX15-Orthologen von Mensch (61), Kaninchen (106) und Schwein (60) wurde in früheren Untersuchungen gezeigt, dass diese Enzyme Membranlipide oxygenieren können. Ob die ALOX15-Orthologen der anderen Säugetierspezies dazu auch in der Lage sind, wurde bisher jedoch noch nicht tiefgehend erforscht. Dieses Experiment ist insofern von Bedeutung, als dass eine verbesserte Membranoxygenierungsfähigkeit von 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen diesen Enzymen einen evolutionären Vorteil verschaffen könnte und damit als Triebkraft für die Veränderung der Reaktionsspezifität im Rahmen der späten Säugetierentwicklung angesehen werden könnte.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Membranoxygenierungsaktivitäten der 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen des Menschen und des Schimpansen mit den entsprechenden Aktivitäten der 12-lipoxygenierenden Enzyme von Rhesusaffe und Schwein verglichen. Für diese Experimente wurden die Enzyme mit einer Präparation von Mitochondrieninnenmembranen (SMP) für fünf Minuten inkubiert und die dabei entstandenen oxygenierten Fettsäuren mittel HPLC quantifiziert. Als entscheidenden readout-Parameter wurde dabei der Oxygenierungsgrad der Membranlipide quantifiziert, der sich aus dem OH-PUFA/PUFA-Verhältnis der Membranlipide vor und nach der Inkubation der Enzyme mit den Biomembranen ergab. Die ermittelten Werte der OH-PUFA/PUFA-ratios wurden auf die eingesetzten Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten der Enzyme normalisiert. Werden Lipoxygenasen mit Biomembranen inkubiert, wird ein Teil der in den Membranen vorkommenden PUFAs zu OH-PUFAs oxygeniert. Werden viele PUFAs oxygeniert steigt der OH-PUFA/PUFA Quotient an. Diesen Quotienten kann man aus der Quantifizierung der OH-PUFAs und der dominanten PUFAs (Linolsäure, Arachidonsäure) berechnen.

Die Auswertung der durchgeführten Experimente zeigte, dass aus der Gesamtmenge an Polyenfettsäuren, die in den Modellmembranen enthalten sind, nur ein geringer Anteil von den ALOX-Isoformen oxygeniert wurde. Der weitaus größere

Anteil blieb nach der Inkubationszeit als nicht-oxidierte Fettsäuren zurück und konnte in der HPLC beim Verfolgen der Absorption bei 210 nm detektiert werden.

Abb. 23 zeigt die Chromatogramme des Membranoxygenaseassays der humALOX15. Die Chromatogramme wurden bei 210 nm (Quantifizierung der nicht-oxygenierten PUFAs) und bei 235 nm (Quantifizierung der OH-PUFAs) verfolgt. Das obere Chromatogramm zeigt bei 7,5 Minuten einen Peak, welcher der Menge an oxygenierten Fettsäuren entspricht, die von der humALOX15 während der Inkubationszeit gebildet wurden. Das Chromatogramm darunter zeigt bei einer Absorption von 210 nm den Anteil an nicht-oxygenierten Fettsäuren, in Form eines Peaks bei 25 Minuten. Dieser ist um ein vielfaches größer als der Anteil der Hydroxyfettsäuren (siehe auch Tab. 4). In der Abb. 24 sind die zwei Chromatogramme der Nichtenzym-Kontrolle des Membranoxygenaseassays zu sehen. Der bei einer Wellenlänge von 235 nm und einer Retentionszeit von 7,5 min nachweisbare Peak entspricht der Menge der oxygenierten Fettsäuren, die sich bereits vor der Inkubation der Membranen mit der humALOX15 im Ansatz befanden. Dieser Peak ist sehr viel kleiner, als der entsprechende Peak in Abb. 23. Dies beweist die Oxygenierung der Membranlipide durch die humALOX15. Die Menge an nicht-oxidierten Fettsäuren ist in der Nichtenzym-Kontrolle größer als in der humALOX15-Messung.

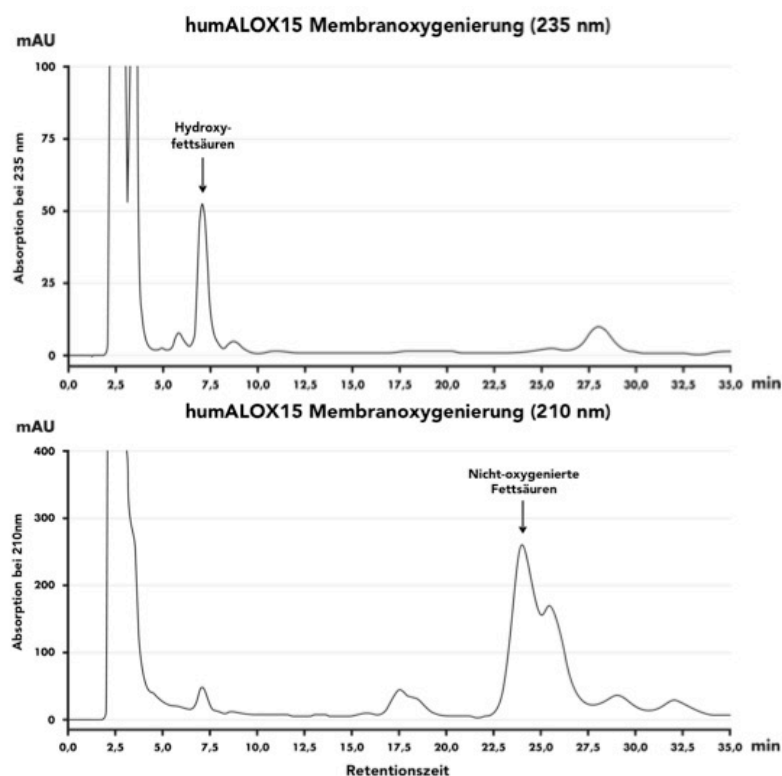


Abb. 23: Chromatogramm des Membranoxygenaseassays der humALOX15. Das obere Bild zeigt die Absorption bei 235 nm, das untere Bild zeigt die Absorption bei 210 nm.

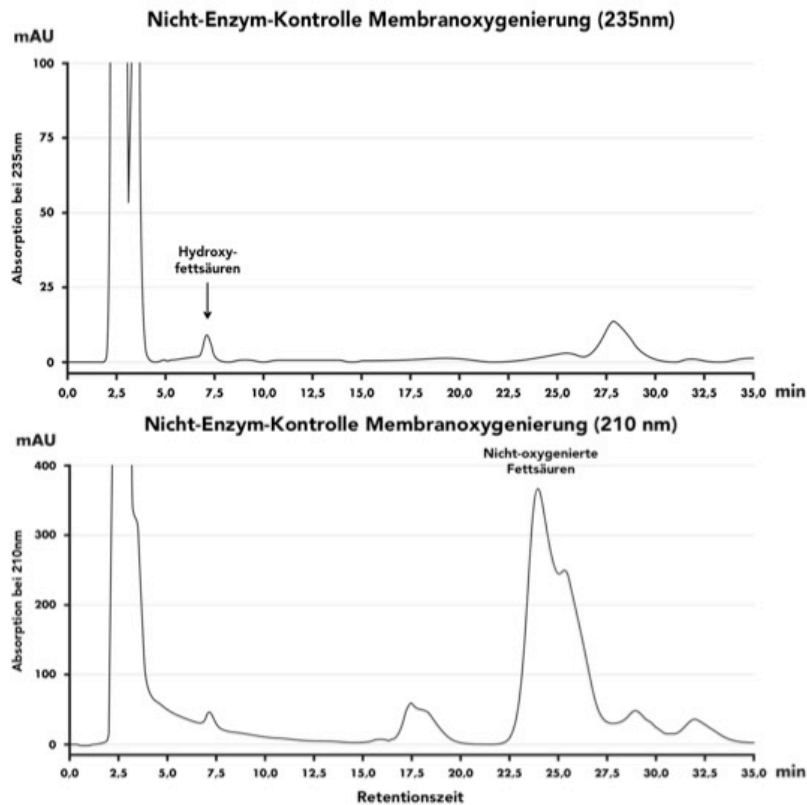


Abb. 24: Chromatogramm des Membranoxygenaseassays der nicht-Enzym-Kontrolle. Das obere Bild zeigt die Absorption bei 235 nm, das untere Bild zeigt die Absorption bei 210 nm.

In Tab. 4 wird der relative Anteil der oxygenierten Fettsäuren am Gesamtgehalt der Polyenfettsäuren angegeben. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der oxygenierten Fettsäuren an den Gesamtpolyenfettsäuren bei den getesteten ALOX15-Orthologen < 3 % liegt. Die humALOX15 oxygenierte lediglich 2,9 % aller Polyenfettsäuren, die in den Modellmembranen vorhanden waren. 97,1 % der Fettsäuren lagen nach der Inkubationszeit weiterhin als nicht-oxidierte Fettsäuren vor. Das Verhältnis von oxidierten Fettsäuren zu nicht-oxidierten Fettsäuren beträgt somit 1 : 34. Ähnliche Werte zeigte auch die 12-lipoxygenierende ALOX15 des Rhesusaffen. Die ALOX15-Orthologen des Schimpansen und des Schweins bildeten während der Inkubationszeit mit 1,2 % und 1,5 % geringere Mengen an oxygenierten Fettsäuren. Zusammengefasst ergaben sich in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen Membranoxygenierungskapazitäten von 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen.

Tab. 4: Relative Membranoxygenierungskapazität ausgewählter ALOX15-Orthologen. Die Membranoxygenaseaktivität der ausgewählten Enzyme wurde wie im Abschnitt Membranoxygenaseaktivität beschrieben analysiert und auf vergleichbare Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten normiert. Die Summe aus oxygenierten und nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren in einer Probe wurde 100 % gesetzt. Der prozentuale Anteil an oxygenierten Polyenfettsäuren ist ein geeignetes Maß für den Oxygenierungsgrad der Membranlipide.

| Spezies | Anteil von Fettsäurederivaten in den Membranlipiden (%) | | |
|------------|---|------------------------------------|----------|
| | Oxygenierte Polyenfettsäuren | Nicht-oxygenierte Polyenfettsäuren | Quotient |
| | 15-lipoxygenierend | | |
| Mensch | 2,86 | 97,14 | 1 : 34 |
| Schimpanse | 1,19 | 98,81 | 1 : 83 |
| | 12-lipoxygenierend | | |
| Rhesusaffe | 2,23 | 97,77 | 1 : 44 |
| Schwein | 1,49 | 98,51 | 1 : 66 |

Zusammenfassung: 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe besitzen keine höhere Membranoxygenaseaktivitäten als die 12-lipoxygenierenden Enzyme, wenn diese Enzymaktivität auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der ALOX15-Orthologen normalisiert wird.

4.5 Lipoxinsynthese

Dass ALOX15-Orthologe an der Biosynthese antiinflammatorischer und proresolutorischer Mediatoren beteiligt sind, ist seit geraumer Zeit bekannt (72). Ob sich die Lipoxinsyntheseaktivität von 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen unterscheidet, wurde hingegen noch nicht erforscht. Um dieser Frage nachzugehen, wurden fünf 12-lipoxygenierende (Rhesusaffe, Maus, Ratte, Schwein, humIle418Ala) und fünf 15-lipoxygenierende (Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Kaninchen, ratPhe353Leu) ALOX15-Orthologe exprimiert und ihre Lipoxinsyntheseaktivität quantifiziert. Als Substrate wurden dabei diejenigen Zwischenprodukte der Lipoxinsynthese verwendet, die entsprechend des klassischen Biosynthesemechanismus durch die ALOX5 hergestellt werden können. Dies sind i) 5(S)-HETE als reduziertes Oxygenierungsprodukt der Arachidonsäure durch die ALOX5 und ii) 5(S),6(R/S)-DiHETE, das durch Hydrolyse von LTA₄ entsteht. LTA₄ wird durch enzymatische Dehydratisierung von 5S-HpETE gebildet und diese Reaktion wird *in vivo* ebenfalls von der ALOX5 katalysiert.

Für die Lipoxinsyntheseaktivität der verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden die Lipoxygenasen zunächst mit je 30 μM 5(S)-HETE über zehn Minuten inkubiert und danach die Bildung von Lipoxin A und Lipoxin B per RP-HPLC quantifiziert. Dabei wurde dem Reaktionsansatz 3 μM Linolsäure zugesetzt. Diese Fettsäure wird zunächst zu 13S-HpODE umgewandelt, was als essentieller Aktivator der ALOX15-Orthologen fungiert. Nach der abgelaufenen Reaktion wurden die Peroxide durch die Zugabe von Natriumborhydrid reduziert und anschließend in einem geeigneten RP-HPLC System analysiert, wobei die Chromatogramme bei 300 nm verfolgt wurden. Zur Eichung des chromatographischen Systems wurden kommerzielle Standards von LxA₄ und LxB₄ analysiert. Für die Bestimmung der Lipoxinsyntheseaktivität der ALOX15-Orthologen wurde die Bildung von LxA₄ und LxB₄ durch die verschiedenen ALOX15-Orthologen quantifiziert und anschließend auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität normalisiert. Danach wurde die normalisierte Lipoxinsyntheseaktivität der humanen ALOX15 100% gesetzt und die Aktivitäten der anderen Orthologen relativ zu diesem Wert berechnet (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Relative Lipoxinsyntheseaktivität von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies. Die Lipoxinsyntheseaktivitäten der verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben quantifiziert. Dafür wurde die Lipoxinbildung innerhalb der Inkubationsperiode auf die Arachidonsäureoxygenaseaktivität des jeweiligen Enzyms bezogen. Dieser Wert der humanen ALOX15 wurde 100 % gesetzt. Die entsprechenden Werte der anderen ALOX15-Orthologen wurden relativ zum humanen Enzym berechnet.

| Spezies | 15-/12-HETE-Verhältnis | Relative Lipoxinsyntheseaktivität in % | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|
| | | 5-HETE als Substrat | 5,6-DiHETE als Substrat |
| 15-lipoxygenierend | | | |
| Mensch | 8,1 | 100,0 | 100,0 |
| Schimpanse | 8,1 | 118,0 | 145,8 |
| Orang-Utan | 8,1 | 172,2 | 105,6 |
| Kaninchen | 24,0 | 39,5 | 108,6 |
| ratL353F | 13,3 | 197,3 | 262,5 |
| Mittelwert \pm SD | 12,3 \pm 6,9 | 125,4 \pm 62,1 | 144,5 \pm 68,4 |
| 12-lipoxygenierend | | | |
| Makake | 0,01 | 25,7 | 19,9 |
| Maus | 0,03 | 36,1 | 1,5 |
| Ratte | 0,26 | 8,4 | 0,0 |
| Schwein | 0,04 | 35,4 | 61,1 |
| huml418A | 0,11 | 29,2 | 2,1 |
| Mittlewert \pm SD | 0,09 \pm 0,10 | 27,0 \pm 11,2 | 17,1 \pm 25,9 |

Die Tab. 5 zeigt, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe bis zu fünffach höhere Lipoxinsyntheseraten verglichen mit 12-lipoxygenierenden Lipoxygenasen aufweisen ($p < 0,01$), wenn 5S-HETE als Substrat verwendet wird. Die 15-

lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen zeigen mit Ausnahme des Kaninchens eine Lipoxinsyntheserate, die über der des humanen Enzyms liegt. Die 12-lipoxygenierenden Enzyme hingegen erreichen lediglich Werte von 8-36 %. Weiterhin wurde ein alternativer Synthesemechanismus für die Lipoxinbiosynthese getestet. Dieser beruht auf der Umwandlung von Arachidonsäure zu Leukotrien A₄ (5,6-Epoxy-7,9,11,14-icosatetraensäure), das *in vitro* weiter zu den Leukotrienen B₄ oder C₄ verstoffwechselt werden kann. Alternativ kann Leukotrien A₄ jedoch auch durch Epoxidhydrolyse zu 5S,6(R/S)-DiHETE umgewandelt werden. Die Produkte dieser Hydrolyse können anschließend sowohl durch 12-, als auch durch 15-lipoxygenierende ALOX-Isoformen zu LxA₄-Isomeren oxygeniert werden. Um dieses Experiment durchzuführen wurden die rekombinanten ALOX15-Orthologen mit einer 1 : 1 Mischung aus 5(S),6(S)- und 5(S),6(R)-DiHETE (Endkonzentration 30 µM) über zehn Minuten inkubiert und die Bildung von Lipoxin A-Isomeren mittels RP-HPLC quantifiziert. Abb. 25 zeigt die Chromatogramme der Lipoxinsynthese mit 5(S),6(R/S)-DiHETE als Substrat. In Chromatogramm A, welches die Analyse eines authentischen Standards von Lipoxin A₄ darstellt, ist ein Absorptionspeak nach ungefähr 13 Minuten zu sehen, wenn das Chromatogramm bei 300 nm aufgezeichnet wird. Das Retentionsverhalten von Lipoxin B₄ im gleichen chromatographischen System ist in Chromatogramm B wiedergegeben. Dieses Lipoxinisomer wird nach ca. 10 min von der Säule eluiert. Die Chromatogramme C und D zeigen die Ergebnisse der Lipoxinsyntheseaktivitäten der humanen und murinen ALOX15. Hier ist deutlich ein hoher Peak im Chromatogramm der humALOX15 zu erkennen, der dem gebildeten Lipoxin A entspricht. Chromatogramm D zeigt, dass die murine 12-lipoxygenierende ALOX15 nur in sehr geringem Maße Lipoxine bildet. In Abb. 25 E werden die UV-Spektren der konjugierten Tetraene dargestellt, die von der humanen ALOX15 gebildet wurden.

Die UV-Spektren wurden zu den drei Zeitpunkten a, b und c während des chromatographischen Durchlaufs online aufgezeichnet, die in Abb. 25 C eingezeichnet sind. Es ist zu erkennen, dass eine Mischung verschiedener konjugierter Tetraen-Isomere mit lokalen Absorptionsmaxima bei 289 nm, 301 nm und 316 nm gebildet wurde. Diese Absorptionsmaxima sind auf die Elektronen des konjugierten Tetraensystems zurückzuführen.

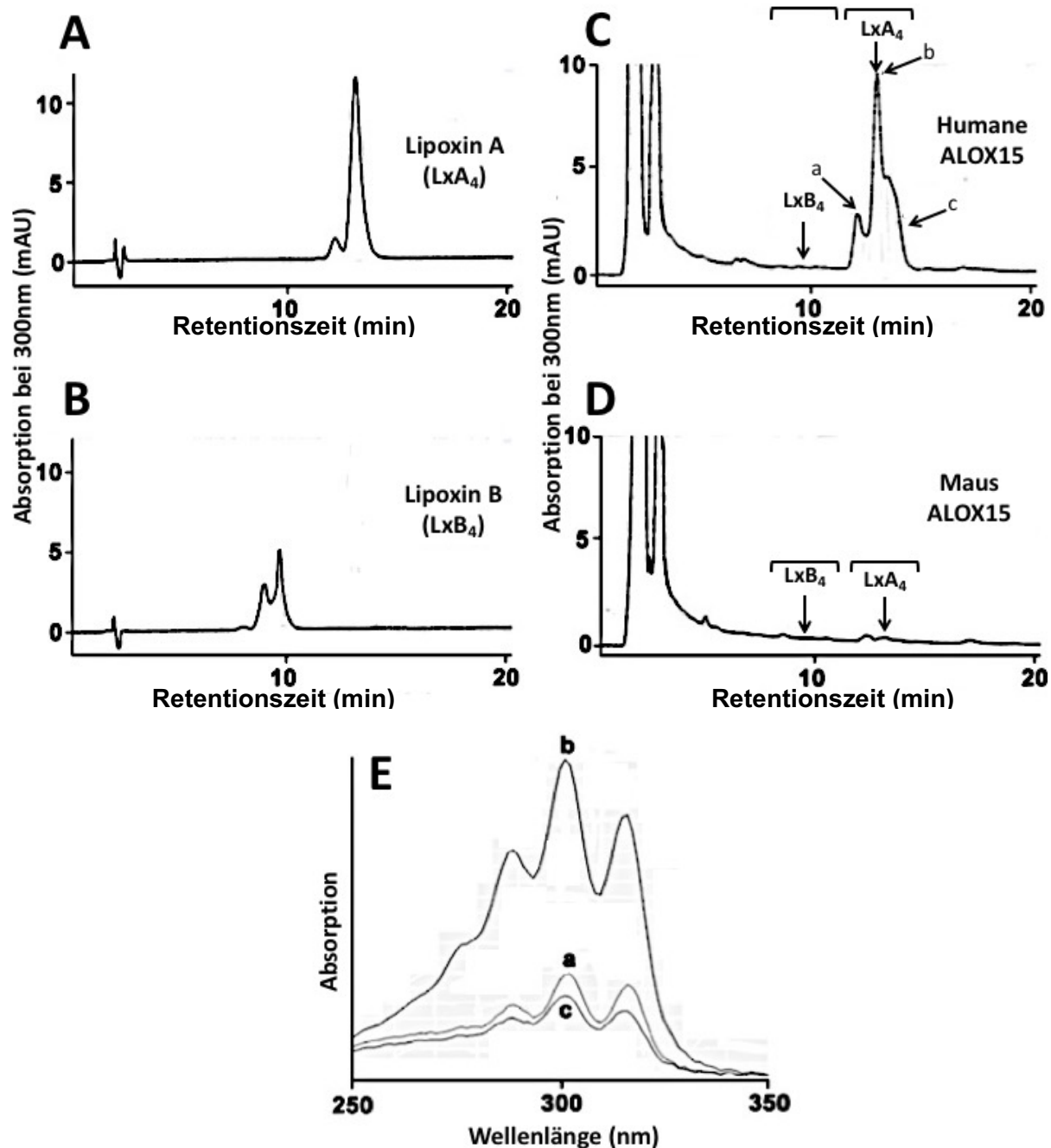


Abb. 25: Lipoxinsyntheseaktivität der ALOX15-Orthologen von Mensch und Maus. A) Authentischer Standard von LxA₄. B) Authentischer Standard von LxB₄. C) Lipoxinsyntheseaktivität der humanen ALOX15 mit 5(S),6(S/R)-DiHETE als Substrat. D) Lipoxinsyntheseaktivität der murinen ALOX15 (5(S),6(S/R)-DiHETE als Substrat. Zur Quantifizierung der Lipoxinsyntheseaktivität der verschiedenen Säuger-ALOX15-Orthologen wurden alle Peaks, die bei 300 nm absorbierten und im Lipoxinzeitfenster eluiert wurden (durch die Klammern über den Graphen kenntlich gemacht) quantifiziert. E) Vergleich der UV-Spektren verschiedener Lipoxinisomere, die von der humanen ALOX15 gebildet wurden.

Zusammenfassung: 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe zeigen eine deutlich höhere Lipoxinsyntheseaktivität als 12-lipoxygenierende Enzyme. Wird 5-HETE als Substrat eingesetzt, bilden die 15-lipoxygenierenden Enzyme annähernd fünfmal mehr Lipoxine. Wird 5,6-DiHETE als Substrat verwendet, kommt es zu einer fast neunfach höheren Lipoxinbildung.

4.6 Wirkung beschriebener LOX-Hemmstoffe auf ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere

4.6.1 Isoform- und Orthologspezifität von LOX-Hemmstoffen

Neben gentechnisch veränderten Mäusen sind Isoform-spezifische LOX-Hemmstoffe wertvolle Forschungswerkzeuge, um die Rolle der verschiedenen LOX-Isoformen in komplexen biologischen Systemen (z.B. Krankheitsmodellen) zu charakterisieren. Zwar existieren in der Literatur mehrere Berichte zu Isoform-spezifischen Hemmstoffen der humanen ALOX15 (107), doch wurde die Isoformspezifität nur gegen ausgewählte humane LOX-Isoformen (z.B. gegen ALOX5, ALOX12 und ALOX15B, nicht aber gegen ALOX12B oder ALOXE3) getestet. Weiterhin waren die verwendeten Testsysteme nicht immer strikt vergleichbar. So wurde z.B. die Hemmwirkung (IC_{50}) einer Substanz gegen die gereinigte ALOX15 des Kaninchens bestimmt und dieser Wert dann mit der IC_{50} der humanen ALOX5 verglichen, die in einem zellulären Aktivitätsassay ermittelt wurde.

Ein bisher weitgehend vernachlässigter Parameter bei der Charakterisierung von LOX-Hemmstoffen ist deren Orthologspezifität (Speziesspezifität). Dabei geht es vor allem darum herauszufinden, ob eine bestimmte Substanz, welche z.B. als Hemmstoff der humALOX15 oder der humALOX5 identifiziert wurde, auch die entsprechenden Orthologen anderer Säugetiere hemmt. Hierbei sind vor allem die Orthologen von Maus und Ratte bedeutsam, da diese Nagetiere häufig als Labortiere genutzt werden. Weil die Reaktionsspezifitäten der ALOX15-Orthologen des Menschen auf der einen Seite (Arachidonsäure-15-lipoxygenierend) und Maus und Ratte (Arachidonsäure-12-lipoxygenierend) auf der anderen Seite, unterschiedlich sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch die Hemmstoffsensitivitäten voneinander unterscheiden. Das Problem der Orthologspezifität von LOX-Hemmstoffen wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Gregus et al. deutlich (108). In diesen Untersuchungen wurden die LOX-Isoformen der Ratte in HEK-Zellen exprimiert und die Hemmaktivität bereits beschriebener LOX-Hemmstoffe auf die verschiedenen Isoformen getestet. Dabei ergab sich, dass 10 μ M PD146176 die ratALOX15b hemmte, die ratALOX15 jedoch nur minimal einschränkte. Als Hemmstoff der rabALOX15 und der humALOX15 wurde dieser Hemmstoff jedoch bereits identifiziert (108). Diese Beobachtung könnte damit zusammenhängen, dass die ALOX15-Orthologen von

Kaninchen und Mensch 15-lipoxygenierende Enzyme sind, während die ratALOX15 ähnlich wie das entsprechende Mausezym 12-lipoxygenierend wirkt.

Um die Orthologspezifität (Speziesspezifität) verschiedener in der Literatur beschriebener LOX-Inhibitoren zu testen und um eine mögliche Korrelation zur Reaktionsspezifität der entsprechenden Enzyme herzustellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hemmaktivitäten von zwölf in der Literatur beschriebenen LOX-Hemmstoffen (15-Lipoxygenaseinhibitor-1, 4-[[[(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]amino]-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698), 4-Nitrocatechol, Baicalein, 5,8,11,14-Eicosatetraensäure, Epigallocatechingallat, Salicylhydroxamsäure, Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, Nordihydroguaiarsäure) auf 15- (Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Kaninchen) und 12-lipoxygenierende (Schwein, Rhesusaffe, Ratte, Maus) ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies getestet. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der Hemmstoffe mit den entsprechenden rekombinanten Enzymen (bakterielle Lysatüberstände) für fünf Minuten in 0,5 ml PBS vorinkubiert und die LOX-Reaktion durch Zugabe von Arachidonsäure als LOX-Substrat (150 μ M Endkonzentration) gestartet. Nach drei Minuten Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumborhydrid, 50 μ l Essigsäure und 0,5 ml Methanol gestoppt. Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert und Aliquots des Überstandes wurden zur Quantifizierung der entstandenen LOX-Produkte mittels RP-HPLC analysiert. Die ermittelten Restaktivitäten (Produktbildung in Anwesenheit der Hemmstoffe in % der Produktbildung des ungehemmten Enzyms) wurden dann in einer Dosis-Wirkungskurve (halblogarithmische Darstellung) zusammengefasst und die Halbhemmungskonzentrationen (IC_{50} , Hemmstoffkonzentration die zur 50%-igen Hemmung der Enzyme nötig ist) ermittelt. Hemmstoffe mit geringen IC_{50} -Werten weisen eine hohe Hemmeffizienz auf, während Hemmstoffe mit hohen IC_{50} -Werten ineffizient sind. Um eine mögliche Spezifitätsänderungen der Lipoxygenasen verursacht durch die Hemmstoffe zu erkennen, wurden die Verhältnisse von Hauptprodukt zu Nebenprodukt berechnet und miteinander verglichen.

4.6.2 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Nordihydroguaiarsäure (NDGA)

NDGA ist ein natürliches Produkt und wirkt als Standardhemmstoff für Lipoxygenasen (73). Für die humane ALOX15 wurde eine detaillierte Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 26) aufgenommen, in die drei unterschiedliche experimentelle Serien eingegangen sind. Diese zeigt einen klassischen sigmoiden Verlauf. Eine IC_{50} von 3,5 μ M konnte aus der Dosis-Wirkungs-Kurve abgelesen werden.

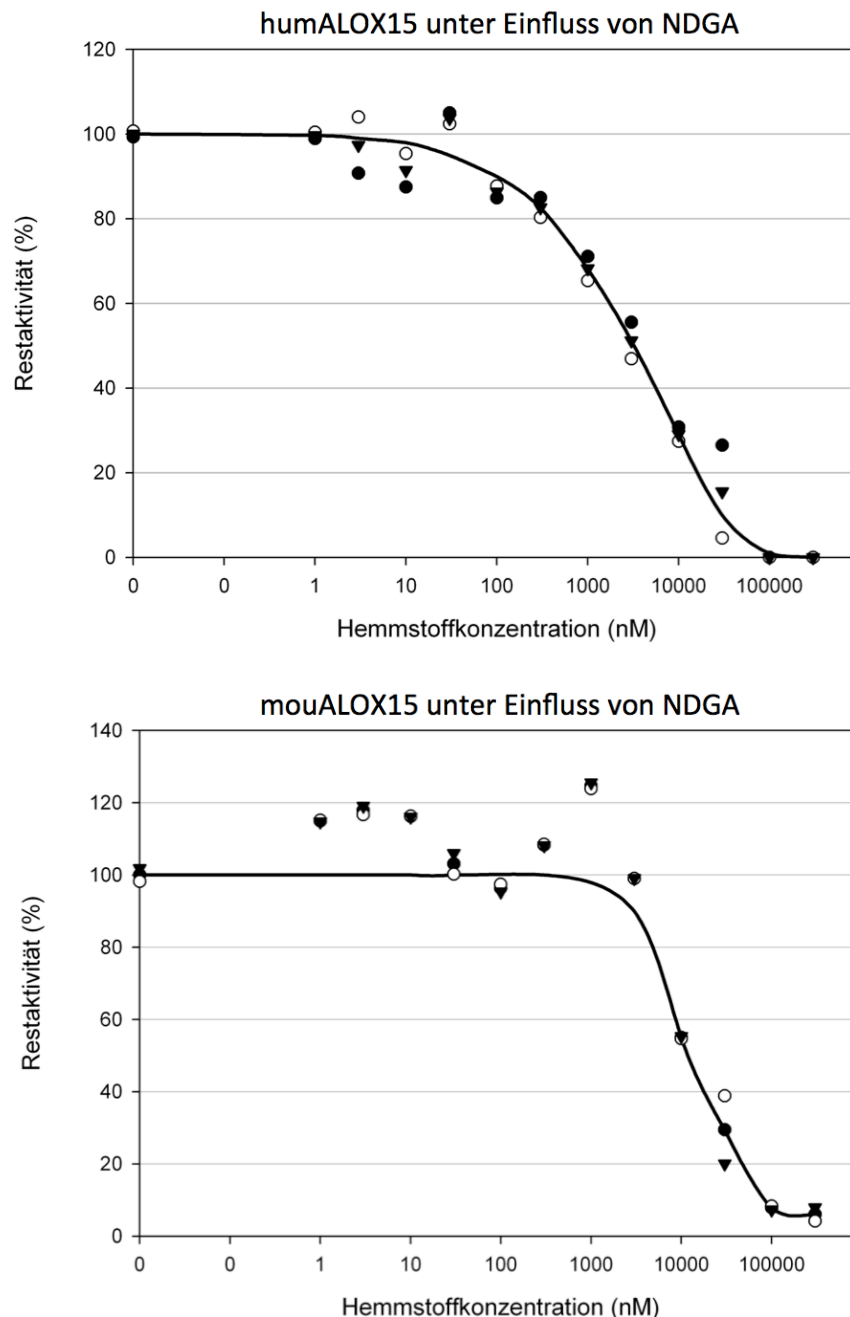


Abb. 26: Einfluss von NDGA auf die ALOX15 Orthologen von Mensch und Maus. Die Titrationskurven wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt. Die drei verschiedenen Messserien sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet.

Für das Mausenzym wurde eine ähnliche Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Hier zeigt sich, dass die Kurve erst bei höheren Hemmstoffkonzentrationen in den steil abfallenden Teil übergeht (siehe Abb. 26). Auch hier gingen drei separate experimentelle Serien in die Dosis-Wirkungs-Kurve ein. Die ermittelte IC₅₀ liegt hier bei 11,7 µM. Bei der mouALOX15 konnten wir bei geringen Hemmstoffkonzentrationen konsistent eine Aktivierung des Enzyms (bis zu 20 % der Aktivität in Abwesenheit von Hemmstoff) beobachten. Die Ursachen für diese Aktivierung sind unklar und wurden im Rahmen der Arbeit nicht näher untersucht. Es handelt sich jedoch nicht um einen Lösungsmittelleffekt, was durch entsprechende Kontrollinkubationen (Lösungsmittelkontrollen) ausgeschlossen werden konnte. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ermittelten IC₅₀-Werte für alle getesteten Enzyme sind in der Tab. 6 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass NDGA ein sehr potenter LOX-Hemmstoff ist und dass keine systematischen Unterschiede in der Hemmaktivität zwischen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen nachweisbar waren. Die ALOX15-Orthologen des Schimpansen (15-lipoxygenierend) und Ratte (12-lipoxygenierend) sind besonders empfindlich gegen NDGA und besitzen IC₅₀-Werte im niedrigen nanomolaren Bereich (20 nM, 10 nM).

Tab. 6: Mittlere inhibitorische Konstanten (IC₅₀) der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von NDGA. Titrationskurven für die verschiedenen ALOX15 Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC₅₀-Werte wurden graphisch ermittelt.

| ALOX15-Spezies | IC ₅₀ (in µM) |
|--------------------|--------------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 3,51 |
| Schimpanse (chi) | 0,02 |
| Orang-Utan (pon) | 0,91 |
| Kaninchen (rab) | 0,91 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Makake (mac) | 0,18 |
| Schwein (pig) | 0,89 |
| Ratte (rat) | 0,01 |
| Maus (mou) | 11,70 |

Zusammenfassung: NDGA ist ein guter Hemmstoff für alle getesteten ALOX15-Orthologen. Die ermittelten IC₅₀-Werte variieren zwischen 0,01 µM (Ratte) und 11,7 µM (Maus). Die humALOX15 zeigt eine IC₅₀ von 3,51 µM. Es gibt keine Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und der Hemmstoffsensitivität gegenüber NDGA.

4.6.3 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA)

Acetylenanaloga von mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind seit langem als Inhibitoren von fettsäuremetabolisierenden Enzymen wie Desaturasen, Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen bekannt (109). Theoretisch sollten Acetylenfettsäuren aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Arachidonsäure alle LOX-Isoformen hemmen, die diese Fettsäure als Substrat oxygenieren. In der Praxis konnte jedoch eine gewisse Selektivität der Hemmwirkung gezeigt werden. So inhibiert ETYA zwar 12- und 15-lipoxygenierende ALOX-Isoformen, die humane ALOX5 wird jedoch nicht gehemmt (110).

Tab. 7: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von ETYA. Titrationskurven für die verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC₅₀-Werte wurden graphisch ermittelt.

| ALOX15-Spezies | IC ₅₀ (in µM) |
|--------------------|--------------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 0,01 |
| Schimpanse (chi) | 0,002 |
| Orang-Utan (pon) | 0,011 |
| Kaninchen (rab) | 0,04 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Makake (mac) | 0,02 |
| Schwein (pig) | 0,005 |
| Ratte (rat) | 0,01 |
| Maus (mou) | 12,59 |

ETYA fungiert als Acetylenfettsäure für Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen als Suizidsubstrat (76). Unter unseren experimentellen Bedingungen wurden alle ALOX15-Orthologen durch ETYA gehemmt. Die IC₅₀-Werte unterschieden sich jedoch sehr deutlich voneinander. Für die ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Orang-Utan, Kaninchen, Makake, Schwein und Ratte wurden IC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich bestimmt. Für das Mausenzym konnte jedoch nur ein IC₅₀-Wert von 13 µM ermittelt werden (Tab. 7).

Abb. 27 zeigt als Beispieldarstellung die Chromatogramme der Hemmstofftestung von ETYA auf die humALOX15. Das obere Bild (A) spiegelt dabei die hemmstofffreie Kontrollmessung wider. Dieser Wert wurde als Ausgangsaktivität (100 %

Restaktivität) definiert. Im mittleren Bild (B) verringert sich der Peak mit der Retentionszeit von 7 Minuten, der für das gebildete 15-HETE steht, drastisch, sodass von einer gehemmten ALOX-Aktivität ausgegangen werden muss. Im unteren Bild ist bei 10 μM ETYA im Inkubationsansatz kaum noch 15-HETE-Bildung nachweisbar. Damit wurde gezeigt, dass die humane ALOX15 durch ETYA nahezu vollständig gehemmt werden kann.

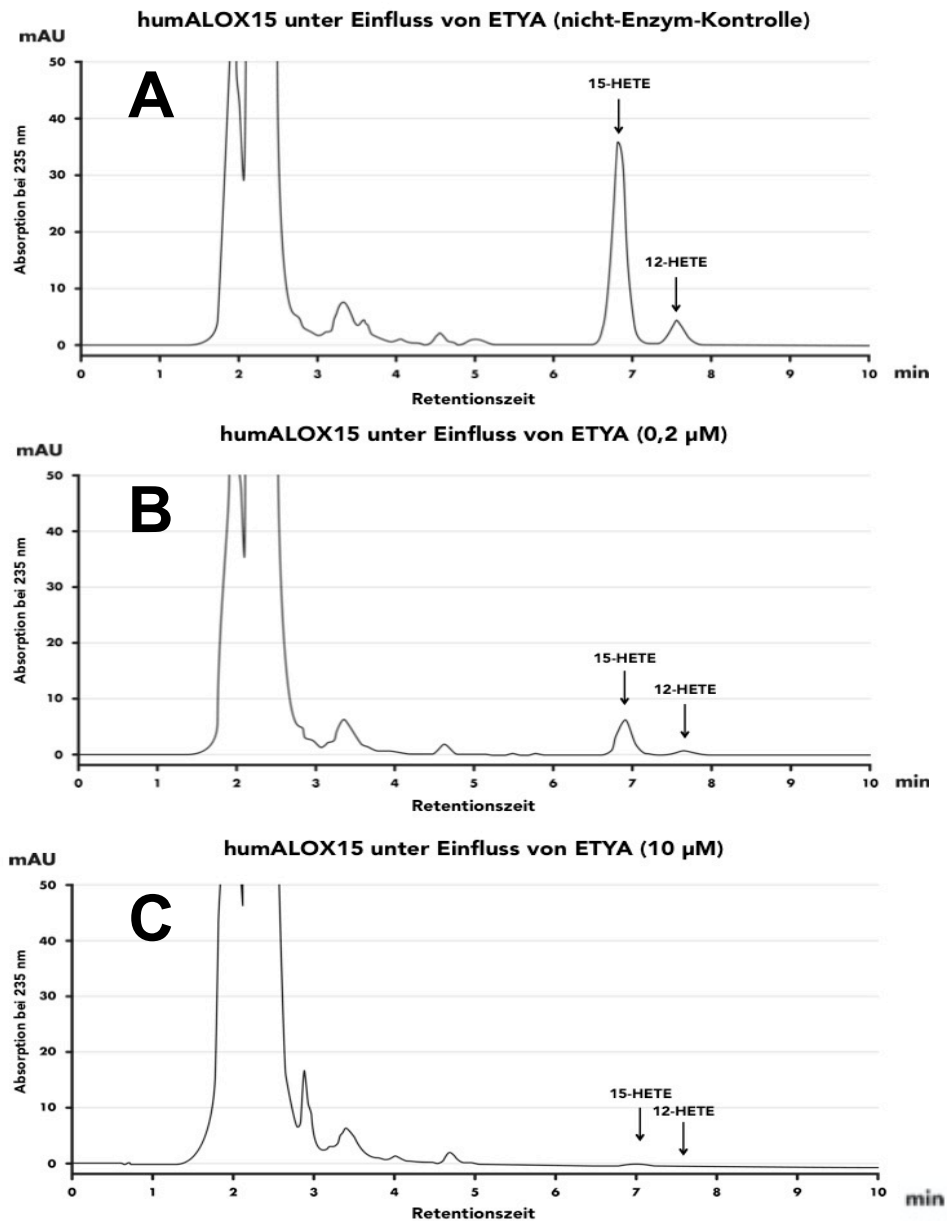


Abb. 27: Hemmstofftestung von ETYA für die humALOX15. Das oberste Bild (A) zeigt die hemmstofffreie Kontrollmessung. Das mittlere Bild (B) zeigt die Restaktivität bei Einsatz von 0,2 μM ETYA. Das untere Bild zeigt die Restaktivität bei Einsatz von 10 μM ETYA.

Zusammenfassung: ETYA ist ein guter Hemmstoff für alle getesteten ALOX15-Orthologen. Die ermittelte IC_{50} -Werte variieren zwischen 2 nM (Schimpanse) und 13 μ M (Maus). Die humALOX15 zeigt eine IC_{50} von 0,01 μ M. Es gibt keine Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und der Hemmstoffsensitivität gegenüber ETYA.

4.6.4 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Baicalein (BCC)

Baicalein gehört zu den Flavonen und wurde ursprünglich aus den Wurzeln der *Scutellaria baicalensis* isoliert. Es wurde festgestellt, dass Baicalein in Tumorzellen von Mamma-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinomen eine Apoptose induziert. Die Hemmwirkung des Baicaleins auf ALOX-Isoformen beruht auf der direkten Bindung des catecholischen Teils des Baicaleins an das Eisen im aktiven Zentrum. Der IC_{50} -Wert des Baicaleins gegenüber der rekombinanten humALOX15 wurden von Deschamps et al. mit 1,6 μ M bestimmt (80). Für die aufgereinigte native Kaninchen-ALOX15 bestimmten Sadik et al. einen IC_{50} -Wert von 1,0 μ M (111).

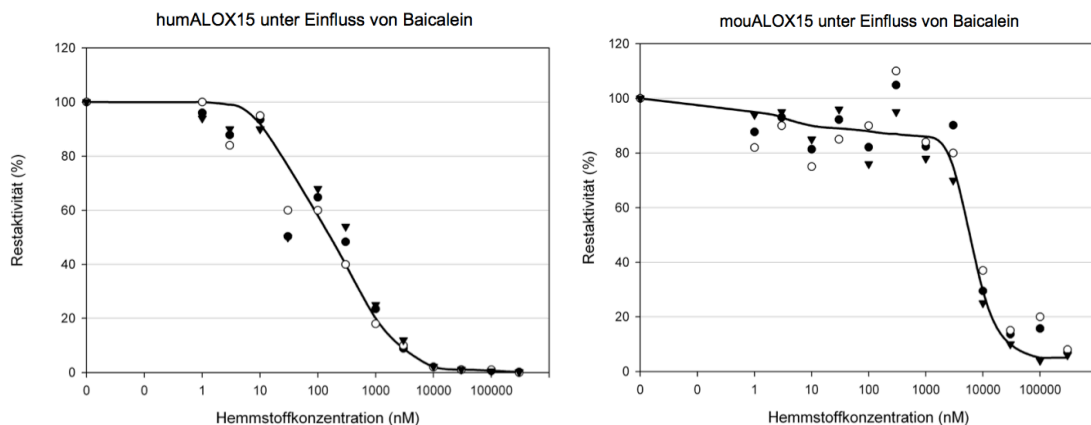


Abb. 28: Einfluss von Baicalein auf die humane und die murine ALOX15. Die Titrationskurven für die beiden ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC_{50} -Werte wurden graphisch ermittelt. Die drei verschiedenen Messserien, die für jedes Enzym durchgeführt wurden, sind als verschiedene Symbole dargestellt.

Die Titrationskurven der humanen und der murinen ALOX15 in Anwesenheit von Baicalein sind in Abb. 28 dargestellt. Aus dem Verlauf dieser Kurven kann geschlossen werden, dass die Titrationskurve der murinen ALOX15 gegenüber dem humanen Enzym deutlich nach rechts verschoben ist. Diese Verläufe deuten darauf hin, dass das humane Enzym deutlich sensitiver gegenüber dem Hemmstoff ist als das

murine ALOX15-Ortholog. Diese Schlussfolgerung spiegelt sich auch bei der Zusammenstellung der IC₅₀-Werte (Tab. 8) wieder.

Tab. 8: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von Baicalein. Die Titrationskurven für die verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC₅₀-Werte wurden graphisch ermittelt.

| ALOX15-Spezies | IC ₅₀ (in µM) |
|--------------------|--------------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 0,13 |
| Schimpanse (chi) | 0,02 |
| Orang-Utan (pon) | 0,23 |
| Kaninchen (rab) | 1,78 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Makake (mac) | 0,18 |
| Schwein (pig) | 0,26 |
| Ratte (rat) | 0,01 |
| Maus (mou) | 8,26 |

Die für die Kaninchen-ALOX15 bestimmte IC₅₀ von 1,78 µM stimmt ungefähr mit dem von Sadik ermittelten Wert (1,0 µM) überein (111). Die menschliche Lipoxygenase wurde jedoch in diesem Versuchsaufbau deutlich stärker gehemmt, als das bisher gemessen wurde. Mit 0,13 µM ist die IC₅₀ zehnmal geringer als der von Deschamps et al. ermittelte Wert von 1,6 µM (80). Die molekularen Ursachen für diesen Unterschied in der Baicaleinsensitivität wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Sie könnten allerdings auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (andere Enzympräparation, andere Substratkonzentration, andere Inkubationsbedingungen) zurückzuführen sein (siehe Kap. 5.5.3).

Vergleicht man die Sensitivität der unterschiedlichen ALOX15-Isoformen mit ihrer Reaktionsspezifität lässt sich keine Korrelation nachweisen. Es existiert also kein statistischer Zusammenhang zwischen der Baicaleinsensitivität und der Positionsspezifität von ALOX15-Orthologen. Es sollte aber trotzdem darauf hingewiesen werden, dass die meisten Enzyme IC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich zeigten. Das einzige Enzym, das eine deutlich höhere IC₅₀ aufweist, ist die 12-lipoxygenierende ALOX15 der Maus.

Zusammenfassung: Baicalein ist ein guter Hemmstoff für alle getesteten ALOX15-Orthologen. Die ermittelte IC₅₀-Werte variieren zwischen 10 nM (Ratte) und 8 µM (Maus). Die humALOX15 zeigt eine IC₅₀ von 0,13 µM. Es besteht keine statistische Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und der Hemmstoffsensitivität gegenüber Baicalein.

4.6.5 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Epigallocatechingallat (EGCG)

Polyphenole wie Epigallocatechingallat sind in grünem Tee und anderen Lebensmitteln enthalten und epidemiologische Studien haben einen protektiven Effekt gegenüber verschiedenen Erkrankungen, wie Schlaganfall, koronaren Herzerkrankungen und verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen (82). Strukturell scheinen die vorhandenen Hydroxylgruppen und der Grad der Sättigung des Flavonoids für die Bindungsaffinität des Inhibitors an das aktive Zentrum von Lipoxygenasen bedeutsam zu sein (81). Gegenüber der ALOX15 des Kaninchens (gereinigtes, natives Enzym aus Kaninchenretikulozyten) wurde in früheren Untersuchungen eine mittlere inhibitorische Konstante von 4 μM ermittelt (81).

Die unter unseren experimentellen Bedingungen ermittelten Ergebnisse sind in Form von IC_{50} -Werten in Tab. 9 zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass sowohl die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse und Orang-Utan, als auch die 12-lipoxygenierenden Enzyme von Rhesusaffe, Schwein und Ratte im mikromolaren Bereich durch EGCG gehemmt werden. Dabei zeigen Schimpanse, Schwein und Ratte mit IC_{50} -Werte um 1 μM die stärksten Hemmeffekte.

Tab. 9: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von EGCG. Die Titrationskurven für die verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC_{50} -Werte wurden graphisch ermittelt.

| ALOX15-Spezies | IC_{50} (in μM) |
|--------------------|--------------------------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 6,53 |
| Schimpanse (chi) | 1,17 |
| Orang-Utan (pon) | 8,71 |
| Kaninchen (rab) | n/a |
| 12-lipoxygenierend | |
| Makake (mac) | 36,41 |
| Schwein (pig) | 1,06 |
| Ratte (rat) | 1,19 |
| Maus (mou) | 112,20 |

Interessanterweise zeigte die rekombinante rabALOX15 auch bei einer EGCG Konzentration von 10 μM keinerlei Hemmwirkung. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da für das gereinigte native Enzym aus Kaninchenretikulozyten ein IC_{50} -Wert von 4 μM gemessen wurde (81). Um dieser qualitativen Diskrepanz nachzugehen, wurden zusätzliche Experimente mit der gereinigten nativen rabALOX15 durchgeführt. Dazu wurde das gereinigte Kaninchenenzym 5 Minuten mit 10 μM EGCG vorinkubiert. Anschließend wurde diese Enzym-Hemmstoffmischung für 3 Minuten mit

Arachidonsäure inkubiert und die entstandenen Reaktionsprodukte quantifiziert. Hierbei ergab sich ein starker Abfall der Produktbildung auf unter 20% des Kontrollwertes ohne Hemmstoff. Diese Experimente deuten darauf hin, dass der Grad der proteinchemischen Reinheit der Enzympräparation einen großen Einfluss auf die Hemmaktivität von EGCG hat. Offensichtlich sind im Lysatüberstand der ungereinigten rekombinanten Enzympräparation Substanzen enthalten, die den Hemmeffekt von EGCG gegenüber der rabALOX15 reduzieren.

Zusammenfassung: Epigallocatechingallat ist ein Hemmstoff für die meisten ALOX15-Orthologen. Die IC_{50} -Werte variieren zwischen 1 μ M (Schimpanse) und 36 μ M (Makake). Die Maus-ALOX15 und die rekombinante rabALOX15 werden auch bei hohen Hemmstoffkonzentrationen (10 μ M) kaum inhibiert. Da das gereinigte Kaninchenenzym jedoch bei 10 μ M EGCG zu über 80% gehemmt wird, scheint die fehlende Hemmung der rekombinanten rabALOX15 darauf zurückzuführen zu sein, dass in der Enzympräparation Substanzen enthalten sind, die den Hemmstoff unwirksam machen. Es gibt keine statistische Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und der Hemmstoffsensitivität gegenüber Epigallocatechingallat.

4.6.6 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-Nitrocatechol (4-NC)

4-Nitrocatechol wurde 1980 von Spaapen et al. als Inhibitor der Sojabohnen-LOX1 beschrieben und für dieses Enzym wurde eine mittlere inhibitorische Konstante von 16,3 μ M ermittelt (83). Eine Hemmstofftestung gegenüber ALOX15-Orthologen von Säugetieren wurde noch nicht durchgeführt. Obwohl der molekulare Wirkmechanismus der LOX-Hemmung durch 4-Nitrocatechol noch nicht abschließend untersucht wurde, deuten die vorläufigen mechanistischen Daten darauf hin, dass 4-NC mit dem LOX-Substrat um die Bindung am aktiven Zentrum konkurriert. Aus spektroskopischen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass 4-NC direkt mit dem Nichthämeisen der Sojabohnen-LOX1 wechselwirkt (83). Mit Hilfe seiner catecholischen OH-Gruppen kann es dabei das Enzymeisen komplexieren und den Wertigkeitswechsel während des katalytischen Zyklus verhindern (Redoxhemmstoff). Als Catechol besitzt 4-NC jedoch auch antioxidative Eigenschaften, sodass auch eine Wirkung als Radikalfänger in Frage kommt. Die IC_{50} -Werte der einzelnen Enzyme sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von 4-Nitrocatechol. Die Titrationskurven für die verschiedenen ALOX15-Orthologen wurden wie im Methodenteil beschrieben erstellt und die IC₅₀-Werte wurden graphisch ermittelt. n/a, nicht bestimmbar.

| ALOX15-Spezies | IC ₅₀ (in µM) |
|--------------------|--------------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 10,72 |
| Schimpanse (chi) | 2,00 |
| Orang-Utan (pon) | 34,67 |
| Kaninchen (rab) | 0,39 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Makake (mac) | n/a |
| Schwein (pig) | 14,20 |
| Ratte (rat) | 3,33 |
| Maus (mou) | n/a |

Zusammenfassung: 4-Nitrocatechol ist ein geeigneter Hemmstoff für die meisten der getesteten ALOX15-Orthologen. Die ermittelten IC₅₀-Werte variieren zwischen 0,4 µM (Kaninchen) und 35 µM (Orang-Utan). Die humALOX15 zeigt eine IC₅₀ von 11 µM. Für die ALOX15-Orthologen von Maus und Makaken konnten wegen mangelnder Hemmung keine IC₅₀-Werte berechnet werden. Es gibt keine Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und der Hemmstoffsensitivität gegenüber 4-Nitrocatechol.

4.6.7 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1

Bakavoli et al. beschrieben 2007 die Wirkung von 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1 (4-Methyl-2-(4-methylpiperazinyl)pyrimido[4,5-b]benzothiazine) auf die Sojabohnen-LOX1 (84). Dabei wurde für das heterozyklische Pyrimidobenzothiazin, das als Antioxidanz mit dem Redoxzyklus des Nichthämeisens interferiert, eine mittlere inhibitorische Konstante von 18 µM festgestellt. Mit tierischen ALOX15-Orthologen wurden bisher noch keine entsprechenden Experimente durchgeführt.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde die Hemmaktivität dieser Substanz für acht verschiedene ALOX15-Orthologe untersucht. Dabei konnten für die meisten Enzyme bei dieser Hemmstoffkonzentration nur partielle (<50%) oder gar keine Hemmung nachgewiesen werden (Tab. 11). Für das menschliche Enzym ergab sich sogar ein deutlicher Aktivierungseffekt, der jedoch mechanistisch nicht weiter untersucht wurde. Aus diesen Daten, kann geschlossen werden, dass der Lipoxygenasehemmstoff-1 unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen keinen geeigneten Hemmstoff für die ALOX15-Orthologen von Säugetieren darstellt. Da die bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 µM erzielten Hemmungen 50 % nicht überschritten,

wurden keine weiteren Untersuchungen (Titrationskurven) mit diesem Hemmstoff durchgeführt.

Tab. 11 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 μM Lipoxygenaseinhibitor-1.

| ALOX15-Spezies | Restaktivität (in %) |
|--------------------|----------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 145,6 |
| Schimpanse (chi) | 77,8 |
| Orang-Utan (pon) | 110,8 |
| Kaninchen (rab) | 94,0 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Rhesusaffe (mac) | 50,8 |
| Schwein (pig) | 53,2 |
| Ratte (rat) | 80,3 |
| Maus (mou) | 107,3 |

Zusammenfassung: Der Lipoxygenasehemmstoff-1, der als geeigneter Hemmstoff für die Sojabohnen-LOX1 identifiziert wurde, ist kein effektiver Hemmstoff für die ALOX15-Orthologen von Säugetieren. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine mögliche Korrelation von Reaktionsspezifität und Hemmeffizienz.

4.6.8 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-N-2-thiazolylbenzenesulfonamid (CAY10698)

CAY10698 ist ein Thiazolderivat, das die Bindung der Fettsäuresubstrate an das aktive Zentrum von Lipoxygenasen verhindert und mit dem katalytisch aktiven Nichthämeisen wechselwirkt. Es wurde 2014 von Luci et al. als selektiver ALOX12-Hemmstoff charakterisiert (85). Für die humALOX12 ergab sich eine IC_{50} von 5,1 μM . Für die humane ALOX15 hingegen wurden höhere Werte von über 50 μM berechnet (85). Die humane Plättchen-ALOX12 und die humane Retikulozyten-ALOX15, die bei diesen Experimenten verwendet wurden, wurden nach Amagata et al. (89) rekombinant exprimiert und aufgereinigt. ALOX15-Orthologe anderer Säugetierspezies wurden noch nicht getestet.

Die Messung der Lipoxygenaseaktivität unter Einfluss von CAY10698 im Zuge dieser Dissertation ergab, dass dieser Hemmstoff bei keinem der getesteten Enzyme eine starke Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität hervorruft. Die Restaktivitäten bei Einsatz von 10 μM CAY10698 sind in Tab. 12 zusammengefasst und liegen für alle untersuchten Enzyme deutlich über 60%. Diese Daten sind konsistent mit den früher

publizierten Ergebnissen, die darauf hingedeutet haben, dass die humALOX15 durch diese Substanz nur wenig gehemmt wird (85).

Tab. 12 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 μM CAY10698.

| ALOX15-Spezies | Restaktivität (in %) |
|--------------------|----------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 137,3 |
| Schimpanse (chi) | 62,2 |
| Orang-Utan (pon) | 108,5 |
| Kaninchen (rab) | 93,8 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Rhesusaffe (mac) | 80,6 |
| Schwein (pig) | 63,7 |
| Ratte (rat) | 87,8 |
| Maus (mou) | 101,2 |

Zusammenfassung: Der Hemmstoff CAY10698 stellt keinen effektiven Hemmstoff von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere dar. Diese Resultate sind konsistent mit der früheren Vermutung, dass es sich bei diesem Inhibitor nicht um einen guten Hemmstoff der humALOX15 handelt.

4.6.9 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Salicylhydroxamsäure

Salicylhydroxamsäure wurde als Hemmstoff der gereinigten nativen rabALOX15 identifiziert, der entweder durch eine Komplexierung des enzymgebundenen Eisens oder durch Reduktion des enzymatisch aktiven Fe^{3+} in das inaktive Fe^{2+} wirkt. Für die native Kaninchen-ALOX15 wurde eine IC_{50} von 50 μM berechnet (86). Andere ALOX15-Orthologe wurden bisher noch nicht getestet.

Die im Zuge dieser Arbeit erhobenen Daten belegen, dass Salicylhydroxamsäure verglichen mit anderen Lipoxygenasehemmstoffen nur eine geringe Hemmwirkung auf die ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere ausübt. Auf weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde wegen der geringen Hemmeffektivität verzichtet. Tab. 13 gibt die Restaktivitäten der verschiedenen Lipoxygenasen unter dem Einfluss von 10 μM Salicylhydroxamsäure an.

Tab. 13 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 µM Salicylhydroxamsäure.

| ALOX15-Spezies | Restaktivität (in %) |
|--------------------|----------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 107,2 |
| Schimpanse (chi) | 69,3 |
| Orang-Utan (pon) | 126,8 |
| Kaninchen (rab) | 63,0 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Rhesusaffe (mac) | 92,1 |
| Schwein (pig) | 72,7 |
| Ratte (rat) | 66,1 |
| Maus (mou) | 136,1 |

Zusammenfassung: Salicylhydroxamsäure, die in früheren Experimenten als mäßiger Hemmstoff der nativen rabALOX15 identifiziert wurde, zeigt nur geringe Hemmaktivitäten für ALOX15-Orthologe anderer Säugetiere. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für mögliche Korrelationen von Reaktionsspezifität und Hemmeffizienz.

4.6.10 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure

Zimtsäuren besitzen antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften. Sie hemmen die Sojabohnen-LOX1, indem sie das katalytisch aktive Enzym, das dreiwertiges Nichthämeisen enthält, in die inaktive zweiwertige Form umwandeln (73). Die humALOX15 und humALOX12 werden durch CHCA allerdings nicht gehemmt (88).

Tab. 14 Restaktivität der ALOX15-Orthologen bei Einfluss von 10 µM CHCA

| ALOX15-Spezies | Restaktivität (in %) |
|--------------------|----------------------|
| 15-lipoxygenierend | |
| Mensch (hum) | 104,8 |
| Schimpanse (chi) | 79,1 |
| Orang-Utan (pon) | 106,0 |
| Kaninchen (rab) | 68,5 |
| 12-lipoxygenierend | |
| Rhesusaffe (mac) | 93,7 |
| Schwein (pig) | 87,5 |
| Ratte (rat) | 84,8 |
| Maus (mou) | 99,4 |

Um zu untersuchen, ob die ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere durch CHCA gehemmt werden, wurden zunächst die ALOX15-Orthologen mit 10 µM CHCA vorinkubiert und die Menge der gebildeten LOX Produkte nach dreiminütiger Inkubation mit Arachidonsäure quantifiziert (Tab. 14). Dabei konnte festgestellt werden, dass es

bei allen getesteten Enzymen nur zu einer geringen (< 30%) Hemmung der Arachidonsäureoxygenaseaktivität kam. Aufgrund der schwachen Hemmung bei 10 µM Hemmstoff wurde auf eine detaillierte Bestimmung der IC50-Werte für die verschiedenen ALOX15-Orthologen verzichtet.

Zusammenfassung: Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure wurde in früheren Untersuchungen der Sojabohnen-LOX1 identifiziert. Für die ALOX15-Orthologen von Säugetieren stellt diese Verbindung keinen brauchbaren Hemmstoff dar. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine mögliche Korrelation von Reaktionsspezifität und Hemmeffizienz.

5 Diskussion

5.1 Expression von Lipoxygenasen und Positionsspezifitätstestung

Für die verschiedenen Fragestellungen dieser Arbeit wurden Wildtyp-lipoxygenasen von acht verschiedenen Säugetierspezies und zwei mutierte Enzyme miteinander verglichen, deren Positionsspezifität sich von den entsprechenden Wildtypenzymen deutlich unterscheidet. Dieser Vergleich erforderte die rekombinante Expression verschiedener Enzyme in vergleichbaren prokaryotischen Expressionssystemen (*E. coli*). Dazu wurden die mRNAs, die für die verschiedenen Enzyme kodieren aus peripheren Blutzellen extrahiert und mittels reverser Transkription in die entsprechenden cDNAs umgeschrieben. Die cDNAs wurden dann in prokaryotische Expressionsvektoren einkloniert, die rekombinanten Expressionsplasmide in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und die Enzyme als rekombinante N-terminale his-Tag-Fusionsproteine exprimiert. Das prinzipielle methodische Vorgehen entsprach damit der Methode, die für die humane ALOX15 von Sigal et al. (19) bereits 1988 beschrieben wurde. Die Aktivitätsmessung der exprimierten rekombinanten Enzyme erfolgte durch HPLC-Quantifizierung der während einer dreiminütigen Inkubation mit Arachidonsäure gebildeten LOX-Produkte. Dafür wurde die Skala der HPLC durch die Injektion definierter Mengen authentischer Standards von 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE geeicht. Die dabei ermittelten Retentionszeiten von 6,5 Minuten (für 15S-HETE), 7,5 Minuten (12S-HETE) und 9 Minuten (5S-HETE) wurden verwendet, um die in den verschiedenen Analyseproben detektierten chromatographischen Peaks zuzuordnen. Die Fläche dieser chromatographischen Peaks reflektiert dabei die Menge der gebildeten LOX-Produkte.

In unseren Analysen konnte festgestellt werden, dass die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Orang-Utan und Kaninchen sowie die Leu353Phe-Mutante der ALOX15 der Maus sowohl 15-HETE, als auch 12-HETE in einem Mengenverhältnis von ca. 9:1 bildeten. Die humALOX15 produzierte 9,5 mal mehr 15-HETE als 12-HETE. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Resultaten zur Reaktionsspezifität der humALOX15 überein (105).

Schimpansen sind die nächsten lebenden Verwandten des modernen Menschen. Vergleicht man die Aminosäuresequenz der ALOX15 des Schimpansen (*chiALOX15*) mit der des Menschen, so zeigt sich eine 99,7-prozentige Übereinstimmung. Adel et al. konnten kürzlich erstmals vergleichbare Verhältnisse der 15-HETE- und 12-HETE-

Bildung beim Vergleich der humALOX15 und chiALOX15 zeigen. Für die humALOX15 wurde ein 15-HETE/12-HETE-Verhältnis von 3,7:1 quantifiziert. Für das Schimpansenenzym ergab sich ein Verhältnis von 4,1:1 (51). Diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die Aminosäuren der humALOX15 und des orthologen Enzyms des Orang-Utans (ponALOX15) stimmen zu 97% überein (91). Insbesondere die Determinanten der Positionsspezifität (BG1, SL, BG2), sind verglichen mit dem menschlichen Enzym streng konserviert, was auf ein 15-lipoxygenierendes Enzym schließen lässt. Die Positionsspezifität der ponALOX15 wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen experimentell getestet (29, 52) und in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die ALOX15 des Kaninchens (rabALOX15) wurde bereits 1982 von Bryant et al. hinsichtlich ihrer Positionsspezifität untersucht. Dabei wurde eine 16-fach höhere 15-HETE-Bildung als 12-HETE-Bildung beobachtet (54). In der vorliegenden Arbeit wurde ein 15-HETE/12-HETE Verhältnis von 19:1 bestimmt. Demnach handelt es sich bei der rabALOX15 um ein 15-lipoxygenierendes ALOX15-Ortholog. Diese experimentellen Daten deuten darauf hin, dass die rabALOX15 als Ausnahme betrachtet werden muss, da sich das Enzym nicht in das Evolutionskonzept der ALOX15-Spezifität (3) einordnen lässt. Dieses Konzept postuliert, dass die ALOX15-Orthologen von Säugetieren, die einen höheren Entwicklungsgrad aufweisen als der Gibbon, als Arachidonsäure-15-lipoxygenierende Enzyme wirken. ALOX15-Orthologe von weniger entwickelten Säugetieren (z.B. Maus, Ratte, Makake, Schwein) zeigen dagegen überwiegend Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Aktivitäten. Das ALOX15-Ortholog des Gibbons selbst zeigt eine duale Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung, wobei fast gleiche Mengen an 12-HETE und 15-HETE gebildet werden.

Das Kaninchen zeigt mit Blick auf den ALOX15-Weg noch eine weitere Besonderheit. Obwohl das ALOX15-Gen des Kaninchens entsprechend des Triadenkonzeptes für ein 15-lipoxygenierendes ALOX15-Ortholog kodiert und eine 15-lipoxygenierende Isoform in Kaninchenretikulozyten gefunden wurde, wird in peripheren Kaninchenmonozyten eine 12-lipoxygenierende ALOX15 exprimiert. Beide Enzyme sind mit Ausnahme weniger Aminosäuren sequenzidentisch. Funktionell bedeutsam ist dabei vor allem, dass das Monozytenenzym an der Position 353 seiner Aminosäuresequenz ein Leucin trägt, was entsprechend des Triadenkonzeptes seine 12-Lipoxygenierungsaktivität erklärt. Im Gegensatz dazu trägt das Retikulozytenenzym ein Phenylalanin an dieser Stelle, was dieses Enzym als 15-lipoxygenierende LOX

ausweist. Es konnte bisher leider noch nicht geklärt werden, warum das ALOX15-Gen des Kaninchens für zwei unterschiedliche ALOX15 Isoformen kodiert, die sich hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität und ihrer Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden.

Die Leu353Phe Mutante der mouALOX15 trägt am Boden ihrer Substratbindungstasche ein großes Phenylalanin anstatt des deutlich kleineren Leucins, das beim Wildtypenzym an dieser Stelle nachweisbar ist. Dadurch verkleinert sich das Volumen der Substratbindungstasche und die Substratfettsäure kann nicht mehr so tief eindringen. Als Konsequenz kommt bei der Enzymmutante die Arachidonsäure mit ihrem dreizehnten Kohlenstoffatom (C13) am katalytisch aktiven Nighthämeisen zu liegen. Dies ist der Grund für die 15-lipoxygenierenden Eigenschaften dieser Mutante. Nach der genetischen Modifikation wurde diese Enzymvariante rekombinant exprimiert und seine Arachidonsäureoxygenaseaktivität gemessen. Dabei zeigte sich, dass das mutierte Enzym neunmal mehr 15-HETE als 12-HETE bildet. Im Gegensatz dazu katalysiert das entsprechende Wildtypenzym überwiegend die Bildung von 12-HETE. Diese Daten belegen die 15-lipoxygenierende Aktivität der Leu353Phe Mutante der mouALOX15 und können als weitere Bestätigung des Triadenkonzeptes der Reaktionsspezifität von ALOX15-Isoformen (30) interpretiert werden.

Die ALOX15-Orthologen von Rhesusaffe, Schwein, Ratte und Maus, die in früheren Arbeiten bereits als Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Enzyme charakterisiert worden sind (51) sowie die Ile418Ala Mutante der humALOX15 bilden mehr 12-HETE als 15-HETE und stellen damit dominant 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe dar. Die ALOX15 von Makaken trägt an der Position der Sloane-Determinanten die Kombination Val418-Val419, was entsprechend des Triadenkonzeptes auf ein 12-lipoxygenierendes Enzym schließen lässt. Expressionsuntersuchungen an diesem Enzym konnten belegen, dass vom Wildtypenzym 15-mal mehr 12-HETE als 15-HETE gebildet wird (29, 52). Diese Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation bestätigt, wobei ein 12-HETE/15-HETE Verhältnis von 98:2 quantifiziert wurde. Damit reiht sich die macALOX15 ins Evolutionskonzept der ALOX15-Spezifität ein.

Yokoyama et al. beschrieben bereits 1986, dass polymorphkernige Leukozyten des Schweins Arachidonsäure überwiegend zu 12-HETE oxygenieren. Das entsprechende Enzym wurde als Leukozytentyp-12-LOX bezeichnet (112). Spätere Aminosäuresequenzvergleiche haben eindeutig belegt, dass es sich bei diesem Enzym

um das Schweineortholog der humanen ALOX15 handelt, das ein überwiegend 12-lipoxygenierendes Enzym darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde für die rekombinante Schweine-ALOX15 (pigALOX15) ein 12-HETE/15-HETE Verhältnis von 87:13 gemessen, was konsistent mit den früher publizierten Daten (112) ist.

Die murinen ALOX15-Orthologen (ratALOX15, mouALOX15) sind 12-lipoxygenierende Enzyme (93, 113) und die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen diese Schlussfolgerung. Für die ratALOX15 wurde kürzlich ein 12-HETE/15-HETE Verhältnis von 86:14 quantifiziert (48). Für das Mausezym lag dieser Wert bei 80:20 (113). Da beide murinen ALOX15-Orthologen große Ähnlichkeit mit der ALOX15 aus Schweineleukozyten aufweisen, wurde sie ursprünglich als Leukozytentyp-12-LOX klassifiziert. Auch für diese Lipoxygenasen haben spätere Aminosäuresequenzvergleiche eindeutig bewiesen, dass es sich bei diesen Enzymen um die murinen Orthologen der humanen ALOX15 handelt. Die hier erhaltenen Ergebnisse zur Reaktionsspezifität der murinen ALOX15-Orthologen bestätigen die früheren Daten zu diesen Enzymen.

Wie oben bereits beschrieben ist die humane ALOX15 ein überwiegend 15-lipoxygenierendes Enzym. Tauscht man jedoch das an der Sloane-Determinante liegende Ile418 durch ein kleineres Ala aus (Ile418Ala), erhält das Enzym einen 12-lipoxygenierenden Charakter. Dieser Wechsel in der Reaktionsspezifität wurde hier experimentell bestätigt. Für das mutierte Enzym wurde ein 12-HETE/15-HETE Verhältnis von 13:1 nachgewiesen. Die molekulare Basis der veränderten Reaktionsspezifität kann durch die Anwendung des Triadenkonzeptes erklärt werden. Die relativ große Seitenkette des Ile418 im Wildtypenzym verhindert, dass die Substratfettsäure tiefer in die Substratbindungstasche des Enzyms eindringen kann, sodass eine Wasserstoffabstraktion vom C13 der Substratfettsäure favorisiert ist. Wird die Seitenkette des Isoleucins durch die kleinere eines Alanins ersetzt, entsteht in der Substratbindungstasche zusätzlicher Raum, sodass die Substratfettsäure tiefer hineinrutschen kann. Dadurch wird eine Wasserstoffabstraktion vom C10 der Arachidonsäure möglich, was sich in einer dominanten 12-Lipoxygenierung widerspiegelt.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass die Reaktionsspezifitäten aller in dieser Arbeit verwendeten ALOX15-Varianten mit früheren Daten zur Charakterisierung der jeweiligen Enzyme vereinbar sind (51) und durch das Triadenkonzept der ALOX15-Spezifität erklärt werden können. Für alle rekombinant

exprimierten ALOX15-Orthologen konnte eine gut messbare katalytische Aktivität nachgewiesen werden, was eine unabdingbare Voraussetzung für die weiterführenden Experimente war.

5.2 Substratspezifität von ALOX15-Orthologen

ALOX15-Orthologe sind in der Lage, verschiedene Substratfettsäuren zu oxygenieren. Dazu gehören alle natürlich vorkommenden omega-3 und omega-6 PUFAs (3) wie Linolsäure, alpha-Linolensäure und gamma-Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Allerdings können auch bereits oxygenierte Fettsäuren wie 15-H(p)ETE, 5,6-DiH(p)ETE oder 5,15-DiH(p)ETE von ALOX15-Orthologen weiter oxygeniert werden, wobei unter anderem Lipoxine entstehen (44). Auch Phospholipide, Cholesterolester und komplexe Lipid-Protein-Aggregate wie Biomembranen und Lipoproteine können als Substrat der ALOX15 dienen (44). Die gebräuchlichsten Substrate vieler pflanzlicher Lipoxygenasen sind Linol- und Linolensäurederivate. Demgegenüber bevorzugen tierische Lipoxygenasen häufig Arachidonsäure. So ist zum Beispiel nur Arachidonsäure, jedoch nicht Linolsäure, Substrat der humALOX5 und der humALOX12. Die humALOX15 hingegen kann sowohl Linolsäure als auch Arachidonsäure oxygenieren (114).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fähigkeit verschiedener 12- bzw. 15-lipoxygenierender ALOX15-Orthologen getestet werden, unterschiedliche Substratfettsäuren zu oxygenieren, um dabei möglicherweise konservierte Unterschiede zwischen Arachidonsäure-12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen festzustellen.

15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe katalysieren die initiale Wasserstoffabstraktion vom omega-8 Kohlenstoffatom mehrfach ungesättigter Fettsäuren (C13 der Arachidonsäure). Dieses Kohlenstoffatom entspricht dem C11 der Linolsäure. Damit sollten 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe sowohl Arachidonsäure als auch Linolsäure als Oxygenierungssubstrate verwenden können. Bei 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen sehen die Voraussetzungen anders aus. Diese Enzyme katalysieren eine Wasserstoffabstraktion vom omega-11 Kohlenstoffatom (C10 der Arachidonsäure). Im Falle der Linolsäure ist dieses Kohlenstoffatom jedoch nicht Teil einer doppelallylständigen Methylengruppe, sodass eine Wasserstoffabstraktion nicht möglich ist. Diese theoretischen Überlegungen

würden bedeuten, dass 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe zwar Arachidonsäure oxygenieren können, Linolsäure aber weniger effizient umsetzen. Damit stehen diese theoretischen Überlegungen im Widerspruch zu bereits durchgeführten Untersuchungen zur Substratspezifität der ALOX15-Orthologen der Maus (115) und der Ratte (48), für die eine Linolsäureoxygenierung gezeigt werden konnte. In diesen Experimenten wurden die Umsatzgeschwindigkeiten von Linolsäure und Arachidonsäure in separaten Inkubationsansätzen quantifiziert. Um das Problem der Substratspezifität von 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen erneut zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. In unseren Experimenten wurde den Enzymen Linolsäure und Arachidonsäure in identischen Konzentrationen in einem Inkubationsansatz angeboten und die Menge der entstandenen Oxidationsprodukte nach einer festgelegten Inkubationszeit quantifiziert. Die vorhandene Arachidonsäure wurde zu 12- und 15-H(p)ETE umgewandelt, während Linolsäure zu 13-H(p)ODE oxygeniert wurde. Diese Metabolite konnten mittels SP-HPLC getrennt quantifiziert werden. Entsprechende Untersuchungen wurden mit zwei 15-lipoxygenierenden (humALOX15, chiALOX15) und zwei 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (macALOX15, pigALOX15) durchgeführt. Für die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen konnte gezeigt werden, dass knapp zwei Drittel (62 % bei der humALOX15, 65% bei der chiALOX15) der entstandenen Oxygenierungsprodukte aus Arachidonsäure gebildet wurden (Tab. 3). Nur ca. ein Drittel der Oxygenierungsprodukte entsprang der Linolsäureoxygenierung (Tab. 3). Unter den Oxygenierungsprodukten der Arachidonsäure war erwartungsgemäß 15-HETE bei beiden Enzymen dominant. Für die beiden 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (macALOX15, pigALOX15) wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Der prozentuale Anteil der Linolsäureoxygenierungsprodukte lag für die macALOX15 bei 27 % und für die pigALOX15 bei 42 % (Tab. 3), was einen Mittelwert von 34 % ergab. Erwartungsgemäß wurde bei diesen Enzymen 12-HETE als dominantes Oxygenierungsprodukt der Arachidonsäure identifiziert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früher publizierten Daten zur Substratspezifität verschiedener ALOX15-Orthologen, widersprechen jedoch den oben erläuterten theoretischen Vorhersagen. Sie verdeutlichen, dass theoretische Vorhersagen zur Substratspezifität von ALOX15-Orthologen auf der Basis von Daten zur Reaktionsspezifität der Enzyme mit

Arachidonsäure nicht gemacht werden können. Für gesicherte Aussagen muss die Substratspezifität jedes Enzyms experimentell getestet werden.

5.3 Membranoxygenierungskapazität von ALOX15-Orthologen

Für verschiedene ALOX15-Orthologe (pigALOX15 (60), rabALOX15 (116), humALOX15 (61)) konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass diese Enzyme in der Lage sind, Membranphospholipide zu oxygenieren. Diese Fähigkeit verknüpft die rabALOX15 mit dem Abbau der Mitochondrien im Rahmen der Reifung von Retikulozyten zu Erythrozyten (2). Ein site-by-site Vergleich der Membranoxygenasekapazitäten verschiedener 12- und 15-lipoxygenierender ALOX15-Orthologe wurde bisher noch nicht durchgeführt. Um entsprechende experimentelle Daten zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe in einem *in vitro* Ansatz mit Biomembranen (Membranvesikel aus Rinderherzmitochondrien) inkubiert und die Menge der während der Inkubation entstandenen Oxygenierungsprodukte quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde das Hydroxypolyenfettsäure/Polyenfettsäure-Verhältnis (OH-PUFA/PUFA-Ratio) berechnet, welches einen leicht quantifizierbaren Parameter für den Oxidationsgrad der Membranlipide darstellt. Abschließend wurde dieser Parameter hinsichtlich der eingesetzten Arachidonsäureoxygenaseaktivität normalisiert. Die durchgeführten Messungen ergaben für die humALOX15 ein OH-PUFA/PUFA-Verhältnis von 1:34. Diese Daten verdeutlichen, dass während der Inkubationszeit (5 min) 2,9 % der in den Modellmembranen vorhandenen PUFAs (vor allem Linolsäure und Arachidonsäure) zu den entsprechenden Hydroxyfettsäuren umgewandelt wurden. Bei der Inkubation der anderen ALOX15-Orthologen ergaben sich folgende Prozentsätze: chiALOX15 1,2 %, macALOX15 2,3 %, pigALOX15 1,5 %. Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass es offenbar keine systematischen Unterschiede in der Membranoxygenierungskapazität gibt, wenn 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe miteinander verglichen werden.

5.4 Lipoxinsynthaseaktivität von ALOX15-Orthologen

Lipoxine sind proresolutorische Entzündungsmediatoren und spielen eine Rolle bei der Entzündungshelung. Die Beendigung einer Entzündungsreaktion ist ein aktiver Prozess, der pathophysiologisch ebenso so wichtig ist wie die Entzündungsinduktion (69). Proresolutorische Lipoxine werden durch das Zusammenspiel verschiedener Lipoxygenasen aus Arachidonsäure synthetisiert, wobei transzelluläre Mechanismen vermutet werden (71). Dass ALOX15-Orthologe an der Biosynthese von Lipoxinen beteiligt sind, wurde in Voruntersuchungen nachgewiesen (69). Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob es quantitative Unterschiede in der Lipoxinsynthaseaktivität zwischen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen gibt. Theoretische Überlegungen zu diesem Thema deuten darauf hin, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen eine höhere Lipoxinsynthaseaktivität aufweisen sollten, wenn die Reaktion von den ALOX5-Produkten 5S-HETE oder 5,6-DiHETE ausgeht. Diese Überlegungen können wie folgt zusammengefasst werden: i) An der Lipoxinsynthese ist die ALOX5 beteiligt, die Arachidonsäure zu 5-HETE oder über das LTA₄ zum Hydrolyseprodukt 5,6-DiHETE umwandelt (69). Diese beiden Verbindungen können dann von der ALOX15, ALOX15B bzw. ALOX12 weiter verstoffwechselt werden. ii) Im Falle des 5,6-DiHETES führt eine Oxygenierung am C15 zum Lipoxin A₄ (5,6,15-TriHETE) und diese Reaktion sollte von 15-lipoxygenierenden ALOX15 Isoformen effektiver katalysiert werden, als von 12-lipoxygenierenden Enzymen. iii) 5-HETE sollte von 12-lipoxygenierenden ALOX15-Isoformen zu 5,12-DiHETE umgesetzt werden, welches aufgrund einer fehlenden doppelallylständigen Methylengruppe nicht weiter zu Lipoxinisomeren oxygeniert werden kann (dead end product). Damit sollten 12-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen 5-HETE weniger effizient in Lipoxine umwandeln können. 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe würden 5-HETE zu 5,15-DiHETE umwandeln, welches anschließend entweder zu 5,6,15-TriHETE oder zu 5,14,15-TriHETE metabolisiert werden kann. Aus diesen Überlegungen kann geschlussfolgert werden, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe für die Lipoxinbiosynthese besser geeignet sein sollten.

Bisher gab es in der Literatur jedoch keine Hinweise darauf, ob diese theoretischen Überlegungen in der Praxis auch wirklich zutreffen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden 5S-HETE und 5S,6S/R-DiHETE als Substrat eingesetzt und mit 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies für zehn Minuten inkubiert. Nach Reduktion der Hydroperoxyverbindungen wurde die

Menge an gebildeten Lipoxinen mittels RP-HPLC quantifiziert und so die Lipoxinsyntheseaktivität der verschiedenen ALOX15-Orthologen in einem site-by-site Vergleich ermittelt. Die experimentellen Daten ergaben eine fünf- bis zehnfach höhere Lipoxinbildung durch 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologen, wenn die Werte auf identische Arachidonsäureoxygenaseaktivität normalisiert wurden (Tab. 5). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen aber auch, dass 12-lipoxygenierende LOX-Isoformen, wie z.B. die ALOX12, prinzipiell zur Lipoxinsynthese fähig sind. Diese Schlussfolgerung ist konsistent mit früher publizierten Daten, die darauf hindeuten, dass auch die ALOX12 an der Lipoxinbiosynthese *in vivo* beteiligt sein könnte (69). 15-lipoxygenierende Isoformen scheinen hingegen die besser geeigneten Katalysatoren für diese Reaktionen zu sein.

Kritisch sollte dabei jedoch erwähnt werden, dass die durchgeführten Lipoxinsynthesemessungen keine detaillierten kinetischen Untersuchungen beinhalteten und dadurch kein direkter Vergleich grundlegender kinetischer Parameter (K_m , V_{max} , katalytische Effizienz) möglich war. Außerdem müssen diese *in vitro* Daten nicht notwendiger Weise die Lipoxinsyntheseaktivität der verschiedenen ALOX15-Orthologen *in vivo* widerspiegeln. Um die *in vivo* Lipoxinsyntheseaktivität von 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen zu vergleichen, könnte die Lipoxinsynthese während der Heilungsphase in einem murinen Entzündungsmodell quantifiziert werden. Diese Experimente sollten anschließend mit ALOX15-knock-in Mäusen wiederholt werden, bei denen das *Alox15*-Gen dahingehend modifiziert wurde, dass diese Mäuse anstatt einer 12- eine 15-lipoxygenierende ALOX15-Isoform exprimieren. Um solche Mäuse zu erhalten, würde es ausreichen, das Triplet des ALOX15-Gens, das für die Aminosäure Phe353 kodiert, in ein Ala-kodierendes Triplet umzuwandeln. Die Phe353Ala Mutante der murinen ALOX15 ist im Gegensatz zum Wildtypenzym (überwiegend 12-lipoxygenierend) eine 15-lipoxygenierende ALOX15 (51). Solch eine gezielte gentechnische Veränderung von embryonalen Stammzellen der Maus sollte unter Verwendung der CRISPR/CAS-Systems (117) relativ einfach durchgeführt werden können. Die anschließende Züchtung von in dieser Weise humanisierten Mäusen ist heutzutage experimentelle Routine und wird von mehreren Firmen auf kommerzieller Basis angeboten.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse und Orang-Utan sowie die Leu353Phe Mutante der *rat*ALOX15 eine deutlich höhere

Lipoxinsynthaseaktivität aufweisen als die 12-lipoxygenierenden Orthologen von Rhesusaffe, Schwein, Ratte und Maus sowie die Ile418Ala Mutante der humALOX15. Diese Daten lassen vermuten, dass der evolutionäre Switch der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen in Rahmen der späten Primatenevolution zu einer Effektivierung der Lipoxinbildung geführt hat. Da Lipoxine antiinflammatorisch bzw. proresolutorisch wirken, können diese Daten dahingehend interpretiert werden, dass bei höheren Primaten (Mensch, Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan) die Entzündungsreaktion besser kontrolliert werden kann als bei niederen Primaten und anderen Säugetieren, die 12-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen exprimieren. Damit würde diese evolutionäre Veränderung der ALOX15-Spezifität zu einer Optimierung des Immunsystems höherer Primaten beitragen.

5.5 Differentielle Wirkung von Hemmstoffen auf ausgewählte 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere

Lipoxygenasen erfüllen wichtige Aufgaben bei Pflanzen und Tieren (3). Sie bilden beispielsweise antiinflammatorische Mediatoren wie Lipoxine, Resolvine und Protectine (68), sind aber auch an der Biosynthese proinflammatorischer Mediatoren wie Leukotrienen (6), Hepoxilinen (86) und Eoxinen (118) beteiligt. Die Reduzierung der Eoxinbildung durch Hemmung der ALOX15 stellt ein mögliches Ziel bei der Behandlung entzündlicher respiratorischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) dar (118). Weiterhin wurden ALOX15-Metabolite wie 15-HETE als wichtige Mediatoren in der Entwicklung Th1-vermittelter allergischer Erkrankungen beschrieben (119). Neben den Oxygenierungsprodukten der Arachidonsäure spielen auch ALOX15-Produkte der Linolsäureoxygenierung eine wichtige Rolle. So ist z.B. 13-HODE bei der Regulation der Progression des Prostatakarzinoms involviert (39). Dabei korreliert eine starke Expression der ALOX15 mit der Malignität der Tumorzellen, wodurch das ALOX15-Gen als potentiell Onkogen identifiziert wurde (120).

Die ALOX15 ist außerdem an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt, indem sie Lipoproteine wie das Low-density Lipoprotein (LDL) oxygenieren kann (63). Diese atherogene Variante des LDL (oxLDL) wird von Makrophagen *via* Scavengerrezeptoren aufgenommen, wodurch sich Schaumzellen bilden. Wenn sich diese Schaumzellen im subendothelialen Raum von Arterien ablagern, entstehen *fatty*

streaks, die als frühe Atheroskleroseläsionen angesehen werden. Mehrere Studien berichten über das Vorkommen von LOX-Produkten in atherosklerotischen Läsionen von Tieren und Menschen (121, 122). Außerdem deuten Tierexperimente mit ALOX15-defizienten Mäusen darauf hin, dass die ALOX15 als proatherogenes Enzym bei der Atherogenese fungiert. Gleichzeitig weisen Experimente mit ALOX15-überexprimierenden Tieren auf eine antiatherogene Wirkung des Enzyms hin (123).

Oxidativer Stress trägt auch zur Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie *M. Alzheimer* und *M. Parkinson* (124) bei. Die ALOX15 könnte als prooxidatives Enzym, das in der Lage ist, Esterlipide zu oxygenieren, eine Schlüsselstellung in der Pathogenese dieser Erkrankungen einnehmen. Sobald sie katalytisch aktiv ist, bildet sie Lipidhydroperoxide, die zum zellulären oxidativen Stress beitragen. Außerdem kann die ALOX15 Membranen von Zellorganellen direkt oxydieren und damit schädigen. Erhöhte Mengen an ALOX15 wurden in Mäusen nach einem experimentellen Schlaganfall gefunden und Zellmodelle deuten darauf hin, dass ALOX15-abhängige Mechanismen an der Pathogenese des *M. Alzheimer* beteiligt sind (125).

Im Jahre 2006 wurde in einer Studie gezeigt, dass Hemmstoffe der ALOX5 und ALOX15 in der Lage sind, die Glukosehomöostase in diabetischen Tiermodellen zu beeinflussen und die Serumglukosewerte signifikant zu verringern (126). Nadler et al. registrierten ein hohes Maß an ALOX15-Transskription im abdominalen Fettgewebe, was auf eine Rolle des Enzyms bei der Differenzierung von Adipozyten und bei der Entwicklung einer abdominalen Adipositas hindeutet (127).

Durch die Beteiligung der ALOX15 an vielen verschiedenen Erkrankungen besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von ALOX15-Inhibitoren, die potentiell zur therapeutischen Intervention eingesetzt werden können. Für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe müssen Tiermodelle verwendet werden, wobei Mäuse, Ratten, Kaninchen und Schweine häufig verwendete Säugetierspezies für Arzneimittelentwicklungen darstellen (120), (121), (125). Im Falle der Entwicklung von ALOX15-Hemmstoffen wird man jedoch mit dem Problem konfrontiert, dass die ALOX15-Orthologen von Nagetieren, die oft als Versuchstiere in pharmakologischen Studien verwendet werden, meist 12-lipoxygenierende Enzyme darstellen, während das humane Enzym 15-lipoxygenierend ist. Damit kann *a priori* nicht davon ausgegangen werden, dass Hemmstoffe der humALOX15 auch die murinen (*mouALOX15*, *ratALOX15*) Enzyme hemmen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die

ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere und des Menschen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber ausgewählten LOX-Hemmstoffen deutlich voneinander unterscheiden. Diese Ergebnisse, die von großer pharmakologischer Bedeutung sind und für die Suche nach isoform- und ortholog-spezifischen Hemmstoffen unbedingt berücksichtigt werden müssen, werden in den folgenden Kapiteln der vorliegenden Arbeit für jeden der ausgewählten Hemmstoffe in Detail diskutiert werden.

5.5.1 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Nordihydroguaiaretsäure (NDGA)

Die Hemmwirkung von Nordihydroguaiaretsäure auf die LOX-1 der Sojabohne wurde bereits 1987 beschrieben (73). Später wurde auch die Hemmwirkung auf die humane ALOX5 und ALOX15 nachgewiesen (74). NDGA kann aufgrund seiner Katecholstruktur als Eisenkomplexbildner aber auch als Redoxhemmstoff fungieren und damit die initiale Wasserstoffabstraktion durch das Enzym behindern.

Unsere experimentellen Daten zeigen, dass es keine statistische Korrelation zwischen der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen und der Hemmeffektivität durch NDGA gibt. Diese Schlussfolgerung bedeutet, dass 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe nicht grundsätzlich stärker oder schwächer durch NDGA gehemmt werden. Aus diesen Untersuchungen muss geschlussfolgert werden, dass sich aus der Reaktionsspezifität des Enzyms nicht sicher vorhersagen lässt, ob das betreffende Enzym stark oder schwach durch NDGA gehemmt wird. Die IC_{50} -Werte für die verschiedenen ALOX15 Orthologen differieren dabei teilweise um mehrere Größenordnungen. So konnte für die ALOX15 der Ratte eine IC_{50} von 10 nM bestimmt werden, während der Wert für das Mausenzym 12 μ M beträgt. Interessanterweise sind beide Enzyme 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe, die kleine Aminosäuren am Boden der Substratbindungstasche tragen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Tiefe der Substratbindungstaschen nicht wesentlich das Hemmstoffverhalten der ALOX15-Orthologen beeinflusst. Andere sterische Eigenschaften der Hemmstoffmoleküle scheinen dafür wichtiger zu sein (128).

Whitman et al. untersuchten die Selektivität von NDGA gegenüber der humanen ALOX12 aus Blutplättchen und der humanen ALOX15 aus unreifen roten Blutzellen. Beide Enzyme wurden als rekombinante Enzyme exprimiert und aufgereinigt (75). Bei den Hemmstoffuntersuchungen zeigte sich eine Präferenz von NDGA zur Hemmung der rekombinanten ALOX15 (46-fach bessere Hemmung). Dieses Ergebnis wurde von

den Autoren dahingehend interpretiert, dass die Bindung des Hemmstoffs am aktiven Zentrum der humALOX12 erschwert ist (75).

Für die ALOX15-Orthologen des Menschen und der Maus wurden mehrere Hemmstoffkonzentrationen im Bereich zwischen 0,1 nM und 300 μ M eingesetzt, was eine genaue Berechnung der IC_{50} -Werte zuließ. Der von uns für das humane Enzym gemessene Wert von 3,5 μ M weicht von der IC_{50} von 0,11 μ M ab, die in einer anderen Untersuchung für das gereinigte rekombinante Enzym bestimmt wurde (75). Die Ursachen für diesen relativ großen Unterschied könnten darin begründet liegen, dass in unseren Experimenten Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 150 μ M als Substrat eingesetzt wurde. In der Untersuchung von Whitman wurde Linolsäure in einer finalen Konzentration von 3 μ M als Oxygenierungssubstrat verwendet. Diese Substratkonzentration liegt deutlich unterhalb des K_m -Wertes dieses Enzyms für Fettsäuresubstrate, sodass man unter diesen Bedingungen von nicht-sättigenden Bedingungen ausgehen kann. Bei 150 μ M liegt die Konzentration des Fettsäuresubstrates deutlich über dem K_m -Wert, so dass sich das Messsystem im Sättigungsbereich befindet. Welches der beiden kinetischen Systeme die intrazellulären Bedingungen besser widerspiegelt, kann auf der Basis der verfügbaren Daten nicht mit Sicherheit gesagt werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegen die durchschnittlichen intrazellulären Fettsäurekonzentrationen eher in einstelligen mikromolaren Bereichen oder sogar noch darunter. Wie es jedoch mit lokalen Konzentrationen am Ort der katalytischen Aktivität aussieht ist schwer abzuschätzen. Es ist durchaus möglich, dass sich die aus den Membranphospholipiden freigesetzten Substratfettsäuren in der Lipiddoppelschicht der Membranen anreichern, wodurch erheblich höhere lokale Fettsäurekonzentrationen möglich sind. Ein weiterer Grund für die deutliche Abweichung der IC_{50} -Werte für die humALOX15 könnte darin begründet liegen, dass für unsere Untersuchungen keine gereinigten Enzympräparationen verwendet wurden. Diese experimentelle Strategie beinhaltet, dass Fremdproteine Hemmstoff binden können, der damit nicht mehr für die Hemmung der Lipoxygenasen zur Verfügung steht. Dadurch sollte die effektive Hemmstoffkonzentration deutlich reduziert sein. Andererseits stellt die ALOX15 in zellulären Systemen kein dominantes Protein dar. Auch hier könnten Fremdproteine die effektive Hemmstoffkonzentration reduzieren, sodass die Arbeit mit unreinen Enzympräparationen durchaus von biologischem Interesse ist. Deshalb ist es auch in diesem Punkt nicht möglich zu entscheiden, welches System die intrazellulären Reaktionsbedingungen besser widerspiegelt.

Die Hemmstoffsensitivität der 12-lipoxygenierenden mouALOX15 wurde in identischer Weise quantifiziert und eine IC_{50} von 11,7 μ M ermittelt. Dieser Wert liegt deutlich über dem IC_{50} -Wert der humALOX15, obwohl sowohl das Expressionssystem als auch das Messsystem absolut identisch waren. Diese Daten deuten darauf hin, dass es quantitative Unterschiede im Hemmstoffverhalten der humALOX15 und der mouALOX15 gibt. Das humane Enzym scheint zehnfach sensitiver auf NDGA zu reagieren als die mouALOX15. Im Gegensatz dazu lagen sowohl die IC_{50} -Werte der 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Schimpansen, Orang-Utans und Kaninchen, als auch die entsprechenden Werte der 12-lipoxygenierenden Enzyme von Makaken, Schweinen und Ratten teilweise deutlich unter 1 μ M (Tab. 6). Diese Enzyme reagieren damit sehr viel sensitiver auf NDGA als die humALOX15 und die mouALOX15.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass NDGA alle getesteten ALOX15-Orthologen hemmt. Jedoch weisen die verschiedenen Enzyme unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber diesem Hemmstoff auf. So zeigt die mouALOX15 eine IC_{50} von 11,7 μ M während die orthologen Enzyme von Ratte und Schimpansen unter identischen experimentellen Bedingungen bereits bei Hemmstoffkonzentrationen von 10 nM bzw. 20 nM zu 50 % gehemmt werden. Eine Korrelation zwischen Hemmstoffsensitivität und Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung konnte nicht nachgewiesen werden.

5.5.2 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 5,8,11,14-Eicosatetraensäure

Bei 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (ETYA) handelt es sich um eine Acetylenfettsäure, die seit geraumer Zeit als Lipoxygenasehemmstoff bekannt ist (109). Acetylenfettsäuren fungieren als Suizidsubstrate für Lipoxygenasen. Sie werden am aktiven Zentrum der Enzyme gebunden und zu reaktiven Reaktionsintermediaten oxygeniert. Diese Intermediate reagieren anschließend mit Aminosäuren des aktiven Zentrums, was zu einer irreversiblen Inaktivierung der Enzyme führt (31). Die LOX-Hemmung durch ETYA wurde erstmals für die Sojabohnen-LOX1 beschrieben (129). Sun et al. wiesen 1981 die Wirksamkeit von ETYA als potenten Hemmstoff gegenüber der ALOX12 des Menschen nach (77). Dazu wurden aus menschlichen Blutkonserven Thrombozyten präpariert. Die Zellsuspension wurde über 5 Minuten mit ETYA vorinkubiert und dann mit verschiedenen Konzentrationen an Arachidonsäure über 5

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei ergab sich eine IC_{50} von $0,03 \mu\text{M}$ für die ALOX12. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass ETYA auch die Cyclooxygenase-1 hemmt, was in separaten Untersuchungen bestätigt werden konnte (77). In diesem System wurde IC_{50} -Wert von $3,2 \mu\text{M}$ für die COX-1 ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene ALOX15-Orthologen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber ETYA untersucht. Die Experimente ergaben, dass es sich bei ETYA um einen sehr potenten Hemmstoff aller getesteten ALOX15-Orthologen handelt. Alle Enzyme wurden unter strikt vergleichbaren experimentellen Bedingungen im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich gehemmt. Für das menschliche Enzym ergab sich ein IC_{50} -Wert von 10 nM . Die mouALOX15 stellte im Kontext der anderen getesteten ALOX15-Orthologen eine Ausnahme dar, da dieses Enzym mit einer IC_{50} von $> 10 \mu\text{M}$ um zwei bis drei Größenordnungen weniger empfindlich gegenüber ETYA war als alle anderen Enzyme. Worauf dieser deutliche Unterschied in der Sensitivität gegenüber ETYA zurückzuführen ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Die Positionsspezifität der ALOX15-Orthologen steht in keiner kausalen Beziehung zur Hemmeffizienz von ETYA. 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe werden ähnlich stark gehemmt wie 15-lipoxygenierende Enzyme.

5.5.3 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Baicalein

Baicalein ist ein Lipoxygenaseinhibitor der zur Stoffgruppe der Flavonoide gehört. Diesen Verbindungen werden antioxidative, antiinflammatorische, antimikrobielle und antivirale Eigenschaften zugeschrieben. Die Katecholgruppe des Baicaleins interagiert wahrscheinlich direkt mit den katalytischen Nichthämeisen der Lipoxygenase und führt zu dessen Reduktion (Redoxinhibitor). Bereits 1982 suchten Sekiya et al. nach einem selektiven Inhibitor für die ALOX12. Dazu wurde ein Thrombozytenlysats aus Rattenblut hergestellt und über fünf Minuten mit Arachidonsäure inkubiert (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$). Die Autoren fanden dabei heraus, dass die ALOX12 durch Baicalein stark gehemmt wurde, während sich der COX1 Weg kaum veränderte (79). Deschamps et al. knüpften an diese Forschungen an und versuchten eine mögliche Selektivität des Baicaleins zwischen humALOX12 und humALOX15 nachzuweisen (80). Dazu nutzten sie rekombinant exprimierte und aufgereinigte Enzyme (89). Der Aktivitätsassay wurde nach Carroll et al. durchgeführt (130). Dabei wurde für die ALOX12 $2,5 \mu\text{M}$

Arachidonsäure, für die ALOX15 hingegen 2,5 μM Linolsäure als Substrat verwendet. Bei diesen Versuchen ergaben sich für beide Enzyme vergleichbare IC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich. Damit zeigt Baicalein in seiner Hemmwirkung keine Unterschiede zwischen der ALOX12 und ALOX15. Schewe et al. untersuchten 2001 die Hemmstoffkapazitäten verschiedener Polyphenole gegenüber der aufgereinigten nativen ALOX15 des Kaninchens (81) und bestimmten dabei einen IC_{50} -Wert für Baicalein von 1 μM .

Die Fragestellung unserer Experimente war, ob die Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere Auswirkungen auf die Hemmwirkung des Baicaleins hat. Dazu wurden die rekombinanten ALOX15-Orthologen mit verschiedenen Konzentrationen Baicalein vorinkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 150 μM Arachidonsäure gestartet. Anschließend wurde die Bildung der Hydroxyfettsäuren quantifiziert. Unsere Experimente zeigten, dass es sich bei Baicalein um einen potenten Hemmer aller ALOX15-Orthologen handelt. Mit Ausnahme des murinen Enzyms wurden alle ALOX15-Orthologen stark gehemmt. Die bestimmten IC_{50} -Werte lagen durchgängig im nanomolaren Bereich. Auch hier macht die mouALOX15 eine Ausnahme. Bei diesem Enzym wurde bei Einsatz von 10 μM Baicalein noch eine Restaktivität von 30 % gemessen. Erst bei 100 μM Hemmstoffkonzentrationen konnte keine Restaktivität mehr nachgewiesen werden.

Ein Vergleich von Literaturdaten zur LOX-Hemmung durch Baicalein und unseren experimentellen Daten ergab Übereinstimmungen aber auch deutliche Unterschiede. Die von Schewe et al. ermittelte IC_{50} für die gereinigte native rabALOX15 von 1,0 μM (81) konnte in unseren Versuchen mit dem nicht gereinigten rekombinanten Enzym (IC_{50} : 1,8 μM) bestätigt werden (Tab. 8). Für die humALOX15 ergaben sich jedoch deutliche Abweichungen von Literaturdaten. In unserem System konnte eine IC_{50} von 0,13 μM bestimmt werden (Tab. 8). Im Gegensatz dazu lag der entsprechende Wert in der Deschamps-Studie bei 1,6 μM (80). Der wesentliche Unterschied der beiden Messsysteme bestand darin, dass in der Deschamps-Studie Linolsäure als Oxygenierungssubstrat in einer Konzentration von 2,5 μM verwendet wurde. In unseren Hemmstoffassays wurde Arachidonsäure in einer Konzentration von 150 μM verwendet.

Zusammenfassend kann zum Baicalein geschlussfolgert werden, dass diese Substanz unabhängig von den oben diskutierten quantitativen Unterschieden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die methodischen Besonderheiten der verwendeten Testsysteme zurückgeführt werden können, ein guter bis sehr guter Hemmstoff für die

meisten ALOX15-Orthologen ist. Baicalein macht jedoch keinen Unterschied zwischen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen, sondern hemmt alle getesteten Enzyme mehr oder minder gleichermaßen. Einzige Ausnahme ist die mouALOX15. Dieses Enzym ist mit einer geschätzten IC_{50} von 8,26 μ M deutlich weniger sensitiv als die anderen ALOX15-Orthologen.

5.5.4 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Epigallocatechingallat (EGCG)

Polyphenole wie Epigallocatechingallat kommen in einer Reihe von Lebensmitteln wie Kakao, Tee, Wein, Früchten oder Gemüse vor (82). Sie wirken als Antioxidantien (Radikalfänger) und sind in der Lage, freie Radikale zu entgiften. Sie können aber auch durch ihre phenolischen OH-Gruppen als Eisenkomplexbildner fungieren. Wenn sie an das aktive Zentrum von Lipoxygenasen gelangen, können sie als redox-aktive Verbindungen den Wertigkeitswechsel des Nichthämeisens verhindern, der für die katalytische Wirkung dieser Enzyme essentiell ist.

Freie Radikale und oxidativer Stress spielen in der Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, neuro-degenerativen Veränderungen, chronischen Entzündungen und Krebs eine wichtige Rolle (44). Obwohl derzeit noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob oxidativer Stress als mögliche Ursache oder als Folgeerscheinung dieser Erkrankungen angesehen werden sollte, könnte die Hemmung oxidativer Reaktionen bei den oben genannten Erkrankungen kurative Effekte haben. Da die ALOX15-Reaktion eine Fettsäureoxidation darstellt, könnte eine Hemmung des Enzyms durch Polyphenole protektiv wirken.

Für die rabALOX15 und die Sojabohnen-LOX1 konnten in der Vergangenheit IC_{50} -Werte für EGCG von 4 μ M und 1000 μ M ermittelt werden (81). Schewe et al. verwendeten dazu natives aufgereinigtes Enzym aus Kaninchenretikulozyten. Andere LOX-Isoformen wurden bisher nicht untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigten eine Hemmung aller ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies. Die Hemmung erfolgte speziesübergreifend ohne Abhängigkeit von der Positionsspezifität der Lipoxygenasen. Die IC_{50} -Werte lagen im niedrigen mikromolaren Bereich. Interessanterweise wird das Kaninchenenzym nur dann gehemmt, wenn eine aufgereinigte Enzympräparation verwendet wurde. Dies spricht für eine Wechselwirkung des Hemmstoffs mit Fremdproteinen, die in der nicht aufgereinigten Enzympräparation vorhanden sind. Durch diese Wechselwirkung sollte

die freie Hemmstoffkonzentration absinken, sodass weniger Hemmstoff für die Enzymhemmung zur Verfügung steht. Da für die Testung der anderen Lipoxygenasepräparationen jedoch auch nicht aufgereinigte Enzyme verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass es auch bei diesen Experimenten zu Hemmstoff-Protein-Wechselwirkungen gekommen ist. Deshalb sollten die IC_{50} -Werte für die gereinigten Enzyme noch deutlich geringer sein. Leider konnte diese Arbeitshypothese aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weitergehend überprüft werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Epigallocatechingallat ein guter Hemmstoff für alle getesteten ALOX15-Orthologe ist und dass keine Abhängigkeit der Hemmaktivität von der Positionsspezifität der Enzyme besteht. Auch hier wurde beobachtet, dass die mouALOX15 mit einer $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ deutlich resistenter gegen EGCG war als die anderen ALOX15-Orthologen.

5.5.5 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-Nitrocatechol

4-Nitrocatechol (4-NC) wirkt wie alle Katechole als Antioxidans und Radikalfänger. Durch seine katecholischen OH-Gruppen kann es aber auch als Eisenkomplexbildner fungieren. Wenn es an das katalytische Zentrum von LOXs gelangt, kann es das Redox-shuttling des Nichthämeisens verhindern und damit die katalytische Aktivität hemmen.

1980 beschrieben Spaapen et al. die Wirkung von 4-NC als Hemmstoff der Sojabohnen-LOX1. Dabei ermittelten sie eine IC_{50} von $16,3 \mu\text{M}$ (83). Bisher wurden jedoch keine Experimente zur möglichen Wirkung von 4-NC als Hemmstoff von tierischen Lipoxygenasen durchgeführt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle getesteten ALOX15-Orthologen durch 4-NC gehemmt werden. Dabei wiesen die ALOX15-Orthologen von Mensch, Schimpanse, Kaninchen, Ratte und Schwein IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich auf ($10,72 \mu\text{M}$; $2,0 \mu\text{M}$; $0,39 \mu\text{M}$; $3,33 \mu\text{M}$; $14,20 \mu\text{M}$)(Tab. 10). Im Gegensatz dazu wurden die ALOX15-Orthologen von Makaken und des Orang-Utans erst bei hohen Hemmstoffkonzentrationen inhibiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass 4-NC verschiedenen ALOX15-Orthologen mit unterschiedlicher Effizienz hemmt, dass aber kein Zusammenhang zwischen Hemmaktivität und Reaktionsspezifität festgestellt werden konnte.

5.5.6 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch den 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1

Der 15-Lipoxygenase-Inhibitor-1 wurde 2007 von Bakavoli et al. synthetisiert und seine Wirkung auf die Sojabohnen-LOX1 untersucht (84). Dabei ergab sich für das Pyrimidobenzothiazin eine IC_{50} von 18 μM . Der Hemmstoff wirkt durch Wechselwirkung mit dem Redoxzyklus des Nichthämeisens im aktiven Zentrum des Enzyms. Für die Lipoxygenasen anderer Spezies wurden bisher noch keine Messungen bezüglich der Hemmwirkung durchgeführt.

Für die getesteten ALOX15-Orthologen ergaben sich unter unseren experimentellen Bedingungen unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmeffekte. Die Enzyme von Rhesusaffe und Schwein wurden bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 μM zu fast 50 % gehemmt. Die ALOX15-Orthologen von Schimpanse und Ratte zeigten bei 10 μM Hemmstoff noch 80 % Restaktivität. Bei den Enzymen von Mensch, Orang-Utan und Kaninchen konnten bei dieser Hemmstoffkonzentration keine Hemmeffekte nachgewiesen werden (Tab. 11).

Zusammenfassend lässt sich damit schlussfolgern, dass der 15-Lipoxygenaseinhibitor-1 kein guter Hemmstoff für ALOX15-Orthologe von Säugetieren ist. Aufgrund der nicht nachweisbaren Hemmaktivitäten auf verschiedene ALOX15-Orthologe, konnten keine gesicherten Schlussfolgerungen darüber gezogen werden, ob die Hemmaktivität gegenüber ALOX15-Orthologen von der Reaktionsspezifität der Enzyme abhängt. Als molekulares Werkzeug zur Untersuchung des ALOX15 Stoffwechsels zellulärer Systeme ist diese Substanz eher ungeeignet.

5.5.7 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch 4-N-2-thiazolyl-benzenesulfonamid (CAY10698)

Das Thiazolderivat CAY10698 wirkt als Lipoxygenasehemmstoff durch Verhinderung der Bindung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms. Es wurde 2014 von Luci et al. als selektiver ALOX12-Hemmstoff charakterisiert (85). Für die Experimente zur Isoformselektivität dieser Substanz wurden die humALOX12 und die humALOX15 als N-terminale His-Tag-Fusionsproteine exprimiert und chromatographisch gereinigt. Für die humALOX12 wurde anschließend eine IC_{50} von 5,1 μM bestimmt. Die humane ALOX15 hingegen wird durch CAY10698 kaum gehemmt und Luci et al. gaben eine IC_{50} von $>50 \mu\text{M}$ an. Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit wurden acht ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere untersucht. Dabei

ergab sich für keines der getesteten Enzyme eine Hemmung, wenn der Hemmstoff in submikromolaren Konzentrationen eingesetzt wurde. Die ALOX15-Orthologen von Schimpanse (15-lipoxygenierend) und Schwein (12-lipoxygenierend) zeigten bei einer Hemmstoffkonzentration von 10 μM nur 30-40 % Hemmung. Die anderen Enzyme wurden bei diesen Hemmstoffkonzentrationen nicht gehemmt (Tab.12).

Diese Daten belegen, dass CAY10698 kein guter Hemmstoff von Säugetier-ALOX15-Orthologen ist. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl 12- als auch 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe nicht gehemmt wurden, lassen sich keine sicheren Schlussfolgerungen dahingehend ziehen, ob die Sensitivität gegenüber diesem Hemmstoff von der Reaktionsspezifität des Enzyms abhängt.

5.5.8 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Salicylhydroxamsäure

Hydroxamsäuren sind Eisenkomplexbildner (102) und können, wenn sie am aktiven Zentrum von Lipoxygenasen binden, zu einer Unterbrechung des katalytischen Zyklus führen, indem sie den Wertigkeitswechsel des Nichthämeisens der Lipoxygenasen verhindern. Damit stellen Hydroxamsäuren im Allgemeinen potentielle LOX-Hemmstoffe dar. Außerdem sind Hydroxamsäuren redox-aktive Verbindungen und können damit auch als Redoxhemmstoff wirken. Für die Salicylhydroxamsäure (SHAM) berechneten Nigam et al. eine IC_{50} gegenüber der gereinigten, nativen rabALOX15 von 50 μM (86). Dieser Wert belegt eine mäßige Hemmeffizienz für SHAM, andere Hydroxamsäurederivate erreichen jedoch deutlich geringere IC_{50} -Werte (86). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die möglichen Hemmaktivitäten von SHAM auf andere ALOX15-Orthologe getestet. Dabei zeigte sich, dass bei Einsatz von 10 μM Hemmstoff die ALOX15-Orthologen von Mensch (15-lipoxygenierend), Orang-Utan (15-lipoxygenierend) und Rhesusaffe (12-lipoxygenierend) ihre volle Aktivität beibehielten. Die Lipoxygenasen von Schimpanse (15-lipoxygenierend), Kaninchen (15-lipoxygenierend) und Ratte (12-lipoxygenierend) büßten nur ungefähr ein Drittel ihre Oxygenasekapazität ein (Tab. 13).

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten schlussfolgert werden, dass SHAM kein guter Hemmstoff der ALOX15 ist. Weiterhin konnte keine systematische Korrelation zwischen Hemmstoffsensitivität und Reaktionsspezifität nachgewiesen werden.

5.5.9 Hemmung der ALOX15-Orthologen durch Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure

Zimtsäurederivate wurden als Substanzen mit antioxidativen, antiinflammatorischen aber auch zytotoxischen Eigenschaften beschrieben (87). Pontiki et al. zeigten, dass einige Zimtsäurederivate die Fähigkeit zur Hemmung der Sojabohnen-LOX1 besitzen (131). Mechanistisch wird die LOX-Hemmung auf die Fähigkeit der Zimtsäurederivate zur Reduktion des Fe^{3+} zum inaktiven Fe^{2+} im aktiven Zentrum der Enzyme zurückgeführt (73), sodass diese Substanzen als Redox-Hemmstoffe eingestuft werden können. Später wurde festgestellt, dass Zimtsäurederivate die gereinigte, rekombinante humALOX15 und die humALOX12 auch bei Konzentrationen von 200 μM nicht hemmen (88).

In unseren Versuchen verwendeten wir CHCA als Zimtsäurederivat, um die potentielle Hemmwirkung von Zimtsäuren auf ALOX15-Orthologe zu untersuchen. Dabei konnten wir feststellen, dass die Hemmungen aller getesteten Enzyme so gering waren, dass verlässliche IC_{50} -Werte nicht berechnet werden konnten. Alle Enzyme zeigten selbst bei 10 μM Hemmstoffkonzentration hohe (>90%) Restaktivitäten (Tab. 14).

Zusammenfassend kann deshalb geschlussfolgert werden, dass CHCA kein guter Hemmstoff der ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere ist. Aufgrund der fehlenden Hemmwirkung sowohl für einige 12- als auch für verschiedene 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe können keine Aussagen dazu gemacht werden, ob eine systematische Korrelation zwischen Hemmstoffsensitivität und Reaktionsspezifität besteht.

6 Zukünftige weiterführende Experimente

Im Rahmen dieser Arbeit taten sich einige Fragen auf, die aus zeitlichen Gründen nicht bearbeitet werden konnten. Diesen sollte jedoch in späteren Experimenten auf den Grund gegangen werden:

1. In der vorliegenden Arbeit wurde die Substratspezifität verschiedener ALOX15-Orthologe für Linolsäure und Arachidonsäure getestet. Bei beiden Substraten handelt es sich um omega-6-Polyenfettsäuren, die bei Säugetieren häufig vorkommen. Aus Zeitgründen konnte leider nicht untersucht werden, ob andere Fettsäuren, wie z.B. die omega-3-Fettsäuren, alpha-Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure als Substrate verwendet werden und welche Produkte dabei entstehen. Diese Untersuchungen wären vor allem deshalb von Interesse, da omega-3-Fettsäuren Substrate für die Biosynthese antiinflammatorischer Resolvine darstellen (132). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass verschiedene ALOX15-Orthologe mit einigen omega-3-Fettsäuren eine ausgeprägte duale Positionsspezifität aufweisen, was für die Resolvinsynthese vorteilhaft sein sollte (133).

2. Die *in vitro* Experimente zur Lipoxinbildung haben gezeigt, dass 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe weniger Lipoxine bilden als ihre 15-lipoxygenierenden Verwandten. Um herauszufinden, ob sich diese Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen lassen, sollte das Ausmaß der Lipoxinsynthese im Rahmen der Heilungsphase verschiedener muriner Entzündungsmodelle untersucht werden. Um dabei die Rolle der verschiedenen ALOX-Isoformen zu charakterisieren, könnten ALOX15-, ALOX12- und ALOX5-knockout-Mäuse verwendet werden. Weiterhin ließen sich mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Strategie knockin-Mäuse herstellen, die eine 15-lipoxygenierende ALOX15 exprimieren. Bei diesen Tieren sollte nach unseren *in vitro* Untersuchungen die Lipoxinsynthaseaktivität höher sein als bei Wildtyptieren, was zu einer schnelleren Entzündungsheilung beitragen sollte.

3. In dieser Arbeit wurde u.a. die Orthologspezifität verschiedener LOX-Hemmstoffe getestet. Dabei wurde die Sensitivität von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies gegenüber verschiedener Hemmstoffen getestet. Leider konnte aus Zeitgründen die Paralogspezifität nicht untersucht werden. Es bleibt also nach wie vor unklar, ob die verschiedenen Hemmstoffe neben der humanen ALOX15 z.B. auch die humane ALOX12 und/oder die humane ALOX15B hemmen. Solche Untersuchungen wären vor allem deshalb von biologischem Interesse, da die verschiedenen ALOX-Paraloge einer Spezies unterschiedliche biologische Funktionen

haben. Bei fehlender Paralogspezifität eines Hemmstoffs sollten verschiedene biologische Prozesse gehemmt werden, so dass mit einem breiten Spektrum an Nebenwirkungen des Hemmstoffs gerechnet werden muss. Um dieses Risiko zu minimieren, sollten vor allem ortholog- und paralog-spezifische ALOX-Hemmer für weitere Arzneimittelwirkungen berücksichtigt werden.

4. Aus bisher nicht geklärten Gründen war unter allen getesteten ALOX15-Orthologen die murine ALOX15 besonders unempfindlich gegenüber den meisten der getesteten Hemmstoffe. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür wäre, dass in der Präparation dieses ALOX15-Orthologs hemmstoffabbauende Enzyme und/oder hemmstoffbindende Proteine enthalten sind. Da die murine ALOX15 aber im gleichen Expressionssystem hergestellt wurde wie die anderen Enzymorthologen, scheint diese Erklärungsmöglichkeit eher unwahrscheinlich zu sein. Trotzdem sollte in nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob der deutliche Unterschied in der Hemmeffektivität fast aller getesteten Standardhemmstoffe zwischen muriner und humaner ALOX15 auch für die gereinigten Enzympräparate nachzuweisen ist.

7 Literaturverzeichnis

1. Haeggstrom JZ, Funk CD. 2011. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111: 5866-98
2. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. 2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1851: 308-30
3. Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. 2015. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res* 57: 13-39
4. Newcomer ME, Brash AR. 2015. The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Sci* 24: 298-309
5. Mancini AD, Di Battista JA. 2011. The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammotaxis. *Inflamm Res* 60: 1083-92
6. Savari S, Vinnakota K, Zhang Y, Sjolander A. 2014. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20: 968-77
7. Romano M. 2010. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal* 10: 1048-64
8. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. 2013. Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol* 11: 664-76
9. Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lødrup Carlsen KC, Carlsen KH, Szczeklik A. 2010. Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 126: 859-67.e9
10. Pace-Asciak CR. 2009. The hepxilins and some analogues: a review of their biology. *Br J Pharmacol* 158: 972-81
11. Serhan CN, Petasis NA. 2011. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev* 111: 5922-43
12. Sun D, Funk CD. 1996. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 271: 24055-62
13. Kuhn H, Sprecher H, Brash AR. 1990. On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 265: 16300-5
14. Gardner HW. 1989. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1001: 274-81
15. 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: 827-35
16. Feussner I, Wasternack C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-97
17. Andreou A, Feussner I. 2009. Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70: 1504-10
18. Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. 2002. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 303-12
19. Sigal E, Grunberger D, Cashman JR, Craik CS, Caughey GH, Nade JA. 1988. Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: Partial purification and properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150: 376-83

20. Sigal E, Dicharry S, Highland E, Finkbeiner WE. 1992. Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. *Am J Physiol* 262: L392-8
21. Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. 1992. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 217-21
22. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. 1997. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 6148-52
23. Funk CD, Furci L, FitzGerald GA. 1990. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 5638-42
24. Virmani J, Johnson EN, Klein-Szanto AJP, Funk CD. Role of platelet-type 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer Letters* 162: 161-5
25. Zheng Y, Yin H, Boeglin WE, Elias PM, Crumrine D, Beier DR, Brash AR. 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: 24046-56
26. Chen XS, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG, Funk CD. 1994. cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. *J Biol Chem* 269: 13979-87
27. Sloane DL, Leung R, Craik CS, Sigal E. 1991. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* 354: 149-52
28. Borngaber S, Kuban RJ, Anton M, Kuhn H. 1996. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol* 264: 1145-53
29. Johannesson M, Backman L, Claesson HE, Forsell PKA. 2010. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 121-9
30. Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. 2010. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys* 503: 161-74
31. Wecksler AT, Jacquot C, van der Donk WA, Holman TR. 2009. Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid. *Biochemistry* 48: 6259-67
32. Kuhn H, Schewe T, Rapoport SM. 1986. The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 58: 273-311
33. Garreta A, Val-Moraes SP, García-Fernández Q, Busquets M, Juan C, Oliver A, Ortiz A, Gaffney BJ, Fita I, Manresa À, Carpena X. 2013. Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB J* 27: 4811-21
34. Koljak R, Boutaud O, Shieh BH, Samel N, Brash AR. 1997. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science* 277: 1994-6
35. Löhelaid H, Järving R, Valmsen K, Varvas K, Kreen M, Järving I, Samel N. 2008. Identification of a functional allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein in the soft coral *Gersemia fruticosa* suggests the generality of this pathway in octocorals. *Biochim Biophys Acta* 1780: 315-21

36. Oldham ML, Brash AR, Newcomer ME. 2005. The structure of coral allene oxide synthase reveals a catalase adapted for metabolism of a fatty acid hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 297-302
37. Walther M, Hofheinz K, Vogel R, Roffeis J, 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 516: 1-9
38. Powell WS, Rokach J. 2015. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1851: 340-55
39. Shappell SB, Olson SJ, Hannah SE, Manning S, Roberts RL, Masumori N, Jisaka M, Boeglin WE, Vader V, Dave DS, Shook MF, Thomas TZ, Funk CD, Brash AR, Matusik RJ. 2003. Elevated expression of 12/15-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in a transgenic mouse model of prostate carcinoma. *Cancer Res* 63: 2256-67
40. Wu Y, Fang B, Yang XQ, Wang L, Chen D, Krasnykh V, Carter BZ, Morris JS, Shureiqi I. 2008. Therapeutic molecular targeting of 15-lipoxygenase-1 in colon cancer. *Mol Ther* 16: 886-92
41. Andersson CK, Claesson HE, Rydell-Tormanen K, Swedmark S, Hallgren A, Erjefalt JS. 2008. Mice lacking 12/15-lipoxygenase have attenuated airway allergic inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 648-56
42. Chawengsub Y, Gauthier KM, Campbell WB. 2009. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H495-507
43. Chan PH. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-9
44. Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. 2015. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene* 573: 1-32
45. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-9
46. Hansen J, Garreta A, Benincasa M, Fusté MC, Busquets M, Manresa A. 2013. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 4737-47
47. Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. 2015. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Progress in Lipid Research* 57: 13-39
48. Pekarova M, Kuhn H, Bezakova L, Ufer C, Heydeck D. 2015. Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation. *Arch Biochem Biophys* 571: 50-7
49. Yoshimoto T, Suzuki H, Yamamoto S, Takai T, Yokoyama C, Tanabe T. 1990. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 2142-6
50. De Marzo N, Sloane DL, Dicharry S, Highland E, Sigal E. 1992. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am J Physiol* 262: L198-207
51. Adel S, Karst F, Gonzalez-Lafont A, Pekarova M, Saura P, Masgrau L, Lluch JM, Stehling S, Horn T, Kuhn H, Heydeck D. 2016. Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E4266-75

52. Vogel R, Jansen C, Roffeis J, Reddanna P, Forsell P, Claesson HE, Kuhn H, Walther M. 2010. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* 285: 5369-76
53. Chaitidis P, Adel S, Anton M, Heydeck D, Kuhn H, Horn T. 2013. Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms. *J Lipid Res* 54: 1397-409
54. Bryant RW, Bailey JM, Schewe T, Rapoport SM. 1982. Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* 257: 6050-5
55. Bryant RW, Schewe T, Rapoport SM, Bailey JM. 1985. Leukotriene formation by a purified reticulocyte lipoxygenase enzyme. Conversion of arachidonic acid and 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid to 14, 15-leukotriene A4. *J Biol Chem* 260: 3548-55
56. Berger M, Schwarz K, Thiele H, Reimann I, Huth A, Borngraber S, Kuhn H, Thiele BJ. 1998. Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J Mol Biol* 278: 935-48
57. Walther M, Ivanov I, Myagkova G, Kuhn H. 2001. Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *Chemistry & Biology* 8: 779-90
58. Toledo L, Masgrau L, Lluch JM, Gonzalez-Lafont A. 2011. Substrate binding to mammalian 15-lipoxygenase. *J Comput Aided Mol Des* 25: 825-35
59. Kuhn H, Brash AR. 1990. Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells. *J Biol Chem* 265: 1454-8
60. Takahashi Y, Glasgow WC, Suzuki H, Taketani Y, Yamamoto S, Anton M, Kuhn H, Brash AR. 1993. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. *Eur J Biochem* 218: 165-71
61. Kuhn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, Bursztyn-Pettegrew H, Chan H, Sigal E. 1993. Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1169: 80-9
62. Rapoport SM, Schewe T. 1986. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta* 864: 471-95
63. Steinberg D, Witztum JL. 2010. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2311-6
64. Libby P. 2012. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2045-51
65. Lankin VZ, Kuhn H, Hiebsch C, Schewe T, Rapoport SM, Tikhaze AK, Gordeeva NT. 1985. On the nature of the stimulation of the lipoxygenase from rabbit reticulocytes by biological membranes. *Biomed Biochim Acta* 44: 655-64
66. Walther M, Wiesner R, 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: 3717-25
67. Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-35
68. Serhan CN, Chiang N. 2013. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol* 13: 632-40
69. Chandrasekharan JA, Sharma-Walia N. 2015. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J Inflamm Res* 8: 181-92

70. Romano M, Cianci E, Simiele F, Recchiuti A. 2015. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. *Eur J Pharmacol* 760: 49-63
71. Kieran NE, Maderna P, Godson C. 2004. Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney Int* 65: 1145-54
72. Kuhn H, Brash AR, Wiesner R, Alder L. 1988. Lipoxygenase catalyzed oxygenation of hydroxy fatty acids to lipoxins. *Adv Exp Med Biol* 229: 39-49
73. Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL. 1987. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 26: 7064-72
74. Rai G, Joshi N, Jung JE, Liu Y, Schultz L, Yasgar A, Perry S, Diaz G, Zhang Q, Kenyon V, Jadhav A, Simeonov A, Lo EH, van Leyen K, Maloney DJ, Holman TR. 2014. Potent and selective inhibitors of human reticulocyte 12/15-lipoxygenase as anti-stroke therapies. *J Med Chem* 57: 4035-48
75. Whitman S, Gezginci M, Timmermann BN, Holman TR. 2002. Structure-activity relationship studies of nordihydroguaiaretic acid inhibitors toward soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. *J Med Chem* 45: 2659-61
76. Hitchcock M, Kokolis NA. 1981. Arachidonic acid metabolism and modulation of in vitro anaphylaxis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid and 9a,12a-octadecadienoic acid. *Br J Pharmacol* 72: 689-95
77. Sun FF, McGuire JC, Morton DR, Pike JE, Sprecher H, Kunau WH. 1981. Inhibition of platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase by acetylenic acid compounds. *Prostaglandins* 21: 333-43
78. Nigam S. 1999. *Lipoxygenases and their Metabolites*: Springer US
79. Sekiya K, Okuda H. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem Biophys Res Commun* 105: 1090-5
80. Deschamps JD, Kenyon VA, Holman TR. 2006. Baicalein is a potent in vitro inhibitor against both reticulocyte 15-human and platelet 12-human lipoxygenases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 4295-301
81. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. 2001. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 382: 1687-96
82. Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073s-85s
83. Spaapen LJ, Verhagen J, Veldink GA, Vliegthart JF. 1980. Properties of a complex of Fe(III)-soybean lipoxygenase-1 and 4-nitrocatechol. *Biochim Biophys Acta* 617: 132-40
84. Bakavoli M, Nikpour M, Rahimizadeh M, Saberi MR, Sadeghian H. 2007. Design and synthesis of pyrimido[4,5-b][1,4]benzothiazine derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 15: 2120-6
85. Luci DK, Jameson JB, Yasgar A, Diaz G, Joshi N, Kantz A, Markham K, Perry S, Kuhn N, Yeung J, Kerns EH, Schultz L, Holinstat M, Nadler JL, Taylor-Fishwick DA, Jadhav A, Simeonov A, Holman TR, Maloney DJ. 2014. Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of 4-((2-Hydroxy-3-methoxybenzyl)amino)benzenesulfonamide Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of 12-Lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry* 57: 495-506
86. Nigam S, Pace-Asciak CR. 2012. *Lipoxygenases and their Metabolites: Biological Functions*: Springer US
87. Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmira FJ, Costa-Lotufo LV. 2006. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Braz J Med Biol Res* 39: 801-7

88. Gutierrez-Lugo MT, Deschamps JD, Holman TR, Suarez E, Timmermann BN. 2004. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med* 70: 263-5
89. Amagata T, Whitman S, Johnson TA, Stessman CC, Loo CP, Lobkovsky E, Clardy J, Crews P, Holman TR. 2003. Exploring sponge-derived terpenoids for their potency and selectivity against 12-human, 15-human, and 15-soybean lipoxygenases. *J Nat Prod* 66: 230-5
90. Schewe T, Kuhn H, Wiesner R, Belkner J, Moch D. 1991. Mammalian lipoxygenases--are they only involved in the arachidonic acid cascade? *Agents Actions* 32: 77-8
91. Johannesson M, Backman L, Claesson HE, Forsell PK. 2010. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82: 121-9
92. Yamamoto S, Takahashi Y, Hada T, Hagiya H, Suzuki H, Reddy GR, Ueda N, Arakawa T, Nakamura M, Matsuda S, Taketani Y, Yoshimoto T, Azekawa T, Morita Y, Ishimura K, Arase S, Glasgow WC, Brash AR, Anton M, Kuhn H. 1997. Mammalian arachidonate 12-lipoxygenases. *Adv Exp Med Biol* 400a: 127-31
93. Watanabe T, Haeggstrom JZ. 1993. Rat 12-lipoxygenase: mutations of amino acids implicated in the positional specificity of 15- and 12-lipoxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 1023-9
94. Funk CD, Keeney DS, Oliw EH, Boeglin WE, Brash AR. 1996. Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase. *J Biol Chem* 271: 23338-44
95. Rapoport SM, Schewe T, Wiesner R, Halangk W, Ludwig P, Janicke-Hohne M, Tannert C, Hiebsch C, Klatt D. 1979. The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem* 96: 545-61
96. Deschamps JD, Ogunsola AF, Jameson JB, 2nd, Yasgar A, Flitter BA, Freedman CJ, Melvin JA, Nguyen JV, Maloney DJ, Jadhav A, Simeonov A, Bomberger JM, Holman TR. 2016. Biochemical and Cellular Characterization and Inhibitor Discovery of *Pseudomonas aeruginosa* 15-Lipoxygenase. *Biochemistry* 55: 3329-40
97. Banthiya S, Pekarova M, Kuhn H, Heydeck D. 2015. Secreted lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* exhibits biomembrane oxygenase activity and induces hemolysis in human red blood cells. *Arch Biochem Biophys* 584: 116-24
98. Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-7
99. Di Venere A, Nicolai E, Ivanov I, Dainese E, Adel S, Angelucci BC, Kuhn H, Maccarrone M, Mei G. 2014. Probing conformational changes in lipoxygenases upon membrane binding: fine-tuning by the active site inhibitor ETYA. *Biochim Biophys Acta* 1841: 1-10
100. Mascayano C, Espinosa V, Sepulveda-Boza S, Hoobler EK, Perry S. 2013. In vitro study of isoflavones and isoflavans as potent inhibitors of human 12- and 15-lipoxygenases. *Chem Biol Drug Des* 82: 317-25
101. Pham C, Jankun J, Skrzypczak-Jankun E, Flowers RA, 2nd, Funk MO, Jr. 1998. Structural and thermochemical characterization of lipoxygenase-catechol complexes. *Biochemistry* 37: 17952-7
102. Urbaniak MD, Capes AS, Crossman A, O'Neill S, Thompson S, Gilbert IH, Ferguson MA. 2014. Fragment screening reveals salicylic hydroxamic acid as an

- inhibitor of *Trypanosoma brucei* GPI GlcNAc-PI de-N-acetylase. *Carbohydr Res* 387: 54-8
103. Kaneshiro K, Watanabe M, Terasawa K, Uchimura H, Fukuyama Y, Iwamoto S, Sato TA, Shimizu K, Tsujimoto G, Tanaka K. 2012. Rapid quantitative profiling of N-glycan by the glycan-labeling method using 3-aminoquinoline/alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid. *Anal Chem* 84: 7146-51
 104. Ueda N, Yamamoto S, Fitzsimmons BJ, Rokach J. 1987. Lipoxin synthesis by arachidonate 5-lipoxygenase purified from porcine leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 996-1002
 105. Sloane DL, Dixon RA, Craik CS, Sigal E. 1991. Expression of cloned human 15-lipoxygenase in eukaryotic and prokaryotic systems. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 21a: 25-8
 106. Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. 1990. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem* 265: 18351-61
 107. Sadeghian H, Jabbari A. 2016. 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 26: 65-88
 108. Gregus AM, Dumlao DS, Wei SC, Norris PC, Catella LC, Meyerstein FG, Buczynski MW, Steinauer JJ, Fitzsimmons BL, Yaksh TL, Dennis EA. 2013. Systematic analysis of rat 12/15-lipoxygenase enzymes reveals critical role for spinal eLOX3 hepoxilin synthase activity in inflammatory hyperalgesia. *Faseb j* 27: 1939-49
 109. Kuhn H, Holzhutter HG, Schewe T, Hiebsch C, Rapoport SM. 1984. The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids. *Eur J Biochem* 139: 577-83
 110. Corey EJ, Park H. 1982. Irreversible inhibition of the enzymic oxidation of arachidonic acid to 15-hydroperoxy-5,8,11-Z,13-E-eicosatetraenoic acid (15-HPETE) by 14,15-dehydroarachidonic acid. *Journal of the American Chemical Society* 104: 1750-2
 111. Sadik CD, Sies H, Schewe T. 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology* 65: 773-81
 112. Yokoyama C, Shinjo F, Yoshimoto T, Yamamoto S, Oates JA, Brash AR. 1986. Arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes by immunoaffinity chromatography and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem* 261: 16714-21
 113. Freire-Moar J, Alavi-Nassab A, Ng M, Mulkins M, Sigal E. 1995. Cloning and characterization of a murine macrophage lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1254: 112-6
 114. Soler J, Saura P, Garcia-Lopez D, Masgrau L, Lluch JM, Gonzalez-Lafont A. 2016. How Can Linoleic Acid Be the Preferential Substrate of the Enzyme 15-Lipoxygenase-1? A QM/MM Approach. *J Phys Chem B* 120: 1950-60
 115. Mashima R, Okuyama T. 2015. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol* 6: 297-310
 116. Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM. 1975. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett* 60: 149-52
 117. Cui J, Chew SJ, Shi Y, Gong Z, Shen HM. 2017. CRISPR system for genome engineering: the application for autophagy study. *BMB Rep*
 118. Feltenmark S, Gautam N, Brunnstrom A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Bjorkholm M, Claesson HE. 2008. Eoxins are proinflammatory

- arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 680-5
119. Jeon SG, Moon HG, Kim YS, Choi JP, Shin TS, Hong SW, Tae YM, Kim SH, Zhu Z, Gho YS, Kim YK. 2009. 15-lipoxygenase metabolites play an important role in the development of a T-helper type 1 allergic inflammation induced by double-stranded RNA. *Clin Exp Allergy* 39: 908-17
 120. Sen M, McHugh K, Hutzley J, Philips BJ, Dhir R, Parwani AV, Kelavkar UP. 2006. Orthotopic expression of human 15-lipoxygenase (LO)-1 in the dorsolateral prostate of normal wild-type C57BL/6 mouse causes PIN-like lesions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 81: 1-13
 121. Hugou I, Blin P, Henri J, Daret D, Larrue J. 1995. 15-Lipoxygenase expression in smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis* 113: 189-95
 122. Bocan TM, Rosebury WS, Mueller SB, Kuchera S, Welch K, Daugherty A, Cornicelli JA. 1998. A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis* 136: 203-16
 123. Gertow K, Nobili E, Folkersen L, Newman JW, Pedersen TL, Ekstrand J, Swedenborg J, Kuhn H, Wheelock CE, Hansson GK, Hedin U, Haeggstrom JZ, Gabrielsen A. 2011. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis* 215: 411-6
 124. van Leyen K, Arai K, Jin G, Kenyon V, Gerstner B, Rosenberg PA, Holman TR, Lo EH. 2008. Novel lipoxygenase inhibitors as neuroprotective reagents. *J Neurosci Res* 86: 904-9
 125. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. 2006. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke* 37: 3014-8
 126. Boddupalli S, Liebowitz D, Miller G. 2006. Methods for treating diabetes. Google Patents
 127. Nadler JL, Taylor-Fishwick D, Chakrabarti S, Dobrian A. 2011. Treatment of diabetes and disorders associated with visceral obesity with inhibitors of human arachidonate 12 lipoxygenase and arachidonate 15-lipoxygenase. Google Patents
 128. Nelson MJ, Brennan BA, Chase DB, Cowling RA, Grove GN, Scarrow RC. 1995. Structure and kinetics of formation of catechol complexes of ferric soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 34: 15219-29
 129. Downing DT, Ahern DG, Bachta M. 1970. Enzyme inhibition by acetylenic compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 40: 218-23
 130. Carroll J, Jonsson EN, Ebel R, Hartman MS, Holman TR, Crews P. 2001. Probing sponge-derived terpenoids for human 15-lipoxygenase inhibitors. *J Org Chem* 66: 6847-51
 131. Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Litinas K, Geromichalos G. 2014. Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies. *Molecules* 19: 9655-74
 132. Gyurko R, Van Dyke TE. 2014. The role of polyunsaturated omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid-derived resolvin E1 (RvE1) in bone preservation. *Crit Rev Immunol* 34: 347-57
 133. Kutzner L, Goloshchapova K, Heydeck D, Stehling S, Kuhn H, Schebb NH. 2017. Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1862: 666-75

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen..... | 16 |
| Abb. 2: Kristallstruktur der ALOX15 des Kaninchens | 17 |
| Abb. 3: Das Triadenkonzept der Positionsspezifität von ALOX15-Orthologen | 18 |
| Abb. 4: Beteiligung der ALOX15 an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen | 19 |
| Abb. 5: Darstellung der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen der späten Primatenevolution | 22 |
| Abb. 6: Phylogenetische Systematik der Säugetierspezies mit bekannten ALOX15 Reaktionsspezifitäten | 23 |
| Abb. 7: Strukturformeln der beiden Lipoxinisiomere LxA ₄ und LxB ₄ | 28 |
| Abb. 8: Reaktionsweg der Lipoxinsynthese..... | 30 |
| Abb. 9: Strukturformel von NDGA..... | 32 |
| Abb. 10: Strukturformel von ETYA | 32 |
| Abb. 11: Strukturformel von Baicalein | 33 |
| Abb. 12: Strukturformel von Epigallocatechingallat | 34 |
| Abb. 13: Strukturformel von 4-NC | 34 |
| Abb. 14: Strukturformel von LI-1 | 35 |
| Abb. 15: Strukturformel von CAY10698 | 35 |
| Abb. 16: Strukturformel von Salicylhydroxamsäure..... | 36 |
| Abb. 17: Strukturformel von CHCA | 36 |
| Abb. 18: RP-HPLC Chromatogramm der Standards von 15-, 12- und 5-HETE bei einer Wellenlänge von 235 nm..... | 60 |
| Abb. 19: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenasekapazität der humALOX15.. | 61 |
| Abb. 20: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität der mouALOX15.... | 62 |
| Abb. 21: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität huml418AALOX15. | 63 |
| Abb. 22: Chromatogramm der Arachidonsäureoxygenaseaktivität mouL353FALOX15. | 63 |
| Abb. 23: Chromatogramm des Membranoxygenaseassays der humALOX15. | 67 |
| Abb. 24: Chromatogramm des Membranoxygenaseassays der Kontrollmessung | 68 |
| Abb. 25: Lipoxinsyntheseaktivität der ALOX15-Orthologen von Mensch und Maus..... | 72 |
| Abb. 26: Einfluss von NDGA auf die ALOX15 Orthologen von Mensch und Maus. | 75 |
| Abb. 27: Hemmstofftestung von ETYA für die humALOX15. | 78 |
| Abb. 28: Einfluss von Baicalein auf die humane und die murine ALOX15. | 79 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Determinanten des Triadenkonzepts der ALOX15-Orthologen von Säugetieren. | 21 |
| Tab. 2: Arachidonsäureoxygenaseaktivität der ALOX15-Orthologen..... | 64 |
| Tab. 3: Substratspezifitätstestung mit den Substraten Arachidonsäure und Linolsäure. | 65 |
| Tab. 4: Relative Membranoxygenierungskapazität ausgewählter ALOX15-Orthologen. | 69 |
| Tab. 5: Relative Lipoxinsynthaseaktivität von ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies..... | 70 |
| Tab. 6: Mittlere inhibitorische Konstanten (IC_{50}) der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von NDGA..... | 76 |
| Tab. 7: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von ETYA..... | 77 |
| Tab. 8: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von Baicalein..... | 80 |
| Tab. 9: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von EGCG..... | 81 |
| Tab. 10: Mittlere inhibitorische Konstanten der ALOX15-Orthologen unter Einfluss von 4-Nitrocatechol..... | 83 |
| Tab. 11 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 μ M Lipoxygenaseinhibitor-1..... | 84 |
| Tab. 12 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 μ M CAY10698..... | 85 |
| Tab. 13 Restaktivität der ALOX15-Orthologen unter dem Einfluss von 10 μ M Salicylhydroxamsäure..... | 86 |
| Tab. 14 Restaktivität der ALOX15-Orthologen bei Einfluss von 10 μ M CHCA..... | 86 |

10 Lebenslauf

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

11 Publikationsliste

1. Kühn H, **Karst F**, Heydeck D. 2016. **Catalytic Multiplicity of 15-Lipoxygenase-1 Orthologs (ALOX15) of Different Species**. In *Lipoxygenases in Inflammation*, ed. D Steinhilber, pp. 47-82. Switzerland: Springer
2. Adel S, **Karst F**, Gonzalez-Lafont A, Pekarova M, Saura P, Masgrau L, Lluch JM, Stehling S, Horn T, Kuhn H, Heydeck D 2016. **Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E4266-75

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Felix Karst, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Veränderung der Reaktionsspezifität der 15- Lipoxygenase (ALOX15) im Rahmen der späten Säugetierevolution und zur Wirkung von Hemmstoffen auf die ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung

Felix Wilhelm Karst hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Kühn H, **Karst F**, Heydeck D. 2016. **Catalytic Multiplicity of 15-Lipoxygenase-1 Orthologs (ALOX15) of Different Species**. In *Lipoxygenases in Inflammation*, ed. D Steinhilber, pp. 47-82. Switzerland: Springer

Bei dieser Publikation handelt es sich um einen eingeladenen systematischen Übersichtsartikel zur katalytischen Vielfalt von Lipoxygenasen. Der Titel der Arbeit wurde vom Herausgeber vorgegeben. Für die Erstellung des Manuskriptes war eine umfangreiche (der Artikel beinhaltet mehr als 150 verschiedene Literaturzitate) Literaturrecherche notwendig, die von mir nach Angaben der Erstautors/Betreuers durchgeführt wurde. Die Struktur des Manuskripts (Kapitel mit Kapitelüberschriften) wurde in einer gemeinsamen Besprechung der drei Koautoren festgelegt. Die von mir herausgesuchten mehr als 200 Arbeiten wurden anschließend gemeinsam von mir und meinem Betreuer sortiert, ergänzt und den einzelnen Kapiteln des Übersichtsartikels zugeordnet. Die Erstellung der Erstfassung der einzelnen Kapitel wurde unter den Koautoren aufgeteilt, wobei ich die Kapitel 2., 5.2. und 5.3. erstellt habe. Anschließend wurden die einzelnen Kapitel vom Erstautor zusammengestellt und komplett überarbeitet. Diese präfinale Fassung des Manuskriptes wurde von allen Koautoren noch einmal durchgearbeitet, bevor das Manuskript eingereicht wurde. Nach externer Begutachtung des Manuskripts wurden die Gutachterkommentare im Kreis aller Koautoren diskutiert und die erforderlichen Textänderungen durchgeführt.

Adel S, **Karst F**, Gonzalez-Lafont A, Pekarova M, Saura P, Masgrau L, Lluch JM, Stehling S, Horn T, Kuhn H, Heydeck D 2016. **Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E4266-75

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Originalarbeit, bei der der Anteil der einzelnen Koautoren in einem separaten Statement definiert ist. Mein Anteil an den experimentellen Arbeiten bezog sich auf die Expression der verschiedenen ALOX15 Spezies und auf die Quantifizierung der Lipoxinsynthaseaktivität der

verschiedenen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15 Orthologen. Weiterhin habe ich an der Konzeption der Arbeit und an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Datum

Unterschrift Betreuer

Unterschrift Promovend

Danksagung

Ich möchte allen Mitgliedern der AG Kühn und ganz besonders Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn und Frau Dr. Heydeck für ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken. Mein Dank gebührt weiterhin meiner Familie und meinen Freunden, meiner Freundin Carlota Dolben sowie Herrn Jan Wiechmann für die Hilfe bei der graphischen Gestaltung dieser Dissertation.