

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

DISSERTATION

Untersuchungen zum Polymorphismus der
alpha – 1 – Antitrypsin – und ALOX15 – Gene
in der indonesischen Bevölkerung und die
pathophysiologischen Rollen der Enzyme bei der chronisch –
obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und
Artherosklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Eckert – Schurmann geb. Heeß

aus Waiblingen

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abstrakt.....	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Definitionen.....	6
1.1.1 Polymorphismus	6
1.1.2 Single – Nukleotid – Polymorphism (SNP)	7
1.2 Alpha – 1 – Antitrypsin.....	8
1.2.1 Physiologische Funktion und Entstehung.....	8
1.3 Chronisch – obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	11
1.3.1 Definition	11
1.3.2 Epidemiologie	13
1.3.3 Pathogenese.....	13
1.3.4 Risikofaktoren	14
1.3.5 Rolle des alpha – 1 – Antitrypsingens bei COPD	14
1.4 SNPs beim alpha – 1 – Antitrypsin	15
1.5 ALOX15	19
1.5.1 Vorkommen und Verwandtschaft von Lipoxygenasen	19
1.5.2 Biologische Funktionen der Lipoxygenasen	22
1.6 Arteriosklerose	24
1.6.1 Definition	24
1.6.2 Pathogenese.....	25
1.6.3 Risikofaktoren	27
1.6.4 Rolle der ALOX15	28
1.7 SNP – Vorkommen bei der ALOX15	31
1. 8 Gegenstand und Ziele dieser Arbeit.....	34
2 Material und Methoden.....	35
2.1 Materialien.....	35
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien für analytisches Arbeiten	35
2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien für präparatives Arbeiten	35
2.1.3 Puffer, Nährmedien und Lösungen.....	36
2.1.4 Enzyme und Kits	37
2.1.5 Plasmide, Oligonukleotide und Zelllinie.....	37
2.2 alpha – 1 – Antitrypsin – Genotypisierung	38
2.2.1 Genomische Polymerasekettenreaktion (PCR).....	39
2.2.2 Spaltung mit Taq alpha1	40
2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese	41
2.3 ALOX15 – Genotypisierung	41
2.3.1 Real time PCR	41
2.3.2 Expression in HEK 293 Zellen.....	43
2.3.3 Expression der rekombinaten LOX in <i>E. coli</i> und Aufreinigung des Enzyms.....	43
2.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese	44
2.3.5 Transformation von Bakterienzellen	45
2.3.6 Mini – Präparation.....	45
2.3.7 Kontrollspaltung	45
2.3.8 Proteinbestimmung nach Bradford	46

Inhaltsverzeichnis

2.3.9 Western – Blot	46
2.3.10 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) der LOX – Produkte	47
2.3.11 Photometrische Aktivitätsbestimmung.....	48
2.3.12 Bestimmung kinetische Konstanten K_M und V_{Max}	49
2.3.13 Swiss – Pbd Viewer 4.0.1	49
2.3.14 VMD	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Ergebnisse der alpha – 1 – Antitrypsin – Genotypisierung	50
3.2 Ergebnisse zur ALOX15	54
3.2.1 ALOX15 – Genotypisierung	54
3.2.2 Expression der ALOX15 und deren T560M – Mutante in <i>E. coli</i> und Charakterisierung der rekombinanten Proteine.....	56
3.2.3 Enantioselektivität der ALOX15 – Varianten	58
3.2.4 Expression der ALOX15 in HEK 293 – Zellen.....	58
3.2.5 Die Aktivitätsbestimmungen der HEK 293 – Transfektanten mittels HPLC und Überprüfung der Positionsspezifität	60
3.2.6 Enantioselektivität der ALOX15 Varianten, die in HEK 293 – Zellen exprimiert wurden	61
3.2.7 Reaktionskinetik.....	61
3.2.8 Bestimmung von V_{max} und K_m – Wert des Wildtypenzym mit Hilfe eines Lineweaver – Burk – Diagramms.....	63
3.2.9 Untersuchung zur molekularen Ursache der geringen katalytischen Aktivität der T560M – Mutante	64
3.2.10 Mutation einzelner Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerks.....	66
3.2.11 Charakterisierung der Q294L – und N287 – Mutanten	67
4 Diskussion	70
4.1 Häufigkeit des untersuchten SNPs beim Alpha – 1 – Antitrypsin	70
4.2 ALOX15	72
4.2.1 Häufigkeit der T560M – Mutation der ALOX15.....	72
4.2.2 Aktivitätsbestimmungen der 12/15 – LOX	74
4.2.3 Enantiomeraselektivität der ALOX15 und der T560M – Mutante in <i>E. coli</i> und HEK 293 – Zellen	76
4.2.4 Bestimmung der Proteinmenge und des Gehalts an ALOX15 in HEK 293 – Zellen.....	77
4.2.5 Reaktionskinetik.....	77
4.2.6 Struktur und katalytische Aktivität der ALOX15 und seiner T560M – Mutante	80
4.2.7 Mutation einzelner Aminosäuren des Wasserstoffbrücken – Netzwerks	81
5 Zusammenfassung.....	84
6 Literaturverzeichnis	85

Abstrakt

Der genetische Polymorphismus trägt wesentlich zur funktionellen Individualität verschiedener Individuen einer Spezies bei und sorgt auch beim Menschen dafür, dass unterschiedliche Individuen sich gegenüber vergleichbaren Umwelteinflüssen unterschiedlich verhalten. Genetische Polymorphismen sind regional unterschiedlich stark ausgeprägt und tragen dazu bei, dass bestimmte Erkrankungen in verschiedenen Gebieten gehäuft oder seltener auftreten. Da bisher keine Daten zur Häufigkeitsverteilung des S – und Z – Allels des alpha – 1 – Antitrypsingens und des T560M – SNPs der ALOX15 in der indonesischen Bevölkerung vorlagen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Häufigkeit der genannten genetischen Polymorphismen in einem 150 Individuen umfassenden Probandenkollektiv der ost – javanesischen Bevölkerung untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass weder die alpha – 1 – Antitrypsin Allele noch der genetische Polymorphismus der zur T560M – Mutation in der ALOX15 führt, mit hoher Frequenz (>2%) in untersuchten Probandenkollektiv vorkamen. Damit eignet sich die ost – javanesische Bevölkerung nicht für groß angelegte Korrelationsuntersuchungen zur funktionellen Bedeutung der untersuchten Polymorphismen bei bestimmten Erkrankungen.

Der genetische Polymorphismus des humanen ALOX15 Gens, der einen T560M Austausch im kodierten Enzym bedingt, führt zu einem 95% Verlust der Enzymaktivität. Da die molekularen Ursachen für diesen Aktivitätsverlust unbekannt waren, wurde diese im zweiten Teil der Arbeit untersucht. Durch multiple ortsgerichtete Mutagenese an der rekombinanten ALOX15 und durch computergestützte Strukturmodellierung wurde festgestellt, dass dieser Aminosäureaustausch zu einer Störung des Wasserstoffbrückennetzwerkes führt, welches Thr560, das sich an der Peripherie des Enzymmoleküls befindet, mit Met418 verbindet, das direkt zur Geometrie des aktiven Zentrums beiträgt. Durch den Verlust der freien OH – Gruppe des Thr560 kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Umorientierung der Seitenkette des Met418 und damit zu einer Strukturveränderung der Substratbindungstasche. Diese Veränderung könnte zu einer Behinderung der Substratbindung führen, was zum beobachteten Aktivitätsverlust beitragen könnte.

Abstract

Genetic polymorphisms are responsible for the functional individuality of human beings. They are involved in the variable sensitivity of human individuals towards external stimuli and contribute to genetic predisposition of certain individuals for a number of diseases. Genetic polymorphisms occur with high frequencies in certain regions but show a less frequent distribution in other geographic areas. When this work was started there were no experimental data available in either of the major Indonesian subpopulations characterizing the allele frequency of the S – and the Z – allele of the human alpha – 1 – antitrypsin gene. Similarly, no experimental data have been published on the distribution of the single nucleotide polymorphism, which leads to the T560M mutation in the human ALOX15 gene, in Indonesia. In my dissertation I first quantified the frequency of occurrence of the above – specified genetic polymorphisms in a selected cohort (150 individuals) of the east – Javanese population. It was found that neither the two alpha – 1 – antitrypsin alleles nor the specified ALOX15 SNP occur with a frequency above 2 % in this cohort. These data indicate that the east – Javanese population may not be suitable for more detailed investigation into the functional relevance of these genetic variations and into their possible involvement in the pathogenesis of different diseases.

The genetic polymorphism (SNP) leading to a T560M exchange in human ALOX15 induces a 95% loss in the catalytic activity of this enzyme. Since the molecular basis for the impaired catalytic activity has not been clarified, I explored the possible structural alterations induced by this amino acid exchange. Applying an integrated research strategy involving multiple site – directed mutagenesis, kinetic measurements and computer – assisted structural modelling I found that the T560M exchange may restructure the hydrogen bond network, which interconnects Thr560 (localized at periphery of the enzyme molecule) with Met418 (localized at the active site). The loss of the OH – group of Thr560 induces a reorientation of its side – chain and this restructures the hydrogen bond network stabilizing the catalytic centre. This structural alteration is likely to impair substrate binding at the active site and thus, reduces the catalytic efficiency of the enzyme.

Abkürzungsverzeichnis

12 – HETE	12-Hydroxyeicosa-5,8,10,14-tetraensäure
15 – HETE	15-Hydroxyeicosa-5,8,11,14-eicotetraensäure
Amp	Ampicillin
ARMS	amplification refractory mutation system
ATP	Adenosin – 5' – triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
COPD	Chronisch – obstruktive Lungenerkrankung (Chronic – obstructive Pulmonary Disease)
CP – HPLC	Chiralphasen – HPLC
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonuclein Acid)
dNTP	desoxyNukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie (High Performance Liquid Chromatographie)
HPODE	Hydroxyperoxid-9Z, 11E- octadecadiensäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	kilo Basenpaare
LB – Medium	Luria Bertani Medium
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (Low Density Lipoprotein)
LOX	Lipoxygenase
MADGE	microplate array diagonal gel electrophoresis
Ni – Agarose	Nickelagarose
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphat buffered Saline)
PCR	Polymerase – Kettenreaktion (Polymerase – Chain – Reaction)
RP – HPLC	Umkehrphasen – HPLC (Reversed – phase – HPLC)
SNP	Single – Nukleotid – Polymorphism

1 Einleitung

1.1 Definitionen

1.1.1 Polymorphismus

Sowohl in translatierten Regionen eukaryotischer Genen als auch in nicht translatierten Bereichen findet man durch zufällige Mutationen entstandene Veränderungen in der Nukleotidsequenz. Da diese Veränderungen in den meisten Fällen nur einen der beiden Genorte betreffen, entstehen unterschiedliche Allele. Damit sind die Träger solcher zufällig entstandenen Mutationen zunächst überwiegend heterozygot in diesem Merkmal. Kommen solche Mutationen bei verschiedenen Individuen vor, spricht man von einem genetischen Polymorphismus.

Der erste genetische Polymorphismus wurde im Jahre 1900 von Karl Landsteiner entdeckt. Es handelte sich dabei um den Polymorphismus der ABO – Blutgruppen. Mit Methoden der Elektrophorese entdeckte man dann ab den 1950er Jahren weitere Polymorphismen vor allem für Serumproteine und später auch für Enzyme.

Um definitionsgemäß von genetischem Polymorphismus sprechen zu können, müssen bezüglich eines Merkmals mit monogener Vererbung mindestens zwei Phänotypen, welche auf mindestens zwei Genotypen zurückzuführen sind, vorhanden sein. Dabei müssen die Genotypen mit einer Frequenz von mindestens 1 – 2% vorkommen. Im Gegensatz dazu spricht man von seltenen genetischen Varianten, wenn die Häufigkeit ihres Auftretens geringer als 1 – 2% ist [1].

Die Auswirkungen eines genetischen Polymorphismus können sehr vielfältig sein. So wird zum Beispiel in einer Gruppe von Menschen, die unter vergleichbaren Bedingungen leben und gemeinsam bestimmten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, immer wieder beobachtet, dass nur einige Individuen als Folge der Umwelteinflüsse von gesundheitlichen Auswirkungen betroffen sind. In der Auseinandersetzung mit der Umwelt und den aus ihr aufgenommenen Fremdstoffen spielen stets Enzyme, die solche Fremdstoffe abbauen können, eine wichtige Rolle. Genetische Polymorphismen können für bedeutende Unterschiede beim Abbau der Fremdstoffe im Körper unterschiedlicher Personen verantwortlich sein. Des Weiteren wurden erhebliche ethnische Unterschiede beim Auftreten von Polymorphismen beobachtet, wobei die molekularen Ursachen dafür in den meisten Fällen noch unklar sind.

1.1.2 Single – Nukleotid – Polymorphism (SNP)

Mit Single – Nukleotid – Polymorphismen, kurz SNPs, werden Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA –Abschnitt bezeichnet. Es handelt sich dabei um Mutationen, die lediglich die Änderung eines einzelnen Nukleotids betreffen. Das bedeutet, dass in einer Gensequenz eine Base gegen eine Andere ausgetauscht wird, was zu einer Punktmutation führt. Befindet sich die Mutation im offenen Leserahmen und führt der Basenaustausch nicht zum Abbruch der Translation (Entstehung eines Stoppcodons), kann ein SNP einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, der die Struktur – und Funktionseigenschaften des Proteins verändert. Allerdings muss nicht jeder SNP in einem kodierenden Abschnitt notwendigerweise zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, da bis auf zwei Ausnahmen (Methionin, Tryptophan) alle Aminosäuren im Sinne der Degeneriertheit des genetischen Codes durch mehrere Triplets kodiert werden. Dies bedeutet, dass ein einzelner Nukleotidaustausch meist nicht zu einer Veränderung des exprimierten Proteins führt. Man spricht dann von einer stummen Mutation, da die Mutation auf DNA – Ebene sich nicht auf das Protein auswirkt.

Des Weiteren gibt es SNPs, die sich in nicht – translatierten Bereichen von Genen befinden und damit die Aminosäuresequenz nicht verändern. Dies ist z.B. dann der Fall, wenn die Mutationen in Promotorregionen oder in Introns vorkommen. Diese Mutationen verändern zwar nicht die Aminosäuresequenz, können aber für die Expressionsregulation von entscheidender Bedeutung sein. Sie können damit darüber entscheiden, ob die Expressionseffizienz eines bestimmten Proteins hoch – oder runterreguliert wird, was gravierende funktionelle Konsequenzen haben kann.

Ingesamt lässt sich sagen, dass SNPs den Großteil aller genetischen Variationen im menschlichen Genom darstellen. Sie sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern treten in bestimmten Genomregionen gehäuft auf. So ist z.B. die MHC Region des menschlichen Genoms hochgradig polymorph, so dass es praktisch keine MHC – identischen Individuen gibt. Selbst eineiige Zwillinge, die sich durch einen hohen Identitätsgrad ihres genetischen Materials auszeichnen, weisen im MHC Cluster strukturelle Unterschiede auf. Mehr als 60% aller humanen SNPs bestehen in einem Austausch von Cytosin durch Thymin. Dies begründet sich auf der Tatsache, dass Cytosin im Genom der Wirbeltiere häufig methyliert wird und durch spontane Desaminierung Thymin aus 5 – Methylcytosin entsteht. Durch diese gekoppelten Reaktionen (Methylierung,

Desaminierung) kommt es zu einem C – T Austausch, der die Aminosäuresequenz betroffener Proteine verändern könnte.

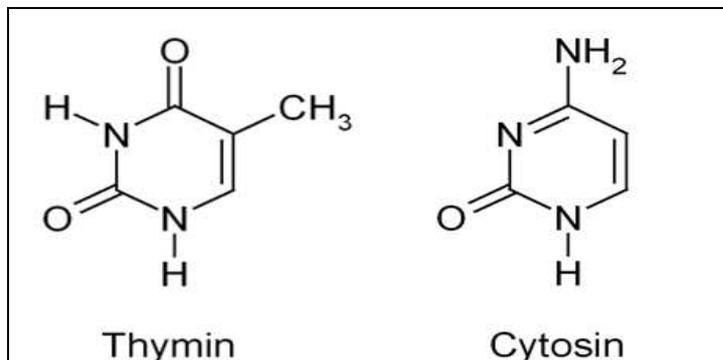


Abb 1: Dies zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der zwei Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin [2]

1.2 Alpha – 1 – Antitrypsin

1.2.1 Physiologische Funktion und Entstehung

Das Akutphaseprotein alpha – 1 – Antitrypsin ist ein 52 kDa großes Glycoprotein, das aus 394 Aminosäuren besteht. An Position 358 befindet sich ein Methionin, welches für die Komplexierung von Proteasen bedeutsam ist und damit eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins spielt [3]. Alpha – 1 – Antitrypsin wird hauptsächlich in Hepatozyten produziert und in den Blutkreislauf ausgeschüttet [4-7]. In geringeren Mengen wird es auch von Alveolarmakrophagen synthetisiert [8, 9]. Als Antiprotease schützt es Proteine des Extrazellulärraumes vor proteolytischer Spaltung. Bei Entzündungsreaktionen kommt es häufig zu einer Aktivierung von Proteasen, die zum Abbau extrazellulärer Bindegewebsproteine beitragen. Um diese Prozesse einzudämmen und zu begrenzen, sind Antiproteasen von entscheidender Bedeutung. Sie bilden mit den Proteasen katalytisch inaktive Komplexe und inaktivieren dadurch die Enzyme. Aus diesen Überlegungen wurde die Protease – Antiprotease – Hypothese abgeleitet, die davon ausgeht, dass unter Normalbedingungen ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Proteasen und Antiproteasen existiert [3]. Eine Störung dieses Verhältnis würde entweder zu einer Erhöhung oder zu einer Verringerung der Proteolysekapazität im Gewebe führen, was in beiden Fällen pathologische Konsequenzen hätte. Bei einer Erhöhung des Antiproteasespiegels würde der proteolytische Bindegewebsumsatz verringert, was zu einer vermehrten oxidativen

Einleitung

Modifizierung der extrazellulären Matrixproteine und damit zu einer Verringerung der Qualität des Bindegewebes führen würde. Ein Absinken der Antiproteaseaktivität führt zu einer verstärkten Proteolyse und damit zur quantitativen Abnahme der Bindegewebsproteine. Auf molekularer Ebene binden Antiproteasen mit hoher Affinität an ihre Zielproteasen. Dadurch entsteht ein katalytisch unwirksamer Komplex, die Protease kann ihre eigentliche Funktion nicht mehr ausüben und wird abgebaut [3]. Die Inhibitionsmechanismen, über die $\alpha - 1 -$ Antitrypsin verschiedene endogene Proteasen inaktiviert, sind unterschiedlich. Sie beinhalten Interaktionen mit Kofaktoren und gipfeln in der Bildung stabiler Protease – Antiprotease – Komplexe. Da die Struktur des aktiven Zentrums des $\alpha - 1 -$ Antitrypsin sehr flexibel ist, kann es die katalytische Aktivität verschiedener Proteasen mit unterschiedlicher Effektivität regulieren [10]. Die tägliche Syntheserate von $\alpha - 1 -$ Antitrypsin beträgt normalerweise ca. 34 mg/kg Körpergewicht, was zu einer Serumkonzentration von 150 – 350 mg/dl führt [7]. Das Protein findet sich in allen Körpergeweben, scheint aber in erster Linie in Leber und Lunge von physiologischer Bedeutung zu sein. Auf Grund der großen Kontaktfläche der Lunge mit der Umgebung laufen in diesem Organ eine Vielzahl zellulärer Abwehrvorgänge statt. Vor allem aus neutrophilen Granulozyten werden hochaktive Proteasen in das umgebende Lungengewebe freigesetzt. Eine der wichtigsten, hierbei freigesetzten Proteasen ist die neutrophile Elastase, welche mit einer hohen Aktivität in der Lunge vorkommt und Elastin als wesentlichen Bestandteil der elastischen Fasern des Lungengewebes abbauen kann. Der Körper eines Gesunden schützt das pulmonale Bindegewebe vor einem exzessiven Abbau der extrazellulären Matrixproteine durch eine Vielzahl von Antiproteasen, die zu einer Inaktivierung der neutrophilen Elastase, aber auch anderer Proteasen, beitragen. $\alpha - 1 -$ Antitrypsin spielt hierbei eine besonders wichtige Rolle, da es quantitativ und auch hinsichtlich der Bindungsaffinität zur neutrophilen Elastase die wichtigste Antiprotease ist [4, 7].

$\alpha - 1 -$ Antitrypsin gehört zur Proteinfamilie der Serpine (Hemmstoffe von Serinproteasen) und besitzt als charakteristisches Strukturmotiv drei $\beta -$ Faltblattstrukturen, die durch bewegliche Schleifen miteinander verbunden sind. In Abbildung 2A ist die Kristallstruktur des Proteins dargestellt. In 2B ist als Beispiel für einen $\alpha - 1 -$ Antitrypsin – Protease – Komplex der enzymatisch inaktive Komplex von $\alpha - 1 -$ Antitrypsin und Neutrophilenelastase abgebildet. Ähnliche Strukturen

Einleitung

werden auch für andere alpha – 1 – Antitrypsin – Protease – Komplexe (z.B. Neutrophilenelastase, Proteinase 3, Cathepsin G) vermutet [3].

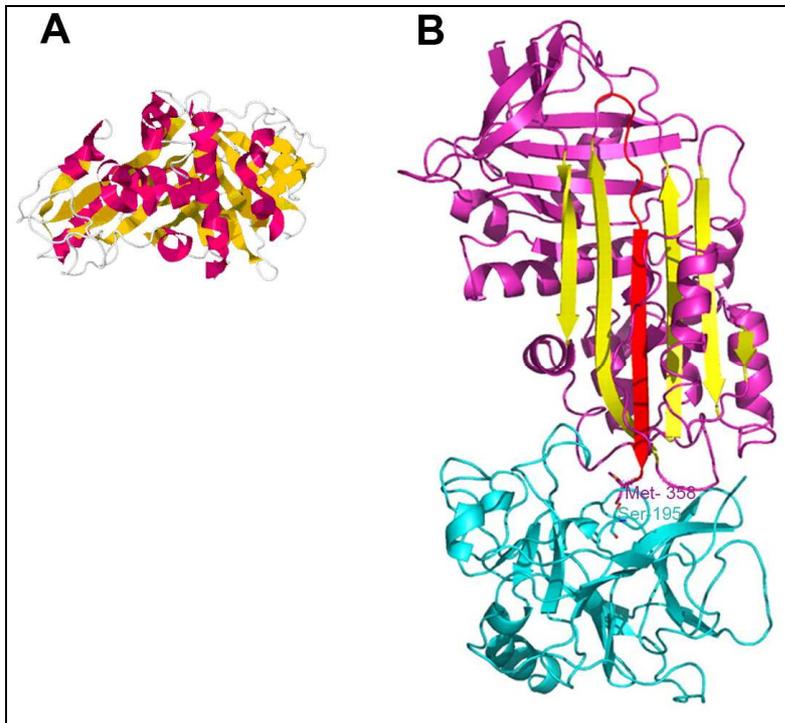


Abb. 2 A) Kristallstruktur des alpha – 1 – Antitrypsin und B) Kristallstruktur eines alpha – 1 – Antitrypsin – Pankreaselastase – Komplexes. Die Elastase ist in blau, alpha – 1 – Antitrypsin in lila abgebildet. Mit Rot wurde die reaktive Schleife und mit der Farbe gelb die beta – Faltblattstrukturen dargestellt. Die interagierenden Aminosäuren Methionin-358 und Serin-195 wurden extra beschriftet [11, 12].

Herrscht im Gewebe ein Ungleichgewicht zwischen Antiproteasen, speziell alpha – 1 – Antitrypsin, und der Neutrophilenelastase, so führt ein Überwiegen der neutrophilen Elastase zu einem verstärkten Abbau des pulmonalen Bindegewebes, welches zu einem Großteil aus Elastin besteht. Elastin ist neben Kollagen ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des Lungenbindegewebes und bildet zusammen mit Fibrillin die elastischen Fasern. Diese sind für die elastischen Rückstellkräfte der Lunge von besonderer Bedeutung, welche den Antrieb für die Expiration darstellen. Wird Elastin durch ein Überwiegen der Neutrophilenelastase vermehrt abgebaut, verliert die Lunge ihre Eigenelastizität. Dies hat zur Folge, dass es der Lunge nicht mehr möglich ist, bei der Expiration durch ihre elastischen Rückstellkräfte die gesamte eingeatmete Luft auszutreiben, wodurch es über längere Zeiträume zu einer Überblähung der Lunge (Lungenemphysem) kommt [7]. Eine Erhöhung der Serumkonzentration des alpha – 1 –

Antitrypsin kann auftreten bei: Tumoren, vor allem Bronchialkarzinomen, im Rahmen einer Östrogenbehandlung, bei Schwangerschaften oder aber bei akuten Schüben von chronisch – entzündlichen Prozessen [13]. Eine Erniedrigung der Serumkonzentration kann das Resultat sein von: hereditärem alpha – 1 – Antitrypsinmangel, Ikterus prolongatus, Hepatitis des Neugeborenen, kindlich chronischer Hepatitis, Leberzirrhose oder beim Lungenemphysems [13].

Das Gen, welches für das alpha – 1 – Antitrypsin – Protein codiert, liegt auf Chromosom 14 und hat eine Länge von ca. 10 000 Basenpaaren. Es beinhaltet neben sechs Introns, vier kodierende (II, III, IV, V) und drei nicht – kodierende (I, VI, VII) Exons, die zusammen als mRNA eine Länge von 1,75 kb ausmachen. Die kodierende Bereiche, die für die Antiproteaseaktivität verantwortlich sind, befinden sich hauptsächlich in Exon V [3, 5].

1.3 Chronisch – obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.3.1 Definition

Nach der Definition der American Thoracic Society und der European Respiratory Society handelt es sich bei der COPD um eine verhinderbare und behandelbare entzündliche Lungenerkrankung, welche mit einer nicht vollständig reversiblen Verminderung des Atemflusses einhergeht [14]. Ausgelöst wird diese abnormale Entzündungsreaktion durch inhalierte Partikel und Gase. Die Erkrankung weist üblicherweise einen progredienten Verlauf auf [14]. Des Weiteren wird dann von einer chronisch obstruktiven Bronchitis gesprochen, wenn jeweils mindestens drei Monate andauernder Husten und Auswurf in zwei aufeinander folgenden Jahren bestehen und zusätzlich eine permanente, nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion diagnostizierbar ist.

Nach den aktualisierten Leitlinien der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie zur Diagnostik und Therapie von COPD – Patienten sowie nach den internationalen GOLD – Leitlinien wird die COPD nach Schweregraden in die Stadien I bis IV unterteilt.

Die Grundlage für diese Stadieneinteilung sind die in der Spirometrie erhobenen Werte des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde, die Einsekundenkapazität (FEV₁), sowie die inspiratorische Vitalkapazität (VC) [15].

Einleitung

Stadium I entspricht einem leichten Schweregrad mit Husten und Auswurf als mögliche Symptome und einer FEV₁ von >80% des Sollwertes und FEV₁/VC <70% des Sollwertes.

Stadium II entspricht einem mittleren Schweregrad mit Husten, Auswurf und Dyspnoe als mögliche Symptome und einer FEV₁ zwischen 50 und 80% des Sollwertes sowie FEV₁/VC < 70% des Sollwertes.

Stadium III kann dieselben Symptome wie Stadium II zeigen, allerdings liegt hier durch die Spirometriewerte ein schwerer Schweregrad mit einer FEV₁ zwischen 30 und 50% des Sollwertes und FEV₁/VC <70% des Sollwertes vor.

Stadium IV ist meist durch schwerere Symptome einer chronischen respiratorischen Insuffizienz gekennzeichnet, wobei die FEV₁ <30% des Sollwertes beträgt, wenn keine Zeichen der respiratorischen Insuffizienz bestehen und < 50%, wenn gleichzeitig eine respiratorische Insuffizienz besteht. Das FEV₁/VC Verhältnis liegt beide Male über 70% des Sollwertes. Eine respiratorische Insuffizienz ist gekennzeichnet durch einen arteriellen O₂ – Partialdruck unter 60 mmHg mit oder ohne respiratorische Partialinsuffizienz oder mit Anstieg des CO₂ – Partialdruckes über 45 mm Hg [15, 16].

Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer expiratorischen Flusslimitierung, die unter anderem durch eine cholinerg vermittelte Bronchokonstriktion bedingt wird. Es ist den COPD – Patienten nicht mehr möglich, die eingeatmete Luft wieder vollständig auszuatmen. Dadurch kommt es sukzessiv zu einer Vergrößerung, der nach der Expiration noch in der Lunge verbleibenden Luftmenge und damit zu einer zunehmenden Überblähung der Lunge. Dies führt zunächst zur Belastungsdyspnoe. Dadurch vermeiden viele Patienten körperliche Belastung. Als Folge resultiert ein Circulus vitiosus: es kommt zu weiterem Konditionsverlust → verstärkter Atemnot → reduzierter Belastbarkeit und letztlich zu einer reduzierten Lebensqualität [15, 17]. Durch wiederholtes Auftreten von Exazerbationen werden die expiratorische Flusslimitierung, der Luftstau und die Atemnot zusätzlich verstärkt. Es können systemische Konsequenzen wie Osteoporose, Muskelschwäche und Gewichtsverlust

resultieren. Leider leiden die Patienten häufig gleichzeitig noch zusätzlich an einer Erkrankung des Herz – Kreislauf – Systems [15, 17].

1.3.2 Epidemiologie

Nach den aktuellen Daten der BOLD – Studie (Burden of Chronic Obstructive Lung Disease Initiative) hat die COPD in Deutschland eine Prävalenz von 14,7% in der Bevölkerung der über 40jährigen. Etwa die Hälfte der Patienten befindet sich zurzeit im Stadium I nach GOLD. Bei circa 50 % der durch die Studie diagnostizierten COPD – Patienten war die COPD vorher nicht ärztlich diagnostiziert und daher auch nicht behandelt [18]. Die Prävalenz der über 70jährigen Bevölkerung in Deutschland beträgt 29,7%.

Weltweit ist die COPD nach der KHK die zweithäufigste nichtinfektiöse Erkrankung und stellt derzeit die vierthäufigste Todesursache dar. Vermutlich wird die COPD im Jahre 2020 nach der KHK und dem Schlaganfall an dritter Stelle der Mortalitätsstatistik stehen [19]. Des Weiteren sei noch erwähnt, dass im Jahre 2000 erstmals mehr Frauen an den Folgen einer chronischen Lungenerkrankung verstarben als Männer [20].

1.3.3 Pathogenese

Grundlage der Entstehung einer COPD ist vor allem eine Imbalance zwischen Proteasen und Antiproteasen und ein erhöhter oxidativer Stress [21, 22]. Durch eine Entzündung in der Bronchialschleimhaut werden Makrophagen und T – Helferzellen aktiviert, welche durch Freisetzung pro – inflammatorischer Mediatoren neutrophile Granulozyten anlocken. Aus den Entzündungszellen werden Proteasen freigesetzt, die zum Abbau der extrazellulären Matrix des Lungengewebes beitragen [22]. Werden zelleigene Antiproteasen gleichzeitig inaktiviert (zum Beispiel durch alpha – 1 – Antitrypsinmangel, Nikotin, Chlorgas, Stickoxide usw.), führt dies zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen und zur progredienten Zerstörung des Lungengewebes [22]. Die Entstehung des oxidativen Stress resultiert aus der vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoff – bzw. Stickstoffradikale aus Granulozyten und aus der verminderten antioxidativen Kapazität des bereits geschädigten Lungengewebes [22]. Durch die chronische Reizung der Bronchialschleimhaut kommt es zur Ausbildung der Kardinalsymptomen Husten, Auswurf und Belastungsdyspnoe [21]. Als Folge resultiert eine chronisch persistierende Entzündung des Lungengewebes mit Bronchokonstriktion, da durch die erhöhte

Entzündungsaktivität und wiederholte Schädigung vermehrt Kollagen eingelagert wird (pulmonales Remodelling) [21, 22]. Als Folge davon kommt es durch die Bildung von Narbengewebe zu einer Lumeneinengung der peripheren Bronchiolen [22]. Hierdurch wird der Tonus der glatten Bronchialmuskulatur lang anhaltend erhöht. Des Weiteren beobachtet man eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, eine Vasodilatation und eine Insuffizienz der mukociliären Clearance. Dies führt zu einer Vergrößerung der schleimproduzierender Drüsen und zu einem vermehrten Einbau von Becherzellen in die Bronchialschleimhaut [21, 22]. Das Resultat hieraus ist eine Hyper – und Dyskrie [21]. Durch die Defekte und Irritationen der Mukosa, die über efferente parasymphatische Fasern zu einer Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur führen, kommt es letztendlich zu einer andauernden Bronchialobstruktion mit Dyspnoe [21].

1.3.4 Risikofaktoren

Über viele Jahre war die Inhalation von Tabakrauch der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung der COPD. Rauchen führt zu einer erhöhten Konzentration an freien Sauerstoffradikalen im Atemtrakt [23]. Neun von Zehn COPD – Patienten sind aktuelle oder Ex – Raucher. Das Ausmaß der pathologischen Veränderungen korreliert mit der Anzahl der Packungsjahre. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass nur ca. 10 bis 20% aller Raucher eine COPD entwickeln [8, 9].

Am Arbeitsplatz gelten Exposition gegenüber organischen oder anorganischen Stäuben (Baumwollverarbeitung, Webereien) sowie Säuren, Basen, toxischen Gasen oder inhalierbare Dämpfe (Kunststoffindustrie) als mögliche COPD – Risikofaktoren. Auch Umweltfaktoren wie zum Beispiel virale Infektionen des Respirationstraktes im Kindesalter sowie die globale Umweltverschmutzung wurden als Risikofaktoren für die Entstehung der COPD identifiziert [8, 9, 24]. Eine hohe bronchiale Belastung mit Schwefeldioxid kann die Entstehung einer COPD begünstigen,

Auf Grund von Erkenntnissen aus der Zwillingforschung ist zu vermuteten, dass es für die COPD auch eine genetische Veranlagung gibt. Als gesicherter Risikofaktor gilt hierbei der angeborene alpha – 1 – Antitrypsinmangel.

1.3.5 Rolle des alpha – 1 – Antitrypsingens bei COPD

Das Bindegewebe der Lunge unterliegt einem kontinuierlichen Umbauprozess, bei dem sich der proteolytische Abbau und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine die Waage halten. Dieses Gleichgewicht kann dadurch gestört werden, dass im pulmonalen

Bindegewebe zusätzlich Proteasen aus Entzündungszellen freigesetzt werden. Dies geschieht u.a. deshalb, da mit jedem Atemzug Pathogene über die Atemluft in den Körper gelangen. In der Lunge besteht die Hauptaufgabe des Akutphaseproteins alpha – 1 – Antitrypsin vor allem darin, eiweißspaltenden Enzyme zu neutralisieren und das Enzym neutrophile Elastase, das in hohen Konzentrationen im Bindegewebe der Lunge vorkommt, zu inaktivieren [25, 26]. Passiert dies auf Grund eines Mangels an alpha – 1 – Antitrypsin nicht oder nur in unzureichendem Maße, entsteht eine Störung der Proteostase, welche zu einem verstärkten Abbau von Elastin in der extrazellulären Matrix des Lungenbindegewebes führt.

Der alpha – 1 – Antitrypsinmangel ist bislang die einzige genetische Prädisposition, die für die Entstehung einer COPD überzeugend nachgewiesen wurde [7, 25].

1.4 SNPs beim alpha – 1 – Antitrypsin

Für das alpha – 1 – Antitrypsin wurden bisher mehr als 125 verschiedene Varianten beschrieben [3, 6, 27]. Als „Wildtyp“ wird in dieser Arbeit jenes Allel bezeichnet, welches mit der größten Häufigkeit in der mitteleuropäischen Normalbevölkerung auftritt. Dieses Allele wird M – Allel genannt. Von biochemischer Relevanz in Bezug auf die zu bearbeitende Fragestellung sind zwei andere häufige Allelvarianten, die als S – und Z – Allele bezeichnet werden. Diese Bezeichnungen beziehen sich auf die Wandergeschwindigkeit der exprimierten Proteine in der Gelelektrophorese, wobei M für medium, S für slow und Z für very slow steht [3]. Alle Allele können in heterozygoter oder homozygoter Form vorliegen, so dass sich sechs verschiedene Allelkombinationen (MM, MS, MZ, SS, SZ, ZZ) ergeben. Die Mutation, welche das Z – Allel betrifft, befindet sich in Exon V [7]. Die das S – Allel betreffende Mutation befindet sich in Exon III [27].

M – Allel	5' – Ende	...ACCATCGAC G AGAAAGGGACT...	3' – Ende
Z – Allel	5' – Ende	...ACCATCGAC A AGAAAGGGACT...	3' – Ende

Tab. 1: Gensequenzen des M – Allels und des Z – Allels, wobei an Position 9992 (Exon V) des M – Allels ein SNP auftritt, woraus dann die Gensequenz des Z – Allels resultiert.

M – Allel	5' – Ende	...ACTACAGCACCTGG A AAA...	3' – Ende
S – Allel	5' – Ende	...ACTACAGCACCTGG T AAA...	3' – Ende

Tab. 2: Gensequenzen des M – Allels und des S – Allels, wobei an Position 7680 (Exon III) des M – Allels ein SNP auftritt, woraus dann die Gensequenz des S – Allels resultiert.

Einleitung

Die Gensequenzen für die entsprechenden Allele sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden hier die entsprechenden Positionen fettgedruckt hervorgehoben. Aus der Gensequenz des M – Allels entsteht durch ein SNP an der Position 9992 die Gensequenz des Z – Allels. Vergleicht man das M – Allel mit dem S – Allel, so muss eine andere Stelle in der Gensequenz betrachtet werden. Dieser Polymorphismus tritt an der Position 7680 des Gens auf. Alle hier aufgeführten SNPs führen zu einem Aminosäureaustausch, welcher sich in einer Änderung der Primärstruktur des Proteins niederschlägt. So wird bei der Z – Allelmutation an der 342. Stelle der Aminosäuresequenz statt der neutralen Aminosäure Glutamin ein positiv geladenes Lysin eingebaut. Dies hat im Protein eine Konformationsänderung der reaktiven Schleife zur Folge, so dass ein zweites alpha – 1 – Antitrypsinmolekül binden kann. Dadurch kommt es zur Bildung von nicht – kovalenten alpha – 1 – Antitrypsinpolymeren. Diese bilden in Hepatozyten Einschlusskörperchen und können nicht in den Blutkreislauf abgegeben werden. Als Folge der intrazellulären Anreicherung kommt es bei dieser Mutation zu einem Untergang der Hepatozyten, zu einer Leberzirrhose und in letzter Konsequenz zum Leberversagen. Durch die Polymer – und Einschlusskörperchenbildung des alpha – 1 – Antitrypsins in Hepatozyten vermindert sich der Serumspiegel der aktiven Antiprotease massiv und es kommt zu einem Mangel der Antiprotease in der Lunge. Damit fehlt ein Schutzmechanismus gegen die neutrophile Elastase, es kommt zum verstärkten Abbau des Elastins, wodurch die Entstehung der COPD und des Lungenemphysems ausgelöst wird.

Bei der Mutation zum S – Allel wird an der 264. Stelle der Aminosäuresequenz statt der neutralen Aminosäure Glutamin ein ebenfalls neutrales Valin eingebaut. Dieser Austausch induziert keine so drastische Konformationsänderung wie beim Z – Allel, so dass die Rate der Polymerbildung geringer ausfällt und ein milderer Abfall des alpha – 1 – Antitrypsin – Serumspiegels beobachtet wird. Daraus resultieren abgeschwächte Verläufe der Leber – bzw. Lungenerkrankungen.

Für die beschriebenen Mutationen lassen sich hinsichtlich ihrer Häufigkeit erhebliche Unterschiede in verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen nachweisen. Zur Verteilung der Mutationshäufigkeit des alpha – 1 – Antitrypsingens wurden zahlreiche Studien durchgeführt und in Tabelle 3 wird eine Metaanalyse der publizierten Daten dargestellt. Diese Analyse beschreibt die ethnische Verteilung der Mutationen in Europa

Einleitung

und ermöglicht Aussagen darüber, wie hoch die Mutationsraten in den einzelnen Ländern sind [28].

Land	Mutationshäufigkeit	MZ	SZ	ZZ	MS	SS
Belgien	13,7	22,69	1,33	0,20	73,63	2,15
Dänemark	10,68	47,84	1,41	0,68	44,66	0,73
Deutschland	6,07	31,46	0,68	0,16	66,98	0,73
Estland	7,22	64,22	0,85	0,8	33,91	0,27
Finnland	2,77	47,12	0,35	0,16	52,17	0,19
Frankreich	16,99	13,79	1,15	0,1	81,56	3,4
Italien	7,69	41,04	0,97	0,35	56,96	0,68
Litauen	6,27	46,48	0,81	0,36	51,90	0,45
Lettland	14,69	56,74	1,92	1,39	39,29	0,67
Niederlande	6,24	31,78	0,70	0,17	66,61	0,74
Norwegen	8,45	41,84	1,07	0,40	0,59	0,72
Österreich	6,57	38,98	0,81	0,27	59,32	0,62
Polen	3,75	21,68	0,33	0,05	77,37	0,58
Portugal	26,47	8,94	1,34	0,07	83,39	6,26
Russland	2,60	25,86	0,25	0,05	73,49	0,38
Schweden	9,28	47,33	1,22	0,57	50,23	0,65
Schweiz	9,68	22,23	0,9	0,13	75,23	1,52
Serbien	3,83	65,21	0,44	0,42	33,81	0,11
Spanien	22,81	13,32	1,58	0,13	80,22	4,75
Ungarn	6,27	20,87	0,54	0,07	77,51	1,01
UK	7,7	29,79	0,85	0,19	68,21	0,97

Tab. 3: Ermittelte Anzahl (in %) der Merkmalsträger der fünf Genotypenmutationsmöglichkeiten in den jeweiligen Ländern [28]. UK – Vereinigtes Königreich

Am Beispiel Deutschland soll exemplarisch erläutert werden, wie die einzelnen Prozentangaben zu verstehen sind. 6,07% der deutschen Bevölkerung weisen die untersuchten SNPs im alpha – 1 – Antitrypsingen auf. Von diesen 6,07% zeigen ca. zwei Drittel (66,98%) den MS-Genotyp und ein knappes Drittel (31,46%) den MZ – Genotyp. Die übrigen Genotypen verteilen sich wie folgt: 0,68% die SZ – Mutation,

Einleitung

0,16% den ZZ – Genotyp, 0,73% die SS – Mutation auf [28]. Durch weitere Literaturdaten lässt sich belegen, dass zum Beispiel 7,7% der nordeuropäischen aber 25% der iberischen Bevölkerung mindestens entweder ein Z – oder ein S – Allel tragen [29]. Das Z – Allel, welches den stärksten Mangel an alpha – 1 – Antitrypsin im Plasma verursacht, hat in Südkandinavien und an der europäischen Nordwestküste seine höchste Prävalenz [29]. Das S – Allel, welches nur geringe Veränderungen des alpha – 1 – Antitrypsinspiegels im Plasma verursacht, ist am weitesten in Südeuropa verbreitet [29]

Im Hinblick auf das Thema meiner Dissertation erscheint es interessant, wie sich die Mutationshäufigkeit im asiatischen Raum gestaltet. Für diesen Teil der Weltbevölkerung wurde die ethnische Verteilung der Mutationshäufigkeit des alpha – 1 – Antitrypsingens in Tabelle 4 zusammengefasst. Da bisher keine entsprechenden Daten für Indonesien verfügbar sind, ergibt sich die Frage, wie hoch die Mutationshäufigkeit für das Z – bzw. S – Allel in der indonesischen Bevölkerung ist.

In Tabelle 4 beziehen sich die angegebenen Prozentzahlen der Mutationshäufigkeit, wie auch in Tabelle 3, auf die Gesamtbevölkerung des jeweiligen Landes. Im Gegensatz dazu beziehen sich die Allelfrequenzen auf die Anzahl aller aufgetretenen Mutationen des Landes und nicht auf die Gesamtbevölkerung des jeweiligen Landes [28, 30].

Land	Mutationshäufigkeit	MS	MZ	SS	SZ	ZZ
Afghanistan	5,11	40,53	58,15	0,22	0,64	0,46
Indien	0,32	77,71	22,20	0,05	0,03	0,00
Iran	1,12	71,22	28,49	0,15	0,12	0,02
Pakistan	4,05	53,98	44,99	0,31	0,51	0,21
Tadschikistan	3,77	19,81	79,23	0,04	0,31	0,62
Japan	0,12	66,65	33,32	0,01	0,01	0,00
Südkorea	2,36	49,68	49,68	0,16	0,32	0,16
Malaysia	4,99	93,65	5,05	1,16	0,13	0,00
Thailand	7,00	61,97	36,20	0,73	0,85	0,25

Tab. 4: Berechnete Anzahl (in %) der Merkmalsträger der fünf Genotypenmutationsmöglichkeiten in den jeweiligen Ländern [30]

Zur Verdeutlichung soll dies hier am Beispiel Thailand exemplarisch dargestellt werden: 7% der thailändischen Gesamtbevölkerung weisen eines der untersuchten SNPs im

alpha – 1 – Antitrypsingen auf. Von diesen 7% zeigen 61,97% den MS – Genotyp, 36,20% weisen genotypisch die MZ – Mutation, 0,73% tragen seine SS – Mutation, 0,85% eine SZ – Mutation und 0,25% tragen den ZZ – Genotyp [30]. Die Prozentangaben beider Tabellen sind auf die zweite Nachkommastelle gerundet.

1.5 ALOX15

1.5.1 Vorkommen und Verwandtschaft von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind nichthämeisenhaltige Dioxygenasen, welche den stereospezifischen Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren unter Bildung von Hydroperoxyfettsäuren katalysieren. Sie sind im Tier – und Pflanzenreich weit verbreitet, kommen aber auch in Pilzen, niederen Meeresorganismen sowie in pro – und eukaryotischen Einzellern vor [31-42]. In den drei Königreichen des irdischen Lebens (Archeaen, Bakterien, Eukaryonten) wurden lediglich bei Aracheaen bisher keine Lipoxygenasen beschrieben.

Alle Lipoxygenasen sind relativ eng miteinander verwandt. So unterscheiden sich die pflanzliche Sojabohnen LOX – 1 und die ALOX15 aus Kaninchenretikulozyten als klassische Vertreter pflanzlicher bzw. tierischer LOX zwar in ihrer Größe um ca. 25 kDa, ihre Raumstruktur ist jedoch sehr ähnlich. Auf der Ebene der Aminosäuren besteht zwischen diesen beiden Enzymen eine Sequenzhomologie von 31%, die allerdings im Bereich des aktiven Zentrums deutlich höher ausfällt.

Lipoxygenasen werden klassischer Weise nach ihrer Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung klassifiziert [43, 44]. Dementsprechend unterscheidet man bei Säugetieren die 5 – LOX, die 8 – LOX, die 12 – LOX und 15 – LOX. Interessant ist, dass die erste pflanzliche LOX bereits 1932 beschrieben wurde, aber erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts die ersten Lipoxygenasen in tierischen Zellen, und zwar in Thrombozyten, Retikulozyten und polymorphkernigen Leukozyten entdeckt wurden [45-48]. Seitdem steigt die Zahl der neu identifizierten Lipoxygenasen ständig an. Mittlerweile wurde die Expression von Lipoxygenasen u. a. in menschlichen eosinophilen Granulozyten, Bronchialepithelzellen, in der Uteruszervix und in vielen anderen Zellen und Geweben nachgewiesen [49-53].

Das menschliche Genom enthält sechs funktionellen Lipoxygenasegene, welche für unterschiedliche Lipoxygenaseisoformen codieren. Mit Ausnahme des Genes für die 5 – LOX liegen alle auf dem Chromosom 17 [54]. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung

Einleitung

der funktionellen humanen LOX – Gene, der entsprechenden LOX – Isoformen sowie deren Verbreitung in Zellen bzw. Gewebearten.

Gen – Bezeichnung	LOX – Isoform	Hauptsächliches Vorkommen
ALOX15	12/15 – LOX	Retikulozyten, eosinophile Granulozyten, Bronchialepithelzellen [50, 51, 53]
ALOX15B	15 – LOX – 2	Haarwurzeln, Haut, Prostata, Cornea, Bronchialepithelzellen [33]
ALOX12	Plättchen – Typ 12 – LOX	Thrombozyten, Megakaryozyten, Epidermis [47, 55, 56]
ALOX12B	12R – LOX	Epidermis (Menschen, Mäuse), Tonsillen [57, 58]
ALOXE3	Epidermis – Typ LOX – 3	Epidermis [59]
ALOX5	5 – LOX	Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen [60-63]

Tab. 5: Zusammenstellung der funktionellen humanen LOX – Gene, entsprechenden LOX – Isoform und deren Verbreitung in Zellen bzw. Gewebearten

Ein detaillierter Vergleich der enzymatischen Eigenschaften verschiedener LOX – Isoformen, die eine ähnliche Reaktionsspezifität aufweisen (z.B. Arachidonsäure – 12 – Oxygenierung), ergab, dass diese in ihren sonstigen Eigenschaften nicht zwangsläufig ähnlich sein müssen. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Lipoxygenasen mit unterschiedlichen Positionsspezifitäten sehr nahe miteinander verwandt sein können. Aus diesen Gründen kam es zu einer weiteren Unterteilung der Lipoxygenasen, so dass sie nun auch hinsichtlich ihres Vorkommens in bestimmten Zelltypen eingeteilt sind. Dieses Klassifizierungsschema berücksichtigt zum einen die Sequenzhomologie, zum anderen aber auch die enzymatischen Eigenschaften und biologischen Relevanz der verschiedenen LOX – Isoformen [39, 64]. In Abbildung 3

Einleitung

(rechte Seite) sind ausgewählte Lipoxygenasen von Säugetieren nach den oben genannten Kriterien klassifiziert.

In den letzten Jahren hat sich zunehmend ein Klassifizierungsschema durchgesetzt, das vor allem auf den Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen LOX – Isoformen beruht (strukturbasiert). Dieses System ist eindeutiger als das funktionsbasierte System der Arachidonsäureoxygenierung. Heute ist man zunehmend dazu übergegangen, auch die Enzyme mit den Namen der kodierenden Gene zu benennen. Dabei wird die entsprechende Spezies in Form eines Dreibuchstabencodes der Genbezeichnung vorangestellt. So werden die ALOX15 des Menschen als humALOX15, die 5 – LOX der Maus mit mouALOX5 bezeichnet. Dieses System bewahrt die Vorzüge der verwandtschaftsbasierten Nomenklatur, vereinfacht aber die eindeutige Genzuordnung.

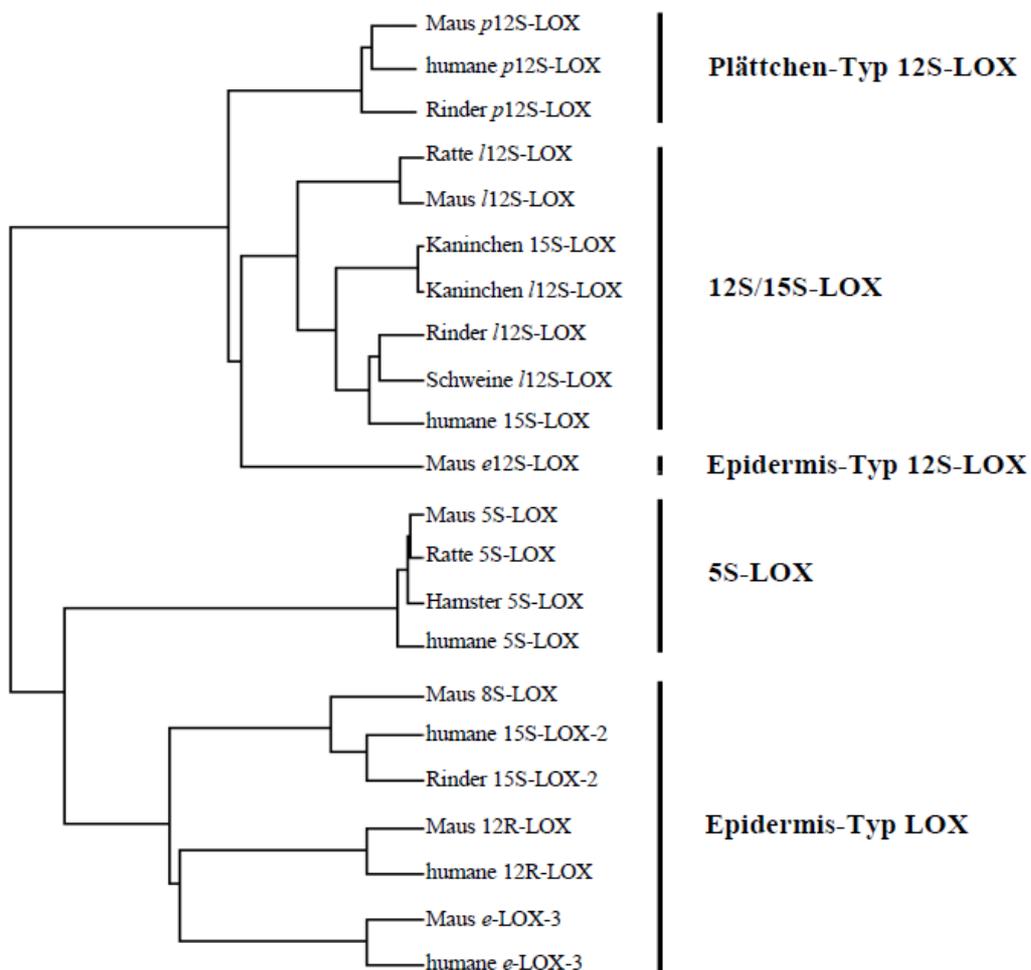


Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum: Klassifizierung der Lipoxygenasen aus Säugetieren [64].

1.5.2 Biologische Funktionen der Lipoxygenasen

Da die ALOX15 in der vorliegenden Arbeit einen Schwerpunkt darstellt, wird in diesem Abschnitt hauptsächlich auf die physiologische bzw. pathophysiologische Rolle dieser LOX – Isoform eingegangen werden. Die biologische Rolle anderer LOX – Isoformen wird hier nur kurz beschrieben.

Die Produkte der ALOX15 können sowohl pro – als auch anti – inflammatorisch wirken. Zum Beispiel induziert das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung durch die ALOX15, die 15 – Hydroxy – 5Z,8Z,11Z,13E – eicosatetraensäure (15 – HETE), eine Entzündungsreaktion in der Haut. 13 – Hydroxy – 9Z,11E – octadecadiensäure (13 – HODE), die als Hauptprodukt der Linolsäureoxygenierung durch die ALOX15 identifiziert wurde, induziert für Entzündungszellen eine Chemotaxis [65, 66]. Beide Wirkungen sind potentiell pro – inflammatorisch. Andererseits hemmt 15 – HETE die Biosynthese des pro – inflammatorisch wirkenden Leukotrien B₄ und dessen Chemotaxis, was als anti – inflammatorische Wirkung klassifiziert werden kann [67]. In vivo wurde bei Ratten in eine der beiden Nieren das ALOX15 Gen durch topisch somatischen Gentransfer eingeschleust. Die kontralaterale Niere wurde scheinbehandelt. Wurde dann in den Ratten eine experimentelle Glomerulonephritis induziert, konnte gezeigt werden, dass in der ALOX15 behandelte Niere geringere Entzündungssymptome auftraten, was auf eine anti – inflammatorische Aktivität des Enzyms hindeutet [68].

Man geht heute davon aus, dass zumindest ein Teil der anti – inflammatorischen Eigenschaften der ALOX15 auf deren Beteiligung an der Biosynthese von Lipoxinen und anderen anti – inflammatorischen bzw. pro – resolutorischen Mediatoren (z.B. Resolvine, Protektine, Maresine) zurückzuführen ist [69]. Die Bildung dieser Mediatoren erfolgt unter Beteiligung verschiedener Lipoxygenase – Isoformen über einen transzellulären Mechanismus. Dabei setzt zum einen die ALOX5 das Produkt der ALOX15 katalysierten Arachidonsäureoxygenierung (15 – HETE) weiter um, wodurch z.B. Lipoxine entstehen [70, 71]. Werden omega – 3 – Polyenfettsäuren (z.B. Eikosapentaensäure, Docosahexaensäure) als Substrate verwendet entstehen Resolvine und Protektine. Die Lipoxinsynthese kann aber auch anders herum verlaufen. So kann die ALOX5 aus Arachidonsäure Leukotrien A₄ bilden, das Vorstufe des pro – inflammatorischen Leukotrien B₄ ist. Leukotrien A₄ bzw. dessen Hydrolyseprodukt 5S,6S – DiHETE kann dann durch die ALOX15 zu Lipoxin A₄ (5S,6S,15S-TriHETE)

umgewandelt werden. Lipoxine hemmen einerseits die Chemotaxis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und deren Interaktion mit Endothelzellen, während sie andererseits die Chemotaxis von Monozyten stimulieren und diesen einen anti – inflammatorischen Phänotyp verleihen [72-74]. Sie stimulieren also die M2 – Differenzierung von Monozyten. Zusammenfassend betrachtet sind Lipoxine also Botenstoffe, welche die Entzündungsreaktion hemmen und die Entzündungsheilung stimulieren [69].

Neben den Lipoxinen gibt es, wie oben bereits erwähnt, noch weitere anti – inflammatorische Eikosanoide, welche bei der Entzündungsheilung eine wichtige Rolle spielen. Resolvine werden im Körper aus der omega – 3 – Fettsäure Docosahexaensäure gebildet und können bereits in kleinen Mengen Entzündungsprozesse verringern [75]. Während der Entzündung kommt es zur Anheftung von Leukozyten an das Endothel der Blutgefäße, von wo aus diese dann in das Gewebe gelangen. Resolvin D2 zum Beispiel führt nun dazu, dass in den Endothelzellen vermehrt Stickstoffmonooxid produziert wird, wodurch die Anheftung der Leukozyten an das Endothel und damit die Einwanderung in das Gewebe unterbunden wird [75]. Des Weiteren verändert Resolvin D2 die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel, was ein weiterer Grund für die verringerte Anheftung der Leukozyten an die Gefäßwand darstellt [75]. Seit einigen Jahren sind neben Resolvin D2 auch Resolvin E1 und E2 bekannt, welche beide ebenfalls eine entzündungshemmende Wirkung haben. Resolvin E1 hemmt zum Beispiel die Bildung des Botenstoffs Interleukin 12 [75]. Als weiteres Beispiel anti – inflammatorischer Eikosanoide seien hier noch die Maresine aufgeführt. Die Bezeichnung Maresin leitet sich vom Begriff **macrophage mediator in resolution of inflammation** ab. Es zeigte sich, dass Maresine potente anti – inflammatorische Eigenschaften aufweisen. Maresine werden ebenso aus der omega – 3 – Fettsäure Docosahexaensäure im Körper gebildet. Es konnte gezeigt werden, dass das Maresin 1 (MaR1) ein Mediator ist, welcher die Leukozyteninfiltration hemmt und gleichzeitig die Phagozytose bereits apoptotischer Zellen durch alternativ stimulierte Makrophagen beschleunigt [76]. Dabei wird eine ausgeprägte Stereoselektivität diskutiert, da Strukturisomere von MaR1 eine geringere anti – inflammatorische Potenz aufweisen [76].

Zusammenfassend muss man schlussfolgern, dass trotz der immer weiter fortschreitenden Charakterisierung von ALOX15 – Isoformen verschiedener Spezies deren physiologische Bedeutung noch nicht ganz klar ist.

Experimente mit knockout Mäusen haben für einige epidermale LOX – Isoformen neue Hinweise geliefert. So konnte z. B. gezeigt werden, dass ALOX12b knockout Mäuse nach der Geburt auf Grund eines erhöhten Wasserverlustes sterben [77]. Damit scheint diese LOX – Isoform für die Hautdifferenzierung, insbesondere für die Ausbildung der epidermalen Verdunstungsbarriere, mitverantwortlich zu sein. ALOX5 knockout Mäuse weisen keinen deutlichen Phänotyp auf. Ebenso zeigen ALOX12 knockout Mäuse keinen auffälligen Phänotyp; allerdings scheint das Enzyme an der Tumorentstehung beteiligt zu sein [78]. Im Falle der ALOX15 knockout Mäuse zeigte sich ebenfalls kein auffälliger Phänotyp, wenn die Mäuse nicht zusätzlich stimuliert wurden. Wurden sie jedoch in verschiedenen Krankheitsmodellen getestet (Arteriosklerose, Krebs, Osteoporose, Diabetes mellitus), konnten Phänotypen identifiziert werden [79].

1.6 Arteriosklerose

1.6.1 Definition

Durch die WHO wird die Arteriosklerose folgendermaßen definiert: Die Arteriosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der arteriellen Intima. Diese bestehen aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Calciumablagerungen und Bindegewebe. Diese Intimaveränderungen gehen mit einer Veränderung der Arterienmedia einher [80]. Die WHO teilt die Arteriosklerose in 4 Stadien ein:

Stadium 0: Gesunde, elastische, nicht eingeeengte Arterien

Stadium I: Frühe Wandschädigung: streifenartige Fetteinlagerung; sog. fatty streaks

Stadium II: Fortgeschrittene Wandschädigung: mit bindegewebigen Platten

Stadium III: Komplizierte Wandschädigung: massive Arterienverengung mit bereits bestehender Folgeerkrankung

Die Arteriosklerose ist eine multifaktorielle und multigenische Erkrankung, deren Ursachen trotz intensiver Forschungen noch nicht vollständig aufgeklärt sind [81]. Die

morphologischen Gefäßveränderungen an Koronarien bzw. Hirngefäßen können zum Myokardinfarkt – bzw. zum Schlaganfall führen. Arteriosklerotische Veränderungen in peripheren Gefäßen erhöhen das Risiko einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit [82, 83]. Seit vielen Jahren sind Herz – Kreislaferkrankungen, die sich häufig aufgrund einer Arteriosklerose entwickeln, die Haupttodesursache in allen Industrienationen. Es gibt jedoch mittlerweile epidemiologische Berechnungen, denen zu Folge es in 15 bis 20 Jahren zu einer Veränderung in der Todesursachenstatistik kommen könnte. Diese Daten deuten darauf hin, dass maligne Tumoren die Herz – Kreislaferkrankungen von Platz 1 der Todesursachen in den Industrienationen verdrängen könnten [82, 84, 85].

1.6.2 Pathogenese

Zur Entstehung der Arteriosklerose gibt es mehrere Hypothesen, wobei die response – to – injury – Hypothese (1976 von Russell Ross postuliert) und die Hypothese der endothelialen Dysfunktion vor allem die frühen Stadien der Krankheitsentstehung beschreiben [86, 87]. Beide Hypothesen gehen davon aus, dass eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion als auslösender Faktor für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen anzusehen ist. Solche Beeinträchtigungen der Endothelfunktion können entweder durch mechanische Verletzungen der Intima ausgelöst werden, was zu chronisch fibroproliferativen Reparaturprozessen führt, die von überschießenden Immunreaktionen begleitet werden. Andererseits können als Auslöser einer endothelialen Dysfunktion auch Veränderungen des chemischen (z.B. Hypercholesterolämie oder Hypertriglyceridämie) bzw. metabolischen (vaskuläre Hypoxie) Milieus angesehen werden. Diese führen u. a. zu einer gestörten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, wodurch Vasokonstriktion, Leukozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation eingeleitet werden [83, 86, 87]. Auch ein erhöhter Blutdruck (Hypertonie), veränderte Strömungseigenschaften des Blutes (turbulente Strömungen an Gefäßbifurkationen) oder Infektionen (Chlamydien) können zur Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen beitragen [83, 86, 87].

Eine weitere Hypothese, die sich an die beiden vorangegangenen Hypothesen anlehnt und vor allem die Frage thematisiert, warum es bei der Entstehung der primären Gefäßläsionen zu einer Lipidablagerung im Subendothelialraum der Arterien kommt, ist die „lipid oxidation“ Hypothese [16]. Dabei wird davon ausgegangen, dass oxidiertes LDL durch Makrophagen übermäßig stark aufgenommen wird, so dass sich die Zellen

in Schaumzellen verwandeln. Die LDL – Oxidations – Hypothese sieht in der response – to – injury – Hypothese und in der Theorie der endothelialen Dysfunktion einen beginnenden Teilschritt in der Abfolge von komplexen Vorgängen zur Entstehung der Arteriosklerose [16, 88, 89]. In der Beschreibung des weiteren Verlaufes der Atherogenese ähneln sich die erwähnten Hypothesen. Es kommt zu einer LDL – Akkumulation im Subendothelialraum der Arterien mit nachfolgender Gefäßentzündung. Durch diese Lipidansammlung werden Makrophagen angezogen, welche mittels ihrer membranständigen Scavenger – Rezeptoren in der Lage sind, oxLDL zu phagozytieren. Durch die fehlenden negativen Feedbackmechanismen der Scavengerrezeptor – vermittelten Aufnahme von modifiziertem LDL kommt es zu einer exzessiven intrazellulären Lipidablagerung, wodurch die Makrophagen zu Schaumzellen differenzieren [75]. Im histologischen Präparat ist die subendotheliale Ansammlung von Schaumzellen als Fettstreifen, sogenannte fatty streaks, sichtbar. Diese werden als frühe arteriosklerotische Läsionen (Stadium 1) angesehen [81, 88-90]. Kommt es zum Absterben der Schaumzellen, entleeren sich die gespeicherten Lipide in das umliegende Gewebe, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion initiiert wird. Es wandern zahlreiche Lymphozyten ein, die pro – inflammatorische Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren freisetzen. Dadurch kommt es u. a. zur Proliferation von glatten Muskelzellen und zum Einwandern von Myofibroblasten aus der Media, welche zu Fibrozyten transformieren [90]. Solange die Plaques von einer dicken fibrösen Kapsel abgedeckt werden, bezeichnet man sie als stabile Plaques (Stadium 2). Diese stabilen Plaques können über Jahre persistieren und sind noch relativ ungefährlich. Beginnen sie jedoch unter dem Einfluss sezernierter Wachstumsfaktoren weiter zu wachsen, wird ihre fibröse Kappe instabil und es kommt zur Plaqueruptur. Diese Läsionen werden dann als vulnerable oder instabile Plaques (Stadium 3) bezeichnet und führen zur unmittelbaren Aktivierung der primären (Blutplättchenaggregation) und sekundären (plasmatisches Gerinnungssystem) Hämostase. Die Ausbildung von Thromben kann schließlich zu einer kompletten Gefäßokklusion führen (Stadium 4) [81].

Noch vor nicht all zu langer Zeit betrachtete man die Arteriosklerose als nicht – entzündliche hyperproliferative Gefäßerkrankung. Heute geht man jedoch davon aus, dass die Gefäßentzündung einer der entscheidenden frühen Prozesse bei der Atherogenese ist. Durch einen bzw. multiple entzündungserregende Reize, wie zum Beispiel eine Gefäßverletzung in Folge einer Hypertonie, ein infektiöses Mikrotrauma wie z. B. bei Chlamydieninfektion oder auch durch erhöhtes Plasma LDL – Cholesterol

Einleitung

wird eine Entzündungsreaktion in der Arterienwand induziert, in deren Folge es zur LDL Modifizierung, zur Schaumzellbildung und zur Lymphozyteninfiltration kommt. Interessanter Weise scheint die vaskuläre Entzündung primär chronisch zu beginnen, da es bisher nicht gelungen ist, akute Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten) in frühen arteriosklerotischen Läsionen in größerer Menge nachzuweisen.

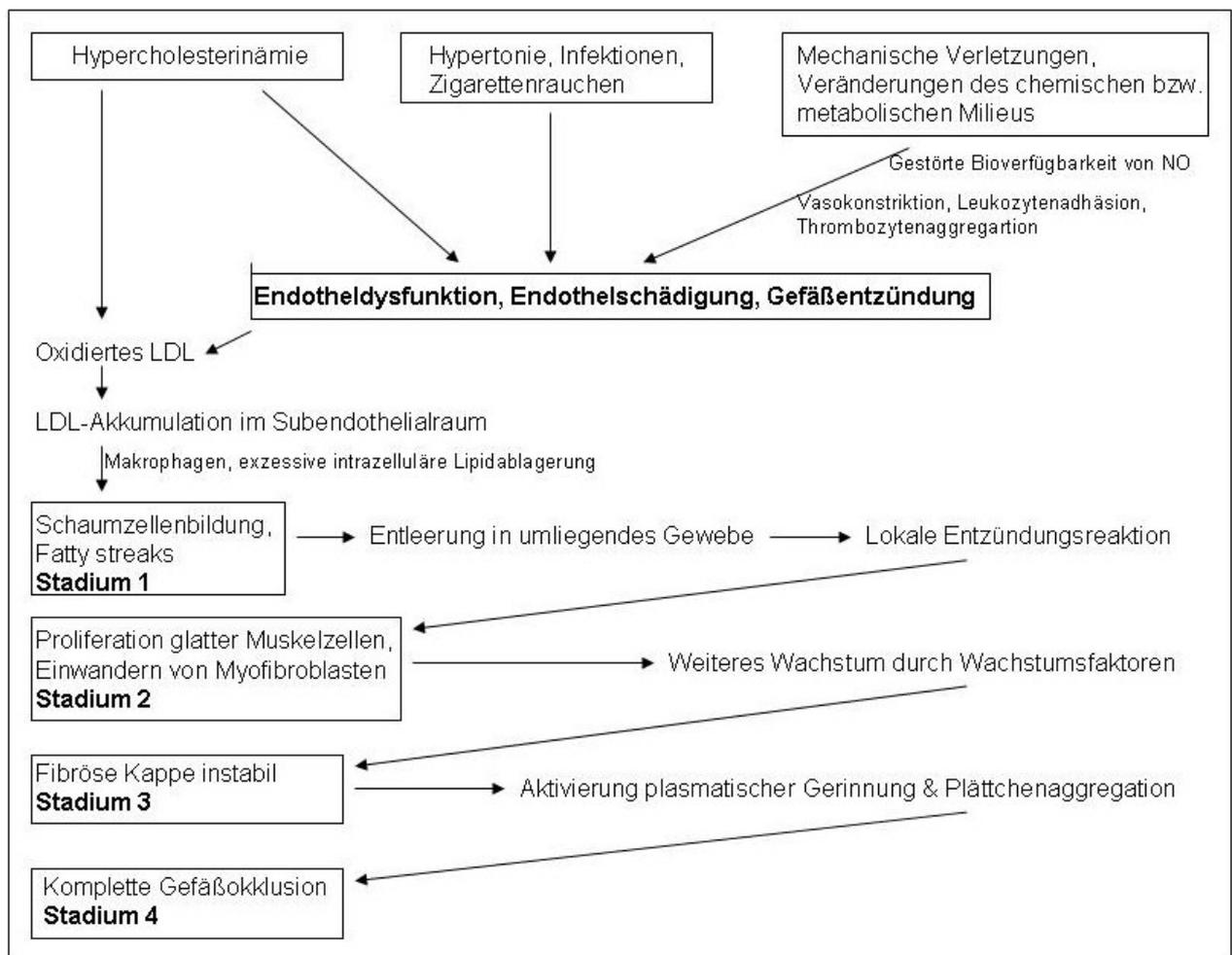


Abb. 4 Schematische Darstellung der Pathogenese der Arteriosklerose nach der LDL – Oxidationshypothese

1.6.3 Risikofaktoren

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die bestimmte Individuen dazu prädisponieren, eine Arteriosklerose zu entwickeln. Zu diesen gehört das männliche Geschlecht, da Männer auf Grund der höheren Androgenspiegel und der niedrigeren Östrogenspiegel häufiger betroffen zu sein scheinen als Frauen [86, 90-92]. Frauen haben einen sogenannten Östrogenschutz. Daraus ergibt sich allerdings, dass bei Frauen nach der Menopause das Risiko ansteigt, da zu diesem Zeitpunkt das Östrogen abfällt und es zu

einem funktionellen Östrogenmangel kommt [86, 90-92]. Ebenso begünstigen erhöhte Apolipoprotein – a Werte und erniedrigte HDL – Spiegel im Blutplasma das Risiko an einer Arteriosklerose zu erkranken. Auch das metabolische Syndrom, arterielle Hypertonie, Adipositas und Diabetes mellitus zählen zu den Risikofaktoren der Arteriosklerose [80]. Auf der anderen Seite erhöhen auch eine Reihe von Umweltfaktoren oder individuell beeinflussbare Faktoren das Arterioskleroserisiko. Hierzu gehören eine fettreiche Ernährung, der Konsum von Nikotin, Bewegungsmangel, ein erniedrigter Plasmaspiegel an endogenen Antioxidantien und Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* oder dem Zytomegalievirus [86, 91]. Auch Stress kann die Entstehung einer Arteriosklerose fördern [86, 90-92], wobei derzeit noch nicht genau definiert werden kann, was Stress eigentlich bedeutet. Zur Berechnung des persönlichen Risikos eine KHK bzw. einen Myokardinfarkt zu erleiden, gibt es verschiedene Punktesysteme, welche sich aus umfangreichen epidemiologischen Untersuchungen ableiten. So gibt zum Beispiel der PROCAM – Score an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Individuum in den nächsten 10 Jahren einen Myokardinfarkt erleidet. Der Framingham – Score charakterisiert die Wahrscheinlichkeit mit der bei einem Individuum sich in den nächsten 5 Jahren eine KHK einstellen wird. Für die Ermittlung dieser Scores findet eine unterschiedliche Wichtung der individuellen Risikofaktoren statt.

1.6.4 Rolle der ALOX15

Vier der sechs Unterfamilien von Säugertierlipoxygenasen haben nach derzeitigem Wissenstand einen Bezug zu kardiovaskulären Erkrankungen. Dies sind die ALOX15, die ALOX5, die ALOX12 und, mit Einschränkungen, auch die ALOXE3. Allerdings sind die pathophysiologischen Mechanismen aller vier Isoenzyme sehr unterschiedlich [83]. Mitte der 80er Jahre wurde erstmals postuliert, dass LOX für die Pathogenese der Arteriosklerose bedeutsam sein könnten [93]. Zu Beginn der Forschung wurde der Focus auf die ALOX12 gelegt, da ihr Produkt, das 12S – HETE, die Migration glatter Muskelzellen induziert [83, 94, 95]. Ende der 80er Jahre wurde durch den Nachweis von ALOX15 Produkten in arteriosklerotischen Läsionen des Menschen vermutet, dass auch dieses Enzym in die Pathogenese der Arteriosklerose involviert sein könnten [96, 97]. Allerdings gab es zu diesem Zeitpunkt keinerlei Vorstellung zur mechanistischen Basis dieser Beteiligung. Der erste direkte Hinweis auf eine Beteiligung der ALOX15 an der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen stammt aus

dem Jahr 1990. In makrophagenreichen Regionen arteriosklerotischen Läsionen von mit Cholesterol – gefütterten Kaninchen fand man mRNA und Protein der ALOX15 zusammen mit oxidiertem LDL [98]. Des Weiteren wurden spezifische ALOX15 – Produkte in Lipidextrakten von arteriosklerotischen Läsionen des Kaninchen nachgewiesen, welche in zeitlichem Zusammenhang mit Lipidablagerungen in der Aortenwand standen [99]. Für menschliche Läsionen waren die Ergebnisse ähnlich. Zunächst wurde berichtet, dass sowohl in frühen als auch späten Läsionen spezifische ALOX15 – Produkte vorhanden sind [90]. In anderen Untersuchungen wurden solche Produkte nur in frühen Läsionen gefunden [100, 101]. In fortgeschrittenen Läsionen wurde das Muster der spezifischen ALOX15 Produkte durch unspezifische Lipidperoxidationsprodukte bis zur Unkenntlichkeit überlagert. In beiden Berichten war der Anteil spezifischer LOX – Produkte am Gesamtbestand an Lipidperoxidationsprodukten zwar relativ gering, doch der spezifische Produktnachweis deutet auf eine in vivo abgelaufene ALOX15 – Reaktion hin.

Entsprechend der Oxidationshypothese ist natives LDL nur wenig atherogen. Hingegen gilt oxidiertes LDL als pro – atherogene LDL – Spezies, da diese Form sehr schnell über Scavenger – Rezeptoren von Makrophagen oder glatten Muskelzellen aufgenommen wird [16]. Da die ALOX15 ein Enzym ist, welches LDL – Lipide direkt oxidiert, war es gut möglich, dass dieses Enzym in vivo dazu beitragen könnte, LDL in oxLDL umzuwandeln [83, 102-104]. Genauer untersucht wurde die in vitro Reaktion der ALOX15 mit LDL in isoliertem Zustand und im menschlichen Plasma [102, 105]. Die ALOX15 kann neben der direkten Oxygenierung von LDL – Lipidestern auch die zuvor aus den Lipidestern enzymatisch freigesetzten Fettsäuren oxygenieren [106]. In vitro konnte gezeigt werden, dass die ALOX15 am effektivsten arbeitet, wenn sie als Substrat freie Arachidonsäure umsetzen kann [83]. In den letzten 15 Jahren wurden eine Reihe von in vitro und in vivo Studien durchgeführt, die in tierischen Atherosklerosemodellen eine pro – atherogene Wirkung der ALOX15 ergaben. So wurde zum Beispiel an Mausmakrophagen, die keine ALOX15 exprimieren, gezeigt, dass diese kaum noch in der Lage waren, LDL zu oxygenieren [107]. Hingegen oxygenierten Fibroblasten, die mit ALOX15 transfiziert worden waren, verstärkt LDL [108]. Dies galt allerdings nicht für alle transfizierten Zellen, was wiederum darauf hinwies, dass die Expression des Enzyms alleine für ein erhöhtes Potential zur Oxidation von LDL nicht ausreichend ist. In einer Studie mit LDL – Rezeptor defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die Überexpression der ALOX15 im vaskulären Endothel

zur Beschleunigung der Lipidablagerung im Subendothelialraum der Aorta führte [109]. Apolipoprotein E defiziente Mäuse, in denen das Gen für die ALOX15 inaktiviert wurde, zeigten gegenüber apoE knockout Mäusen, welche das Enzym exprimierten, eine abgeschwächte Tendenz zur Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen [110, 111]. Eine signifikante Verringerung der Lipidablagerung konnte zu allen Zeitpunkten des experimentellen Protokolls nachgewiesen werden [111]. Kaninchen entwickeln eine Arteriosklerose, wenn sie über mehrere Monate mit einer cholesterolreichen Nahrung gefüttert werden [112, 113]. Durch die gleichzeitige Gabe eines oral wirkenden ALOX15 Hemmstoffes konnte die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen gehemmt werden [112, 113].

Andererseits gibt es in der Literatur auch Hinweise auf eine anti – atherosklerotische Wirkung der ALOX15. So sind transgene Kaninchen, welche die menschliche ALOX15 in Makrophagen gewebespezifisch überexprimieren, gegen die Entwicklung einer Arteriosklerose geschützt, wenn die Tiere über mehrere Wochen mit einer lipidreichen Diät gefüttert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesen Tieren die Menge der Lipidablagerungen in der Aorta signifikant geringer war, als bei normalen Kontrollkaninchen, die ebenfalls eine lipidreiche Diät erhielten [114].

Mit einer alternativen Forschungsstrategie konnten sowohl bei Kaninchen als auch bei Mäusen zusätzliche Hinweise auf eine anti – atherosklerotische Aktivität der ALOX15 erhalten werden. Die Induktion einer experimentellen Anämie bei Kaninchen und Mäusen verursacht eine systemische Hochregulation der ALOX15 Expression in den meisten Geweben der Versuchstiere [115, 116]. Diese Expressionsregulation ist langandauernd und konnte im Blut der Tiere noch mehrere Wochen nach Normalisierung der anämischen Symptome nachgewiesen werden. Wurde in solchen Tieren durch die Fütterung mit einer lipidreichen Diät eine experimentelle Arteriosklerose induziert, zeigte sich, dass die ALOX15 exprimierenden Tiere weniger Lipide in der Aorta ablagerten als entsprechende Kontrollen [115, 116]. Die molekulare Ursache für diesen anti – atherosklerotische Effekt konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Es wurde jedoch postuliert, dass die Bildung anti – inflammatorisch wirkender Lipoxine, an deren Biosynthese die ALOX15 beteiligt ist, eine Rolle spielt [117, 118].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Rolle der ALOX15 bei der Entwicklung der Arteriosklerose in tierischen Krankheitsmodellen und bei der humanen Atherogenese noch nicht ausreichend geklärt ist. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass es Unterschiede in den Pathomechanismen zwischen den experimentellen

Tiermodellen und den Vorgängen beim Menschen gibt. Das könnte u. a. auch darauf zurückgeführt werden, dass die murine ALOX15 verglichen mit dem humanen Enzym grundlegend andere Enzymeigenschaften (z.B. eine andere Reaktionsspezifität) aufweist [119, 120]. Eine weitere Möglichkeit die gegensätzlichen Effekte der ALOX15 in verschiedenen Tiermodellen zu erklären besteht darin, dass die Expressionskinetik und die zelluläre Verteilung des Enzyms unterschiedlich ist [121]. So wurde z. B. diskutiert, dass die ALOX15 in frühen Stadien der Arteriosklerose eine anti – atherogene Funktion ausübt, die dann im weiteren Verlauf der Krankheitsentwicklung in eine pro - atherogene Wirkung umschlägt [122]. Eine solche zeitabhängige Veränderung der Enzymfunktion würde bedeuten, dass aufgrund der unterschiedlichen Zeitverläufe der Atherogenese in verschiedenen tierischen Atherosklerosemodellen unterschiedliche Funktionen des Enzyms zu erwarten wären.

1.7 SNP – Vorkommen bei der ALOX15

Das Gen der ALOX15 ist polymorph. Bisher konnten in den öffentlich verfügbaren Datenbanken mehr als 300 verschiedene Allele nachgewiesen werden. In Tabelle 6 sind einige SNPs dieses Gens dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und der Relevanz im Hinblick auf den von mir untersuchten SNP wurden nur Polymorphismen in die Tabelle aufgenommen, welche zu einem Austausch von Aminosäuren führen. Die Zahl in der Spalte „Mutante“ bezeichnet die Position in der Aminosäuresequenz, an welcher der SNP zu einem Aminosäureaustausch geführt hat. Mit dem Buchstaben vor der Zahl wurde nach dem Einbuchstabencode der Aminosäuren die ursprüngliche Aminosäure und mit dem Buchstaben nach der Zahl die Aminosäure nach Mutation benannt. Diese wurde zum besseren Verständnis in der Spalte „Aminosäureaustausch“ noch einmal mit ihrem vollständigen Namen benannt. Da die Datenbankeinträge ständig aktualisiert werden, kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der SNPs, die zu Aminosäureaustauschen führen, bereits heute höher liegt und auch in Zukunft weiter ansteigen wird.

Für die weiteren Untersuchungen zur Struktur – Wirkungsbeziehung von ALOX15 und zu den funktionellen Konsequenzen krankheitsrelevanter SNPs dieses Enzyms habe ich mich in meiner Dissertation mit einem ausgewählten SNP beschäftigt, der zu einem Aminosäureaustausch (Threonin an der Position 560 der Aminosäuresequenz wird durch ein Methionin ersetzt) im Enzym führt. Dabei lautet die nicht – mutierte Gensequenz der betroffenen Region 5' ...AATGCACCCTGCACGATGCGGCTGCCC...

Einleitung

3'. Beim SNP tritt an der 1679. Position in der Basenabfolge ein C – zu – T – Austausch auf, woraus sich eine mutierte Gensequenz von 5' ...AATGCACCCTGCATGATGCGGCTGCC... 3' ergibt. Die entsprechenden Positionen wurden zur besseren Übersichtlichkeit fettgedruckt dargestellt. Ein Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin stellt zwar keine dramatische Veränderung der Aminosäuresequenz dar, da es sich bei beiden Aminosäuren um mittelgroße polare Aminosäuren handelt, die keine Ladung tragen. Da Threonin jedoch eine freie OH – Gruppe aufweist, kann es zur Bildung von Wasserstoffbrücken beitragen. Dies ist beim Methionin nicht der Fall. Damit könnte dieser Aminosäureaustausch zu einer Störung von Wasserstoffbrückennetzwerken führen und so eine Strukturveränderung des Enzyms induzieren.

Variation		Allelaustausch	Mutante	Aminosäureaustausch
c. 515T>C	Rs76317540	GTT → GCT	V172A	Valin → Alanin
c.559A>G	rs 61118773	ATC → GTC	I187V	Isoleucin → Valin
c.1265G>A	Rs61099320	GGG → GAG	G422E	Glycin → Glutamin
c.337G>A	Rs41509647	GGC → AGC	G113S	Glycin → Serin
c.181C>A	rs41493447	CTG → ATG	L61M	Leucin → Methionin
c.383G>A	Rs41490747	CGG → CAG	R128Q	Arginin → Glutamin
c.305G>T	Rs41439950	GGC → GTC	G102V	Glycin → Valin
c.1849C>T	Rs41432647	CCT → TCT	P617S	Prolin → Serin
c.1679C>T	Rs34210653	ACG → ATG	T560M	Threonin → Methionin
c.971G>T	Rs34013857	GGA → GTA	G324V	Glycin → Valin
c.1381G>C	Rs17852625	GCC → CCC	A461P	Alanin → Prolin
c.43T>C	Rs13306168	TAT → CAT	Y15H	Tyrosin → Histidin
c.581T>C	Rs11867874	CTG → CCG	L194P	Leucin → Prolin
c.268G>C	Rs11568142	GAC → CAC	D90H	Aspartat → Histidin
c.614G>A	Rs11568101	CGG → CAG	R205Q	Arginin → Glutamin
c.309C>G	Rs11568099	AAC → AAG	N103K	Asparagin → Lysin
c.715G>A	Rs3892408	GTG → ATG	V239M	Valin → Methionin
c.416A>G	Rs113604586	TAC → TGC	Y139C	Tyrosin → Cystein
c.287G>A	Rs113120171	TGT → TAT	C96Y	Cystein → Tyrosin

Tab. 6: Einige SNPs des humanen 12/15 – LOX Gens, welche zu einem Aminosäureaustausch führen [123].

Einleitung

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass der T560M – SNP mit geringen Allelfrequenz vorkommt, wobei es ethnische Unterschiede in der Verteilung der Häufigkeiten gibt [124, 125]. In funktionelle Untersuchungen wurde deutlich, dass die Enzymmutante eine stark reduzierte katalytische Aktivität (ca. 5 % des Wildtypenzym) aufweist [124].

In einer groß angelegten epidemiologischen Fall – Kontroll – Studie wurde festgestellt, dass Patienten, die den T560M – SNP in heterozygoter Form tragen, ein signifikant erhöhtes Risiko für eine KHK besitzen [124]. Dieses erhöhte Risiko wurde für homozyote T560M – Träger jedoch nicht bestätigt [124]. In einer zweiten Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten des SNPs und einem Myokardinfarkt untersucht. Hierbei konnte zwar kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden [125]. Es gab jedoch einen statistisch nachweisbaren Trend für eine Korrelation des SNP und einem Myokardinfarkt [125].

1. 8 Gegenstand und Ziele dieser Arbeit

Ein genetisch bedingter alpha – 1 – Antitrypsinmangel ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung einer COPD und das S – bzw. das Z – Allel repräsentieren dabei weltweit häufig auftretenden Mutationen [2, 3, 20]. Die Häufigkeitsverteilung dieser beiden Allelvarianten wurde in umfangreichen epidemiologischen Studien in verschiedenen Probandenkollektiven weltweit untersucht. Bisher fehlen allerdings entsprechende Studien in der Durchschnittsbevölkerung von Ost – Java, einer Provinz im Osten der indonesischen Hauptinsel Java, in der etwa 35 Mill. Einwohner leben.

Kürzliche Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle der ALOX15 deuten darauf hin, dass ein natürlich vorkommender SNP im entsprechenden Gen (T560M) zu einem Enzym mit stark reduzierter katalytischen Aktivität (95 %) führt. Ein homozygotes Auftreten dieses SNPs sollte zu Individuen führen, die praktische keine ALOX15 Aktivität exprimieren. Auch für diese Allelvariante gibt es Untersuchungen zur Häufigkeitsverteilung in verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen in den USA und in Europa, wobei auch hier die Häufigkeitsverteilung in der Durchschnittsbevölkerung der indonesischen Provinz Ost – Java noch nicht untersucht wurde. Weiterhin fehlen bislang Daten zu den molekularen Ursachen der drastisch verringerten enzymatischen Aktivität des T560M – Austausches, der durch diesen SNP des ALOX15 Gens verursacht wird. Aus dieser Datenlage ergaben sich für meine Promotionsarbeit die folgenden drei Aufgaben:

1. Untersuchung der Häufigkeitsverteilung des S – und Z – Allels des humanen Antitrypsingens (SERPINA1) in der Normalbevölkerung der indonesischen Provinz Ost – Java.
2. Untersuchung der Häufigkeitsverteilung des SNPs des humanen ALOX15 Gens, der zur T560M – Mutation des entsprechenden Enzyms führt, in der Normalbevölkerung der indonesischen Provinz Ost – Java.
3. Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der katalytischen Inaktivität des T560M – Austausches in der humanen ALOX15.

Zur Untersuchung der Punkte 1. und 2. wurde im Rahmen einer Pilotstudie von ca. 150 klinisch unauffälligen Einwohnern der Provinz Ost – Java genomische DNA gewonnen (Wangenschleimhautabstrich) und auf das Vorkommen der genannten SNPs im ALOX15 and alpha – 1 – Antitrypsingen mit verschiedenen Methoden untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien für analytisches Arbeiten

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Arachidonsäure	Sigma, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Serva, Heidelberg
dNTP – Lösung	Roth, Karlsruhe
5, 8, 11, 14 – Eicosatetrainsäure (ETYA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe
HPLC – Standard 5, 12, 15 – HETE; 9, 13 – HODE je R – und S – Isomer	Cayman Chem., Vertrieb: Alexis Deutschland GmbH Grünberg
Linolensäure	Sigma, Deisenhofen
Linolsäure	Serva, Heidelberg
Marker	Biolabs, Frankfurt am Main
Nickelagarose (Ni – Agarose)	Qiagen, Hilden

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien für präparatives Arbeiten

Ampicillin Natriumsalz	Life Technologies, Eggenstein
Antikörper: anti Maus – IgG	Sigma – Aldich, München
Antikörper: RGSHis	Qiagen, Hilden
Antikörper: PDI (Kaninchen)	Stressgen Biotechnol. Kanada
Bis(Trimethylsilyl)trifluoracetamid	Sigma, Deisenhofen
Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Puffer, Nährmedien und Lösungen

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

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton
 0,5% Hefe-Extrakt
 0,5% NaCl
 1 mM NaOH

LB-Agar: LB-Medium + 1,5% Bacto-Agar

Die Antibiotikakonzentrationen in den Medien betragen 0,1 mg/l Ampicillin (Amp).

PBS (phosphate buffered saline): 150 mM NaCl
 3 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄
 1,5 mM KH₂PO₄
 pH 7,4

Waschpuffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH 8.0
 300 mM NaCl

Elutionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0
 300 mM NaCl
 200 mM Imidazol

TAE – Puffer (Stock 50x) : 121, 14 g Tris (Endkonzentration 40mM)
 18, 625 g EDTA Natrium – Salz (Endkonzentration 2mM)
 28,5 ml konzentrierte Eisessigsäure
 Ad 1000 ml mit A. demin.
 pH ca. 8,5

TAE – Puffer 1x: 20 ml Stock + 980ml A. dest.

2.1.4 Enzyme und Kits

HotStar Taq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Miniprep Spin und Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
native Kaninchen-Retikulozyten 15 – LOX	Frau C. Gerth, AG Kühn
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Taq alpha 1	Qiagen, Hilden
Western Lightning Chemilumineszenz plus	Perkin Elmer, Boston (USA)

2.1.5 Plasmide, Oligonukleotide und Zelllinie

pBluescript	Stratagene, La Jolla (USA)
pQE-9	Qiagen, Hilden

Es wurden folgende Primer für die alpha – 1 – Antitrypsin verwendet, deren Synthese von der Firma BioTeZ Berlin – Buch GmbH durchgeführt wurde:

AntitrypZ up TAA GGC TGT GCT GAC CAT CGT C
 AntitrypZ do CAA AGG GTT TGT TGA ACT TGS CC
 AntitrypS up GAG GGG AAA CTA CAG CAC CTC G
 AntitrypS do ACC CTC AGG TTG GGG AAT CAC C

Für die Versuche bezüglich der ALOX15 wurden folgende Primer verwendet, welche ebenfalls von der Firma BioTeZ Berlin – Buch GmbH synthetisiert wurden:

hALOX15.18F GGT ACT CTT GGG TGC CTA ATG C
 hALOX15.18R TCT CCA GCG TTG CAT CCT T
 hALOX15.18Rep1 Yakima Yellow – CCG CAT CAT GCA GG –Tamra
 hALOX15.18Rep2 6–FAM – CCG CAT CGT GCA GG –Tamra

Als Zelllinie wurde XL – 1 Blue der Firma Stratagene, La Jolla (USA) verwendet.

2.1.6. DNA Proben

Genomische DNA wurde aus den Zellen der Mundschleimhaut (Wangenabstrich) von Studenten der Graduate School der Airlangga University Surabaya unter Verwendung des DNA – Präparationskit (Invisorb Skin Swab Kit der Firma Invitex) präpariert. Das Alter der ausgewählten 150 Probanden variierte zwischen 25 und 35 Jahren, wobei auf eine Gleichverteilung der Geschlechter geachtet wurde. Keiner der zugelassenen Probanden war in ambulanter bzw. stationärer Behandlung wegen einer bekannten Lungen – bzw. Herz – Kreislauf – Erkrankung. Nach Einschätzung der indonesischen Partner, die für die Sammlung der DNA – Proben verantwortlich waren, repräsentierten die gestesteten Probanden einen Querschnitt der ost – javanesischen Mittelschicht der entsprechenden Altersklasse. Angehörige der chinesischen Minderheit wurden nicht zugelassen.

2.2 alpha – 1 – Antitrypsin – Genotypisierung

Hierzu wurde zunächst die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt, um die gewünschten Genabschnitte, welche die potentiellen Mutationsstellen enthalten, zu amplifizieren. Die jeweiligen Amplifizierungsprimer für die unterschiedlichen Allele wurden so konstruiert, dass sie die jeweiligen Mutationsstellen flankierten. Im nächsten Schritt wurde der vervielfältigten DNA eine Restriktionsendonuklease (Taq alpha1) zugesetzt. Dieses Spaltenzym wurde deshalb ausgewählt, da seine Erkennungssequenz die ausgetauschte Base enthielt. Dabei lag eine unveränderte Spaltstelle für Taq alpha1 nur im M – Allel, nicht aber in den mutierten Allelen vor. Bei der Amplifizierung mit den Primern des Z – Allels wurden DNA – Produkte mit einer Länge von 110bp produziert. Aus der Spaltung dieses Amplifizierungsproduktes mit Taq alpha 1 resultieren im Falle des M – Allel zwei Spaltprodukte mit einer Länge von 89bp und 21bp. Beim Z – Allel wurde das Amplifizierungsprodukt nicht gespalten, da die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzymes durch den SNP verändert wurde. Nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym sollte also ein 110 bp langes Produkt nachweisbar sein. Bei der Amplifizierung mit den Primern für das S – Allel entstehen Amplifizierungsprodukte mit einer Länge von 98bp. Auch hier ergeben sich beim M – Allel nach der Spaltung mit der Restriktionsendonuklease zwei Spaltprodukte von 78bp und 20bp. In der darauffolgenden Elektrophorese erwartet man also bei einer genotypischen MM – Kombination eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 78bp (amplifiziert mit S – Allelprimern) oder bei 89bp (amplifiziert mit Z – Allelprimern).

Bei Verwendung eines Molekulargewichtsmarkers von 100bp liegen die beiden anderen, kurzen Banden des M – Allels nach Spaltung außerhalb des sichtbaren Bereichs. Bei genotypischem Vorliegen von SS erwartet man eine Bande bei 98bp und bei genotypischem ZZ eine Bande bei 110bp. Bei Vorliegen einer heterozygoten MS Kombination erwartet man eine Bande von 98 bp (S – Allelbande) und eine bei 78bp (M – Allelbande). Bei einer genotypischen MZ – Kombination sollte eine Bande bei 110bp (Z – Allelbande) und eine bei 89bp (M – Allelbande) auftreten.

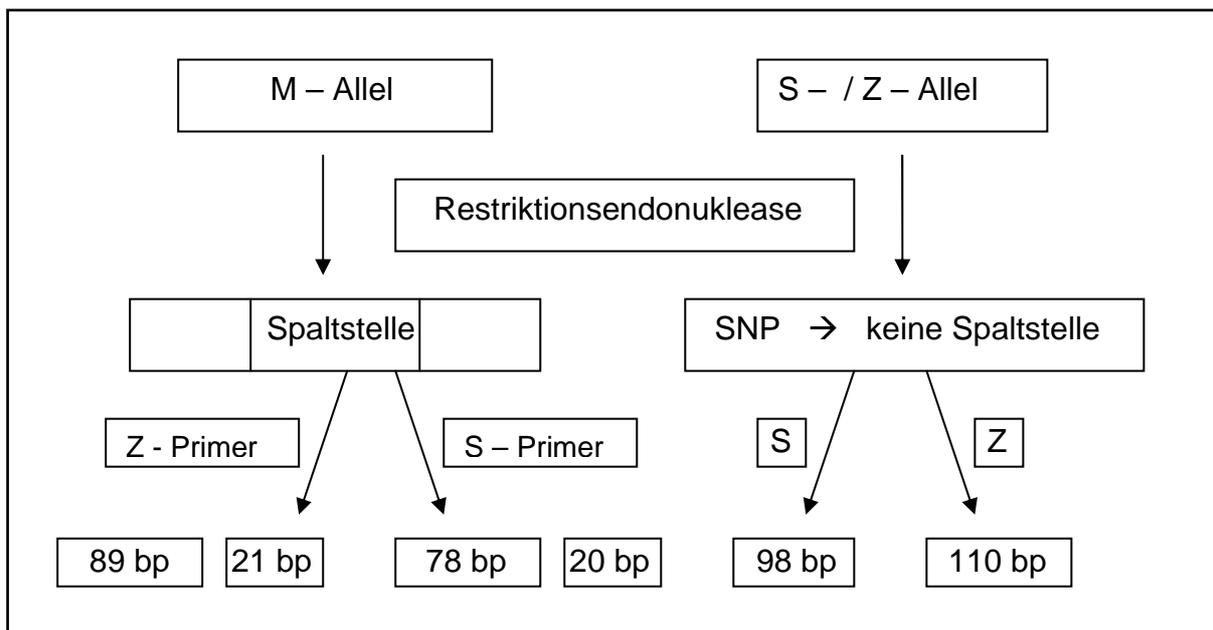


Abb. 5: Schematische Darstellung der Entstehung der unterschiedlichen Fragmente nach der Spaltung mit der Restriktionsendonuklease

2.2.1 Genomische Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Vervielfältigung der ausgewählten DNA – Abschnitte kam die genomische PCR zum Einsatz. Dabei wurde mit der Polymerase HotStar Taq der Firma Qiagen gearbeitet. Um beide Mutationsmöglichkeiten abdecken zu können, mussten auf Grund der unterschiedlichen Lage der beiden Genloci für das S – bzw. das Z – Allel zwei verschiedene Primerpaare verwendet werden. Es wurde je ein PCR – Lauf mit jeder DNA – Probe einmal mit der Primerkombination für das S – Allel und einmal mit der Primerkombination für das Z – Allel durchgeführt. Dabei wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

Material und Methoden

PCR – Ansatz:

- 10 µl genomische DNA
- 2 µl Primer Mix (2,5µM) für Z – Allel bzw. für S – Allel
- 2,5 µl 10x PCR Puffer
- 0,5 µl dNTPs
- 0,2 µl Hot Star Taq Polymerase
- 9,8 µl steriles Wasser
- Endvolumen: 20 µl

PCR – Programm :

- Schritt 1: 10 min 99°C
- Schritt 2: 15 min 95°C
- Schritt 3: 1 min 94°C
- Schritt 4: 1 min 59°C
- Schritt 5: 1 min 72°C
- Schritt 6: 10 min 72°C
- Pause bei 10°C
- Schritt 3, 4 und 5 werden dabei 40-mal durchlaufen.

Nach abgelaufener PCR wurden die Proben auf Eis gestellt und ein Teil des PCR – Ansatzes zur Durchführung der Spaltung verwendet.

2.2.2 Spaltung mit Taq alpha1

Im Anschluss an die PCR wurde ein Teil des PCR – Produktes gespalten, um zu überprüfen, ob in der amplifizierten DNA eine Mutation vorlag. Dabei kam es nur zu einer Restriktionsspaltung, wenn ein M – Allel in einem der beiden Genloci vorlag. Beim Vorliegen von S – bzw. Z – Allelen wurde das entsprechende PCR-Produkt nicht gespalten. Zur Spaltung wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

Ansatz:

- 10 µl PCR – Produkt
- 2 µl Restriktionspuffer
- 0,2 µl 100x BSA
- 0,5 µl Taq alpha1
- 7,3 µl steriles Wasser
- Endvolumen: 20 µl

Bedingungen: 1,5 Stunden bei 65°C

2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Spaltprodukte wurde die Elektrophorese im 3% Agarosegel verwendet. Die erwarteten Größen der Fragmente lagen bei 110bp für das Z – Allel, bei 98bp für das S – Allel und bei entweder 89bp und 21bp (bei Verwendung von Z – Allelprimern) oder 78bp und 20bp (bei Verwendung von S – Allelprimern) für das M – Allel. Hierzu wurden 3 g Agarose zu 100 ml TAE – Puffer 1x gegeben und in der Mikrowelle bei 380W erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Im Anschluss wurden 5 µl 1%-ige Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde abgekühlt und in die Elektrophoreseapparatur gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit TAE – Puffer 1x gefüllt, bis die Gelplatte vollständig bedeckt war. Zu den Proben wurden nun 10-fach konzentrierter Ladungspuffer pipettiert (1 µl Ladungspuffer zu 10 µl Probe) und die so vorbereiteten Proben wurden in die Gelschlitze eingefüllt.

- 20 µl Spaltprodukt + hinzugefügtem Ladungspuffer
- 10 µl PCR – Produkt + hinzugefügtem Ladungspuffer
- 10 µl NTC + hinzugefügtem Ladungspuffer
- 7 µl Marker für die Länge 100bp

Bei einer Laufrichtung von Minus nach Plus wurde mit einer Spannung von 80 Volt gestartet. Diese wurde nach dem Einwandern der Proben ins Gel auf 90 Volt erhöht.

Dauer der Laufzeit: ca. 30 min.

Die Herstellung der Lösungen der Molekulargewichtsmarker für eine Länge von 100 bp erfolgte nach folgender Vorgabe: 50 µl Marker + 400 µl steriles Wasser + 50 µl Ladungspuffer

2.3 ALOX15 – Genotypisierung

2.3.1 Real time PCR

Die Real time PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäureabschnitten und ermöglicht zusätzlich eine online Quantifizierung des Amplifikationsprozesses. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz – Messungen durchgeführt, die während der PCR ablaufen. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional der Menge der Amplifikationsprodukte zu. Ein Lauf besteht aus der Wiederholung mehrerer

Amplifikationszyklen und am Ende eines jeden Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in dieser Phase ist die korrekte Quantifizierung möglich. Es gibt verschiedene Möglichkeiten diese Methode durchzuführen. Hier wurden zweifach – markierte Sonden verwendet. Diese Sonden sind kurze Oligonukleotide, an deren 5' – Ende ein Fluoreszenzfarbstoff und am 3' – Ende ein Fluoreszenzunterdrücker gekoppelt ist. Bei der Amplifikation wird nun eine DNA – Polymerase zugegeben, welche Exonukleaseaktivität besitzt. Diese Aktivität bewirkt, dass der Löscher vom 3' – Ende der Sonde getrennt wird, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff am 5' – Ende sichtbar ist und die Fluoreszenzsignale gemessen werden können. Um mit dieser Methode Mutationen aufdecken zu können, ist es nötig, die Sonden für die Detektierung des Wildtyps und der Homozygoten – Mutante an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe zu koppeln. Für die Detektierung des Wildtyps wurde der Fluoreszenzfarbstoff 6 – FAM und für die Detektierung der homozygoten Mutante Yakima Yellow verwendet. Eine heterozygote DNA wird durch beide detektiert, da ein Allel durch die an 6 – FAM gebundene Sonde und das andere, mutierte, Allel durch die an Yakima Yellow gebundene Sonde sichtbar gemacht. Die Primer werden so entworfen, dass sie den Sonden sehr ähnlich sind, ohne diese zu überlappen. In meinem Fall wurde die Real time PCR mittels Taq Man Genotyping Master Mix zur Detektion der unterschiedlichen SNPs angewandt.

Hierzu wurde folgender PCR – Ansatz verwendet:

1 µl Primer up (10µM) ALOX 15.18F

1 µl Primer do (10µM) ALOX 15.18R

1 µl Sonde 1 (2,5µM) Reporter 1

1µl Sonde 2 (2,5µM) Reporter 2

5 µl 2xSNP Genotyping Master Mix (AB)

1µl DNA bzw. 1 µl Standard (je 1x Mutante, Wildtyp und Heterozygot)

Die Endkonzentration der Primer betrug je 1µM, die der Sonden je 0,25 µM

Die Kontrollplasmide wurden freundlicherweise von Frau Monika Anton in einem pQe 9 Vektor zur Verfügung gestellt. Dabei galt folgendes:

Mutante T560M (Clon 6) 220ng/µl

Wildtyp (Clon 4) 1,22µg/µl

Die Mutante wurde 1:200 000 verdünnt, dies entspricht einem Gehalt von 1 pg DNA, der Wildtyp wurde 1:1 000 000 verdünnt, was ebenfalls 1 pg DNA entspricht, es resultiert eine Endkonzentration im Mix Mutante/Wildtyp (Heterozygot) von 1:2, was 0,5 pg DNA entspricht.

2.3.2 Expression in HEK 293 Zellen

Die Expressionsplasmide des Wildtyps und der T560M – Mutante der humanen ALOX15 im pcDNA3.1 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Astrid Borchert zur Verfügung gestellt. Zuerst erfolgte die Vorbereitung der Zellkultur. Dabei wurden einen Tag vor der Transfektion die Zellen eingesät, wobei die Zellzahl 4×10^5 Zellen/2 ml Medium in 6 – well Platten betrug. Für eine optimale Transfektion sollten sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Transfektion selbst erfolgte nach einem Standardprotokoll mittels FuGENE HD Transfection Reagent entsprechend der Empfehlungen der Fa. Roche, wobei 3µl Fugene und 1 µg DNA pro 6 - well eingesetzt wurden. In einem weiteren Ansatz für die T560M – Mutante wurden 6 µl Fugene und 2 µg DNA verwendet.

2.3.3 Expression der rekombinaten LOX in *E. coli* und Aufreinigung des Enzyms

Für die bakterielle Expression wurden die bereits 2.3.2 beschriebenen Expressionsplasmide verwendet. Um die bestmöglichen Bedingungen für die Expression zu ermitteln, wurden zunächst verschiedene Expressionsstrategien getestet. So wurden zum Beispiel die Temperatur bei der Expression und die Inkubationszeit variiert, wobei die besten Ergebnisse erzielt wurden, wenn die Bakterien in der Hauptkultur bei 37°C über Nacht angezüchtet wurden und anschließend die Proteinexpression bei 25°C erfolgte. Dazu wurden die LOX – aktiven Klone in 20 ml LB – Medium – Ampicillin (Ampicillin Endkonzentration 0,1mg/l) angesetzt und für acht Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 15 ml dieser Vorkultur zu 3 Liter LB – Medium – Ampicillin (0,1mg/l Ampicillin Endkonzentration) gegeben und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln fermentiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Nach Induktion der LOX – Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) erfolgte eine weitere Inkubation bei 25°C für 4 Stunden. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und mit dem „EmulsiFlex – C5 High Pressure Homogenizer“ lysiert. Im Anschluss wurden die

Zelltrümmer abzentrifugiert, der Überstand zu 0,5 ml Nickel – TED Gel gegeben und die Suspension für eine Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Suspension wurde in eine Leersäule transferiert, zweimal mit 1 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl, pH 8) gewaschen und die am Gel anhaftenden Proteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH 8) eluiert. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt, wobei die Fraktionen 2 und 3 die aktive LOX enthielten. Die LOX – Aktivität der Elutionsfraktionen wurde spektrometrisch gemessen. Die aktiven Fraktionen wurden mit Glycerol (10% Endkonzentration) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Um die gewünschten Enzymmutanten herzustellen, wurde eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt. Dies erfolgte mit dem QuikChange Site – directed – Mutagenesis – Kit der Fa. Stratagene. Er ermöglicht in vier Stufen eine ortsgerichtete Mutation in nahezu jedem doppelsträngigen Plasmid mit einer mehr als 80% – igen Effizienz. Man benötigt eine DNA Polymerase (PfuTurbo DNA Polymerase), welche beide Plasmidstränge mit hoher Genauigkeit verdoppelt, einen doppelsträngigen DNA – Vektor, welcher die Zielstelle für die gewünschte Mutation enthält und zwei synthetische Oligonukleotidprimer, welche die gewünschte Mutation aufweisen. Zunächst wird mit den Mutageneseprimern eine PCR durchgeführt, so dass aus einer Plasmidkopie zwei geringfügig unterschiedliche Kopien entstehen. Hierfür benötigte man folgende

Materialien:

- 5 µl Puffer
- Je 5µl up and down Primer (5µM)
- 1µl dNTP
- 1µl Pfu Polymerase
- 20 ng DNA (entspricht 2µl DNA aus Expressionsplasmid pQE9)
- 31 µl Wasser
- Gesamtvolumen 50 µl

Mit den Materialien wurde eine PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1x 95°C für 30 Sekunden
- 14 Zyklen
 - 95°C 30 Sekunden
 - 55°C 1 Minute
 - 68°C 10 Minuten 30 Sekunden

Als Resultat aus der PCR erhält man neben der methylierten DNA des ursprünglichen Expressionsplasmid pQE9 eine nicht – methylierte Kopie, welche die gewünschte Mutation enthält. Nach anschließender Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I und einstündiger Inkubation bei 37°C bleibt nur noch die nicht – methylierte DNA übrig, da die methylierte DNA durch das Restriktionsenzym abgebaut wurde.

2.3.5 Transformation von Bakterienzellen

Für die Transformation wurden 50 µl XL1 – Blue kompetente Zellen aus dem -80°C Schrank aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 1 µl DNA wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden gesetzt, 0,5 ml NZY⁺ – Medium zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB – Ampicillin – Agar ausplattiert und bei 37°C für 16 Stunden angezüchtet. Nur Zellen, die das Expressionsplasmid tragen, waren in der Lage, sich zu vermehren und dabei Zellklone zu bilden. Zellen ohne Expressionsplasmid besaßen keine Antibiotikaresistenz und gingen zugrunde.

2.3.6 Mini – Präparation

Die Plasmidpräparation wurde mit dem Miniprep kit der Fa. Qiagen nach dem von der Firma angegebenen Standardprotokoll durchgeführt.

2.3.7 Kontrollspaltung

Zur Kontrolle, ob die richtige DNA präpariert wurde, erfolgte die Spaltung mit Apa I.

Hierzu benötigte Materialien:

- 1 µl DNA (aus der Mini – Präparation)
- 0,2 µl Apal Restriktionsenzym
- 1 µl NE4 (Puffer 10x)
- 0,1 µl BSA
- 7,7 µl Wasser

Der Ansatz wird 1 bis 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Das Restriktionsenzym schneidet die zugegebene DNA an drei verschiedenen Stellen. Zwei davon liegen im ALOX15 Insert und eine im Expressionsvektor. Demnach erhält man bei der Spaltung drei unterschiedlich lange Fragmente: 319 bp 1274 bp und 3840 bp. Um die Produkte der Restriktionsspaltung aufzutrennen und sichtbar zu machen, wurden im Anschluss an die Spaltung 10 µl des Spaltansatzes mit 1,2 µl 10fach konzentriertem Ladungspuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, welches als unspezifisches

Färbereagenz Ethidiumbromid enthält. Die Elektrophorese erfolgte bei 85 Volt und die DNA – Banden wurden mit einem BioDocAnalyse der Fa. Biometra unter UV – Licht sichtbar gemacht.

Die Messung der DNA – Konzentrationen der PCR – Produkte erfolgte am Photometer bei 260 und 280 nm. Dazu wurden 2 µl der Mini – Präparationen mit 78 µl Wasser versetzt, so dass eine 1:40 Verdünnung resultierte, ein Leerwert wurde mit 80 µl Wasser gemessen. Nach der DNA – Gehalt – Bestimmung wurden die Präparationen zum Sequenzieren geschickt.

2.3.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde die photometrische Methode nach Bradford angewendet. Das Prinzip dieser Reaktion beruht darauf, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie – Brilliant – Blau in saurer Lösung sowohl mit kationischen als auch mit nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe bildet. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner nicht – protonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweist. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff – Protein – Komplexes sehr viel höher ist als der des freien Farbstoffes, stellt die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung dar. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration haben wir das Roti – Quant System der Fa. Roth in Karlsruhe verwendet. Es wurden 100 µl des Zellsyats abzentrifugiert, wobei 1 µl des Lysatüberstandes bzw. der Elutionsfraktionen der Proteinreinigung zur Messung eingesetzt wurden. Die Absorption wurde bei 595 nm im Spektralfotometer gemessen. Für die Eichung der Methode wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen von bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet.

2.3.9 Western – Blot

Für den Nachweis der LOX – Expression auf Proteinebene und zur Quantifizierung der LOX – Konzentrationen in unreinen Präparationsfraktionen wurden Immunoblots angefertigt. Zunächst wurden die Proteine einer Probe über die SDS – PAGE aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrozellulose – Membran nach der semi – dry Methode (1 Stunde bei 10 Volt) übertragen. Der Blot wurde mit 5% Magermilch in PBS/ 0,1% TWEEN – 20 blockiert und mit dem ersten Antikörper (anti – ALOX15 AK, anti – his – tag AK) 1 Stunde inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBS/TWEEN kam als

zweiter Antikörper ein Peroxidase – Konjugat zum Einsatz, mit welchem der Blot erneut 1 Stunde inkubiert wurde. Im Anschluss daran, wurde der Blot erneut intensiv mit PBS/TWEEN gewaschen, mit dem Western – Lightning Chemilumineszenz Plus Reagenz behandelt und zwischen 1 s und 20 s auf einen Röntgenfilm der Fa. Kodak gelegt. Für die Quantifizierung wurde die Intensität der Banden auf dem Röntgenfilm unter Verwendung des Programms Phoretix 1D der Fa. Phoretix International, Newcastle, Großbritannien, densitometrisch ausgewertet. Eine Lösung mit bekannter LOX – Konzentration diente als Quantifizierungsstandard.

2.3.10 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) der LOX – Produkte

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität und Produktspezifität der Enzymmutanten wurde routinemäßig mittels HPLC durchgeführt. Dazu erfolgte die Umsetzung einer Substratfettsäure (100 µM Arachidonsäure) mit der präparierten LOX in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 in einem Volumen von 0,5 ml für 15 min bei Raumtemperatur. Die gebildeten Hydroperoxyverbindungen wurden anschließend mit Natriumborhydrid reduziert, der pH – Wert mit 50 µl konzentrierter Essigsäure auf 3 – 4 eingestellt und 500 µl Methanol zugegeben. Nach intensivem Schütteln und einer 10minütigen Zentrifugation bei 14 000 rpm wurden 400 µl des proteinfreien Überstandes in die Umkehrphasen – HPLC eingespritzt.

Die Umkehrphasen – HPLC wurde an einer HP – Chemstation mit einem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Nucleodur C – 18 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einer entsprechenden Vorsäule (30 x 4 mm). Das Laufmittel bestand aus Methanol/Wasser in den Verhältnissen 80/20 oder 85/15 und 0,1% Essigsäure. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Detektion der eluierten Verbindungen erfolgte im Extinktionsmaximum der zu untersuchenden Verbindung: 210 nm für Arachidonsäure; 235 nm für konjugierte Diene (z.B. 15–H(p)ETE); 242 nm doppelt – konjugierte Diene (z.B. 5,15-Di-HETE); 270 nm konjugierte Triene (z.B. 8,15-DiHETE)

Über den Vergleich der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren mit denen von authentischen Standardsubstanzen konnten die meisten LOX – Produkte bereits in der Umkehrphasen – HPLC strukturell identifiziert werden. Auf der Grundlage von Standardsubstanzen konnten Eichkurven erstellt werden und so die entsprechenden

Verbindungen über die Flächen der detektierten Peaks quantifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden einzelne Produkte präpariert und, nachdem das Laufmittel verdampft wurde, zur Chiralphasen – HPLC eingesetzt.

2.3.10.1 Chiralphasen – HPLC

Da die Reaktion der meisten LOX – Isoformen stereospezifisch unter Bildung von Produkten in der S – Konfiguration abläuft, kann aus der Enantiomerenzusammensetzung der nachgewiesenen Hydroxyfettsäuren auf deren LOX – Herkunft geschlossen werden. Hingegen sind die Produkte aus nicht – enzymatischen Reaktionen (z. B. Autoxidation) racemisch; es werden gleiche Mengen von R – und S – Enantiomeren gebildet. Zur Enantiomerenanalytik wurden die Hydroxyfettsäuren mittels Umkehrphasen – HPLC präpariert, in *n* – Hexan/0,1% Essigsäure aufgenommen und der Chiralphasen – HPLC (CP – HPLC) zugeführt. Hier erfolgte eine Trennung der Enantiomeren an chiralen Säulen (Chiralcel OD bzw. OB, 250x4,6 mm, Diacel Chem. Industries, USA) mit dem Laufmittel *n* – Hexan/2 – Propanol (2-5%) und 0,1% Essigsäure. Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte auch hier bei 235 nm mit dem SPD – M6A Diodenarraydetektor (Shimadzu). Aufgrund gleicher Absorptionseigenschaften der beiden Enantiomere konnte deren Mengeverhältnis direkt aus den Peakflächen abgeleitet werden.

2.3.11 Photometrische Aktivitätsbestimmung

Die spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen wurden am Spektrophotometer UV – 160 A der Firma Shimadzu durchgeführt. Dabei wurde die zeitabhängige Zunahme der Lichtabsorption beim Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes (235 nm für konjugierte Diene) bei einer Temperatur von 25°C verfolgt. Der Standardassay bestand aus Phosphatpuffer, pH von 7,4, dem Enzym und 100 µM Arachidonsäure in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet und der zeitliche Absorptionsverlauf gemessen. Für einige Messungen wurde auch Linolsäure als Substrat verwendet, wobei die Endkonzentration 50 µM betrug. Diese Ansätze enthielten auch 1 µM 13S – HpODE als Enzymaktivator, um die kinetische lag – Phase zu eliminieren.

2.3.12 Bestimmung kinetische Konstanten K_M und V_{Max}

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{Max} erfolgte über die Erstellung eines Lineweaver – Burk – Diagramms. Hierzu wurde mit der humanen Wildtyp – ALOX15 Aktivitätsassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen (zwischen 5 und 150 μ M Arachidonsäure) durchgeführt und die linearen Anfangsgeschwindigkeiten des Substratumsatzes quantifiziert. Für jede Substratkonzentration wurden mindestens drei Messungen durchgeführt und die Standardabweichungen bestimmt. Aus der doppelt reziproken Auftragung der gemittelten Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen (Lineweaver – Burk – Diagramm) wurden die kinetischen Konstanten ermittelt.

2.3.13 Swiss – Pbd Viewer 4.0.1

Mit diesem Programm wurden die Wasserstoffbrücken innerhalb des Strukturmodells der Wildtyp ALOX15 visualisiert. Dabei war es möglich, durch Veränderung von Bindungsparametern verschiedene Varianten der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sichtbar zu machen.

2.3.14 VMD

Als weiteres frei zugängliches Programm wurde VMD zur Visualisierung des Strukturmodells der rabALOX15 genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *alpha – 1 – Antitrypsin – Genotypisierung*

Da es bislang keine Untersuchungen zur Häufigkeitsverteilung der S – und Z – Allele des *alpha – 1 – Antitrypsingens* in der indonesischen Bevölkerung gibt, entsprechende Ergebnisse aber für unsere indonesischen Kooperationspartner von Airlangga Universität Surabaya von großem Interesse sind, habe ich im Rahmen einer Pilotstudie ein 151 Probanden umfassendes Probandenkollektiv, das entsprechend bestimmter Ausschlusskriterien (siehe Material und Methoden) unter Studenten und Angestellten der Airlangga Universität Surabaya (Ost – Java) ausgewählt wurde, hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens beider Allele untersucht. Bei der Auswahl der Probanden wurde darauf geachtet, dass diese nicht jünger als 20 und nicht älter als 40 Jahre waren und dass keine bekannten Lungenerkrankungen vorlagen. Ein Geschlechterverhältnis von 1:1 wurde angestrebt. Da es sich bei den Probanden um einen möglichst repräsentativen Querschnitt der mittelständischen Durchschnittbevölkerung von Surabaya (Ost – Java) handeln sollte, wurde nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden. Auf die Erhebung familienanamnestischer Daten wurde weitgehend verzichtet. Angehörige der chinesischen Minderheit wurden zur Pilotstudie nicht zugelassen.

Für die Analysen wurden zunächst die gewünschten DNA – Abschnitte des *alpha – 1 – Antitrypsingens* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Im Anschluss daran wurde das PCR – Fragment mit dem Restriktionsenzym Taq – *alpha1* gespalten, die entstandenen Spaltprodukte mittels Agarose – Gelelektrophorese aufgetrennt und durch unspezifische Nukleinsäurefärbung sichtbar gemacht.

Abbildung 6 zeigt die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente in der Agarose – Gelelektrophorese nach einer 90minütigen Laufzeit. Die Zahlen bezeichnen die Nummer der jeweils untersuchten DNA – Probe, die Buchstaben „un“ bedeuteten „ungespalten“ (undigested), also das originäre PCR – Produkt ohne anschließende Spaltung mit Taq – *alpha1*, „d“ (digested) bedeutet „gespalten“, also nach Spaltung mit Taq – *alpha1*. In Abbildung 6A wurden links des Molekulargewichtsmarkers (m) das ungespaltene PCR Fragment mit den S – Primern des Probanden 2 (2un) und die dazugehörige gespaltene Probe (2d) aufgetragen. Rechts des Molekulargewichtsmarkers wurde das ungespaltene PCR Fragment mit den Z –

Ergebnisse

Primern des Probanden 3 (3un) und die dazugehörige gesplattene Probe (3d) aufgetragen. Man sieht, dass die Banden vor und nach der Spaltung auf unterschiedlichen Höhen zu liegen kommen und daraus lässt sich folgern, dass sich die Molekulargewichte der PCR – Fragmente vor und nach Restriktionsspaltung unterscheiden. Die Spaltung war also komplett und die abgebildeten DNA – Proben der Probanden 2 und 3 wiesen also in beiden Genloci einen MM – Genotyp auf.

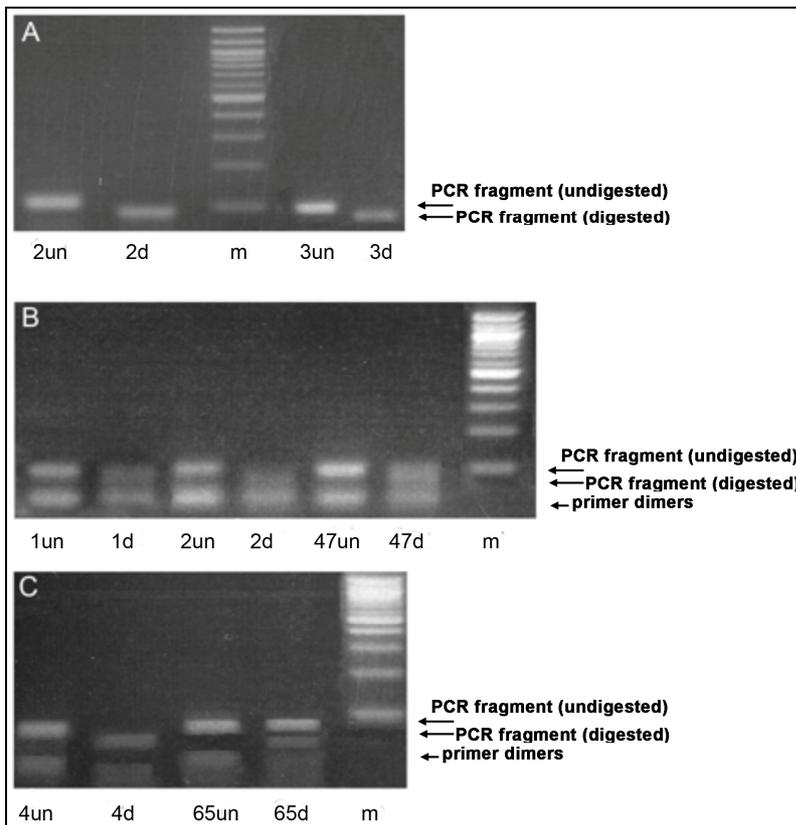


Abb. 6: Auftrennung der Taq – alpha1 gesplattenen PCR – Produkte nach Agarose – Gelelektrophorese A) Auftrennung des S – Allel (2) und Z – Allels (3) beide genotypisch MM B) zeigt in Probe 1 und 47 (d und un) genotypisch SS C) zeigt in Probe 65 (d und un) genotypisch MS

Zum besseren Verständnis sind in den Abbildungen 6B und C, welche die Auftrennung der Agarose – Gelelektrophorese nach 90minütiger Laufzeit darstellen, Mutationen im S – bzw. Z – Locus sichtbar. So zeigt Abbildung 6B beispielsweise die Analytik zweier Proben mit SS – Allelkombination. Auch hier bezeichnen die Zahlen wieder eine untersuchte DNA – Probe, die Buchstaben „un“ bedeuteten „ungespalten“ (undigested), also das originäre PCR – Produkt ohne anschließende Spaltung mit Taq – alpha1, „d“ (digested) bedeutet „gespalten“, also nach Spaltung mit Taq – alpha1. Mit „m“ wurde der Basenpaarmarker bezeichnet. Es zeigen sich in dieser Abbildung bei allen PCR – Produkt zwei dominante Banden. Für die Genotypisierung ist aber nur die obere Bande

Ergebnisse

bedeutsam. Die untere Bande ist Primeroligomeren zuzuordnen, die im Amplifikationsansatz entstehen und in der Agarose – Gelelektrophorese weiter wandern. Es handelt sich dabei also um methodische Artefakte. Wird nur die obere Bande bei den verschiedenen DNA Proben bewertet, sieht man, dass sich die Banden (un und d) der Probe 1 und die Banden (un und d) der DNA – Probe 47 in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit nicht unterscheiden. Dies zeigt an, dass keine Spaltung stattgefunden hat und lässt folgern, dass es sich bei der DNA, welche in der Abbildung mit der Zahl 1 und der Zahl 47 benannt ist, um Proben mit einer homozygoten SS – Allelkombination handelt. Probe 2 hingegen wurde gespalten, da hier die Banden (un und d) nicht auf einer Höhe zu liegen kommen und somit die PCR – Fragmente durch das Spaltenzym Taq alpha1 gespalten wurden. Probe 2 kann somit ein MM – Genotyp zugeordnet werden.

Abbildung 6C zeigt im Unterschied dazu eine MS – Allelkombination. Die Beschriftung der Abbildung folgt der, der vorangegangenen Abbildungen (Zahlen bezeichnen eine untersuchte DNA – Probe, die Buchstaben „un“ bedeuteten „ungespalten“ (undigested), d (digested) „gespalten“, m der Basenpaarmarker). Es wurden zwei DNA – Proben mit ihren dazugehörigen Spaltprodukten und ein Basenpaarmarker aufgetragen. Bei der Probe 4 zeigt sich wieder ein unterschiedliches Molekulargewicht der Banden vor und nach der Spaltung, da die Banden erneut in unterschiedlichen Höhen abgebildet werden. Diese Probe ist somit genotypisch als MM zu interpretieren. Das Spaltprodukt (d) der DNA – Probe 65 hingegen, zeigt eine Bande, welche sich auf derselben Höhe und somit mit demselben Molekulargewicht wie das originäre (un) Produkt darstellt. Dies ist als S – Allel zu werten. Eine zweite Bande, welche auf Grund des geringeren Molekulargewichts im Agarosegel weitergewandert ist, somit gespalten wurde, und etwas unterhalb der ersten Bande sichtbar wird, was als M – Allel zu werten ist. Genotypisch kann diese DNA – Probe 65 also als ein MS – Genotypus interpretiert werden. Auch in dieser Abbildung tauchen teilweise wieder Primerdimere am Unterrand auf, auch hier sind diese als methodische Artefakte zu werten.

Wie in der folgenden Abbildung 7 verdeutlicht, zeigte sich bei der Auswertung, dass die Mutationshäufigkeit in den untersuchten Proben relativ gering ausfiel, da von den 151 Proben drei homozygot für das SS – Allel waren, eine Probe heterozygot für das MS – Allel und drei Proben nicht auswertbar waren. Bei den Z – Allelmutationen waren von

Ergebnisse

den 151 untersuchten Proben sieben nicht auswertbar, eine zeigte eine ZZ – Homozygotie und keine Probe war heterozygot für MZ.

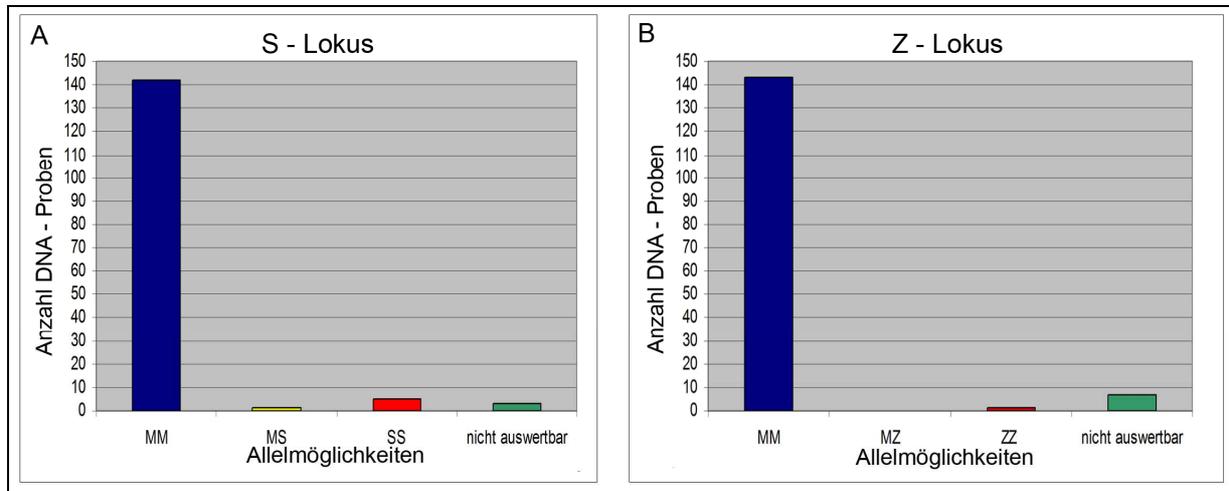


Abb. 7: Mutationshäufigkeit des alpha – 1 – Antitrypsingens A) bezüglich des Lokus des S – Allels B) bezüglich des Lokus des Z – Allels

Zur Quantifizierung der Allelhäufigkeiten wurde eine Tabelle, welche hier auf Grund der Länge nicht abgebildet wurde, angefertigt, anhand welcher die Aufgliederung der Allelhäufigkeiten auf einzelne Individuen erfolgte. Hieraus ergaben sich Häufigkeiten von 90,73% für MM im S – und im Z – Lokus sowie 3,31% für SS im S – Lokus und MM im Z – Lokus und jeweils 0,66% für MM im S – Lokus und ZZ im Z – Lokus.

Um die oben dargestellten Ergebnisse besser interpretieren und mit anderen Ländern vergleichen zu können, wird an dieser Stelle auf Tabelle 3 und 4 verwiesen. In diesen Tabellen wurde bereits im Einleitungsteil ein kurzer Überblick über die Verteilung der Mutationshäufigkeit des Alpha – 1 – Antitrypsingens in Europa und vor allen Dingen in Teilen des asiatischen Raumes gegeben. Interessanterweise liegt das offensichtliche Vorkommen der S – bzw. Z – Allele in den hier durchgeführten Untersuchungen unter der Häufigkeit, die in den meisten europäischen, aber auch in anderen asiatischen Ländern bestimmt wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es innerhalb des asiatischen Raums regionale Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der S – und Z – Alpha – 1 – Antitrypsinvarianten gibt.

3.2 Ergebnisse zur ALOX15

3.2.1 ALOX15 – Genotypisierung

Für die Untersuchungen zum Polymorphismus des ALOX15 Gens wurden dieselben 151 indonesische DNA – Proben verwendet, welche bereits bei der alpha – 1 – Antitrypsin – Genotypisierung untersucht wurden. Dieser Teil der Arbeiten war vor allem für die deutschen Kooperationspartner von Bedeutung. Die Allelfrequenz des T560M – SNP war nach amerikanischen Untersuchungen in der kaukasischen Bevölkerung sehr niedrig [124]. Sollte sich bei der Untersuchung der Häufigkeitsverteilung des T560M – Allels ergeben, dass dieses Allel in der Bevölkerung Ost – Javas deutlich häufiger vorkommen sollte, könnten Untersuchungen zu den funktionellen Konsequenzen dieser Genmutation effektiver durchgeführt werden. Die dazu nötigen Probandenkollektive könnten einen deutlich reduzierten Umfang aufweisen und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer homozygoten Allelkombination wäre höher.

Für die Analyse der ALOX15 Polymorphismus wurde eine andere, deutlich effektivere Analysemethode (real time – PCR) angewendet. In Abbildung 8 sind die typischen Zeitverläufe der Amplifikationskurven für verschiedene Allelkombinationen an Hand von Referenzkonstrukten dargestellt. Hierbei entsprechen die unterschiedlichen Farben, den unterschiedlichen Vergleichsproben (Wildtyp, heterozygote Mutante, homozygote Mutante). Mit der Farbe dunkelblau (steilsten Kurve) wurde zum Beispiel der Wildtyp abgebildet, während die lila Kurve der homozygoten Mutante entspricht. In Grün ist die heterozygote Allelkombination dargestellt. Die Kurven, welche zusätzlich mit kleinen Kreisen markiert sind, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Yakima Yellow aufgenommen.

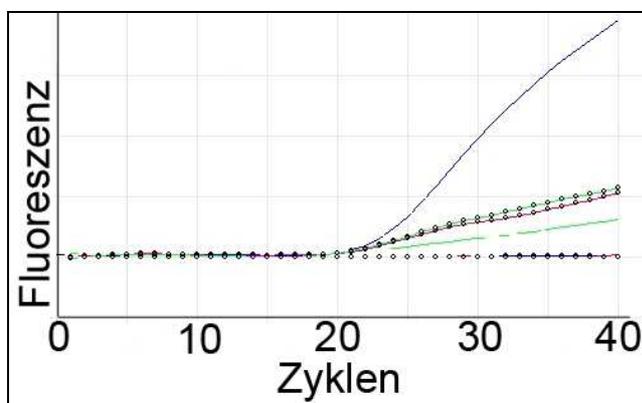


Abb. 8: Kurvenverläufe der 12/15 – LOX Proben bei der Realtime – PCR

Ergebnisse

Die quantitative Auswertung der Amplifikationskurven erfolgte letzten Endes mit der Darstellung in einem Scatterplot. Hiermit lassen sich relativ einfach und übersichtlich die verschiedenen Genotypen voneinander abgrenzen. Dieses Diagramm zeigt die relative Fluoreszenz in 2 ausgewählten Kanälen, wobei jeder Fluoreszenzfarbstoff bei einer anderen Wellenlänge detektiert wird. Ein Farbstoff ist dabei für den Wildtyp kennzeichnend, der andere für die T560M – Mutante. Die Anzeige ist darauf genormt, den x – fachen Anstieg des Signals in jedem Kanal zu bestimmen und in eine logarithmische Darstellung zu transformieren. Zur Genotypisierung definiert der Nutzer anhand der Amplifizierung von synthetisierten von Referenzkonstrukten Regionen (Rechtecke) im Scatterplot, die den entsprechenden Genotypen entsprechen. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

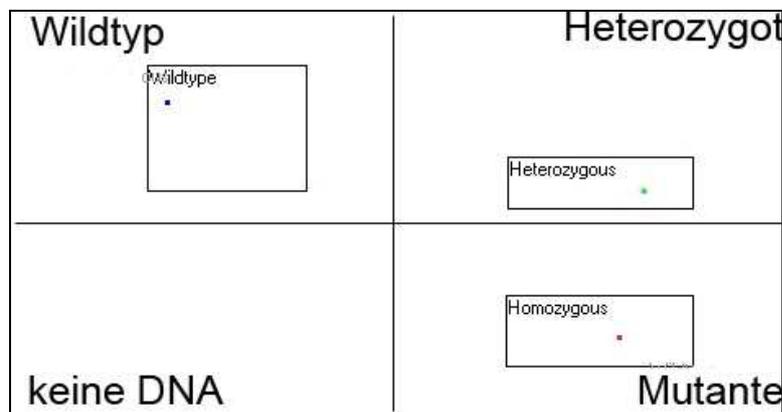


Abb. 9: Darstellung und Auswertung der Proben mit bekannten Vergleichsproben nach Realtime – PCR mit dem Scatterplot.

Die folgende Abbildung wurde nach der Auswertung aller PCR – Kurven angefertigt und zeigt, wie viele der untersuchten Proben die Mutation aufwiesen. Anhand Abbildung 10 wird deutlich, dass es sich bei 150 der 151 von mir untersuchten DNA – Proben um das Wildtypallel handelt. Lediglich eine Probe weist eine heterozygote Mutation auf. Homozygote Mutationen kommen in den hier untersuchten Proben nicht vor. Diese Resultate zeigen, dass es sich beim T560M – Austausch, in dem hier untersuchten Probandenkollektiv, um eine sehr seltene Mutation handelt. Die Mutationshäufigkeit in diesem Kollektiv liegt unter einem Prozent. Diese Daten bestätigen vorhergehende Untersuchungen zur Häufigkeitsverteilung des T560M – SNPs in der amerikanischen Bevölkerung. Damit eignet sich die Bevölkerung von Ost – Java nicht für detaillierte

Ergebnisse

Untersuchungen zu möglichen funktionellen Veränderungen, die auf den T560M – Austausch zurückzuführen sind.

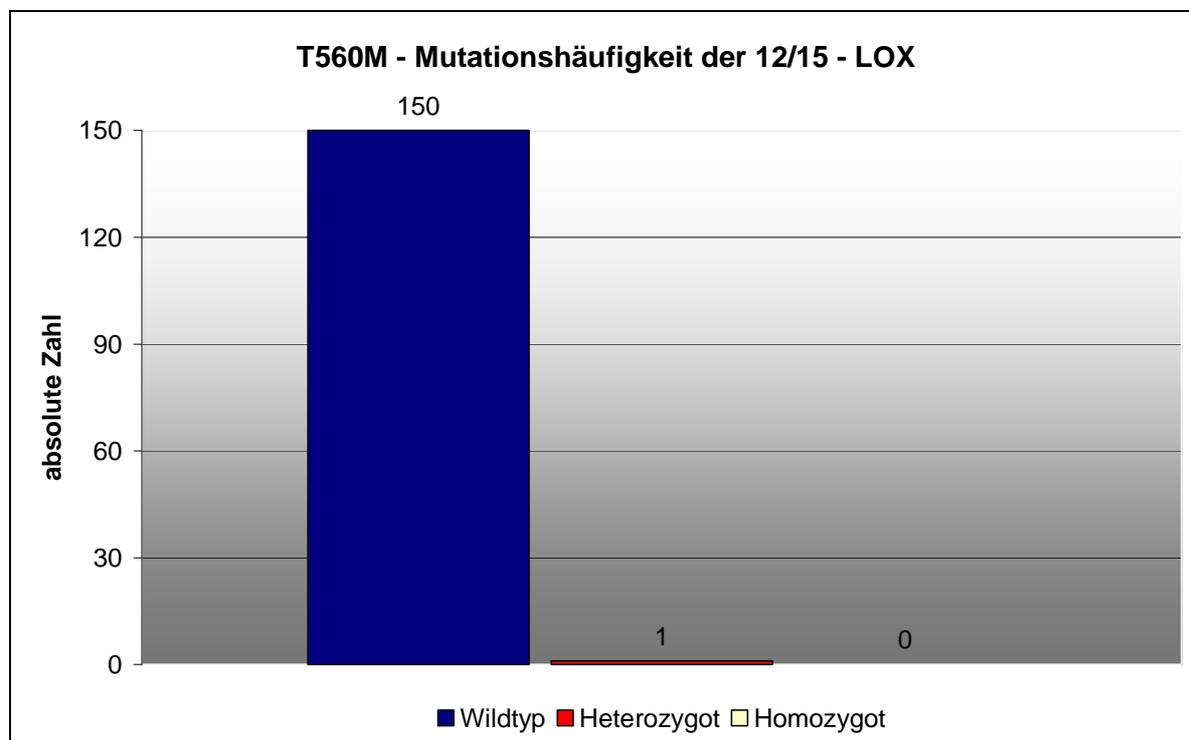


Abb. 10: Mutationshäufigkeit der ALOX15 bezüglich der T560M – Mutante

3.2.2 Expression der ALOX15 und deren T560M – Mutante in *E. coli* und Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Es wurde berichtet, dass die T560M – Mutante eine deutlich geringere katalytische Aktivität als der Wildtyp des Enzyms aufweist, wobei die molekularen Ursachen für die katalytische Inaktivität bislang noch nicht geklärt werden konnten [125]. Um diese Wissenslücke zu füllen, wurden zunächst beide Enzymvarianten vergleichend als rekombinante Proteine in *E. coli* und parallel dazu in einem eukaryotischen Expressionssystem (HEK 293 – Zellen) exprimiert.

3.2.2.1 Expression in *E. coli*

Für die Expression der Wildtyp – ALOX15 wurde die cDNA des Enzyms in das prokaryotische Expressionsplasmid pQe 9 inkliniert, und mit his – tag exprimiert, so dass das Enzym als N-terminales his – tag Fusionsprotein exprimiert werden konnte [126, 127]. Danach wurden die Expressionsbedingungen optimiert, da im ursprünglich

Ergebnisse

verwendeten Expressionssystem nur eine geringe Expression der T560M – Mutante erzielt wurde. Als am besten erwies sich die Expression in *E. coli* bei einer Inkubationszeit mit IPTG von 4 h und eine Temperatur von 25°C.

Um das Expressionsniveau der Enzymvarianten in *E. coli* zu vergleichen, wurde zunächst ein Western – Blot durchgeführt (Abb. 11A). Dazu wurden 50 ml Kulturen von *E. coli* Zellen gezüchtet, die zum einen das Expressionsplasmid des Wildtyp – Enzyms, zum anderen das Expressionsplasmid der T560M – Mutante enthielten. Nach der Kultivierungsperiode wurden die Bakterien abzentrifugiert, gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen. Nach der Zytolyse mit Ultraschall wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und eine Affinitätschromatographie an einer Ni – TED Matrix durchgeführt. Aliquots (20 µl) der Elutionsfraktion wurden zur Western – Blot Analyse eingesetzt. Die erste Bande (Abb. 11A) zeigt den LOX – Standard, die zweite und dritte Bande die Elutionsfraktion nach Ni – TED des Wildtyps der ALOX15 bzw. der T560M – Mutante. Der Vergleich der Bandenintensitäten deutet darauf hin, dass das Wildtypenzym und die T560M – Mutante in vergleichbarem Ausmaß in *E. coli* exprimiert wurden.

Für die Bestimmung der relativen spezifischen Enzymaktivitäten von Wildtyp ALOX15 und ihrer T560M – Mutante war es jetzt noch nötig, die Produktbildung beider Enzyme in einer bestimmten Zeiteinheit zu quantifizieren. Um dies zu erreichen, wurde ein Aliquot der gereinigten Enzympräparation mit Arachidonsäure für 15 min inkubiert und die dabei entstandenen Reaktionsprodukte mittel HPLC quantifiziert. Die entsprechenden HPLC – Chromatogramme sind in Abbildung 11B dargestellt. In diesem Versuch wurden gleiche Enzymmengen des Wildtyp – Enzyms und der Enzymmutante eingesetzt. Aus den Chromatogrammen ist ersichtlich, dass die gleiche Menge des Wildtypenzym in der gleichen Zeit mehr als 10 mal so viel Reaktionsprodukte bildet wie die T560M – Mutante. Dies beweist, dass die spezifische katalytische Aktivität der T560M – Mutante deutlich unter der des Wildtypenzym liegt. Damit wurden die früher erhaltenen Ergebnisse zum Vergleich der katalytischen Aktivitäten der beiden ALOX15 – Varianten bestätigt [125].

Als zweites Ergebnis ergibt sich aus den Chromatogrammen, dass 15 – HETE das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung durch das Wildtypenzym und die T560M – Mutante ist. Andere HETE – Isomere (12 – HETE, 5 – HETE) werden nur in geringen Mengen gebildet. Dieses Produktmuster zeigt, dass das rekombinante Enzym die gleiche Reaktionsspezifität wie die natürlich vorkommenden LOX aufweist und dass

der T560M – Austausch die Reaktionsspezifität des Enzyms nicht verändert, obwohl deren spezifische Aktivität wesentlich geringer ist.

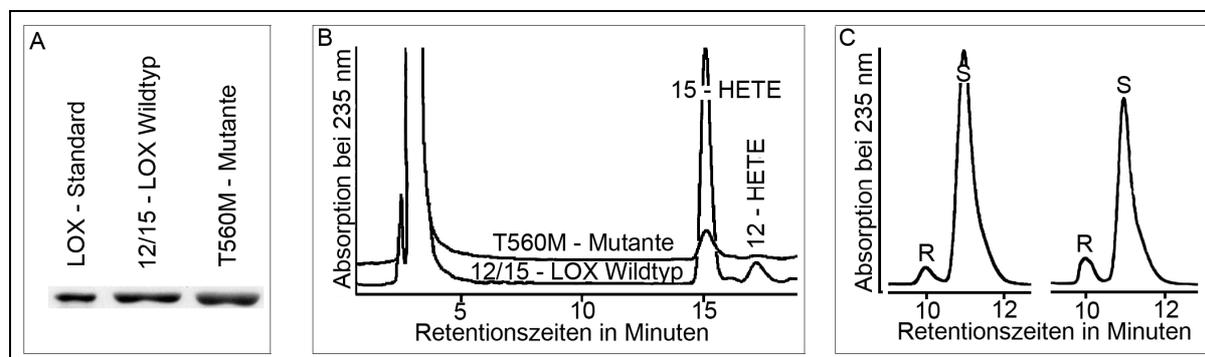


Abb. 11: A) Western – Blot zur Expressionsüberprüfung in *E. coli* bei 25°C B) HPLC – Chromatogramm der 12/15 – LOX und der T560M – Mutante C) CP – HPLC der 12/15 – LOX für 15 – HETE aus *E. coli*

3.2.3 Enantioselektivität der ALOX15 – Varianten

Die native ALOX15 wandelt Arachidonsäure vor allem in 15S – HETE um und frühere Untersuchungen haben dies auch für das rekombinante Enzym gezeigt, welches in anderen Expressionssystemen hergestellt wurde [120, 128]. Um sicherzustellen, dass die hier exprimierten Enzymvarianten die gleiche Enantiomerelektivität aufweisen, wurde das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung (15 – HETE) mittels RP – HPLC präpariert und mittels Chiralphasen – HPLC weiter analysiert. Abbildung 11C zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der CP – HPLC Chromatogramme. Dabei wird deutlich, dass das 15 – HETE, welches durch das Wildtypenzym hergestellt wurde (linke Seite der Abb. 11C) zu mehr als 90% als S – Enantiomer vorliegt. Für die T560M – Mutante (rechte Seite der Abb. 11C) war 15S – HETE ebenfalls das Hauptprodukt, wobei der Anteil an 15R – HETE geringfügig höher lag (15%). Zusammenfassend lassen die Daten zur Reaktionsspezifität der in *E. coli* exprimierten ALOX15 die Schlussfolgerung zu, dass das rekombinante Wildtyp Enzym die gleichen Spezifitätseigenschaften aufweist wie die native ALOX15 und dass der T560M – Austausch zwar die spezifische katalytische Aktivität um mehr als eine Größenordnung verringert, die Reaktionsspezifität jedoch kaum beeinflusst.

3.2.4 Expression der ALOX15 in HEK 293 – Zellen

Um sicher zu stellen, dass die in *E. coli* gemachten Beobachtungen nicht auf methodologische Artefakte des prokaryotischen Expressionssystems (z.B. partielle

Fehlfaltung des mutierten Proteins in *E. coli*) zurückzuführen sind, wurde die Expression der beiden Enzymvarianten in einem eukaryotischen System wiederholt. Dazu wurde ein pcDNA basiertes Expressionsplasmid hergestellt, dessen prinzipielle Struktur in Abbildung 12 dargestellt ist. Um dieses Plasmid zu erhalten, wurde die kodierende Region der humanen ALOX15 cDNA in die multicloning site des Expressionsplasmids so einkloniert, dass der Leserahmen erhalten blieb. Um dies zu erreichen, musste der N – Terminus der ALOX15 verlängert werden. Das entsprechende Expressionsplasmid wurde freundlicher Weise von Frau Dr. A. Borchert zur Verfügung gestellt.

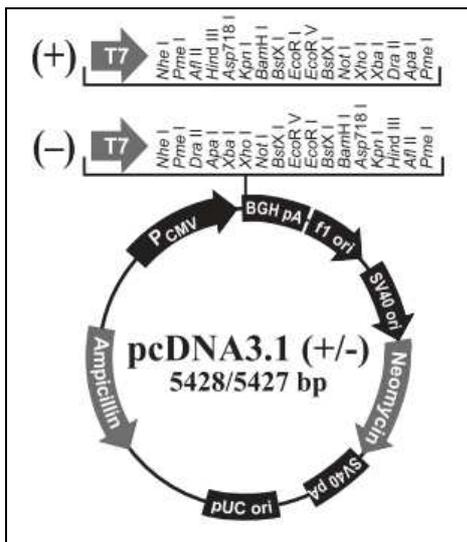


Abb. 12: prinzipielle Struktur des pcDNA 3.1 verwendeten Expressionsplasmids

Wie im *E.coli* – System wurde auch hier zunächst das Expressionsniveau der rekombinanten ALOX15 und der T560M – Mutante im Western – Blot quantifiziert. Damit lässt sich unter Verwendung einer Standardpräparation gereinigter LOX der Gehalt an ALOX15 in den zum Aktivitätsassays eingesetzten Proben ermitteln. Abbildung 13A zeigt einen Western – Blot, der mit einem anti – ALOX15 – Antikörper entwickelt wurde. Mit den Zahlen 1 und 2 wurden Standard – LOX – Proben mit einer vorher exakt quantifizierten LOX Menge von 0,25 µg (1) und 0,5 µg (2) aufgetragen. Mit 3 und 4 sind Zelllysate gekennzeichnet, bei denen HEK Zellen mit 1 µg (3) und 2 µg (4) des mutierten Expressionsplasmids transfiziert wurde. Für das Wildtyp – Enzym erfolgten ähnliche Analysen, die hier aus Platzgründen nicht dargestellt wurden. Nach densitometrischer Auswertung, welche in Bezug zu den Standard – LOX – Proben erfolgen konnte, ergab sich für die Transfektion mit 1 µg DNA eine LOX – Konzentration für die T560M – Mutante von 0,13 µg/ml und für die Transfektion mit 2 µg DNA 0,17

Ergebnisse

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Wie im prokaryotischen Expressionssystem ergaben sich ähnliche Expressionshöhen für das Wildtypenzym (Daten nicht gezeigt).

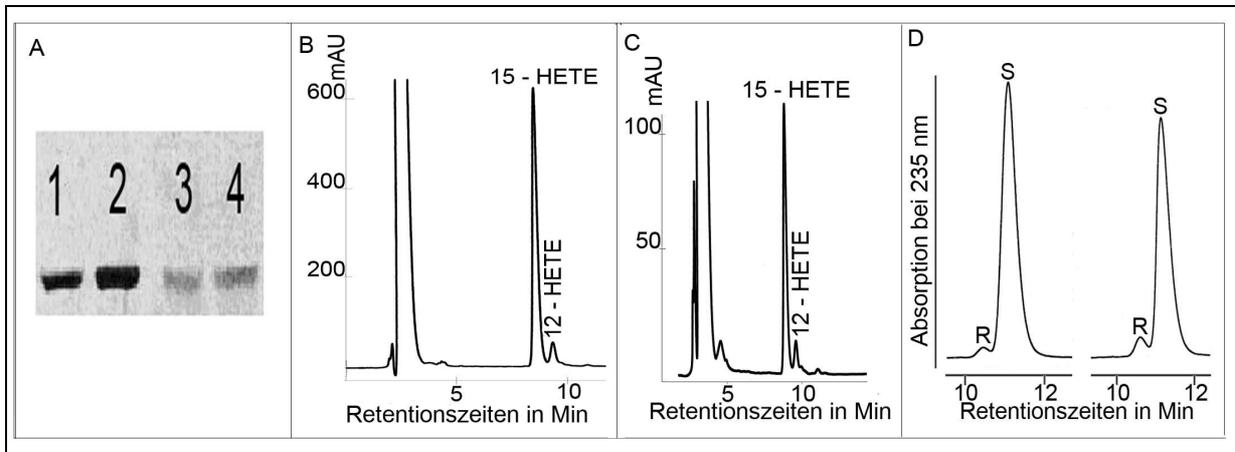


Abb. 13: A) Western – Blot zur Quantifizierung der Expression der T560-Mutante in HEK 293 – Zellen (20 s Exposition), 1. Antikörper Anti – Kaninchen – 15 – LOX (Huhn) 1:20000, 2. Antikörper anti – Huhn – IgG 1: 40000 B) HPLC von 20 μl Wildtyp – Lysat aus HEK 293 – Zellen + 100 μM AA C) HPLC von 100 μl T560M - Lysat aus HEK 293 Zellen + 100 μM AA D) CP – HPLC der ALOX15 für 15 – HETE (links) und der T560M (rechts)

3.2.5 Die Aktivitätsbestimmungen der HEK 293 – Transfektanten mittels HPLC und Überprüfung der Positionsspezifität

Die Aktivitätsbestimmungen der transfizierten HEK 293 – Zellen erfolgten ebenfalls mit Hilfe der HPLC. Hierzu wurden, wie für den prokaryotischen Aktivitätstest beschrieben, Aliquots des Zelllysats von transfizierten HEK 293 – Zellen mit Arachidonsäure inkubiert und nach entsprechender Aufarbeitung in die HPLC injiziert. Repräsentative Chromatogramme sind in den Abbildungen 13B und C dargestellt. In einem Kontrollversuch erfolgte ein Ansatz ohne Enzymzusatz, in dem nur geringe Mengen von 15 – HETE nachweisbar waren (keine Abb.).

Abbildung 13B zeigt die Produktbildung durch HEK 293 – Zellen, die mit dem Wildtyp – Expressionsplasmid transfiziert wurden, wobei 20 μl des Zelllysats zur Inkubation eingesetzt wurde. Das Hauptprodukt der ALOX15 katalysierten Umwandlung der Arachidonsäure wurde nach 8,5 min von der Säule eluiert. Ein Vergleich dieser Retentionszeit mit der eines authentischen Standards von 15 – HETE (8,5 min) belegt die chemische Struktur des Hauptproduktes als 15 – HETE. 12 – HETE wurde nur in geringen Mengen als Nebenprodukt nachgewiesen. Die exakte Quantifizierung der

entsprechenden Flächeneinheiten unter den Peaks ergab ein 15 – HETE/12 – HETE Verhältnis von 88/12. Ein ähnliches 15 – HETE/12 – HETE Verhältnis wurde für die native humane ALOX15 beschrieben [120].

In Abbildung 13C ist das HPLC – Chromatogramm für die T560M – Mutante dargestellt. Hierfür wurden 100 µl Lysat der mit der T560M – Mutante transfizierten HEK – Zellen eingesetzt. Bei diesen Experimenten wurde ein 15 – HETE/12 – HETE Verhältnis von 84/16 bestimmt. Wie im prokaryotischen Expressionssystem ist damit die Positionsspezifität der T560M – Mutante vergleichbar mit der des Wildtyps. Für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität muss allerdings berücksichtigt werden, dass für die Messungen deutlich mehr Lysat des mutierten Enzyms eingesetzt werden musste (100 µl gegenüber 20 µl HEK – Lysat des Wildtyps), um eine gut messbare Produktbildung zu erhalten. Trotzdem wurden durch das Wildtypenzym ca. 5-mal mehr Produkte (600 mAU für Wildtyp vs. 12 mAU für T560M) gebildet. Geht man davon aus, dass Wildtypenzym und T560M – Mutante in vergleichbaren Mengen in den Zelllysaten vorlagen (was durch die Immunoblots bestätigt wurde), kann errechnet werden, dass die T560M – Mutante verglichen mit dem Wildtypenzym nur ca. 4% der katalytischen Aktivität aufweist.

3.2.6 Enantioselektivität der ALOX15 Varianten, die in HEK 293 – Zellen exprimiert wurden

Auch für die in HEK 293 – Zellen exprimierten ALOX15 Spezies wurde die Enantioselektivität der Produktbildung mittel CP – HPLC getestet. In Abbildung 13D wird jeweils für 15 – HETE dargestellt, wie viel Prozent des 15 – HETE tatsächlich in der S – Konfiguration vorliegen und damit LOX – spezifisch gebildet wurden. Es zeigte sich in beiden Chromatogrammen, dass der S – Peak deutlich höher war als der R – Peak. Diese Daten belegen, dass die Arachidonsäureoxygenierung des Wildtypenzymes und der T560M – Mutante unabhängig von der Art des Expressionssystems mit hoher Enantioselektivität verläuft.

3.2.7 Reaktionskinetik

In Abbildung 14 wurde jeweils für den Wildtyp der ALOX15 und die T560M – Mutante die Kinetik der Produktbildung quantifiziert. Dafür wurde die zeitliche Zunahme der Lichtabsorption bei 235 nm verfolgt, die auf die Bildung der konjugierten

Ergebnisse

Doppelbindungssysteme zurückzuführen ist, die bei der Lipoxygenierung von Polyenfettsäuren entstehen. Durch Zugabe von 1 μM HPODE wurde versucht, die kinetische lag – Phase zu unterdrücken. Die Reaktion der Wildtyp – ALOX15 beginnt sofort nach Zugabe des Enzyms und verläuft über mehr als 80 s mit ähnlicher Geschwindigkeit (nahezu linearer Anstieg der kinetischen Progresskurve). Im Gegensatz dazu zeigte die Kurve der T560M – Mutante einen wesentlich flacheren Verlauf. Zwar sind die Reaktionsgeschwindigkeiten zu Beginn der Reaktion (0-5 s) noch vergleichbar. Danach flacht die kinetische Progresskurve der Mutante jedoch zunehmend ab und nach ca. 20 s ist keine weitere Produktbildung mehr zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass die geringere spezifische Aktivität der T560M – Mutante vor allem darauf zurückzuführen ist, dass das Enzym während der Reaktion schnell inaktiviert wird. Selbstinaktivierung während der Substratoxygenierung ist eine prinzipielle Eigenschaft verschiedener Lipoxygenasen und scheint für die T560M – Mutante der ALOX15 besonders ausgeprägt zu sein.

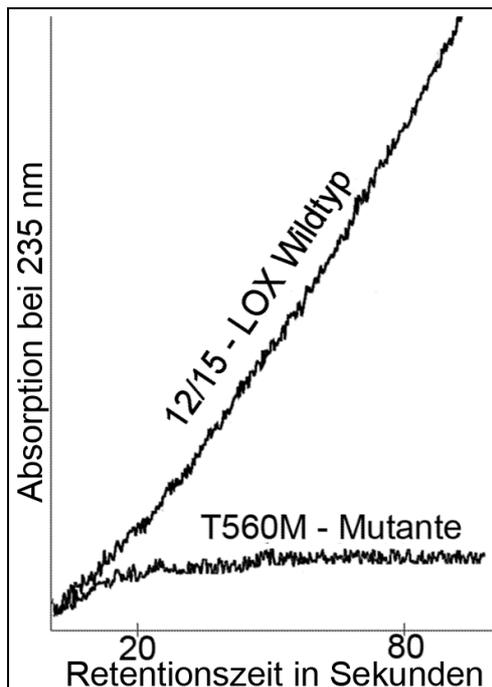


Abb. 14: photometrische Bestimmung der Absorption über die Zeit von ALOX15 und T560M bei Zugabe von jeweils 50 μM Linolsäure und 1 μM HPODE

3.2.8 Bestimmung von V_{\max} und K_m – Wert des Wildtypenzym mit Hilfe eines Lineweaver – Burk – Diagramms

Die orientierenden kinetischen Messungen (Abb. 14), die eine ausgeprägte Selbstinaktivierung der T560M – Mutante während der Fettsäureoxygenierung belegen, deuten darauf hin, dass diese Enzymmutante nicht der Michaelis – Menten – Kinetik folgt. Zur Bestimmung der relevanten reaktionskinetischen Parameter muss eine Reaktion über einen messbaren Bereich linear ablaufen, was für die T560M – Mutante nicht gewährleistet ist. Die Ermittlung von K_m und V_{\max} ist aus diesen Gründen für die T560M – Mutante mit dem konventionellen kinetischen Messsystem nicht möglich. Dafür müssten schnelle stopp – flow Messsysteme eingesetzt werden, mit denen Aktivitäten im ms-Bereich gemessen werden können. Da mir entsprechende Apparaturen nicht zur Verfügung standen, wurden im Folgenden die reaktionskinetischen Parameter (K_m und V_{\max}) nur für das Wildtypenzym bestimmt.

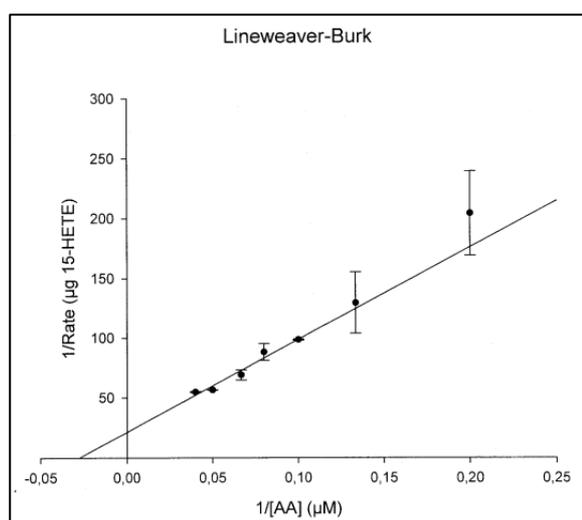


Abb. 15: Lineweaver – Burk – Diagramm des ALOX15 – Wildtyp als Auswertung nach Photometer mit 20 µl Lysat aus der HEK – Zellen – Expression und 26°C .

Um dies zu erreichen, wurde Aliquots des Zelllysats mit verschiedenen Arachidonsäurekonzentrationen inkubiert und die Reaktionsgeschwindigkeit photometrisch gemessen. Für die Auswertung der Messungen wurden die linearen Anteile der kinetischen Progresskurven quantifiziert. Nach der photometrischen Auswertung erfolgte die Anfertigung eines Lineweaver – Burk – Diagramms. Die Auswertung der Regressionsgeraden ergab ein V_{\max} von $0,047 \pm 0,011$ µg HETE/mg Protein und einen K_m – Wert für Arachidonsäure von $36,3 \pm 11,1$ µM. Beide Werte

liegen im Bereich der kinetischen Konstanten, die für die Kaninchen – ALOX15 in früheren Untersuchungen mit Linolsäure als LOX – Substrat bestimmt wurden.

3.2.9 Untersuchung zur molekularen Ursache der geringen katalytischen Aktivität der T560M – Mutante

Aus der Untersuchung der Kaninchen – ALOX15 – Struktur, welche eine Ähnlichkeit von 81% mit der humanen ALOX15 aufweist, folgte, dass die Aminosäure T560 nicht direkt im aktiven Zentrum des Enzyms liegt [124]. Der kleinste Abstand zu einer Aminosäure, die direkt zur Substratbindungstasche beiträgt, beträgt 4,12 Å (Abb. 16A). Da die T560M – Mutation, wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, aber nur eine deutlich reduzierte katalytische Aktivität aufweist, stellte sich die Frage nach den zugrunde liegenden Ursachen. Im Proteinverband ist Threonin, eine ungeladene Aminosäure, die in ihrer Seitenkette eine freie aliphatische OH – Gruppe trägt. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Threonin 560 zu Serin (T560S), einer Aminosäure, die ebenfalls eine freie OH – Gruppe aufweist, nur mit einem geringen Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht [124]. Möglicherweise spielt also die freie OH – Gruppe der Seitenkette eine wichtige Rolle für die Enzymaktivität. Strukturuntersuchungen an der Kaninchen – ALOX15 haben ergeben, dass die freie OH – Gruppe von T560 eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Glutamin 294 (Q294) bildet (Abb. 16B). Diese Wasserstoffbrücke ist sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Konfiguration der Kaninchen – ALOX15 erhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem mehr peripheren Bereich des Proteins keine größeren Strukturveränderungen ablaufen, wenn ein Ligand am aktiven Zentrum des Enzyms bindet. Im Gegensatz dazu, wird die Struktur des aktiven Zentrums durch Ligandenbindung deutlich verändert. So kommt es z. B. zu einer starken Translokation der Helix 2 und damit zu einer Öffnung der Substratbindungstasche (Abb. 16C) [129]. Bezieht man die nähere Umgebung von T560 und Q294 mit in die Strukturuntersuchung ein, zeigte sich, dass beide Aminosäuren Teile eines komplexeren Wasserstoffbrücken – Netzwerks sind, welches T560 mit M418 verbindet (Abb. 16D), das in früheren Untersuchungen als Bestandteil des aktiven Zentrums identifiziert wurde [130, 131]. Die durch einen T560M – Austausch induzierte Unterbrechung dieses Wasserstoffbrücken – Netzwerks könnte als eine Ursache für den Abfall der katalytischen Aktivität interpretiert werden.

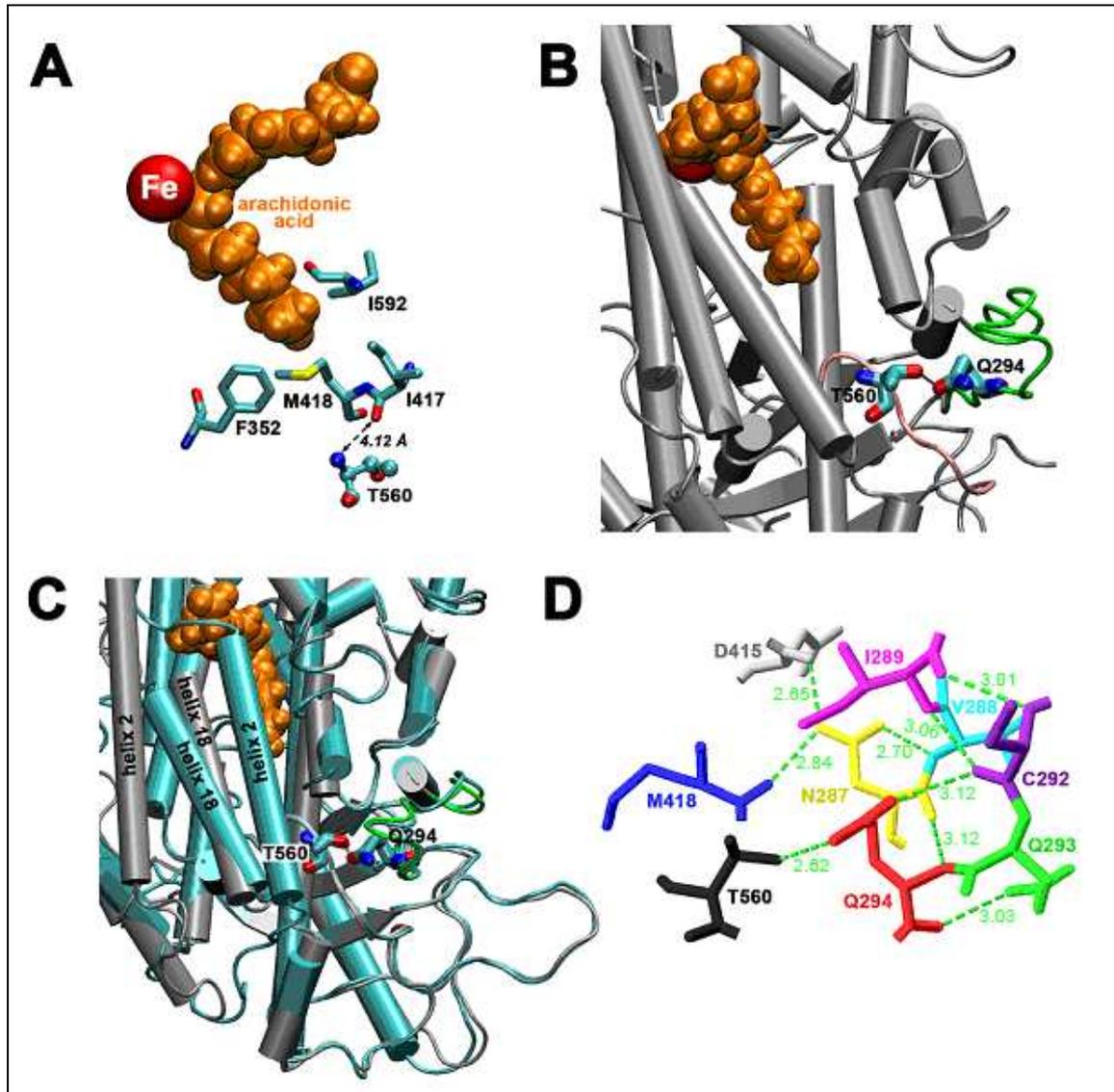


Abb. 16: Lokalisation von T560 in der 3D – Struktur der Kaninchen – ALOX15 und dessen Rolle für ein internes in dem Wasserstoffbrückennetzwerk. A) T560 hat keine direkte Verbindung zum aktiven Zentrum. Der kürzeste Abstand (4,12 Å) ist zwischen einer Carbonylgruppe von I417 (Aminosäure des katalytischen Zentrums) und T560 und liegt damit außerhalb der Bindungsdistanz für nicht – kovalente Wechselwirkungen. B) Der Wasserstoff der OH – Gruppe der T560 – Seitenkette bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff der Seitenkette von Glutamin 294 (Q294). C) Die Schleifenregionen, welche die Aminosäuren T560 und Q294 umgeben, unterliegen keinen größeren Strukturvariationen, wenn ein Ligand am aktiven Zentrum der ALOX15 gebunden wird. Der Bindungsabstand zwischen T560 und Q294 beträgt in der offenen Form (kein Ligand gebunden) 2,62 Å und in der geschlossenen Form (Ligand gebunden) 2,72 Å. D) Q294 ist ein Schlüsselligand im Wasserstoffbrückennetzwerk, welches die T560 – Seitenkette mit M418, einer Aminosäure des aktiven Zentrums, verbindet [129].

3.2.10 Mutation einzelner Aminosäuren des Wasserstoffbrückennetzwerks

Um diese Hypothese der Zerstörung des Wasserstoffbrückennetzwerkes durch einen T560M – Austausch zu bestätigen, wurden zusätzliche Mutationsexperimente an anderen Aminosäuren, durchgeführt, die zu diesem Wasserstoffbrückennetzwerk beitragen. So wurde zunächst die Q294L – Mutante erzeugt. Da die Einführung eines Leucinrestes bei Q294 die Wasserstoffbrücke zwischen Q294 und T560 zerstören sollte, konnte mit einer drastischen Abnahme der katalytischen Aktivität der Q294L – Mutante gerechnet werden. Eine ähnliche Vorhersage wurde für den N287L Austausch gemacht. Da Glutamin (Q) und Asparagin (N) eine ähnliche Struktur besitzen (beide Aminosäuren tragen in ihrer Seitenkette eine Säureamidgruppierung) sollte ein N287Q Austausch zu einer katalytisch aktiven Enzymspezies führen. Da jedoch die aliphatische Seitenkette des N um eine CH_2 – Gruppe kürzer ist als die von Q, könnte die Wasserstoffbrücke weniger stark ausgeprägt sein, so dass das gesamte Netzwerk trotz der Konservierung der Säureamidgruppierung gestört sein könnte. Ein N287D (Asparagin zu Aspartat) sollte hingegen zu einer nahezu inaktiven Enzymspezies führen, da die Säureamidgruppierung des Asparagins durch eine Carboxylgruppe ersetzt ist, so dass die Seitenkette keine zwei Wasserstoffbrücken ausbilden kann.

Um diese Vorhersagen zu überprüfen, wurden die folgenden Enzymmutanten exprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert: Q294L, N287Q, N287D und N287L.

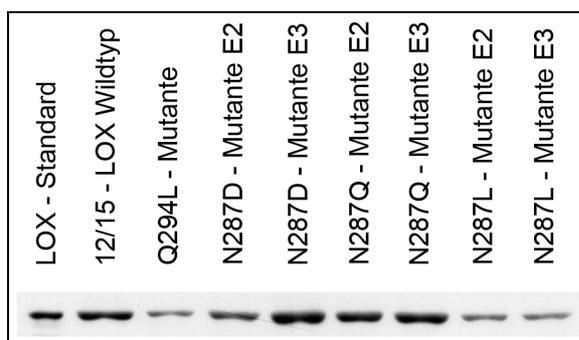


Abb. 17: Western – Blot zur Überprüfung des Expressionsniveaus der ALOX15 Mutanten in *E. coli* bei 25°C.

Abbildung 17 zeigt einen Western – Blot, welcher zur Quantifizierung des Expressionsniveaus der rekombinaten Proteine angefertigt wurde. In dieser Abbildung

bezeichnet die erste Bande den LOX – Standard, die zweite den Wildtyp der ALOX15 und die dritte die Expression der Q294L – Mutante. Die Banden 4 – 9 zeigen die Expression der Mutationen von N287 zu D, Q und L. Mit E2 und E3 sind jeweils die Elutionsfraktionen der Ni – TED Affinitätschromatographie bezeichnet. Es zeigt sich sowohl beim Wildtyp als auch bei allen Mutanten eine gute Expression der rekombinanten Proteine. Für die Bestimmung der relativen spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Enzymmutanten wurde dieser Blot densitometrisch quantifiziert, um vergleichbare Enzymmengen für die Aktivitätstests einsetzen zu können.

3.2.11 Charakterisierung der Q294L – und N287 – Mutanten

Zuerst wurde die katalytische Aktivität der Q294L – Mutante mittels HPLC bestimmt. Aus Abbildung 18 geht hervor, dass im Gegensatz zum Wildtypenzyme durch diese Mutante keine Reaktionsprodukte gebildet wurden. Dieses Ergebnis belegt die oben geäußerte Vermutung, dass ein Q294L Austausch zu einer inaktiven Enzymspezies führen sollte, da das Wasserstoffbrückennetzwerk (Abb. 12D) gestört ist.

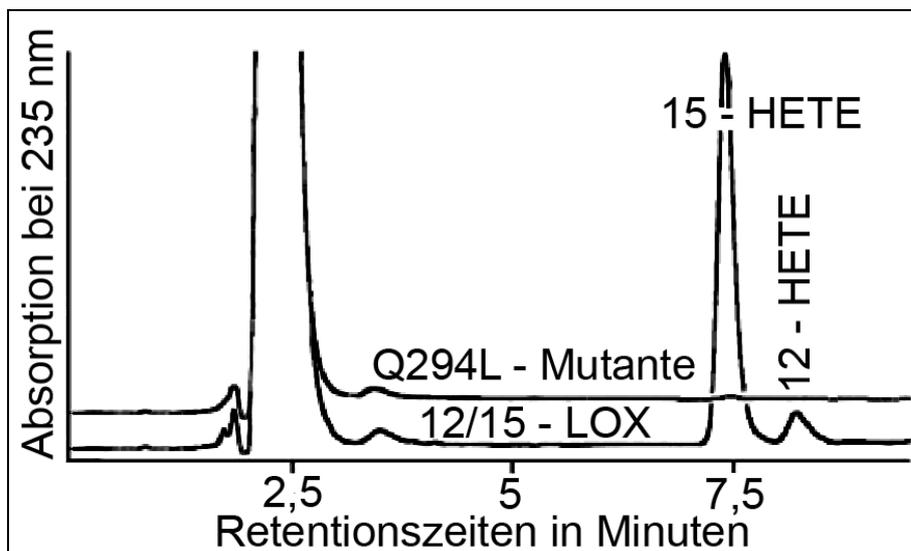


Abb. 18: HPLC - Chromatogramm der ALOX15 und der Q294L – Mutante mit Einsatz gleiche Enzymmengen

Anschließend wurden die drei N287 Mutanten präpariert und deren katalytische Aktivität quantifiziert. Aus Tabelle 7 geht hervor, dass der N287Q – Austausch zu einer drastischen Verringerung der katalytischen Aktivität des Enzyms führt, was auf die Störung des Wasserstoffbrückennetzwerkes durch die zusätzliche CH₂ – Gruppe in der Seitenkette des Q zurückgeführt werden könnte. Der N287D – Austausch führt zu einer

Ergebnisse

noch weitergehenden Verringerung der katalytischen Aktivität und die N287L – Mutation zu einer fast vollständig inaktiven Enzymvariante. Damit konnten die oben gemachten Vorhersagen im Wesentlichen bestätigt werden.

Mutante	Relative katalytische Aktivität (%)	
	Mittelwert	Standardabweichung
Wildtyp	100,0	5,8
N287Q	3,9	0,1
N287D	1,1	0,3
N287L	0,5	0.07

Tab. 7: katalytische Aktivität der humanen ALOX15 N287 – Mutanten, wobei der Wildtyp 100% gesetzt wurde. Pro Mutante wurden 3 Messungen durchgeführt, woraus der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet wurden.

Die den in Tabelle 7 aufgeführten Daten zugrunde liegenden HPLC Chromatogramme sind in Abbildung 19 gezeigt. Auf die nochmalige Darstellung des Wildtypenzym wurde dabei verzichtet, da ein entsprechendes Chromatogramm bereits in Abb. 13B gezeigt wurde.

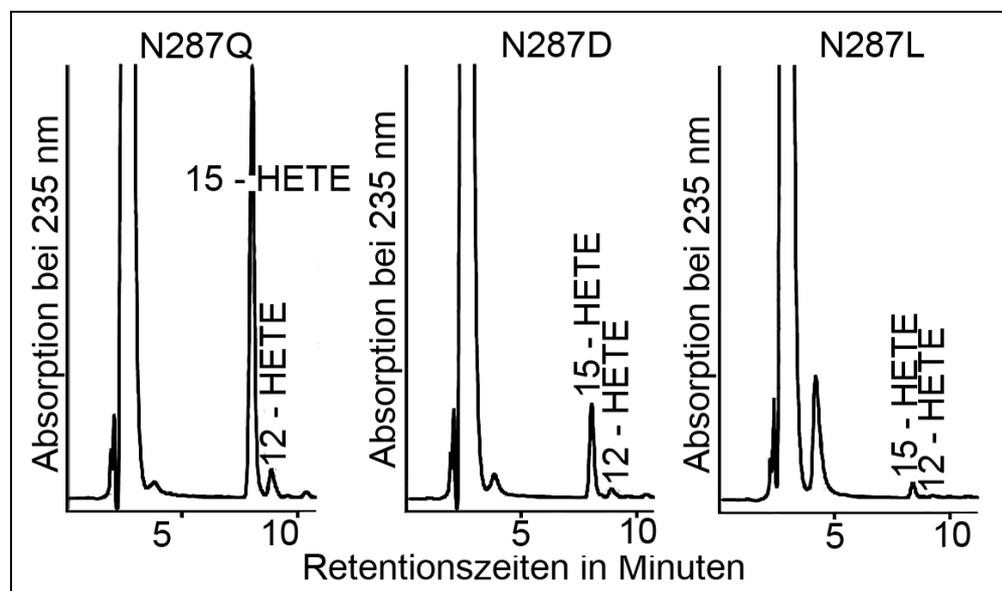


Abb. 19: HPLC – Chromatogramm der verschiedenen N287 – Mutanten

Bei der Auswertung der Chromatogramme fällt auf, dass trotz drastischer Verringerung der katalytischen Aktivität der N287Q – und N287D – Mutanten, die Reaktionsspezifität

Ergebnisse

nicht verändert wurde. Für beide teilweise aktiven ALOX15 – Mutanten konnte 15 – HETE als Hauptprodukt identifiziert werden, während 12 – HETE nur in geringen Mengen gebildet wurde.

4 Diskussion

4.1 Häufigkeit des untersuchten SNPs beim Alpha – 1 – Antitrypsin

Ein Mangel an alpha – 1 – Antitrypsin ist bislang der einzige genetische Faktor, welcher, ausreichend belegt, der Pathogenese der COPD zugrunde liegt. Um diesen Zusammenhang nachzuweisen, wurden in vielen geographischen Regionen bereits epidemiologische Studien zur Häufigkeitsverteilung genetischer Polymorphismen des alpha – 1 – Antitrypsingens durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es Mutationen des alpha – 1 – Antitrypsingens gibt, die zu einem funktionellen Mangel am Akutphaseprotein alpha – 1 – Antitrypsin führen. Hierzu zählt insbesondere die Mutationen, die zum Vorkommen der Allelvarianten Z bzw. S führen [29, 132]. Beide Mutationen sind SNPs und haben einen Aminosäureaustausch zu Folge, welcher sich in einer Änderung der Proteineigenschaften niederschlägt. Im Falle der Z – Mutation kommt es funktionell zu einer Konformationsänderung der reaktiven Schleife des Proteins, so dass andere alpha – 1 – Antitrypsinmoleküle binden können. Dadurch wird die Ausbildung von Proteinpolymeren begünstigt, was zum Untergang von Hepatozyten führt. Diese Veränderungen induzieren eine Leberzirrhose und einen stark verminderten Serumspiegel an alpha – 1 – Antitrypsin. Weiterhin wird die Entstehung einer COPD und eines Lungenemphysems getriggert. Das Z – Allel hat im europäischen Raum in Südschweden und an der Nordwestküste Europas sowie im bisher untersuchten asiatischen Raum in Tadschikistan seine höchste Prävalenz [28, 30].

Bei der Mutation, die zum S – Allel führt, kommt es zu keiner so drastischen Konformationsänderung wie beim Z – Allel, so dass weniger Proteinpolymere gebildet werden und es zu einem milderen Abfall des alpha – 1 – Antitrypsinserumspiegels im Blutplasma kommt. Die klinischen Verläufe der Lungenerkrankung sind ebenfalls milder. Das S – Allel ist im europäischen Raum am häufigsten in Portugal und Spanien und im asiatischen Raum in Malaysia verbreitet [28, 30].

Es lassen sich also bei den hier beschriebenen Mutationen in der Häufigkeit der ethnischen Verteilung deutliche Unterschiede feststellen. Insgesamt tragen zum Beispiel 7,7% der nordeuropäischen und 25% der iberischen Bevölkerung mindestens entweder ein Z – oder ein S – Allel [29]. Im asiatischen Raum ist Thailand mit 7% das Land mit der höchsten Mutationshäufigkeit [30].

Diskussion

Die indonesische Bevölkerung wurde bislang noch nicht auf diese Mutation untersucht. In dieser Arbeit konnte durch eine Analyse von 151 indonesischen DNA – Proben gezeigt werden, dass auch in dieser Bevölkerungsgruppe entsprechende SNPs vorkommen. Für das Z – Allel ergab sich in dieser Arbeit eine genotypische Mutationshäufigkeit von 0,66% für das homozygote Auftreten von ZZ. 94,70% der untersuchten DNA – Proben wiesen genotypisch eine MM Konstellation in diesem Genlocus auf. Eine heterozygote MZ – Mutation wurde bei keinem Probanden nachgewiesen. 4,64% der Analysen waren aufgrund der unzureichenden Qualität der DANN Präparation nicht eindeutig auswertbar. Im Falle des S – Allels ergab sich eine genotypische Mutationshäufigkeit von 3,31% für das homozygote Auftreten von SS. Hierbei wiesen 94,04% der untersuchten Proben genotypisch den „Wildtyp“ auf, eine heterozygote MS – Mutation ergab sich in 0,66% der Fälle. Für diesen Genlokus waren 1,99% der Elektropherogramme nicht eindeutig interpretierbar. Ein wesentliches Problem bei der Durchführung der Experimente war, dass die Qualität der verfügbaren DNA – Proben, die im Rahmen eines kooperativen deutsch-indonesischen Forschungsprojektes an der Airlangga Universität in Surabaya präpariert und aufbewahrt wurden, sehr unterschiedlich war. Bei der Probenanalytik fiel auf, dass in manchen Proben mehr und in anderen deutlich weniger DNA vorhanden war. Auch variierte der Reinheitsgrad (Verhältnis der Lichtabsorption bei 260 nm vs. der Absorption bei 280 nm) der DNA – Proben zum Teil erheblich. Dadurch ließen sich die erhaltenen PCR – Fragmente auch durch eine Erhöhung der Anzahl der Amplifizierungszyklen in der Elektrophorese manchmal nur sehr schwach darstellen. Damit lässt sich die Mehrzahl der nicht auswertbaren Ergebnisse erklären.

Die durchgeführten Untersuchungen waren konzeptionell von Anfang an nicht darauf ausgerichtet, repräsentative und statistisch belastbare Zahlen zur Häufigkeitsverteilung der SNPs im alpha – 1 – Antritypsingen in der Region Ost – Java zu erhalten, die mit den Zahlen anderer Regionen zu vergleichen sind. Dazu waren die angepeilten n – Zahlen (150 Probanden) und die örtlich begrenzte Rekrutierungsstrategie (nur Angestellte und Studenten der Airlangga Universität) nicht repräsentativ genug. Im Rahmen dieser Pilotstudie ging es vor allem darum herauszufinden, ob die verschiedenen Allelvarianten im untersuchten Probandenkollektiv deutlich häufiger vorkommen als in anderen Bereichen des asiatischen Raums. Wäre dies der Fall gewesen, hätte eine umfangreichere Studie geplant und durchgeführt werden können. Eine solche Studie hätte mehrere tausend Probanden umfassen müssen, die zufällig

aus unterschiedlichen Regionen der Provinz Ost – Java hätten ausgewählt werden müssen. Weiterhin hätte eine solche repräsentative Studie mit einem anderen methodischen Ansatz durchgeführt werden müssen, da die von mir verwendete Methode der Restriktionsspaltung von PCR – Fragmenten für kleine n-Zahlen ($n < 200$) gut und verlässlich funktioniert, für größere n-Zahlen ($n > 1000$) aber nicht geeignet ist. Der damit verbundene Arbeitsaufwand ist einfach zu groß. Die im Rahmen dieser Pilotstudie erhaltenen Ergebnisse zeigten aber, dass weder das S – noch das Z – Allel im untersuchten Probandenkollektiv häufig auftritt. Die Häufigkeit der homozygoten Mutation für das Z – Allel in dem von mir untersuchten Teil der Bevölkerung von Ost – Java (eine Provinz im Osten der indonesischen Hauptinsel Java) liegt unter 1%. Auch die Häufigkeit der Mutation, die zum S – Allel führt, ist sehr gering. Um gesicherte Korrelationen zu verschiedenen Krankheitsbildern herstellen zu können, würde man bei solch geringen Allelfrequenzen große Probandenkollektive (mehrere Tausend Probanden) benötigen, was unter den Bedingungen vor Ort nur schwer zu organisieren wäre.

4.2 ALOX15

4.2.1 Häufigkeit der T560M – Mutation der ALOX15

Seit etlichen Jahren gibt es eine Diskussion um die Rolle der ALOX15 im Bezug auf die Entstehung der Arteriosklerose. Diskutiert werden sowohl pro – als auch anti – artherosklerotische Wirkungen des Enzyms. Gegen Ende der 80er Jahre wurde durch die Expression der ALOX15 in artherosklerotischen Läsionen erstmals postuliert, dass dieses Protein direkt an der Pathogenese der Artherosklerose beteiligt sein könnte. In artherosklerotischen Gefäßwänden konnte sein Reaktionsprodukt 13 – HODE nachgewiesen werden [98, 99]. Dieser Befund legte die Beteiligung der ALOX15 an der Atherogenese nahe, konnte aber nicht als direkter Beweis dafür angesehen werden, da Synthesemechanismen außerhalb des ALOX15 Weges zu identischen Produkten führen könnten. Entsprechend der Oxidationshypothese der Artherosklerose ist natives LDL nur wenig atherogen [16]. Hingegen gilt oxidiertes LDL als stark pro – atherogene LDL – Spezies, da diese Form des LDLs sehr schnell über Scavenger – Rezeptoren von Makrophagen oder glatten Muskelzellen aufgenommen wird [16]. Der erste direkte Hinweis für eine Beteiligung der ALOX15 an der Entstehung artherosklerotischer

Läsionen stammte aus dem Jahr 1990. In makrophagenreichen Regionen arteriosklerotischer Läsionen von mit Cholesterol – gefütterten Kaninchen fand man mRNA und Protein des Enzyms zusammen mit oxidiertem LDL [98]. Des Weiteren wurden spezifische ALOX15 Produkte in Lipidextrakten von arteriosklerotischen Läsionen der Kaninchen nachgewiesen, welche in zeitlichem Zusammenhang mit Lipidablagerungen in der Aortenwand standen [99]. In den letzten 15 Jahren wurden eine Reihe von in vitro und in vivo Studien durchgeführt, die in tierischen Arteriosklerosemodellen eine pro – atherogene Wirkung der ALOX15 eindrucksvoll bestätigten [125, 133, 134].

Andererseits gibt es in der Literatur auch Studien und Experimente, welche Hinweise auf anti – atherosklerotische Wirkungen der ALOX15 lieferten [99, 117, 118]. Die molekularen Ursachen für diesen anti – arteriosklerotischen Effekt konnten bislang noch nicht aufgeklärt werden. Es wurde jedoch postuliert, dass die Bildung anti – inflammatorisch wirkender Lipoxine, an deren Biosynthese die ALOX15 beteiligt ist, eine Rolle zu spielen scheint [117, 118].

In bisherigen epidemiologische Studien konnte gezeigt werden, dass der SNP, welcher zur T560M – Mutation führt, in verschiedenen ethnischen Gruppen mit geringer Allelfrequenz vorkommt, wobei es Unterschiede in der Verteilung der Häufigkeiten zwischen den Gruppen gibt [125, 134]. In funktionellen Untersuchungen wurde deutlich, dass die entsprechende Enzymmutante eine stark reduzierte katalytische Aktivität (ca. 5 % des Wildtypenzym) aufweist [125]. Was dies für die Entstehung der Arteriosklerose bei den Merkmalsträgern bedeutet, ließ sich ebenfalls statistisch darstellen. So konnte gezeigt werden, dass dieser SNP für heterozygote Merkmalsträger, ein signifikant erhöhtes Risiko für eine KHK, verglichen mit Nicht – Trägern der T560M – Mutation, besteht [125]. Dieses erhöhte Risiko konnte aufgrund zu geringer n – Zahlen für homozygote T560M – Träger jedoch nicht nachgewiesen werden. Jedoch war auch hier ein Trend zu einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit nachweisbar, der aber statistisch nicht als signifikant gesichert werden konnte [125]. In einer zweiten Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten des SNPs und einem Myokardinfarkt untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden [118]. Es wurde allerdings beobachtet, dass das Auftreten der T560M – Mutation mit einer Zunahme des Risikos (statistisch nicht – signifikanter Trend) einen Myokardinfarkt zu erleiden, einhergeht [125].

In einer weiteren Arbeit lag die Häufigkeit des T560M – SNP unter 1% für das heterozygotes Auftreten einer solchen Mutation [129]. Statistische Abschätzungen ergaben, dass bei solch niedrigen Allelfrequenzen die zu untersuchenden Kohorten mehrere tausend Probanden enthalten müssten, um signifikante Unterschiede zu erreichen. Aufgrund dieser Daten muss eingeschätzt werden, dass alle bisher publizierten Untersuchungen zur physiologischen Rolle des T560M – SNPs nicht die nötige Aussagekraft haben (underpowered), um dessen biologische Bedeutung eindeutig charakterisieren zu können. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, ob in der ost – javanesischen Bevölkerung dieser SNP mit einer deutlich größeren Häufigkeit vorkommt, als das bei den bisherigen Studien der Fall war. Wenn dies der Fall gewesen wäre, hätten mit wesentlich kleineren Probandenkollektiven statistische Korrelationsanalysen durchgeführt werden können. Im Rahmen meiner Arbeit ergab sich jedoch, dass in dieser ethnischen Gruppe der heterozygote T560M – SNP nur mit einer Häufigkeit von 0,66% auftrat. Homozygote Merkmalsträger wurden in der untersuchten Patientenkohorte nicht identifiziert. Als Konsequenz dieser sehr geringen Allelfrequenz des T560M – SNPs in der ost – javanesischen Bevölkerung sind damit weitere Untersuchungen in diesem ethnischen Bereich wenig erfolgversprechend. Wesentlicher Zweck meiner Dissertationsarbeit war die Durchführung orientierende Experimente, die Auskunft darüber geben sollten, ob es sinnvoll wäre, eine größere Studie mit mehreren tausend Probanden in dieser ethnischen Gruppe zu planen. Dies muss angesichts der geringen Häufigkeitsverteilung des T560M – SNPs (<1% für heterozygote Merkmalsträger) klar als nicht lohnenswert eingeschätzt werden.

4.2.2 Aktivitätsbestimmungen der 12/15 – LOX

Um die katalytischen Aktivitäten der Wildtyp ALOX15 und der T560M – Mutante zu bestimmen, mussten die beiden Enzymvarianten rekombinant exprimiert werden. Dabei ergab sich zu Anfang meiner Untersuchungen die Schwierigkeit, dass die Ausbeuten an Plasmid – DNA, die bei der Plasmidpräparation erhalten wurde, sehr gering ausfielen. Damit konnte zunächst keine effiziente Bakterientransformation erreicht werden. Nach Transformation der Bakterien mit den rekombinanten Plasmiden wuchsen nur wenige Bakterienklone auf den Selektionsagarplatten. Die Ursachen dafür konnten nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Expression der rekombinanten Lipoxygenasen die Vermehrung der Bakterien und/oder das

Diskussion

Bakterienwachstum negativ beeinflusst. Trotz umfangreicher Optimierungsversuche war es nicht möglich, die Transformationseffizienz deutlich zu erhöhen. Deshalb habe ich mich entschlossen trotz der geringen Transformationseffizienz die gewachsenen Bakterienklone näher zu untersuchen. Dazu wurde deren Plasmid – DNA präpariert und zur Sequenzierung eingeschickt. Hierbei zeigte sich, dass ein Klon, Klon B, dem Wildtyp entsprach und ein weiterer Klon, Klon 4, die T560M – Mutante enthielt. Alle anderen untersuchten Klone enthielten entweder nicht die gewünscht Mutation oder zusätzlich noch weitere Mutationen. In Folge dessen wurden Klon B und Klon 4 für die folgenden Experimente genutzt.

Parallel hierzu wurden Versuche in einem eukaryotischen Expressionssystem (HEK 293 – Zellen) durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine effiziente Expression der Lipoxygenase in höher entwickelten Zellen möglich ist. Letztlich konnte gezeigt werden, dass die ALOX15 und ihre T560M – Mutanten sowohl in pro – als auch in eukaryotischen Zellen exprimiert werden können.

Die Aktivitätsbestimmungen beider Expressionssysteme erfolgten über eine HPLC – Analyse der innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls (5 Minuten) gebildeten Arachidonsäureoxidaionsprodukte. Für die in *E. coli* exprimierten Enzyme konnte gezeigt werden, dass das Chromatogramm der Reaktionsprodukte, die durch die Wildtypvariante produziert wurden, einen deutlich höheren Peak für 15 – HETE als für 12 – HETE aufwies. Somit ergibt sich, dass die rekombinante ALOX15 Arachidonsäure bevorzugt zu 15 – HETE und weniger zu 12 – HETE umsetzt. Diese Daten belegen eine duale Positionsspezifität des Enzyms und stimmen mit den Ergebnissen der Produktanalyse des nativen Proteins überein, welches aus verschiedenen menschlichen Zellen präpariert werden konnte. Gleichzeitig konnte in diesem System gezeigt werden, dass die Produktbildung der T560M – Mutante deutlich geringer ausfiel als die des Wildtypenzym, was an der relativen Peakfläche der Hauptprodukte (15 – und 12 – HETE) abgelesen werden konnte. Auch für die rekombinante Expression der ALOX15 in HEK 293 – Zellen ergab sich eine duale Positionsspezifität. Beim Einsatz von 20 µl Wildtyplysate wurden 78,3% der Gesamtprodukte als 15 – HETE und 13,1% als 12 – HETE identifiziert. Der Rest der analysierten konjugierten Diene verteilte sich auf andere HETE – Isomere (11 – HETE, 8 – HETE, 9 – HETE, 5 – HETE). Für die Aktivität von 100 µl T560M – Lysat ergaben sich ca. 24,0% 15 – HETE und 10,5% 12 – HETE. Auch hier verteilte sich die restliche Produktbildung auf die anderen HETE – Isomere (11 – HETE, 9 – HETE, 8 – HETE, 5 – HETE). Berechnet man den

Spezifitätskoeffizienten (15 – HETE/12 – HETE – Verhältnis) der Arachidonsäureoxygenierung kann man feststellen, dass die Reaktion des Wildtypenzym deutlich spezifischer ausfiel, als die der Mutante. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass bei der geringen spezifischen Aktivität der T560M – Mutante die relative Menge der Oxidationsprodukte, die sich bereits in der Substratlösung nachweisen lassen, verglichen mit der spezifischen Produktneubildung deutlich höher war. Daraus ergab sich ein höherer Anteil an Autoxidationsprodukten in der Gesamtproduktmischung. Weiterhin muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass wegen der geringeren spezifischen Aktivität der T560M – Mutante eine fünffach höhere Menge an Zellysate eingesetzt werden musste, um überhaupt nachweisbare Produktmengen zu erhalten. Dadurch stieg natürlich die Gefahr unspezifischer Oxidationsprozesse, was den Spezifitätskoeffizienten zusätzlich beeinflusste.

4.2.3 Enantiomeraselektivität der ALOX15 und der T560M – Mutante in *E. coli* und HEK 293 – Zellen

Die ALOX15 – Reaktion verläuft stereospezifisch unter der Bildung von S – Produktisomeren. Im Gegensatz dazu führt die nicht – enzymatische Lipidperoxidation zu racemischen Reaktionsprodukten. Damit kann durch die Bestimmung der Chiralität der Reaktionsprodukte darauf geschlossen werden, ob diese einer enzymatischen oder nicht – enzymatischen Reaktion entspringen. Die Chiralität der verschiedenen HETE – Isomere kann mittels Chiralphasen – HPLC unter Verwendung authentischer Standards bestimmt werden. Hierzu wurde das entsprechende Produkt aus der Umkehrphasen – HPLC aufgefangen, getrocknet, in *n* – Hexan/0,1% Essigsäure aufgenommen und über eine Chiralphasen – HPLC – Säule chromatographiert. Dabei konnte für die Expression in *E. coli* gezeigt werden, dass die ALOX15 Arachidonsäure in einem deutlich höheren Anteil zu 15S – HETE umsetzt als zum entsprechenden R – Enantiomer. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Expression der LOX – Spezies in HEK 293 – Zellen. Hierbei setzt der Wildtyp Arachidonsäure zu 97,6% zu 15S – HETE um. Nur 2,4 % des präparierten 15 – HETE wurde als 15R – HETE identifiziert. Auch für die T560M – Mutante wurde gefunden, dass 94,1% des präparierten 15 – HETE als 15S – HETE darstellten. Dadurch wurde deutlich, dass die analysierten Produkte auch wirklich der LOX – Reaktion entspringen. Weiterhin wurde ersichtlich, dass auch die T560M – Mutante eine hohe Enantiomeraselektivität aufweist. Diese ist zwar etwas geringer als die

des Wildtypenzym, liegt aber immer noch deutlich über der einer nicht – enzymatischen Lipidperoxidation.

4.2.4 Bestimmung der Proteinmenge und des Gehalts an ALOX15 in HEK 293 – Zellen

Um die spezifische Aktivität der LOX – Präparationen zu ermitteln, musste neben der katalytischen Aktivität auch der Gesamtproteingehalt und der Gehalt an LOX in den Lysatüberständen bestimmt werden. Dabei wurde für die Bestimmung des Gesamtproteins die Methode nach Bradford angewandt. Es konnte gezeigt werden, dass, normiert auf den gleichen DNA – Gehalt, im Lysat der T560M – Mutante 1,91 mg/ml Protein und in der Probe der T560M – Mutante 1,02 mg/ml Protein enthalten waren. Um diese Ergebnisse zu erhalten, wurde nach der Zugabe der Reaktionsreagenz zunächst die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen von 2, 4 und 8 mg/ml (Eichkurve) verglichen. An Hand der Eichgeraden ließen sich die oben genannten Werte ablesen. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern, wurden mehrere Messungen der Absorptionen bei 595 nm durchgeführt und der Mittelwert zur Berechnung herangezogen.

Zur Bestimmung des spezifischen LOX – Gehalts wurde ein Western – Blot durchgeführt. Dazu wurde die Farbintensität der LOX – Bande nach Anfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen dieses Protein densitometrisch quantifiziert und die Intensitätsskala mit einer LOX – Standardlösung bekannter Konzentration geeicht. Dadurch ließ sich der Gehalt der verschiedenen Proben an ALOX15 hinreichend genau ermitteln.

4.2.5 Reaktionskinetik

Die normale Reaktionskinetik von Lipoxygenasen zeigt zwei Besonderheiten, die bisher für mehrere Enzyme dieser Klasse nachgewiesen werden konnten: 1.) Kinetische lag – Phase und 2.) Enzyminaktivierung durch Selbstzerstörung [133-136].

4.2.5.1 Kinetische lag – Phase

Werden LOXs aus natürlichen bzw. rekombinanten Quellen präpariert, enthalten sie zweiwertiges Nichthämeisen. Dieses ist aber nicht in der Lage, Wasserstoff von einer bisallylischen Methylengruppe zu abstrahieren und damit die LOX – Reaktion zu starten. Um dies zu ermöglichen, muss das 2 – wertige Eisen zuerst in seine 3 –

Diskussion

wertige Form oxidiert werden. Dies kann durch verschiedene Oxidantien, u. a. auch durch das Produkt der Fettsäureoxygenierung (HpETE) erfolgen. Kurz gesagt, ist für die maximale katalytische Aktivität des Enzyms eine Produktaktivierung nötig. Diese Produktaktivierung spiegelt sich in einer kinetischen lag – Phase wieder. Am Anfang der Reaktion besitzt das Enzym nur eine geringe katalytische Aktivität, da es wegen der geringen Konzentration an Reaktionsprodukt vorwiegend in seiner katalytisch inaktiven 2 – wertigen Form vorliegt. Sammelt sich jedoch im Verlauf der Reaktion Peroxyfettsäure (HpETE) an, werden weitere Enzymmoleküle von der inaktiven 2 – wertigen Form in die katalytisch aktive 3 – wertige Form überführt, so dass der relative Anteil an aktiver Enzymspezies steigt. Dies äußert sich in einer Zunahme der katalytischen Aktivität. Ist das gesamte Enzym oxidiert, kann keine weitere Aktivierung mehr erfolgen und die Reaktion läuft mit konstanter Geschwindigkeit ab. Um zu überprüfen, ob die beiden ALOX15 Spezies eine kinetische lag – Phase aufweisen, wurden die Reaktionskinetiken für beide Enzymspezies aufgenommen. Dabei wurde gefunden (Abb. 15), dass der Wildtyp eine deutliche lag – Phasen – Kinetik zeigt. Die Reaktionsrate stieg zum Anfang der Reaktion kontinuierlich an und erreichte nach ca. 75 Sekunden einen konstanten Wert, der dann beibehalten wurde. Im Vergleich dazu zeigt sich bei der T560M – Mutante keine lag – Phasen – Kinetik. Hier war der Maximalwert der Reaktionsgeschwindigkeit bereits zu Anfang der Reaktion erreicht. Im weiteren Verlauf der Reaktion zeigte sich dann aber ein kontinuierlicher Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit. Nach ca. 120 Sekunden kam die Reaktion zum Erliegen (Selbstinaktivierung des Enzyms). Es wurde keine weitere Produktbildung mehr gemessen. Die molekulare Ursache für das Fehlen der lag – Phasen – Kinetik bei der T560M – Mutanten wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht. Es scheint jedoch möglich, dass das Enzym eine höhere Affinität zum endogenen Aktivator, der Hydroperoxyfettsäure, aufweist, so dass bereits die geringen Mengen an Hydroperoxyfettsäure, die in der angebotenen Substratlösung vorhanden sind bzw. die von außen zugesetzt wurden (1 μ M HpODE), ausreichen, um das Enzym maximal zu aktivieren. Beim Wildtypenzym muss auf Grund seiner geringeren hypothetischen Affinität zum Aktivator in den ersten Sekunden der Reaktion erst noch zusätzlicher Aktivator synthetisiert werden, um eine maximale Aktivierung des Enzyms zu erreichen.

4.2.5.2 Selbstinaktivierung der ALOX15

An Hand der zeitabhängigen Absorptionszunahme bei 235 nm konnte die Umsetzung von 50 μM Linolsäure kontinuierlich verfolgt werden (Abb. 17). Durch die Zugabe von 1 μM HPODE wurde dabei versucht, die kinetische lag – Phase des Wildtypenzym zu unterdrücken. Dabei zeigte sich, dass bei der ALOX15 eine stetige Zunahme der Absorption stattfindet. Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass bei der T560M – Mutante nur zu Beginn des Messintervalls eine katalytische Aktivität messbar war, die Zunahme der Absorption bei 235 nm danach jedoch stagnierte. Damit hängt die in einer Zeiteinheit gemessene Produktbildung für die T560M – Mutante sehr stark von der Inkubationsdauer ab. Bei sehr kurzen Inkubationszeiten (unter 1 min) liegt die Menge der HETE – Bildung durch die Mutante sogar höher als die des Wildtyps. Bei längeren Inkubationszeiten ändert sich dieses Verhalten. Die Menge der HETE – Bildung durch die Mutante stagniert während das Wildtypenzym weiter HETE bildet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die beiden Enzyme unterschiedlichen Reaktionskinetiken folgen, wobei der Verlust der katalytischen Aktivität im Verlaufe der Reaktion als Selbstinaktivierung (suizidaler Charakter der LOX – Reaktion) angesehen werden muss. Die photometrischen Progresskurven bestätigen damit: 1.) Die lag – Phasen Kinetik der ALOX15 Reaktion und 2.) die Enzyminaktivierung im Verlaufe der Reaktion. Beide kinetischen Eigenschaften sind aber für den Wildtyp und die ALOX15 – Mutante unterschiedlich ausgeprägt. Während bei der T560M – Mutante die kinetische lag – Phase fehlt, zeigt dieses Enzym eine ausgeprägte Tendenz zur Selbstinaktivierung. Für das Wildtypenzym ist es genau umgekehrt. Hier ist die lag – Phasen - Kinetik stark ausgeprägt, während die Selbstinaktivierung in den kurzen Zeitintervallen weniger stark ausgeprägt ist. Obwohl auch das Wildtypenzym nach längeren Inkubationszeiten einer suizidalen Inaktivierung unterliegt, scheint diese Tendenz bei der Mutante besonders ausgeprägt zu sein. Obwohl die Selbstinaktivierung von LOXs bereits vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben wurde, ist deren molekulare Basis noch völlig unklar. Es existieren zwar mehrere Hypothesen zu den möglichen Mechanismen der Selbstinaktivierung, wobei keine dieser Hypothesen bislang experimentell bestätigt werden konnte. Aus diesem Grunde ist es derzeit auch nicht möglich abzuschätzen, welche molekularen Ursachen hinter der erhöhte Anfälligkeit der T560M – Mutante für die suizidale Inaktivierung stecken. Für weitere Untersuchungen dieses Phänomens könnte das mutierte Enzym jedoch ein geeignetes Modellsystem darstellen.

4.2.5.3 Bestimmung des K_m – Wertes und von V_{max} des Wildtypenzym an Hand eines Lineweaver – Burk – Diagramms

Um weitere Unterschiede im kinetischen Verhalten des Wildtyps der ALOX15 und seiner T560M – Mutante zu ermitteln, erfolgte die Bestimmung von K_m und V_{max} nach photometrischer Aktivitätsmessung durch die Anfertigung eines Lineweaver – Burk – Diagramms. Dies konnte jedoch nur für das Wildtypenzym realisiert werden, da für die T560M – Mutante aufgrund ihrer starken Selbstinaktivierung keine verlässlichen Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt werden konnten. Für die Wildtyp – ALOX15 wurden die Enzymaktivitäten bei verschiedenen Arachidonsäurekonzentrationen photometrisch gemessen, wobei die linearen Anfangsgeschwindigkeiten ausgewertet wurden. Dadurch konnte ein V_{max} von $0,04688 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}$ und ein K_m – Wert von $36,3 \pm 11,1 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Diese Werte sind vergleichbar mit den entsprechenden Parametern anderer LOX – Isoformen [137, 138]. Für die kinetische Charakterisierung der T560M – Mutante reichen normale Aktivitätsmesstechniken nicht aus, da das Enzym in einem schnellen Prozess inaktiviert wird. Um trotzdem verlässliche Initialraten messen zu können, müssen schnelle Messtechniken, wie z.B. die stopp – flow Technik eingesetzt werden. Mit diesem Verfahren wäre es möglich, Aktivitätsmessungen im Millisekundenbereich durchzuführen, um damit die verfälschenden Effekte der Selbstinaktivierung soweit wie möglich auszuschalten. Leider stand mir während meiner Arbeiten kein Stopp – flow Photometer zur Verfügung, so dass entsprechenden Messungen nicht durchgeführt werden konnten.

4.2.6 Struktur und katalytische Aktivität der ALOX15 und seiner T560M – Mutante

Um zu untersuchen, welche strukturellen Ursachen den bei der Mutation beobachteten Funktionsveränderungen zugrunde liegen, wurde die 3D – Struktur der Kaninchen-ALOX15, welche eine 81% Ähnlichkeit mit der humanen ALOX15 besitzt, eingehender untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass T560 nicht im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisiert ist, sondern sich eher an der Peripherie des Proteins befindet [124, 129]. Da diese Mutation, wie in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt, aber einen sehr hohen Aktivitätsverlust mit schneller Inaktivierung des Enzyms aufweist, musste angenommen werden, dass Veränderungen bei T560 indirekt auf die Struktur des aktiven Zentrums Einfluss nehmen sollte. Strukturmodellierungen und zusätzliche Mutageneseuntersuchungen deuteten letztlich darauf hin, dass T560 durch seine freie OH – Gruppe Teil eines umfassenden Wasserstoffbrückennetzwerkes ist, welches die

Enzymperipherie mit dem aktiven Zentrum verbindet. Damit könnten Veränderungen bei T560 indirekt die Struktur des aktiven Zentrums beeinflussen [129]. So ist T560 z. B. über mehrere Wasserstoffbrücken mit M418 verbunden. Diese Methionin ist Bestandteil des Bodens der Substratbindungstasche und bestimmt damit die Struktur des aktiven Zentrums mit [130, 131]. Daraus könnte man ableiten, dass, durch den T560M – Austausch die Positionierung der Substratfettsäure und/oder der Reaktionsprodukte am aktiven Zentrum verändert wird. Damit könnte die Peroxydgruppe des Reaktionsproduktes in die räumliche Nähe oxidierbarer Aminosäurereste gelangen, was eine chemische Modifizierung ihrer Seitenketten ermöglichen würde. Diese Oxidation könnte zu einer katalytischen Inaktivierung des Enzyms führen. Der genaue Wirkmechanismus und die Gründe für die frühzeitige Enzyminaktivierung und den damit verbundenen Abfall der Aktivität bleiben aber nach wie vor unklar.

4.2.7 Mutation einzelner Aminosäuren des Wasserstoffbrücken – Netzwerks

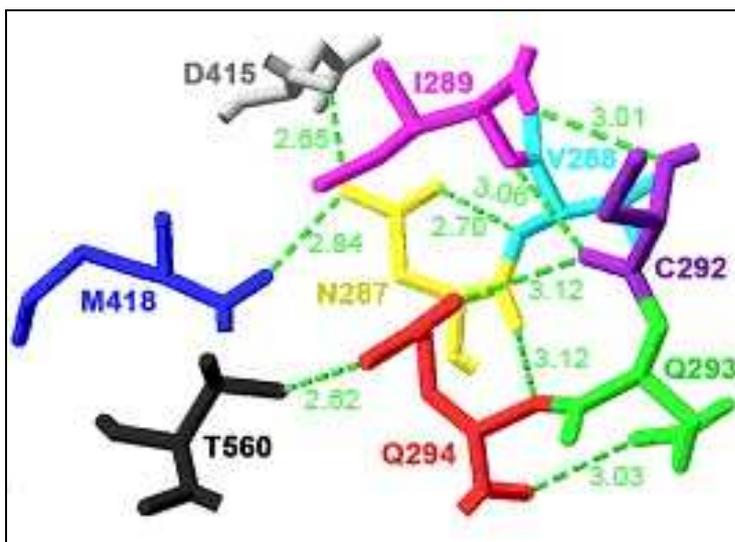


Abb. 20: Wasserstoffbrücken – Netzwerk der ALOX15 im Umfeld des aktiven Zentrums: Q294 und N287 sind wichtige Bestandteile im Wasserstoffbrücken – Netzwerk, da durch diese T560 mit M418, einer Aminosäure des aktiven Zentrums, verbunden wird [129].

Da Q294 und N287 Bestandteile des angesprochenen Wasserstoffbrückennetzwerkes sind, welches T560 mit M418 verbindet, habe ich mich noch mit der Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Enzymaktivität beschäftigt. Dabei zeigte sich, dass das H – Atom der OH – Gruppe von T560 mit der Carbonylgruppe der Seitenkette von Q294 eine H – Brücke bildet. Wird die OH – Gruppe des T560 durch den T560M – Austausch

Diskussion

beseitigt, kann diese H – Brücke nicht mehr gebildet werden, was die relative Inaktivität der T560M – Mutante erklären würde. Ein ähnliches Ergebnis (inaktives Enzym) würde man für den Q294L – Austausch erwarten.

Zum anderen zeigt sich, dass die Seitenketten des N287 Wasserstoffbrückenbindungen mit V288, D415 und M418 bilden. Mutiert man nun N287L (Asparagin zu Leucin) so wird eine Aminosäure eingeführt, die nicht mehr in der Lage ist, über ihre Seitenketten Wasserstoffbrücken zu bilden, so dass auch hier ein inaktives Enzym resultieren könnte. Bei einer weiteren Mutation dieser Aminosäure (N287D) sollte zwar weiterhin eine Wasserstoffbrückenbildung mit dem Hauptkettencarbonyl von V288 möglich sein, da die Seitenkette von Aspartat zwar als Wasserstoffakzeptor fungieren kann und dadurch eine Wasserstoffbrücke zum Amidstickstoff von V288 möglich ist. Allerdings verfügt die Seitenkette von Aspartat über kein Stickstoffamid, so dass keine zusätzlichen Wasserstoffbrücken zu D415 und M418 ausgebildet werden können. Es wurden also für die beiden Enzymmutanten N287L sowie N287D stark eingeschränkte katalytische Aktivitäten erwartet.

Als letzte Mutation habe ich noch die Rolle von N287Q im Wasserstoffbrückennetzwerk betrachtet. Asparagin und Glutamin weisen zwar funktionell identische Reste ihrer Seitenkette auf, allerdings besteht ein deutlicher Unterschied in der Länge ihrer Seitenketten. Prinzipiell sollte es dieser Mutante aber, trotz der zusätzlichen CH₂ – Gruppe im Glutamin, möglich sein dieselben Wasserstoffbrücken an ihrer Seitenkette auszubilden wie das Wildtypenzym. Der Abfall der enzymatischen Aktivität der N287Q Mutante sollte also weniger stark ausfallen, als der bei den anderen Mutanten.

Für die experimentelle Überprüfung der oben beschriebenen Arbeitshypothesen wurden die entsprechenden Enzymmutanten (Q294L, N287L, N287D, N287Q) erzeugt. Danach wurden die relativen katalytischen Aktivitäten der ALOX15, der T560M – Mutante und der drei angegebenen N287 – Mutanten bestimmt. Zu den Aktivitätsassays wurde von allen Enzymen dieselbe Menge eingesetzt, um die erhaltenen Ergebnisse direkt vergleichen zu können. Es zeigte sich, dass die relative katalytische Aktivität der T560M – Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp ($100\% \pm 9,9\%$) nur $3,8\% \pm 1,0\%$ betrug.

Die relative katalytische Aktivität der N287L – Mutante betrug im Vergleich mit dem Wildtyp ($100\% \pm 5,8\%$) nur $0,5\% \pm 0,07\%$, die der N287D – Mutante $1,1\% \pm 0,3\%$ und die der N287Q – Mutante noch $3,9\% \pm 0,1\%$ [129], wobei alle Unterschiede trotz ihres teilweise geringen Ausmaßes statistisch signifikant waren. Interessanterweise kam es

Diskussion

trotz der strukturell sehr ähnlichen Seitenkette von Asparagin und Glutamin bei der N287Q – Mutante zu einem deutlichen Abfall der relativen katalytischen Aktivität verglichen mit dem Wildtyp N287. Allerdings zeigte sich auf der anderen Seite, wie erwartet eine höhere relative katalytische Aktivität der N287Q, verglichen mit den beiden anderen Mutanten der N287 [129].

Des Weiteren erfolgten HPLC – Analysen zum Vergleich der Produktspezifität der verschiedenen Mutanten mit nachweisbarer Enzymaktivität. Hierbei ergab sich, dass diese Enzymeigenschaft durch die eingeführten Mutationen praktisch nicht beeinflusst wurde. Dabei sollte erwähnt werden, dass es nötig war, wesentlich größere Mengen an Enzymprotein der inaktiven Enzymvarianten einzusetzen (>5 – fache Enzymmenge) um überhaupt analysierbare Produktmengen präparieren zu können. Auch unter diesen Bedingungen konnten entsprechenden Analysen nicht für alle Enzymvarianten durchgeführt werden. Bei den N287 – Mutanten ergab sich, dass die Präferenz des Enzyms zur Bildung von 15 – HETE auch nach der N287Q – Mutation bestehen bleibt. Für die N287D – und N287L – Mutanten waren entsprechende Analysen aufgrund der geringen Produktbildung nicht möglich [129].

5 Zusammenfassung

Alpha – 1 – Antitrypsin ist ein Akutphaseprotein, welches als endogener Hemmstoff verschiedenen Proteasen fungiert. Ein Mangel an alpha – 1 – Antitrypsin stellt eine genetische Prädisposition für die Entstehung einer COPD dar. Für das entsprechende Gen wurden bisher mehr als 125 verschiedene Allelvarianten beschrieben von denen das S – und das Z – Allel weltweit am häufigsten vorkommen. Bisher fehlten jedoch Daten zur Häufigkeitsverteilung beider Allele in der indonesischen Bevölkerung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Pilotstudie (151 Probanden) zu deren Häufigkeitsverteilung in der Bevölkerung der indonesischen Provinz Ost – Java durchgeführt. Dabei ergab sich, dass entsprechende Mutationen in beiden Genorten im untersuchten Probandenkollektiv selten vorkommen. Damit erfordern Assoziationsstudien zur Rolle der entsprechenden SNPs bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. COPD) umfangreiche Patienten – bzw. Probandenkollektive.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde zunächst die Häufigkeitsverteilung des T560M – SNPs des ALOX15 Gens in der beschriebenen Bevölkerungskohorte untersucht. Auch hierbei ergab sich, dass das mutierte Allel in der untersuchten Bevölkerungsgruppe selten (< 1%) vorkommt. Damit erfordern Assoziationsstudien zur pathophysiologischen Bedeutung dieses ALOX15 – SNPs bei bestimmten Erkrankungen (z.B. Atherosklerose) ebenfalls umfangreiche Patienten – bzw. Probandenkollektive.

Im dritten Teil der Arbeit wurden molekularen Ursachen für die deutlich reduzierte katalytische Aktivität der natürlich vorkommenden ALOX15 – Mutante T560M untersucht. Diese Enzymvariante wird als Konsequenz eines nicht – synonymen SNPs im ALOX15 Gen bei homo – bzw. heterozygoten Merkmalsträgern exprimiert und ist katalytisch nahezu inaktiv. Durch mehrfache ortsgerichtete Mutagenese an der rekombinanten ALOX15 wurde festgestellt, dass dieser Aminosäureaustausch zu einer Störung des Wasserstoffbrückennetzwerkes führt, welches das T560 mit dem M418 verbindet, das direkt zur Geometrie des aktiven Zentrums beiträgt. Durch den Verlust der freien OH – Gruppe des T560 kommt es zu einer Umorientierung der Seitenkette des M418 und damit zur einer Strukturveränderung in der Substratbindungstasche, was zu einer Behinderung der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes führen sollte. Darauf könnte der über 95% – ige Verlust der enzymatischen Aktivität der T560M – Mutante zurückzuführen sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Buselmaier, T., ed. *Humangenetik*. 4. Auflage ed. 2007, Springer - Medizinverlag: Heidelberg. 429.
2. 2012 [cited; Available from: <http://www.morbus-hodgkin.de/infoserv/basen.gif>.
3. Wood, A.M. and R.A. Stockley, *Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment*. *Respiration*, 2007. **74**(5): p. 481-92.
4. Poller, W., C. Meisen, and K. Olek, *DNA polymorphism of alpha1-antitrypsin gene region in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur J Clin Invest*, 1990. **20**(1): p. 1-7.
5. Nukiwa, T., et al., *Evaluation of "At Risk" Alpha-1-Antitrypsin Genotype SZ with Synthetic Oligonucleotide Gene Probes* *Clinical Investigation*, 1986. **77**: p. 528-537.
6. Gupta, J., D. Bhadoria, and M. Lal, *Association of the PIM3 allele of alpha1 - Antitrypsin Gene and the Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* *Clin Biochem*, 2005. **38**(5): p. 489-491.
7. Biedermann, A. and T. Köhnlein, *Alpha-1-Antitrypsin-Mangel - eine versteckte Ursache der COPD: Überblick über Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie* *Deutsches Ärzteblatt*, 2006. **26**.
8. Barnes, P.J., *Genetics and pulmonary medicine*. 9. *Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease*. *Thorax*, 1999. **54**(3): p. 245-52.
9. Joos, L., P.D. Pare, and A.J. Sandford, *Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease*. *Swiss Med Wkly*, 2002. **132**(3-4): p. 27-37.
10. Wilczynska, M., et al., *Structural insights into serpin-protease complexes reveal the inhibitory mechanism of serpins*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(5): p. 354-7.
11. Dementiev, A., J. Dobo, and P.G. Gettins, *Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(6): p. 3452-7.
12. Ryu, S.E., et al., *The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved alpha1-antitrypsin at 2.7 Å*. *Structure*, 1996. **4**(10): p. 1181-92.
13. Hurtado, I., et al., *In vitro oxidised HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages*. *Atherosclerosis*, 1996. **125**(1): p. 39-46.
14. Vogelmaier, c. and e. al., *Internist*, 2006. **47**: p. 885-894.
15. *Programm für Nationale VersorgungsLeitlinien*, Bundesärztekammer, K. Bundesvereinigung, and A.d.W.M. Fachgesellschaften, Editors. 2010.
16. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(14): p. 915-24.
17. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. 2006 [cited 2010 30.06]; Available from: www.goldcopd.com.
18. Buist, A.S., et al., *International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study*. *Lancet*, 2007. **370**(9589): p. 741-50.
19. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9063): p. 1436-42.
20. Kazerouni, N., et al., *Sex differences in COPD and lung cancer mortality trends--United States, 1968-1999*. *J Womens Health (Larchmt)*, 2004. **13**(1): p. 17-23.

21. COPD - Pathogenese. 2010 [cited 2010 13.07]; Available from: http://www.copd-aktuell.de/fachkreis/copd/definition.htm?si=PE6.1ozGQJ.Z8xZR.31****.
22. Richling, F., COPD. 2006: Georg Thieme Verlag.
23. Shaker, S.B., et al., *Quantitative computed tomography and aerosol morphometry in COPD and alpha1-antitrypsin deficiency*. Eur Respir J, 2005. **25**(1): p. 23-30.
24. Sandford, A.J. and E.K. Silverman, *Chronic obstructive pulmonary disease. 1: Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction*. Thorax, 2002. **57**(8): p. 736-41.
25. *Ursachen der COPD: Alpha-1-Antitrypsinmangel*. 2010 [cited 2010 13.07]; Available from: <http://www.medizininfo.de/lungeundatmung/COPD/alpha-1-antitrypsinmangel.shtml>.
26. *Alpha-1-Antitrypsin Deficiency*. 2008 [cited 2010 16.07]; Available from: <http://www.patient.co.uk/doctor/Alpha-1-Antitrypsin-Deficiency.htm>.
27. Sandford, A.J., et al., *Z and S mutations of the alpha1-antitrypsin gene and the risk of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(2): p. 287-91.
28. Blanco, I., et al., *Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries*. Eur Respir J, 2006. **27**(1): p. 77-84.
29. Lomas, D.A., *The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(10): p. 1072-7.
30. de Serres, F.J., *Worldwide Racial and Ethnic Distribution of alpha1Antitrypsin Deficiency: Summary of an Analysis of Published Genetic Epidemiologic Surveys*. Chest, 2002. **122**: p. 1818-1829.
31. Bisakowski, B., X. Perraud, and S. Kermasha, *Characterization of hydroperoxides and carbonyl compounds obtained by lipoxygenase extracts of selected microorganisms*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997. **61**(8): p. 1262-9.
32. Brash, A.R., *Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23679-82.
33. Brash, A.R., W.E. Boeglin, and M.S. Chang, *Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6148-52.
34. Brash, A.R., et al., *Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral Plexaura homomalla reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20949-57.
35. Brash, A.R., et al., *Allene oxide and aldehyde biosynthesis in starfish oocytes*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22926-31.
36. Grechkin, A., *Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway*. Prog Lipid Res, 1998. **37**(5): p. 317-52.
37. Hada, T., L.L. Swift, and A.R. Brash, *Discovery of 5R-lipoxygenase activity in oocytes of the surf clam, Spisula solidissima*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1346**(2): p. 109-19.
38. Hawkins, D.J. and A.R. Brash, *Eggs of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity*. J Biol Chem, 1987. **262**(16): p. 7629-34.
39. Kuhn, H. and B.J. Thiele, *The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance*. FEBS Lett, 1999. **449**(1): p. 7-11.

40. Mack, A.J., T.K. Peterman, and J.N. Siedow, *Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role*. *Isozymes Curr Top Biol Med Res*, 1987. **13**: p. 127-54.
41. Oliw, E.H., *Plant and fungal lipoxygenases*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 313-23.
42. Su, C. and E.H. Oliw, *Manganese lipoxygenase. Purification and characterization*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(21): p. 13072-9.
43. Smith, R.L. and M.J. Weidemann, *Reactive oxygen production associated with arachidonic acid metabolism by peritoneal macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980. **97**(3): p. 973-80.
44. Yamamoto, S., *Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1128**(2-3): p. 117-31.
45. Borgeat, P., M. Hamberg, and B. Samuelsson, *Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases*. *J Biol Chem*, 1976. **251**(24): p. 7816-20.
46. Hamberg, M. and B. Samuelsson, *On the metabolism of prostaglandins E 1 and E 2 in the guinea pig*. *J Biol Chem*, 1972. **247**(11): p. 3495-502.
47. Nugteren, D.H., *Arachidonate lipoxygenase in blood platelets*. *Biochim Biophys Acta*, 1975. **380**(2): p. 299-307.
48. Schewe, T., et al., *A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria*. *FEBS Lett*, 1975. **60**(1): p. 149-52.
49. Flatman, S., et al., *Biochemical studies on a 12-lipoxygenase in human uterine cervix*. *Biochim Biophys Acta*, 1986. **883**(1): p. 7-14.
50. Hunter, J.A., et al., *Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(14): p. 4633-7.
51. Sigal, E., et al., *Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(11): p. 5328-32.
52. Sigal, E. and J.A. Nadel, *Arachidonic acid 15-lipoxygenase and airway epithelium. Biologic effects and enzyme purification*. *Am Rev Respir Dis*, 1988. **138**(6 Pt 2): p. S35-40.
53. Turk, J., et al., *Arachidonic acid 15-lipoxygenase products from human eosinophils*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(12): p. 7068-76.
54. Funk, C.D., et al., *Lipoxygenase genes and their targeted disruption*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. **68-69**: p. 303-12.
55. Hussain, H., et al., *Epidermis contains platelet-type 12-lipoxygenase that is overexpressed in germinal layer keratinocytes in psoriasis*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(1 Pt 1): p. C243-53.
56. Takahashi, Y., et al., *Arachidonate 12-lipoxygenase of platelet-type in human epidermal cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(22): p. 16443-8.
57. Boeglin, W.E., R.B. Kim, and A.R. Brash, *A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(12): p. 6744-9.
58. Schneider, C., et al., *Detection and cellular localization of 12R-lipoxygenase in human tonsils*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **386**(2): p. 268-74.
59. Krieg, P., F. Marks, and G. Furstenberger, *A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression*. *Genomics*, 2001. **73**(3): p. 323-30.

60. Goldyne, M.E., et al., *Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes. Lipoxygenase-related pathways*. J Biol Chem, 1984. **259**(14): p. 8815-9.
61. Rouzer, C.A., T. Matsumoto, and B. Samuelsson, *Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(4): p. 857-61.
62. Rouzer, C.A. and B. Samuelsson, *On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6040-4.
63. Spanbroek, R., et al., *5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 663-8.
64. Furstenberger, G., F. Marks, and P. Krieg, *Arachidonate 8(S)-lipoxygenase*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: p. 235-43.
65. Henricks, P.A., et al., *9- and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and human polymorphonuclear leukocytes*. Prostaglandins, 1991. **41**(1): p. 21-7.
66. Higgs, G.A., J.A. Salmon, and J.A. Spayne, *The inflammatory effects of hydroperoxy and hydroxy acid products of arachidonate lipoxygenase in rabbit skin*. Br J Pharmacol, 1981. **74**(2): p. 429-33.
67. Fischer, D.B., J.W. Christman, and K.F. Badr, *Fifteen-S-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-S-HETE) specifically antagonizes the chemotactic action and glomerular synthesis of leukotriene B4 in the rat*. Kidney Int, 1992. **41**(5): p. 1155-60.
68. Munger, K.A., et al., *Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13375-80.
69. Fierro, I.M. and C.N. Serhan, *Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins*. Braz J Med Biol Res, 2001. **34**(5): p. 555-66.
70. Edenius, C., et al., *Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue*. FEBS Lett, 1990. **272**(1-2): p. 25-8.
71. Serhan, C.N. and K.A. Sheppard, *Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 772-80.
72. Lee, T.H., et al., *Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine*. Clin Sci (Lond), 1989. **77**(2): p. 195-203.
73. Maddox, J.F., et al., *Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6972-8.
74. Papayianni, A., C.N. Serhan, and H.R. Brady, *Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells*. J Immunol, 1996. **156**(6): p. 2264-72.
75. Spite, M., et al., *Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1287-91.
76. Serhan, C.N., *Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions*. JEM, 2009. **206**(1): p. 15-23.
77. Epp, N., et al., *12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function*. J Cell Biol, 2007. **177**(1): p. 173-82.
78. Virmani, J., et al., *Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis*. Cancer Lett, 2001. **162**(2): p. 161-5.

79. Kuhn, H. and V.B. O'Donnell, *Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(4): p. 334-56.
80. Riedel, S., *Arteriosklerose*. 2001, Grin.
81. Kostner, G.M., *Ursachen der Gefäßschäden Endothelfunktion, Morphologie und Biochemie der Atherosklerose*. Pharm. Unsere Zeit, 2003. **32**(6): p. 458-453.
82. Kuhn, H., *Biologic relevance of lipoxygenase isoforms in atherogenesis*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2005. **3**(6): p. 1099-110.
83. Kuhn, H., I. Romisch, and J. Belkner, *The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(11): p. 1014-29.
84. Kroehnert, S. and R. Muenz, *Lebensspanne und Todesursachen früher und heute*, in *Sterblichkeit und Todesursachen*, RobertBoschStiftung, Editor. 2008, Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung. p. 1-8.
85. *World Health Statistics 2009*, WHO, Editor. 2009.
86. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
87. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
88. Chisolm, G.M. and D. Steinberg, *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1815-26.
89. Kuhn, H., et al., *Arachidonic Acid metabolites in the cardiovascular system: the role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis with particular emphasis on vascular remodeling*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(6): p. 609-20.
90. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, eds. *Repititorium Pathologie*. Vol. 1. 2004, Urban & Fischer Verlag: München.
91. Bayturan, O., et al., *The metabolic syndrome, its component risk factors, and progression of coronary atherosclerosis*. Arch Intern Med. **170**(5): p. 478-84.
92. Everson-Rose, S.A. and T.T. Lewis, *Psychosocial factors and cardiovascular diseases*. Annu Rev Public Health, 2005. **26**: p. 469-500.
93. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Arachidonate metabolism in blood cells and the vessel wall*. Clin Haematol, 1986. **15**(2): p. 273-92.
94. Nakao, J., et al., *Calcium dependency of aortic smooth muscle cell migration induced by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid. Effects of A23187, nifedipine and trifluoperazine*. Atherosclerosis, 1983. **46**(3): p. 309-19.
95. Nakao, J., et al., *Platelets stimulate aortic smooth muscle cell migration in vitro. Involvement of 12-L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid*. Atherosclerosis, 1982. **43**(2-3): p. 143-50.
96. Henriksson, P., M. Hamberg, and U. Diczfalusy, *Formation of 15-HETE as a major hydroxyeicosatetraenoic acid in the atherosclerotic vessel wall*. Biochim Biophys Acta, 1985. **834**(2): p. 272-4.
97. Simon, T.C., A.N. Makheja, and J.M. Bailey, *The induced lipoxygenase in atherosclerotic aorta converts linoleic acid to the platelet chemorepellant factor 13-HODE*. Thromb Res, 1989. **55**(2): p. 171-8.
98. Yla-Herttuala, S., et al., *Transfer of 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low density lipoprotein*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2692-8.
99. Kuhn, H., et al., *Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1903-11.
100. Folcik, V.A., et al., *Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 504-10.
101. Kuhn, H., et al., *In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis*. J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 888-93.

102. Belkner, J., H. Stender, and H. Kuhn, *The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23225-32.
103. Belkner, J., et al., *Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases*. Eur J Biochem, 1993. **213**(1): p. 251-61.
104. Upston, J.M., et al., *Oxidation of free fatty acids in low density lipoprotein by 15-lipoxygenase stimulates nonenzymic, alpha-tocopherol-mediated peroxidation of cholesteryl esters*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30067-74.
105. Yamashita, H., et al., *Oxidation of low density lipoprotein and plasma by 15-lipoxygenase and free radicals*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 287-90.
106. Neuzil, J., et al., *Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in low-density lipoproteins*. Biochemistry, 1998. **37**(25): p. 9203-10.
107. Sun, D. and C.D. Funk, *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, 1996. **271**(39): p. 24055-62.
108. Benz, D.J., et al., *Enhanced levels of lipoperoxides in low density lipoprotein incubated with murine fibroblast expressing high levels of human 15-lipoxygenase*. J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5191-7.
109. Harats, D., et al., *Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(9): p. 2100-5.
110. Cyrus, T., et al., *Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(11): p. 1597-604.
111. Funk, C.D. and T. Cyrus, *12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2001. **11**(3-4): p. 116-24.
112. Bocan, T.M., et al., *A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit*. Atherosclerosis, 1998. **136**(2): p. 203-16.
113. Sendobry, S.M., et al., *Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(7): p. 1199-206.
114. Shen, J., et al., *Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2201-8.
115. Trebus, F., et al., *Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **67**(6): p. 419-28.
116. Paul, A., et al., *Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anemia*. Atherosclerosis, 1999. **147**(1): p. 61-8.
117. Goh, J., et al., *Lipoxins: pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 1043-54.
118. Perretti, M., et al., *Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1296-302.

119. Chen, X.H., T.K. Harden, and R.A. Nicholas, *Molecular cloning and characterization of a novel beta-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 24810-9.
120. Kuhn, H., et al., *Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1169**(1): p. 80-9.
121. Simon, T.C., A.N. Makheja, and J.M. Bailey, *Relationship of vascular 15-lipoxygenase induction to atherosclerotic plaque formation in rabbits*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990. **41**(4): p. 273-8.
122. Kuhn, H. and L. Chan, *The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: pro- and antiatherogenic actions*. Curr Opin Lipidol, 1997. **8**(2): p. 111-7.
123. *SNP human ALOX15*. [cited 2011 30.3.2011]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
124. Assimes, T.L., et al., *A near null variant of 12/15-LOX encoded by a novel SNP in ALOX15 and the risk of coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2008. **198**(1): p. 136-44.
125. Hersberger, M., et al., *No association of two functional polymorphisms in human ALOX15 with myocardial infarction*. Atherosclerosis, 2008.
126. Tang, C. and H.L. Henry, *Overexpression in Escherichia coli and affinity purification of chick kidney ferredoxin*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11474.
127. Walther, M., et al., *The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27360-6.
128. Chen, X.S., et al., *cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 13979-87.
129. Schurmann, K., et al., *Molecular basis for the reduced catalytic activity of the naturally occurring T560M mutant of human 12/15-lipoxygenase that has been implicated in coronary artery disease*. J Biol Chem.
130. Ivanov, I., et al., *Molecular enzymology of lipoxygenases*. Arch Biochem Biophys. **503**(2): p. 161-74.
131. Sloane, D.L., et al., *A primary determinant for lipoxygenase positional specificity*. Nature, 1991. **354**(6349): p. 149-52.
132. de Serres, F.J., I. Blanco, and E. Fernandez-Bustillo, *Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z deficiency alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in Asia*. Eur Respir J, 2006. **28**(6): p. 1091-9.
133. Hartel, B., et al., *Self-inactivation by 13-hydroperoxylinoleic acid and lipohydroperoxidase activity of the reticulocyte lipoxygenase*. Eur J Biochem, 1982. **126**(2): p. 353-7.
134. Rapoport, S.M., et al., *The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte*. Eur J Biochem, 1979. **96**(3): p. 545-61.
135. Schilstra, M.J., et al., *Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics*. Biochemistry, 1992. **31**(33): p. 7692-9.
136. Schilstra, M.J., G.A. Veldink, and J.F. Vliegthart, *Kinetic analysis of the induction period in lipoxygenase catalysis*. Biochemistry, 1993. **32**(30): p. 7686-91.
137. Arai, H., et al., *Reactivity of mammalian 15-lipoxygenase with phospholipids in large unilamellar liposomes*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228**(3): p. 675-82.

Literaturverzeichnis

138. Huang, L.S., M.R. Kim, and D.E. Sok, *Linoleoyl lysophosphatidylcholine is an efficient substrate for soybean lipoxygenase-1*. Arch Biochem Biophys, 2006. **455**(2): p. 119-26.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kathrin Eckert – Schurmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zum Polymorphismus der alpha – 1 – Antitrypsin – und ALOX15 – Gene in der indonesischen Bevölkerung und die pathophysiologischen Rollen der Enzyme bei chronisch – obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) und Artherosklerose 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/der Betreuer/in, 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.“

06. August 2015

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Kathrin Eckert – Schurmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schurmann K, Anton M, Ivanov I, Richter C, Kuhn H, Walther M. (2011) Molecular basis for the reduced catalytic activity of the naturally occurring T560M mutant of human 12/15-lipoxygenase that has been implicated in coronary artery disease. J Biol Chem. 2011 Jul 8;286(27):23920-7. doi: 10.1074/jbc.M110.211821.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption der Publikation und die Planung der Experimente wurden gemeinsam von K. Eckert – Schurmann, M. Walther und H. Kühn durchgeführt.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente wurde überwiegend von K. Eckert – Schurmann unter der Anleitung von M. Walther durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in regelmäßigen Abständen im Kollektiv der

Autoren besprochen und die weitere Strategie festgelegt.

c) Schreiben der Publikationen: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom K. Eckert – Schurmann unter der Anleitung von H. Kühn durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren Anteil, wobei der redaktionelle Prozess vom Erstautor koordiniert wurde. Außerdem nahm Frau Schurmann an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

Molecular basis for the reduced catalytic activity of the naturally occurring T560M mutant of human 12/15-lipoxygenase that has been implicated in coronary artery disease.

Schurmann K, Anton M, Ivanov I, Richter C, Kuhn H, Walther M

J Biol Chem. 2011 Jul 8;286(27):23920-7. Epub 2011 May 10

Danksagung

Für die Entstehung dieser Arbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Kühn, bedanken. Ich danke Ihnen für Ihre unendliche Geduld auf dem doch zwischenzeitlich etwas längerwierigen Weg. Ohne Sie wäre diese Arbeit nie entstanden. Des Weiteren möchte ich mich bei dem kompletten Team der AG Kühn bedanken für die große Hilfe und Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Dagmar Heydeck sowie Herrn Dr. Matthias Walther, welche mich als meine beiden Betreuer in besonderem Maße unterstützt haben.

Der abschließende Dank geht an meine Familie. Ohne meine Eltern, die mich immer wieder zum Weitermachen angestoßen haben, wäre diese Arbeit wohl noch immer nicht fertig. Meinem Ehemann danke ich für die unendliche Unterstützung und die immer wieder motivierenden Gespräche.