

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

DISSERTATION

Untersuchung der Stereospezifität und Positionsspezifität von
Wirbeltier-Lipoxygenasen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Andreas Jansen
aus Essen

Datum der Promotion: 14.02.2014

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Vorkommen und Klassifizierung von Lipoxygenasen	1
1.1.1.	Funktionsweise von LOXen	2
1.1.2.	Verbreitung von LOXen und LOX-Nomenklatur	4
1.1.2.1.	Verbreitung von LOXen	4
1.1.2.2.	LOX-Nomenklatur	6
1.1.3.	Biologische Bedeutung verschiedener LOX-Isoformen	7
1.1.3.1.	LOXen bei der Entzündungsreaktion	10
1.1.3.2.	LOXen bei Atherosklerose	10
1.1.3.3.	LOXen beim Asthma bronchiale	13
1.1.3.4.	LOXen bei der Kanzerogenese	14
1.1.3.5.	LOXen bei der epidermalen Differenzierung	15
1.1.3.6.	Sonstige Funktionen von LOXen	16
1.2.	Struktur-Funktionsbeziehung bei Lipoxygenasen	17
1.2.1.	Strukturelle Basis der LOX-Katalyse	18
1.2.2.	Strukturelle Grundlage der Reaktionsspezifität von LOXen	18
1.2.2.1.	Determinanten der Positionsspezifität	18
1.2.2.2.	Determinanten der Stereospezifität	21
1.2.3.	Kristall- und Lösungsstruktur der ALOX15 des Kaninchens	24
1.2.4.	Kristallstruktur der ALOX15 des Schweins	26
1.2.5.	Kristallstruktur der humanen ALOX5	28
1.2.6.	Kristallstruktur der 11R-LOX der Weichkoralle <i>Gersemia fruticosa</i>	30
1.3.	Ziele der Arbeit	32
2.	MATERIALEN UND METHODEN	33
2.1.	Materialien	33
2.1.1.	Chemikalien und Biochemikalien	33
2.1.2.	Nährböden/-medien, Puffer und sonstige Lösungen	33
2.1.3.	Kits und Enzyme	34
2.1.4.	Plasmide und Oligonukleotide (Primer)	34
2.1.5.	Bakterienstämme	36
2.2.	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.	Identifizierung und Alignierung der Zebrafisch LOX1	37
2.2.2.	Klonierung der Zebrafisch LOX1 und Einbau in ein Expressionsplasmid	38
2.2.2.1.	Transformation kompetenter Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid	40
2.2.3.	Ortsgerichtete Mutagenese	40

2.2.4.	Expression der Zebrafisch LOX1 und der Enzymmutanten	41
2.2.5.	Proteinreinigung (Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie)	42
2.3.	Analytische Methoden	43
2.3.1.	LOX-Aktivitätsassay	43
2.3.2.	Analytik der LOX-Produkte (HPLC)	43
2.3.3.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	45
2.3.4.	Proteinquantifizierung	46
2.4.	Untersuchung der Membranbindungseigenschaften der Zebrafisch LOX1	46
2.4.1.	N-Terminus Trunkation	46
2.4.2.	Membranbindungsassay	47
2.5.	Statistische Auswertung	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1.	Identifizierung der Zebrafisch-LOXen	49
3.1.1.	In silico Screening genomischer Zebrafischdatenbanken nach LOX-Sequenzen	49
3.1.2.	Sequenzvergleich der Zebrafisch-LOXen mit den menschlichen Isoformen	49
3.1.3.	Syntenie der Zebrafisch-LOXen zu humanen und murinen Genabschnitten	50
3.1.4.	Potentielle Mutationstargets (Sequenzdeterminanten der Reaktionsspezifität)	50
3.2.	Expression und Charakterisierung der Wildtyp-Zebrafisch LOX1	51
3.2.1.	Expression der Zebrafisch LOX1 als rekombinantes His-tag Fusionsprotein	51
3.2.2.	Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Zebrafisch LOX1	52
3.3.	Ortsgerichtete Mutagenese der Zebrafisch LOX1	54
3.3.1.	Mutagenese der kritischen Aminosäuren des Triaden-Konzepts	54
3.3.2.	Mutagenese der Determinanten des A vs G-Konzepts	56
3.3.3.	Mutagenese der Determinanten des Jisaka-Postulates	57
3.3.4.	N-terminale Trunkation (mini-LOX)	58
3.3.4.1.	Expression der N-terminalen Trunktationsmutante (mini-LOX)	59
3.3.4.2.	Charakterisierung der N-terminalen Trunktationsmutante (mini-LOX)	60
3.4.	Membranbindungsassay	60
3.4.1.	Membranbindung der Zebrafisch LOX1 (Wildtypenzym)	61
3.4.2.	Membranbindung der N-terminalen Trunktationsmutante (mini-LOX)	61
4.	DISKUSSION	64
4.1.	Charakterisierung eines bisher unbekanntes Enzyms vom Zebrafisch	64
4.1.1.	Eigenschaften der Zebrafisch LOX1	64
4.1.2.	Zuordnung der Zebrafisch LOXen zu humanen Isoformen	66
4.2.	Die Zebrafisch LOX1. Ein Enzym, das Modelvorstellungen untergräbt	67
4.2.1.	Unvereinbarkeit mit dem Triadenkonzept der Positionsspezifität	67
4.2.2.	Unvereinbarkeit mit dem A vs G-Konzept der Stereospezifität	68

4.3.	Bedeutung der N-terminalen β-Domäne der Zebrafisch LOX1	73
4.3.1.	Rolle der β -Domäne für die Aktivitätsregulation	73
4.3.2.	Rolle der β -Domäne für die Membranbindung	76
4.4.	Evolutionäre Aspekte der LOX	77
4.4.1.	Vorkommen von LOXen in irdischen Lebensformen	77
4.4.2.	Multiplizität von 12-lipoxygenierenden LOXen bei Wirbeltieren	80
4.4.3.	12-lipoxygenierende LOXen bei anderen marinen Lebensformen	81
5.	LITERATURVERZEICHNIS	82

ANHANG

ABKÜRZUNGEN

BSA	Rinderserumalbumin
CP-HPLC	Chiralphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKRM	EDTA- (s.o.) high salt stripped rough microsomes
FPLC	Proteinflüssigkeits-/Ionenaustauschchromatographie
5-H(P)ETE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-H(P)ETE	8-Hydro(pero)xy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
9-H(P)ETE	9-Hydro(pero)xy-5Z,7E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
12-H(P)ETE	12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-H(P)ETE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB _{Amp}	Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
LOX /LOXen	Lipoxygenase/Lipoxygenasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RP-HPLC	Umkehrphasen- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMP	Submitochondriale Membranpartikel
SP-HPLC	Normalphasen- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
TAE	Tris (s.u.), Acetat, EDTA (s.o)
TED	Triscarboxymethylethylendiamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

ZUSAMMENFASSUNG

Lipoxygenasen (LOXen) bilden eine heterogene Gruppe von Dioxygenasen, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxygenieren. Auf diese Weise entstehen hochspezifisch chirale Hydro(pero)xyverbindungen, die vorwiegend an Stoffwechselwegen der Inflammation, Zelldifferenzierung und Zellwachstum beteiligt sind. LOXen kommen weit verbreitet bei Pro- und Eukaryonten vor und bestehen aus einer N-terminalen Regulatordomäne und einer C-terminalen Katalysator-domäne, welche das aktive Zentrum des Enzyms beherbergt. Neben ihrer Regulatorfunktion ist die N-terminale Domäne auch für die Membranbindung von LOXen bedeutsam. In jüngerer Vergangenheit tendierte die Namensgebung von LOXen zu dem Namen des kodierenden Gens, zugleich sind jedoch noch weitere Bezeichnungen im Umlauf.

Verschiedene Modelvorstellungen versuchen die Bildung der spezifischen Reaktionsprodukte zu erklären. Das Triadenkonzept der Positionsspezifität besagt, dass das Volumen der Substratbindungstasche die Lage des Substrates am aktiven Zentrum und damit die Reaktionsspezifität von ALOX12- und ALOX15-Isoformen beeinflusst. Bezüglich der Stereospezifität wurde in der Vergangenheit eine Hypothese formuliert, nach welcher S-Lipoxygenasen ein konserviertes Alanin und R-Lipoxygenasen ein konserviertes Glycin an einer kritischen Stelle ihrer Aminosäuresequenz tragen. Diese A vs G- Hypothese basiert darauf, dass Sauerstoff zu einem definierten Kohlenstoffatom der Substratfettsäure stereospezifisch dirigiert wird.

Vor dem Beginn dieser Arbeit standen vor allem pflanzliche LOXen und Enzyme hochentwickelter Säugetiere im Mittelpunkt des Interesses. Zu LOXen niederer Wirbeltiere gab es außer der Verfügbarkeit vereinzelter Gensequenzen nur wenige Informationen. Vor diesem Hintergrund wurde hier erstmals eine LOX des Modelorganismus Zebrafisch (*D. rerio*) kloniert, als rekombinantes His-Tag Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und hinsichtlich ihrer proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Anschließend wurden verschiedene Enzymmutanten angefertigt, um die Anwendbarkeit verschiedener Konzepte der Reaktionsspezifität von LOXen zu untersuchen. Dabei wurde festgestellt, dass die Zebrafisch LOX1 eine S-lipoxygenierende Enzymspezies ist, obwohl sie nach der A vs. G- Hypothese als R-LOX einzuordnen wäre. Veränderungen der Triadendeterminanten haben ebenfalls gezeigt, dass auch dieses Konzept nicht auf das Zebrafischenzym übertragen werden kann. Durch Deletion des N-Terminus konnte gezeigt werden, dass die isolierte katalytische Domäne der Zebrafisch LOX1 katalytisch inaktiv ist und sich die Membranbindungseigenschaften verschlechterten. Im phylogenetischen Kontext der LOX-Familie sind Zebrafisch-LOXen älter

als bisher erforschte LOX-Isoformen höherer Wirbeltiere, aber jünger als die prokaryontischen LOX-Isoformen, auf welche die A vs G-Hypothese oftmals ebenfalls nicht übertragbar ist. Die Zebrafisch LOX1 ist unentbehrlich für eine regelrechte Embryonalentwicklung, möglicherweise entspricht das Zebrafischenzym einem phylogenetischen Entwicklungsschritt von LOXen niederer Wirbeltiere zu den Säugetier ALOX12B-Isoenzymen oder den Epidermis-Typ-LOXen.

ABSTRACT

Lipoxygenases (LOXs) constitute a heterogeneous group of dioxygenases oxygenating polyunsaturated fatty acids. Due to LOX-activity, specific chiral hydro(pero)xyeicosatetraenoic acid metabolites are created, which contribute to inflammation, cellular differentiation and cell growth. LOXs are widely spread within eukaryotes and prokaryotes, they consist of a regulatory N-terminal domain and a C-terminal catalytic domain, which contains the active site. Beside its regulatory function, the N-terminal domain is also important for membrane binding. More recently, the nomenclature of LOXs prones to give respect to the coding gene, whereas further terms are still common.

Several concepts attempt to illuminate the formation of the specific reaction products. The triad concept of the positional specificity pictures the influence of the active site's volume on the alignment of the substrate fatty acid and thus determining the positional specificity of ALOX12- and ALOX15-isoforms. Referring to the stereospecificity of LOXs, a concept was suggested in the past following the thesis that S-lipoxygenases carry a conserved alanine as a critical sequence determinant, while R-lipoxygenases carry a glycine at the same position. This so called A vs G-concept is based on the stereospecific direction of oxygen to the substrate fatty acid.

Up to this investigation, the focus of LOX-research was mainly set on LOXs of plants and highly developed mammals and except the presence of genetic sequences, hardly any information of lower vertebrate LOXs was available. According to that a LOX of the model organism Zebrafish (*D. rerio*) was cloned for the first time, expressed as His-tag fusion protein in *E. coli* and characterized by its physicochemical and enzymatic properties. Subsequently, different mutations of the wild-type enzyme were prepared to prove current concepts of reaction specificity of LOXs. As a result, the Zebrafish LOX1 has to be classified as S-lipoxygenating enzyme species, although, regarding to the A vs G-concept, it should have been classified as R-lipoxygenating enzyme. Mutation of the triad concept sequence determinants also failed to verify its applicability related to the Zebrafish-enzyme. Deletion of the N-terminal domain revealed that the isolated catalytic domain is catalytic inactive and exhibits an impaired membrane binding. Considering the LOX-family from a phylogenetic point of view, Zebrafish-LOXs are older than LOXs of highly developed vertebrates but younger than prokaryotic LOXs, which frequently rejected the A vs G-concept. The Zebrafish LOX1 is essential for regular embryonic development, suggesting a phylogenetic step from LOXs of lower developed vertebrates towards ALOX12B- or epidermis-type-LOXs of mammals.

1.EINLEITUNG

1.1. Vorkommen und Klassifizierung von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXen) sind Enzyme, die Fettsäuren modifizieren durch das Einbringen von molekularem Sauerstoff. Auf diese Weise entstehen einerseits lokale Gewebsmediatoren wie Leukotriene und Lipoxine, andererseits modifizieren LOXen jedoch auch komplexe Lipid-Protein-Aggregate wie Lipoproteine und Biomembranen (1.1.3.). Im Wesentlichen sind die Reaktionsprodukte von LOXen beteiligt an entzündlichen Reaktionen, Zelldifferenzierung und Zellwachstum. Ebenso wie die Bedeutung für den tierischen Organismus komplex ist, stellt sich die Verbreitung dieser Enzyme weitläufig dar: Das Vorhandensein von LOXen erstreckt sich weit durch zahlreiche Taxa wie Säugetiere, Pflanzen, Meeresorganismen sowie Bakterien, insgesamt sind 5 Königreiche aus 2 der 3 Domänen belebter Natur vertreten (1.1.2.). Jüngst wurde im Rahmen einer Datenbanksuche bei Archaeobakterien eine Protein-Sequenz gefunden, die möglicherweise einer LOX-Isoform entspricht (Kühn et al., unveröffentlicht). Wenn sich diese Vermutung bestätigen sollte, wären alle Domänen des irdischen Lebens mit LOXen versehen.

Tierische LOXen wurden ursprünglich nach ihrer Positionsspezifität der Oxygenierung von Arachidonsäure eingeteilt in 5-LOX, 12-LOX etc. Eine weitere Klassifizierung für Säugetier-LOXen wurde unter Berücksichtigung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen vorgenommen. Auf diese Weise ergibt sich eine Einteilung in 4 Subfamilien, 12/15-LOX, 5-LOX, Plättchen-Typ 12-LOX und Epidermis-Typ-LOX, für andere Taxa wie Pflanzen wird jedoch eine andere Namensgebung bevorzugt (1.1.2.2.).

Obwohl ein interdisziplinäres Interesse an verschiedenen LOX-Isoformen besteht, ist die exakte Funktionsweise der Enzyme auf molekularer Ebene nicht umfassend bekannt. Ursächlich hierfür ist v.a. die Kombination von drei Tatsachen: Erstens sind nur einige LOX-Isoformen durch Röntgenkristallanalyse untersucht, zweitens genügt die reine räumliche Abbildung nicht sondern muss stets durch funktionelle Untersuchungen komplettiert werden und drittens weisen die meisten LOX-Isoformen unterschiedliche Struktur-Funktionsbeziehungen auf. Die unterschiedlichen Struktur-Funktionsbeziehungen haben ein Nebeneinander diverser Erklärungsmodelle zur Folge (1.2.2.) und könnten relevante Erkenntnisse über die phylogenetische Entwicklung dieser Enzymfamilie offenbaren.

1.1.1. Funktionsweise von LOXen

Lipoxygenasen sind Nichthämeisen-enthaltende Dioxygenasen, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure bzw. Arachidonsäure in entsprechende Hydroperoxyverbindungen umwandeln. Global betrachtet beinhaltet die Katalyse die Einführung einer Hydroperoxygruppe in das Kohlenwasserstoffrückgrat der Fettsäure. Als Zielregion für den Beginn der Katalyse dienen dabei Methylengruppen, die von 2 Doppelbindungen flankiert werden (Abb.1.1).

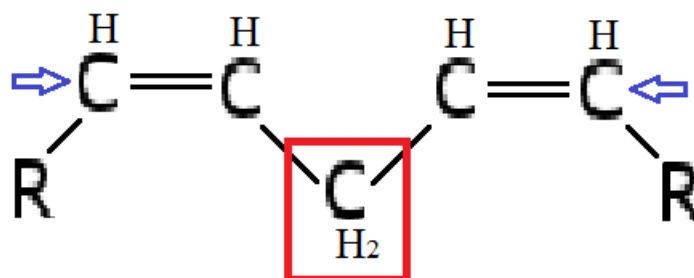


Abb. 1.1: Ausschnitt aus dem Kohlenwasserstoffrückgrat einer mehrfach ungesättigten Fettsäure. Die LOX-Katalyse beginnt mit einer Wasserstoffabstraktion von einer doppelallylständigen Methylengruppe (rot markiert). Im zweiten Schritt der Katalyse wird molekularer Sauerstoff wahlweise an eines der beiden C-Atome eingeführt, die durch einen blauen Pfeil markiert sind.

Im ersten Schritt der Reaktion erfolgt eine Wasserstoffabstraktion von einer doppelallylständigen Methylengruppe, wobei ein Proton freigesetzt wird. Das dabei entstehende Elektron wird auf das Nichthämeisen der LOX übertragen, so dass das Enzym von der katalytisch aktiven Fe^{3+} -Form (ferric LOX) in das inaktive Intermediat Fe^{2+} -LOX (ferrous LOX) übergeht (Abb.1.2). Die Wasserstoffabstraktion verläuft bereits strikt stereospezifisch, so dass nur eines der am doppelallylständigen Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffatome (entweder das proR oder das proS-Atom) abstrahiert wird. Zuvor muss jedoch stets das Fe(II) des Enzyms oxidiert werden, was im Rahmen einer Aktivierungsreaktion durch zelluläre Oxidantien geschieht. Durch die Wasserstoffabstraktion wird die doppelallylständige Methylengruppe des Substrates zum Radikal, um im nächsten Schritt intramolekular in ein Z, E- konjugiertes Dien umgelagert zu werden, das auch Pentadienylradikal genannt wird. Während der Katalyse verbleibt das Substrat bei Standardbedingungen gebunden am aktiven Zentrum des Enzyms. Nun erfolgt die ebenfalls stereospezifische Insertion von molekularem Sauerstoff. Durch die Einführung von molekularem Sauerstoff entsteht zunächst ein Peroxyradikal, welches vom Fe(II) des Enzyms zum entsprechenden Anion reduziert wird. Am Ende wird dieses Anion protoniert, so dass eine Hydroperoxyfettsäure als finales Oxygenierungsprodukt entsteht. Daher werden die Reaktionsprodukte der LOXen in dieser Arbeit auch meistens als H(P)ETE, **Hydro(per)oxyeicosatetraensäure**, bezeichnet. Unter den reduktiven intrazellulären Bedingungen

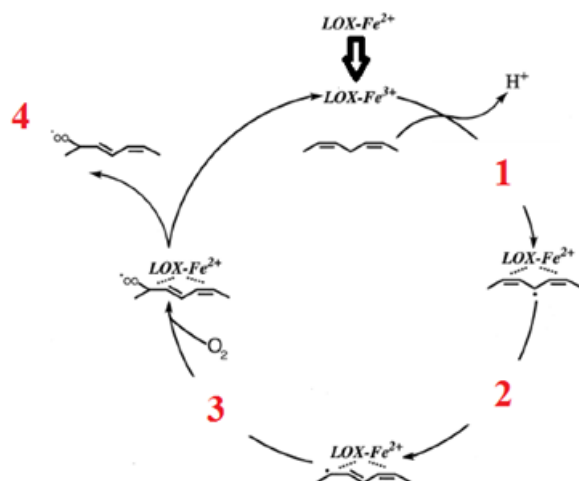


Abb 1.2: Schematische Darstellung des LOX-Reaktionszyklus. Nach der Aktivierung des Eisens zu Fe(III) erfolgen sequentiell folgende Reaktionsschritte:

1. Wasserstoffabstraktion
2. Radikalumlagerung
3. Sauerstoffinsertion
4. Radikalreduktion und Produktdissoziation.

Modifiziert nach Kuhn 2005.

werden die H(P)ETE-Verbindungen üblicherweise sehr schnell und effektiv zu den entsprechenden Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) reduziert. Reduziertes Glutathion oder andere zelluläre Reduktionsäquivalente wie z.B. Peroxyredoxine können dabei als Elektronendonator fungieren.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des LOX-Reaktionszyklus stellt die Wasserstoffabstraktion dar (Glickmann 1995, Weckler 2009). Weiterhin enthält der Katalysemechanismus eine intramolekulare Radikalumlagerung (Abb 1.2), die bei unterschiedlichen LOX-Isoformen in entgegengesetzte Richtung verlaufen kann. Die Umlagerung geschieht entweder in Richtung des Methylendes der Fettsäure ([+2]-Umlagerung) oder in Richtung des Carboxylendes ([-2]-Umlagerung). Warum bestimmte LOX-Isoformen ausschließlich eine [+2]-, andere ausschließlich eine [-2]- und wieder andere sowohl eine [+2]- als auch eine [-2]-Umlagerung katalysieren, ist bisher nicht bekannt. Es existieren zwar mehrere Hypothesen dafür (Ivanov 2010), wobei bislang noch keine als wirklich bewiesen angesehen werden kann.

Die Sauerstoffinsertion erfolgt stereochemisch entgegengesetzt (antarafacial) zur Wasserstoffabstraktion, wenn man von der Ebene des Pentadiensystems ausgeht. Auf welche Weise atmosphärischer Sauerstoff überhaupt in die Nähe des aktiven Zentrums gelangt, ist Gegenstand aktueller Diskussion (Saam 2007, Schneider 2007). Bei der Kaninchen ALOX15 jedenfalls scheinen 4 dynamische Sauerstoff-Kanäle von der Oberfläche des Proteins bis ins aktive Zentrum zu führen (Saam 2007). Die potentiellen Kanäle sind demnach nur flüchtig geöffnet, Öffnung und Schließung beruhen offenbar auf dynamischer Seitenketten-Interaktion. Ähnliche Sauerstoffzugangskanäle wurden auch für die Sojabohnen-LOX1 postuliert.

Ebenso dynamisch wie die diskutierten Sauerstoff-Kanäle sind offenbar weitere Abschnitte des Enzyms während der Katalyse, wie eine Re-Interpretation der Röntgenkristallanalyse der Kaninchen ALOX15 und neuere Untersuchungen zu allosterischen Effekten durch Dimerisierung zeigten (Choi 2008, Ivanov 2012, 1.2.3.).

1.1.2. Verbreitung von LOXen und LOX-Nomenklatur

1.1.2.1. Verbreitung von LOXen

In 2 der 3 taxonomischen Domänen belebter Natur (Woese 1990) sind LOX-Sequenzen bisher nachgewiesen. Dies betrifft die Domänen Eukarya und Bacteria (Andreou 2009, Oliw 2002, Vogel 2010, Ivanov 2010, Brash 1999). Die 3. Archaea-Domäne galt bisher als frei von LOXen, zumal der für die LOX-Reaktion benötigte Sauerstoff für viele Archaea toxisch ist, die ökologischen Nischen der Extremophilen sind nicht immer zugänglich für atmosphärischen Sauerstoff. Jüngst wurde jedoch im Rahmen einer Datenbanksuche bei aeroben Archaeen eine Protein-Sequenz bei *Halorubrum kocurii* gefunden, die möglicherweise einer LOX-Isoform entspricht (Kühn et al., unveröffentlicht). Die Spezies *Halorubrum kocurii* ist stabförmig, extrem halophil (optimal 3,4 M NaCl in der Kultur), gramnegativ und unbeweglich, die Erstisolierung erfolgte in der Inneren Mongolei, Volksrepublik China (Gutiérrez 2008). Wenn sich die gefundene Sequenz als LOX erweisen sollte, wären alle 3 Domänen des irdischen Lebens mit LOXen versehen.

Evolution brachte nach derzeitigem Wissen LOXen in verschiedenen Prokaryonten (Cyanobakterien und Proteobakterien), einzelligen Protisten (Rot- und Grünalge, Amöben), Pilzen, Pflanzen und Tieren hervor (Abb. 1.3). Bei den Tieren ist ein weites Spektrum von vergleichsweise einfach strukturierten mehrzelligen Tieren wie *Trichoplax adhaerens* vom Stamm der Scheibentieren (Placozoa) bis hin zu Primaten und unserer eigenen Spezies vertreten. Einige der betroffenen Spezies dienen zugleich als Modelorganismen, u.a. der Zebrafisch, welcher für Entwicklungsstudien von Chordaten und deren Genfunktion vielfältig Verwendung findet (Piasecka 2013). Ob im Laufe der Evolution eine primitive Ur-LOX existierte, aus der sich die LOXen höherer Spezies entwickelten haben oder ob es durch horizontalen Gentransfer (Lang 2008, Porta 2001) dazu gekommen ist, dass LOXen aus höher entwickelten Organismen in niedere Lebensformen eingeführt wurden, kann heute noch nicht mit Sicherheit geschlossen werden (Ivanov 2010). Cyanobakterien zählen jedenfalls zu den ältesten Lebewesen des Planetens, zumal sie mit ihrer Sonderfunktion der oxygenen Photosynthese höheres Leben erst ermöglichten. Möglicherweise nahm hier die LOX-Entwicklung ihren Ursprung.

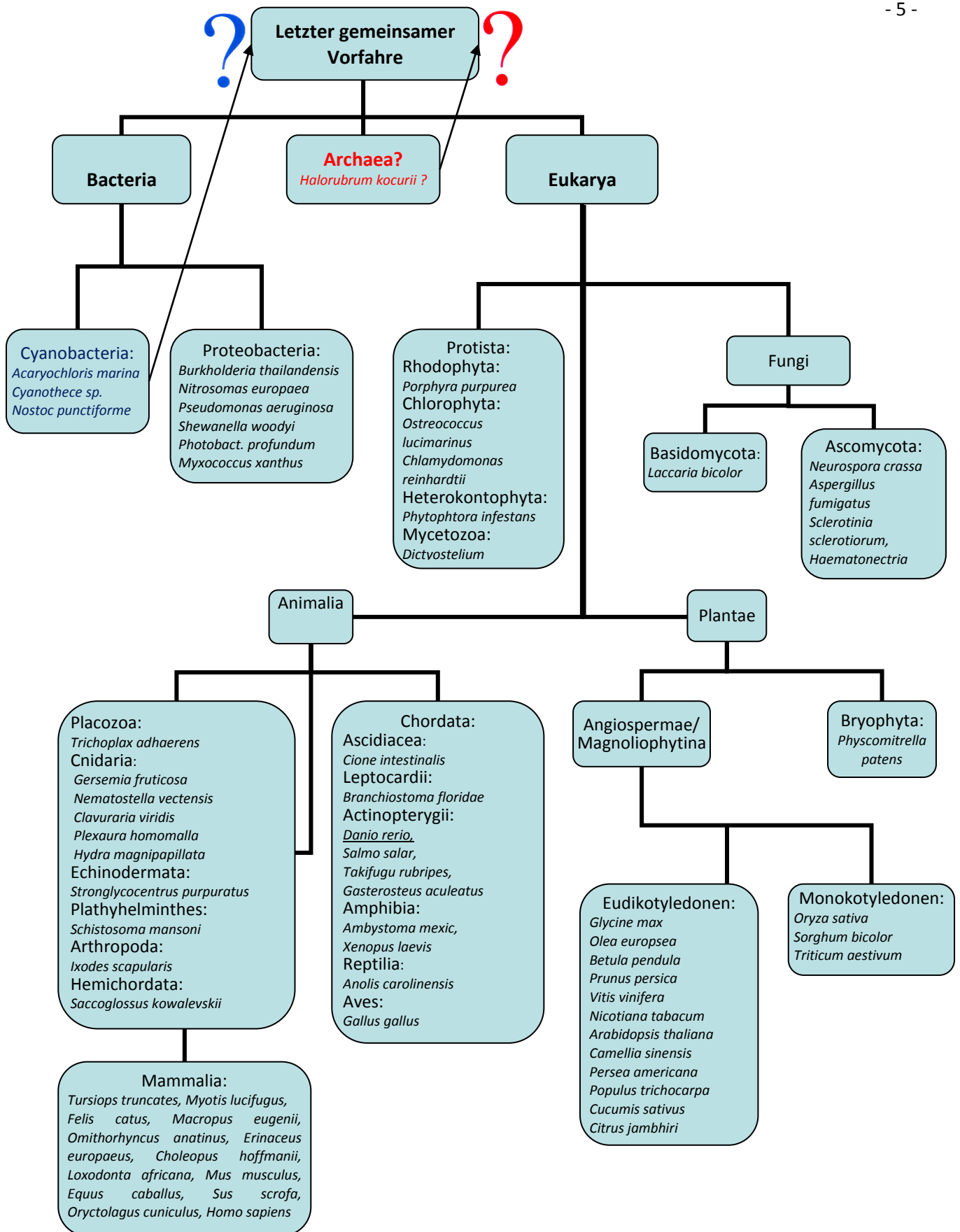


Abb. 1.3: Auszug von Organismen mit LOX-Sequenzen aus 2 Domänen und 5 Königreichen der belebten Natur. Bei der Domäne der Archaea besteht erst jüngst der Verdacht, LOX-Sequenzen zu enthalten (Kuhn et al., unveröffentlicht). Womöglich hat sich die Vielfalt der rezenten LOX-Isoformen aus Cyanobakterien entwickelt (blaues Fragezeichen), vielleicht aber auch aus den bisher fraglichen LOXen von Archaea (rotes Fragezeichen). Modifiziert nach Ivanov 2010.

LOX exprimierende Einzeller enthalten in aller Regel nur ein oder zwei miteinander verwandte LOX-Gene. Im Gegensatz dazu enthalten höher entwickelte Organismen eine Vielzahl unterschiedlicher LOX-Genen deren Verwandtschaftsgrad manchmal eher niedrig ist. Beim Menschen wurden beispielsweise 6 funktionelle LOX-Gene identifiziert und identische Verhältnisse liegen bei anderen Primaten (Bonobo, Schimpanse, Gorilla, Orang Utan) vor. Das Zebrafischgenom enthält 7 LOX- Gene (3.1.1.). Bei einigen Pflanzen (Reis, Sojabohne) gibt es bedeutend mehr LOX-Gene, wobei deren Funktion unklar ist. Diese Sequenzdaten deuten darauf hin, dass die Anzahl der LOX-Gene nicht als Maß für den evolutionären Entwicklungsstand eines Organismus angesehen werden kann. Es bleibt allerdings die Frage zu klären, zu welchem Zweck eine derartige biologische Vielfalt entstanden ist.

1.1.2.2. LOX-Nomenklatur

Die Nomenklatur der LOX-Isoformen ist vielschichtig und teilweise verwirrend. Tierische Lipoxygenasen wurden ursprünglich nach ihrer Positionsspezifität der Oxygenierung von Arachidonsäure eingeteilt in 5-LOX, 12-LOX etc. Dabei kennzeichnet die Zahl im Namen die Nummer des Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure, an welches gemäß des Reaktionsmechanismus (Abb. 1.1) der molekulare Sauerstoff eingeführt wird. Diese Arachidonsäure-basierte Nomenklatur ist zwar einfach und allgemein verständlich, hat aber eine Reihe von Nachteilen. Sie ist zum einen nicht eindeutig, d.h. verschiedene LOXen können in verschiedene Klassen (z.B. 12/15-LOXen) eingeordnet werden. Zum anderen berücksichtigt diese Nomenklatur nicht evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen LOX-Isoformen. Für Säugetiere wurde unter Berücksichtigung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen eine Einteilung in 4 Subfamilien, 12/15-LOX, 5-LOX, Plättchen-Typ 12-LOX und Epidermis-Typ-LOX vorgeschlagen, die aber für niedere Tierformen nicht anwendbar ist. Auch bei Pflanzen stoßen die tierischen Klassifizierungskonzepte an ihre Grenzen, weil Arachidonsäure kein verbreitetes Substrat der Pflanzen-LOXen darstellt und Pflanzen beispielweise keine Blutplättchen besitzen, um als Plättchen-Typ-LOX eingeteilt zu werden. Um dem Abhilfe zu schaffen wurden pflanzliche LOX nach der jeweiligen Pflanze ihrer Entdeckung benannt und teilweise schlicht durchnummeriert wie bei der Sojabohne LOX L-1, L-2 etc. Andere Namensgebungen basieren auf dem jeweiligen Gewebe-Typ der Erstbeschreibung oder auf der Stereospezifität der Reaktionsprodukte. Zusammenfassend muss man sagen, dass es derzeit noch kein allgemeingültiges Konzept zur Klassifizierung von LOXen gibt und auch keine einheitliche LOX-Nomenklatur vorliegt. Für Säugetier-LOXen hat es sich in den letzten Jahren bewährt, die einzelnen Isoenzyme mit den Namen der entsprechenden

menschlichen Gene (ALOX15, ALOX12, ALOX15B, ALOX12B, ALOX5, ALOXe3, ALOXe12) oder murinen Gene (alox15, alox12, alox15b, alox12b, alox5, aloxe3, aloxe12) zu kennzeichnen, wenn immer dies eindeutig möglich ist.

1.1.3. Biologische Bedeutung verschiedener LOX-Isoformen

LOXen besitzen bei tierischen Organismen eine große Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen, die v.a. Entzündungsreaktionen, Zelldifferenzierung und Zellwachstum zuzuordnen sind. Auffallend ist dabei, dass die Reaktionsprodukte unterschiedlicher LOX-Isoformen bei vielen Anwendungsgebieten sowohl wünschenswerte Effekte als auch unerwünschte Effekte erzeugen.

Bei der Atherogenese (1.1.3.2) sollen LOXen durch mindestens 3 Mechanismen beteiligt sein, Bildung von bioaktiven Mediatoren, Modifizierung von Lipoproteinen sowie durch Regulierung der Genexpression (Kuhn 2007, 2005). Paradoxerweise bewirkt eine Hochregulierung entsprechender LOX-Gene bei Kaninchen einen vasoprotektiven Effekt, während ein vasoprotektiver Effekt bei Mäusen durch eine Herunterregulierung der entsprechenden LOX-Gene erreicht wird.

Analog zu diesem scheinbar widersprüchlichen Phänomen stellen sich LOXen in der Kanzerogenese dar. Einerseits nehmen sie Einfluss auf Progression von Karzinomen, andererseits vermögen LOXen die Tumorgenese zu supprimieren (1.1.3.4.).

Vergleichbar entgegengesetzte Effekte wurden auch für die Pathogenese von Entzündungsreaktionen beschrieben, da LOXen sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen besitzen (1.3.1.). Diese Überlegungen führten jüngst zur Überprüfung der Möglichkeit, die proinflammatorische Maus alox5 durch gezielte Verkleinerung ihrer Substratbindungstasche zur 15-Lipoxygenierung zu führen, so dass vermehrt antiinflammatorische Reaktionsprodukte entstehen (Hofheinz 2013).

Generell bestehen mannigfaltige Überlegungen, wie durch Beeinflussung der LOX-Aktivität ein anderes Muster von lokalen Gewebsmediatoren bei verschiedenen Krankheitsbildern medizinisch relevant sein könnte (Di Gennaro 2012, Haeggstrom 2010). Ein konkretes Anwendungsbeispiel stellt das Medikament Zileuton dar, welches den 5-LOX-Stoffwechselweg inhibiert (Berger 2007). Von dieser Hemmung profitieren Patienten mit Asthma bronchiale, Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung, Infekten der oberen Atemwege sowie Patienten mit dermatologischen Krankheitsbildern. Zahlreiche weitere Pharmaka, die

direkt auf LOXen oder auf die LOX-Aktivität modulierende Biomoleküle wirken, sind Gegenstand aktueller Forschung (Hofmann 2013, Schaible 2013).

LOXen sind mittlerweile thematisch in sämtlichen medizinischen Disziplinen vertreten, so dass im Rahmen dieser Arbeit Schwerpunkte für tierische Organismen zu setzen waren. Eine kurze Darstellung zu der biologischen Bedeutung pflanzlicher und bakterieller LOXen gibt Kapitel 1.1.3.6., darüber hinaus werden zunehmend biotechnologische Anwendungsgebiete für LOXen erschlossen (Hansen 2013, Ivanov 2010).

Gemeinsam ist den meisten Anwendungsmöglichkeiten jedoch der Stoffwechsel von Fettsäure-Derivaten, die als lokale Gewebsmediatoren dienen und vornehmlich in Leukozyten, Blutplättchen oder einigen peripheren Geweben entstehen (Di Gennaro 2012, Abb.1.4). Wenn eine mehrfach ungesättigte Fettsäure wie Arachidonsäure aus den zellulären Phospholipiden freigesetzt wird, konkurrieren theoretisch 3 Enzyme um dieses Substrat: i) Cyclooxygenasen (COXen), ii) LOXen und iii) Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen. Im Rahmen dieser Arbeit wird nur der LOX-Stoffwechsel näher betrachtet:

Die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂, im Wesentlichen Gruppe IV der Phospholipasen, Murakami 2011) bildet zusammen mit der 5-LOX und dem 5-LOX-aktivierenden Protein (FLAP) einen Komplex an der Kernmembran. In ruhenden Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten ist dieser Komplex jedoch nicht nachweisbar. Nach Zellaktivierung werden Phospholipase und ALOX5 in Ca²⁺-abhängigen Reaktionen an die Kernmembran transloziert und damit aktiviert. Die genauen Mechanismen der Translokation und der Enzymaktivierung sind noch nicht eindeutig geklärt und auch die genaue Rolle des 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) ist noch nicht eindeutig geklärt. Jedenfalls wird durch die Translokation der cPLA₂ an die Kernmembran Arachidonsäure freigesetzt und durch die 5-LOX zu 5-H(P)ETE oxygeniert (Abb.1.4). Die 5-LOX-Aktivität wird dabei auf mehreren Ebenen reguliert: Intrazelluläre Calcium-Konzentration und das Coactosin Like Protein (CLP) wirken bei der Translokation an die Kernmembran mit, darüber hinaus sind noch ATP/Phosphorylierung, Phosphocholin und FLAP an der Regulierung beteiligt. 5-H(P)ETE wird anschließend über die Leukotrien-A₄-Synthase des Enzyms in das Leukotrien A₄ (LT A₄) als zentrales Zwischenprodukt metabolisiert (Abb. 1.4). Aufgrund seiner Epoxid-Gruppe ist LT A₄ sehr instabil. Es kann enzymatisch durch die LT A₄-Hydrolase in LT B₄ umgewandelt werden, unterliegt aber auch einer nicht-enzymatischen Hydrolyse. Weiterhin kann LT A₄ mit Glutathion konjugiert werden, wobei durch die Katalyse der LT C₄- Synthase LT C₄ entsteht. Alternativ kann LT A₄ durch verschiedene LOXen zu Lipoxin A₄ (LX A₄) verstoffwechselt werden. LT C₄ wiederum kann als Vorläufer für LT D₄ und LT E₄ fungieren. LT C₄ und seine zuletzt genannten

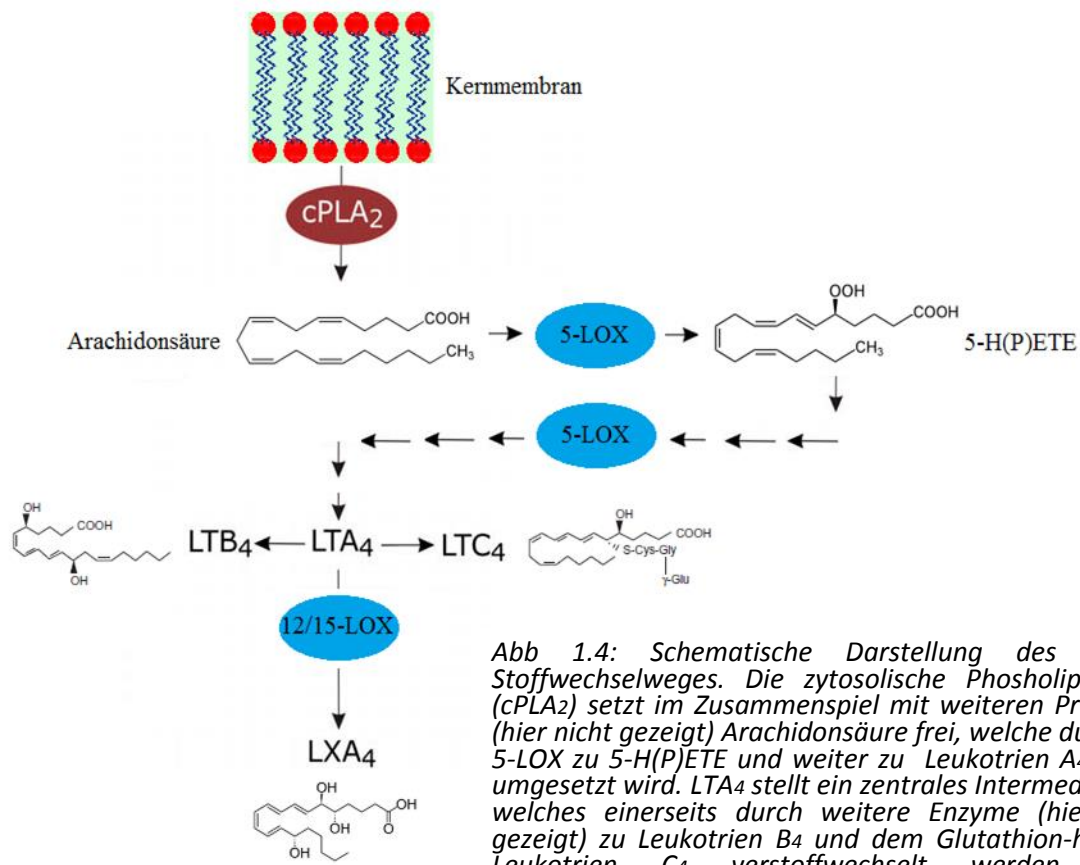


Abb 1.4: Schematische Darstellung des 5-LOX-Stoffwechselweges. Die zytosolische Phospholipase A2 (cPLA2) setzt im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen (hier nicht gezeigt) Arachidonsäure frei, welche durch die 5-LOX zu 5-H(P)ETE und weiter zu Leukotrienen A₄ (LTA₄) umgesetzt wird. LTA₄ stellt ein zentrales Intermediat dar, welches einerseits durch weitere Enzyme (hier nicht gezeigt) zu Leukotrienen B₄ und dem Glutathion-haltigen Leukotrienen C₄ verstoffwechselt werden kann, andererseits durch verschiedene LOXen zu Lipoxin A₄ (LXA₄). Modifiziert nach Di Gennaro 2012.

Derivate werden aufgrund des Vorhandenseins eines Cystein-Restes auch als Cystein-haltige Leukotriene (Cys-LTs) bezeichnet. Diese Nomenklatur ist besonders pragmatisch, da es entsprechende Zelloberflächenrezeptoren (CysLT-Rezeptortyp 1 und 2) sowie weitere Rezeptoren (Di Gennaro 2012) für Cystein-haltige Leukotriene gibt und die biologische Funktion Cystein-haltiger Leukotriene abweicht von der Funktion nicht Cystein-haltiger Leukotriene wie LT B₄ (1.1.3.1., Tab 1.1). LT B₄ wird vor allem von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen ausgeschüttet, während die Cys-LTs vornehmlich von Makrophagen/Monozyten, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und dendritischen Zellen synthetisiert werden. Im Gegensatz zu den Leukotrienen wirkt Lipoxin A₄ antiinflammatorisch, da es mit proinflammatorischen Mediatoren (z.B. LT B₄ oder Cathelicidin LL-37) um deren Rezeptoren (FPR2/ALX, BLT1) konkurriert (Wan 2011).

Durch die Aktivität von 12-lipoxygenierenden Enzymen kann noch eine andere Klasse von Lipid-Mediatoren entstehen, die Hepoxiline (HX) genannt werden (Krieg 2013, Epp 2007). Das primäre Arachidonsäureoxidationsprodukt solcher Enzyme, die 12-H(P)ETE, wird dazu wie

üblich intrazellulär zu 12-HETE reduziert und anschließend zu einem HX isomerisiert. Auf welche Weise die Isomerisierung genau erfolgt ist nicht gänzlich bekannt, offenbar fungieren einige LOXen wie die epidermale LOX-3 (eLOX-3) auch als Hepoxilin-Synthase (Krieg 2013). Durch eine Isomerisierung entstehen jedenfalls die Hydroxy-Epoxid-Derivate HX A3 und HX B3, welche im Gegensatz zu den HETE-Verbindungen keine konjugierten Doppelbindungen mehr besitzen sondern eine hochreaktive Epoxid-Gruppe.

1.1.3.1. LOXen bei der Entzündungsreaktion

Wie bei 1.1.3. erwähnt, sind LOXen in Leukozyten weit verbreitet, generell stellen Leukozyten bekannterweise die Hauptkomponente des angeborenen Immunsystems dar. Daher sind LOX-Reaktionsprodukte maßgeblich beteiligt an der primären Immunantwort bei zellulärem Stress, Verletzung und der Exposition gegenüber Pathogenen (Di Gennaro 2012). Darüber hinaus sind die LOX-Metabolite auch am adaptiven Immunsystem beteiligt. Tab. 1.1 liefert einen Überblick über die weitreichenden Effekte der Leukotriene im lokal entzündlichen Milieu aseptischer und septischer Inflammation (Di Gennaro 2012).

Effektor-Zelltyp	Leukotrien B4	Cys-Leukotriene
Neutrophiler Granulozyt	Chemotaxis, Aggregation, Adhärenz, Aktivierung, Degranulierung	--
Mastzelle	Rekrutierung unreifer Mastzellen	Produktion von IL-5, IL-8, TNF- α , MIP-1 β
Dendritische Zelle	Chemotaxis, Migration zu Lymphknoten	Migration zu Lymphknoten
Monozyt/Makrophage	Produktion von IL-6, MCP-1, TNF- α	Produktion von MCP-1, TNF- α , MMP-9
Lymphozyt	T-Zell-Rekrutierung von lymphatischem Gewebe nach peripher, Expression von CD23, CD54 und CD105 in B-Lymphozyten	Sensibilisierung auf Allergene bei entzündlichen Prozessen der Lunge, Th2-Immunantwort
Glatte Muskelzelle	Proliferation, Migration	Vasospasmus, Bronchospasmus
Endothel	--	Permeabilitätserhöhung, erhöhte Mikrozirkulation, Hochregulation von Adhäsions-Proteinen

Tab 1.1: Übersicht über die biologische Wirkung von Leukotrien B4 und der Cystein-haltigen Leukotriene in verschiedenen Effektorzellen. IL= Interleukin, MCP-1= monocyte chemoattractant protein-1, TNF- α = Tumornekrosefaktor α , MIP-1 β = Macrophage inflammatory protein-1 β , MMP-9= Matrix metalloproteinase -9.

1.1.3.2. LOXen bei Atherosklerose

Atherosklerose ist das wesentliche histopathologische Korrelat für jene Zivilisationskrankheiten von westlich geprägten Gesellschaften, die klassischerweise mit Makroangiopathie einhergehen: Koronare Herzkrankheit/Myokardinfarkt, Schlaganfall sowie periphere Verschlusskrankheit. Bei

der Atherogenese sollen LOXen durch mindestens 3 Mechanismen beteiligt sein, die Einfluss auf eine wesentliche Komponente der Atherogenese, den Umbau der Gefäßwände (vascular remodeling), ausüben: i) Bildung von bioaktiven Mediatoren, ii) Modifizierung von Lipoproteinen sowie iii) durch Regulierung der Genexpression (Kuhn 2007). Der histologische Fokus der Pathogenese ist die Wandung von arteriellen Blutgefäßen, wobei glatte Muskelzellen (SMC), Endothelzellen (EC) und Zellen des Immunsystems eine besondere Rolle spielen:

- (I) Bioaktive Mediatoren: 15-HETE steht jüngst unter Verdacht, die Integrität und Permeabilität von Gefäßwänden zu schädigen, indem die tight-junctions als Zell-Zell-Verbindungen gelöst und die Adhäsion von Makrophagen gefördert wird (Kundumani-Sridharan 2013). Auf diese Weise könnte es bei der Atherogenese zur Plaquebildung kommen. 12/15-LOX-Metabolite bewirken ebenso Mitose-fördernde Kaskaden in EC und SMC durch Bahnung der Signalwege von mitogen-activated protein-Kinasen (MAP-Kinasen, Rao 1994, Setty 1987) und des epidermal growth factor (EGF, Eling 1994, Hui 1999). Proinflammatorische Stimuli werden über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B, Natarajan 2001) und durch 5-LOX-Aktivität ausgelöst (1.1.3.1., Tab 1.1). 15-HETE stimuliert die Migration von EC, so dass ein Zusammenhang mit Neovaskularisierung anzunehmen ist (Graeber 1990). Die Reaktionsprodukte von 12/15-LOXen führen zur Hypertrophie von SMC (Reddy 2002) und sind außerdem vasomotorisch aktiv (Kuhn 2007). Darüber hinaus besteht eine Verbindung von LOX-Signalwegen und dem NO-Stoffwechsel (O' Donnell 2001, Rubbo 2005). Hohe NO-Spiegel wirken auf verschiedene Weise antiatherogen (Li 2013a). Humane arteriosklerotische Plaques zeigen höhere mRNA-Spiegel für 3 zentrale Proteine der LT B₄-Synthese (5-LOX, FLAP, LT A₄-Hydrolase), verglichen mit gefäßgesunden Kontrollgruppen (Qiu 2006). LT B₄ bewirkt eine Aktivierung und Migration von SMC (Heller 2005) neben den in Tab 1.1 genannten Wirkungen im lokal-entzündlichen Milieu wie Chemotaxis.
- (II) Modifizierung von Lipoproteinen/Biomembranen: 12/15-LOXen vermögen nicht nur freie Fettsäuren zu modifizieren sondern auch Fettsäuren, die in komplexen Bioaggregaten wie Lipoproteinen und Biomembranen inkorporiert sind. Die Bildung von Gefäßwandläsionen beruht auf einer subendothelialen Akkumulation von Makrophagen, die durch überschießende Aufnahme von Cholesterolestern zu Schaumzellen werden

(Kuhn 2005). Die Lipidablagerungen in den Schaumzellen stammen im Wesentlichen aus oxidativ modifizierten Lipoproteinen geringer Dichte (LDL), die über Scavenger-Rezeptoren in die Zellen gelangen, native LDL akkumulieren nicht intrazellulär. Auch Lipoproteine hoher Dichte (HDL) können oxidativ geschädigt werden und damit ihren ursprünglich vasoprotektiven Effekt verlieren (Pirillo 2008).

Für Knock-Out-Mäuse wurde gezeigt, dass die Menge an atherosklerotischen Plaques abnimmt, wenn man das *alox15*-Gen ausschaltet (Cyrus 2001, George 2001). Bei einer Überexpression der *alox15* in EC stieg der Anteil atherosklerotischer Plaques signifikant an (Harats 2000). Im Gegensatz zu letztgenanntem Phänomen bei Mäusen zeigte sich bei transgenen Kaninchen, welche die ALOX15 in Monozyten überexprimieren, ein antiatherogener Effekt (Shen 1996). Möglicherweise beruhen diese widersprüchlichen Daten auf einem Schutz der Maus-Makrophagen durch verminderte Scavenger-Rezeptor Expression und erhöhtem intrazellulären Lipid-Umsatz. Ein 1:1 Rückschluss auf den Menschen ist ohnehin nicht zulässig, jüngere Studien zeigten jedoch, dass eine erhöhte Konzentration der ALOX15B in Läsionen der hirnversorgenden Arteria carotis mit einer Zunahme an zerebrovaskulären Ereignissen einhergeht (Gertow 2011).

- (III) Regulierung der Genexpression: Neben den Transkriptionsfaktoren EGF und NFκB, die durch LOX-Metabolite reguliert werden (1.1.3.2., Abschnitt I), ist oxidativer Stress ein Faktor der Genexpressionsregulation (Li 2013b). LOX-Aktivität fördert den oxidativen Stress einer Zelle, zumal die entstehenden Hydroperoxyverbindungen reduzierende Valenzen der Zelle verbrauchen oder radikalische Kettenreaktionen induzieren, die zu einer Erhöhung des oxidativen Potentials führen. Auf diese Weise könnte die Expression redoxsensitiver Gene beeinflusst werden (Higashi 2005). Dies betrifft eine große Anzahl von Proteinen (Kuhn 2007): extrazelluläre Bindegewebskomponenten (Kollagen, Lamine, Fibuline, Fibronectin, Aggrecan, Claudine), extrazelluläre Proteinase (Serpine, Matrix-Metalloproteasen), Gewebshemmer von Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren wie EGF und deren Rezeptoren sowie Adhäsionsmoleküle. Veränderungen der Genexpressionsmuster wurden auch beobachtet, wenn humane EC mit ALOX15 transfiziert werden (Viita 1999, Wolle 1996). Beim entgegengesetzt konstruierten Versuchsaufbau (Expressionsunterdrückung der ALOX15) wurden global gegenläufige Effekte beobachtet, wobei sich die einzelnen Gene in ihrer Regulationskinetik voneinander unterscheiden (Li 2005).

Darüber hinaus wird die Entstehung von Bauchortenaneurysmen durch Leukotriene beeinflusst. LTB₄ könnte durch Chemotaxis Effektorzellen des Immunsystems rekrutieren (Houard 2009), während den CYS-LTs die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix zugeschrieben wird (Di Gennaro 2010, Di Gennaro 2012).

1.1.3.3. LOXen beim Asthma bronchiale

Cys-LTs spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Asthma bronchiale (Duroudier 2009, 1.1.3.1. Tab 1.1). Sie bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur in der Wandung der Bronchien und erhöhen die Gefäßpermeabilität (Haeggstrom 2012, Walch 2000). Letztlich kommt es zu einem strukturellen Umbau des Bronchialsystems mit Vermehrung der Becherzellen und somit vermehrter Schleimproduktion sowie zum fibrotischen Umbau des Lungenbindegewebes (Holgate 2003). Eine verminderte Synthese von LTB₄ wurde durch pharmakologische Hemmung der LTA₄-Hydrolase erreicht, dies reduzierte die Rekrutierung von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten und verminderte auf diese Art den inflammatorischen Prozess (Rao 2010). LTB₄ führt ferner zur Adhäsion von polymorphkernigen Granulozyten am Gefäßendothel (Gimbrone 1984) und fördert deren Wanderung durch die Gefäßwand (Nohgawa 1997). Neben diesen Effekten, die auf 5-Lipoxygenierung beruhen, werden auch für Reaktionsprodukte der ALOX15 proinflammatorische Wirkungen beschrieben. So induziert z.B. 15-HETE eine Bronchokonstriktion und die Ausbildung eines Gewebeödems (Nasser 2002).

Den proinflammatorischen Metaboliten aus dem LOX-Stoffwechsel stehen die antiinflammatorischen Lipoxine gegenüber. Sie entstehen durch interzelluläre Wechselwirkung und ihre Bildung wird mit dem Beginn der Entzündung initiiert (Maderna 2009, Serhan 2005a, Serhan 2005b). Lipoxine bewirken eine Hemmung der Chemotaxis und der Transmigration von Leukozyten aus der Blutbahn ins Lungenparenchym (Serhan 1995, Lee 1989). Ferner wird die Gefäßpermeabilität herabgesetzt (Takano 1998). Auch andere Funktionen der Leukotriene werden antagonisiert. Durch Stimulation der Migration von M2-Monozyten fördern Lipoxine den Abbau apoptotischer Granulozyten (Godson 2000, Maddox 1996). Der fibrotische Umbau des Lungenparenchyms wird durch verringerte Transmission des platelet-derived growth factor (PDGF) begrenzt (Rodgers 2005).

Cys-LTs scheinen außerdem einen alternativen Weg der allergischen Reaktion gegenüber Hausstaubmilben einleiten zu können, der neben den klassischen IgE- und TH2-Lymphozyten-vermittelten Mechanismen besteht (Di Gennaro 2012). Bei diesem alternativen Weg wird eine Dectin-2-Lectin-Rezeptor-CysLT-Achse postuliert (Barrett 2011), um TH2-Lymphozyten zu

stimulieren, außerdem scheint die Affinität von LTE₄ zu dem Blutplättchen P2Y₁₂-Rezeptor bei der Maus die Inflammation zu bahnen (Di Gennaro 2012, Paruchuri 2009).

1.1.3.4. LOXen bei der Kanzerogenese

LOXen sind an der Pathogenese verschiedener maligner Erkrankungen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch nur auf 3 besonders bedeutsame Malignome eingegangen werden: i) Prostatakarzinom als dem häufigsten Karzinom des Mannes, ii) Mammakarzinom als dem häufigsten Karzinom der Frau, iii) Kolorektalen Karzinom als häufigstem Karzinom in der Geschlechtergesamtheit (Robert-Koch-Institut 2008). Ähnlich wie bei anderen Anwendungsgebieten (1.1.3.2., 1.1.3.3.) zeigen LOXen ambivalente Eigenschaften, so dass Progression von Neoplasien als auch Regression beobachtet wurden.

Beim Prostatakarzinom scheinen ALOX15-Metabolite der Docosahexaensäure die Proliferation bereits in niedriger Konzentration zu hemmen (O'Flaherty 2013a), was mit der Regulierung des peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in Zusammenhang stehen könnte. Umgekehrt vermag die Aktivität der ALOX15B die Angiogenese und Proliferation zu hemmen, indem der vascular endothelial growth factor-Signalweg (VEGF) unterbrochen wird (Tang 2009). Daher ist es nicht verwunderlich, dass gesundes Epithel des Prostatagewebes die ALOX15B exprimiert, während entartete Zellen diese Fähigkeit verloren haben. Auch ALOX12 soll beim Prostatakarzinom nachteilige Effekte besitzen (Dilly 2013). Ein Anstieg der 12(S)-HETE-Konzentration induziert die Überexpression der matrix metalloproteinase-9 (MMP9) und eine Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/ Proteinkinase B-Signalweges (PI3K/AKT) sowie des NF κ B-Weges. Letztgenannte Signalwege könnten bei der Migration von Endothelzellen mitwirken und somit zur Vaskularisierung der entarteten Zellen beitragen.

Beim Kolorektalen Karzinom wird der ALOX15 ein positiver Effekt zugeschrieben (Xiangsheng 2012). Der Theorie nach soll dieser Effekt auf einer inversen Beziehung zwischen ALOX15 und Cyclooxygenase-2 (COX-2) beruhen. Die Aktivität der ALOX15 vermindert die Expression von IL-1 β - und TNF- α , so dass der nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells- Signalweg (NF κ B) herunterreguliert wird. Dies hemmt die Expression der prokarzinogenen COX-2.

Die ALOX5 scheint das Wachstum von Kolorektalen Karzinomen zu fördern (Cheon 2012, Wasilewicz 2010). Bei immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine erhöhte

Expression des Enzyms in adenomatösen Polypen (Präkanzerose) und bei vollständig ausgeprägten Karzinomen. Durch Hemmung der 5-LOX ließ sich eine konzentrationsabhängige Minderung der Zellproliferation erzielen (Melstrom 2008). Für die Pathogenese Kolorektaler Karzinome ist eine Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben, die sich in einer Zeitspanne von etwa 10 Jahren vollzieht. Neben anderen präventiven Maßnahmen sollen künftig synthetische und natürliche Pharmaka, die eine Wirkung auf den LOX-Weg ausüben, zur Prävention dieser malignen Erkrankung Anwendung finden (Rao 2012).

Beim Mammakarzinom wurde jüngst ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Arachidonsäure und der zytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) einerseits sowie der Aktivität des mammalian target of rapamycin- (mTOR-) und des vascular endothelial growth factor-Signalweges (VEGF) andererseits gefunden (Wen 2013). Durch zuletzt genannte Signalwege erhöht sich die Proliferation und Angiogenese am Ratten-Modelorganismus. Es konnte ferner gezeigt werden, dass dieser Effekt durch LOX-Aktivität und nicht durch COX-Aktivität verursacht wird. Darüber hinaus ist die Bildung von 13-Hydroxyoctadecadiensäure (HODE) durch die ALOX15 ein Marker für eine infauste Prognose des Mammakarzinoms (O'Flaherty 2013b).

5-LOX-Metabolite vermitteln offenbar zelluläre survival-Strategien via protein kinase C-epsilon-Transmission (PKC ϵ), so dass eine Inhibition der 5-LOX die Apoptose fördert (Sarveswaran 2013). Bezüglich der 5-LOX ist auch bei mehreren malignen Entitäten wie dem Prostatakazinom, Pankreaskarzinom und dem Kolorektalen Karzinom eine unerwünschte Wirkung beschrieben (Hofmann 2013, Steinhilber 2010). Diese Evidenz ergebe sich aus folgenden Beobachtungen:

In entarteten Zellen kommt es zu einer Überexpression der 5-LOX, Leukotriene fördern die Proliferation und aktivieren anti-apoptotische Signalwege. Pharmakologische Hemmung der 5-LOX induziert ferner den Untergang entarteter Zellen, das Ausschalten der ALOX5 und/oder der Leukotrien-Rezeptor-Expression vermindert das Wachstum der betroffenen Zellen. Die vielfältigen Einflüsse der 5-LOX bedingen das pharmakologische Interesse an diesem Enzym (Hofmann 2013, Schaible 2013).

1.1.3.5. LOXen bei der epidermalen Differenzierung

In der Epidermis tragen LOXen wesentlich zur Barrierefunktion bei, wie knock-out-Versuche bei der Maus nachweisen konnten (Krieg 2013, Epp 2007). Beim Menschen kommt es

wohl funktionell zu einem vergleichbaren knock-out-Szenario, wenn bei der dermatologischen Erkrankung der Ichthyose in ihren autosomal-rezessiven congenitalen (ARCI) Formen die Gene der ALOX12B und der epidermalen LOX-3 (eLOX-3) keine aktiven Transkripte erzeugen (Osório 2013). Andere Epithelien wie die Cornea bedürfen der LOX-Metaboliten zur Funktionswiederherstellung nach Verletzung (Kenchegowda 2010).

1.1.3.6. Sonstige Funktionen von LOXen

Es wird zunehmend deutlich, wie viele physiologische und pathophysiologische Funktionen alleine bei tierischen Organismen mit LOXen zusammenhängen. Daher können im Rahmen dieser Arbeit nur stichprobenartig Beschreibungen erfolgen, eine umfassende Darstellung würde ein separates Promotionsthema ergeben.

Die *alox15* scheint bei Mäusen die Spermatogenese zu beeinflussen (Moore 2010). So zeigten entsprechende knock-out-Mäuse eine fehlerhafte Spermatogenese mit morphologisch veränderten Spermatozoen.

In dieser Arbeit wurden molekulare Aspekte der Zebrafisch LOX1 untersucht (3.2.). Offenbar ist dieses Enzym essentiell für die regelrechte embryonale Entwicklung des Zebrafisches, da knock-out-Versuche zu Fehlbildungen des Gehirns, der Augen, des Schwanzes sowie zu Ödemen des Perikards und des Dottersacks führten (Haas 2011, 4.1.2.).

Weitere Anwendungsgebiete ergaben sich in jüngerer Vergangenheit beim neuropathischen Schmerz (Starowicz 2013), bei Endometriose (Canny 2013), darüber hinaus bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington (Rao 2011, Kumar 2011, Wang 2011) sowie beim metabolischen Syndrom und Diabetes mellitus als einer der Komponenten des metabolischen Syndroms (Martínez-Clemente 2011, Dobrian 2011).

Bei Pflanzen besteht eine ähnliche Vielfalt der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen wie bei Tieren. Im Wesentlichen sind pflanzliche LOXen beteiligt an der Produktion von Phytohormonen, der Bereitstellung von Samen, der Seneszenz von Pflanzen, Geschmacksentwicklung sowie an der Abwehr von Pathogenen und bei der Regeneration nach Verletzung und Stress (Hu 2009, Feussner 2002, Porta 2002).

Über die biologische Bedeutung von LOXen bei Bakterien ist hingegen deutlich weniger bekannt. Eine mögliche Funktion könnte in der Beeinflussung der Membranfluidität liegen. Der Anteil an ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran könnte

einen wichtigen Faktor für ihre dynamische Integrität und somit für die Kolonisierung unterschiedlicher Lebensräume bei unterschiedlichen physikalischen Bedingungen darstellen (Hau 2007, Vance 2004, Wasternack 2002).

1.2. Struktur-Funktionsbeziehung bei Lipoxygenasen

Bis auf wenige Ausnahmen (LOXen bei einigen Einzellern und Korallen) bestehen LOXen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich in eine N-terminale β -Faltblatt-Domäne und eine C-terminal α -helikale Domäne faltet (Ivanov 2010). Es sind also prinzipiell monomere Enzyme. In jüngerer Vergangenheit jedoch konnte für die Kaninchen ALOX15 nachgewiesen werden, dass dieses Enzym in wässriger Lösung in einem Monomer-Homodimer-Gleichgewicht vorliegt. Die Dimerisierung wird in Gegenwart von Fettsäure-Liganden stabilisiert und induziert eine Konformationsänderung in beiden Monomeren (Ivanov 2012). Für die humane ALOX5 wurde ebenfalls eine Dimerisierung beschrieben (Häfner 2011), ebenso für die Weichkorallen *Gersemia fruticosa* 11R-LOX (Eek 2012).

Die verschiedenen tierischen LOX-Isoformen bestehen aus ca. 680 ± 20 Aminosäuren. Pflanzen-LOXen sind deutlich größer, die Sojabohnen LOX-1 besteht beispielsweise aus 839 Aminosäuren und war historisch gesehen auch die erste LOX, deren Kristallstruktur aufgeklärt wurde (Boyington 1993, Minor 1996). Derzeit sind in der PDB Datenbank die Kristallstrukturen von 32 LOXen hinterlegt, wobei für bestimmte LOX-Isoformen mehrere Varianten aufgeführt sind (mit oder ohne Substrat, unterschiedliche destabilisierende Sequenzen, Mutanten etc., www.pdb.org, Berman 2000, Zugriff am 23.6.2013). Weiterhin gibt es für die Kaninchen ALOX15 eine Lösungsstruktur, die mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung erstellt wurde (Ivanov 2010). An dieser Stelle soll sich jedoch auf die Struktur der Kaninchen ALOX15, Schweine ALOX15, der humanen ALOX5 und der Weichkoralle *Gersemia fruticosa* 11R-LOX beschränkt werden. Die Kaninchen ALOX15 ist besonders ausführlich untersucht (Choi 2008, Boyington 1993, Minor 1996, Vogel 2010, Borngraber 1996, Borngraber 1999, Sloane 1991, Ivanov 2011, Walther 2002), die Schweine ALOX15 ist die derzeit aktuellste 12-lipoxygenierende LOX mit aufgeklärter Röntgenstruktur (Xu 2012). Die humane ALOX5 ist eine der medizinisch relevantesten LOX-Isoformen und die Arbeiten zur Weichkorallen *G.fruticosa* 11R-LOX sind aktuell, berücksichtigen allosterische Effekte ebenso wie funktionelle Untersuchungen (Eek 2012).

1.2.1. Strukturelle Basis der LOX-Katalyse

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass es für unterschiedliche LOX-Isoformen unterschiedliche Erklärungsmodelle bezüglich ihrer Positions- und Stereospezifität gibt. Ein universelles Erklärungsmodell blieb bisher verborgen, ebenso ist es nicht möglich, allein anhand struktureller Daten wie der Kristallstruktur die entsprechenden Reaktionsprodukte mit Sicherheit vorherzusagen. Im Folgenden sollen einige Erklärungsmodelle näher vorgestellt werden, die sich bei einer Vielzahl von LOXen bewährt haben.

1.2.2. Strukturelle Grundlage der Reaktionsspezifität von LOXen

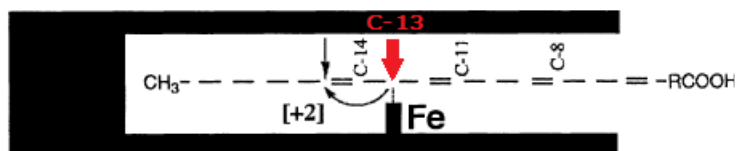
Die Reaktionsspezifität einer beliebigen LOX-Isoform setzt sich aus der Positionsspezifität und der Stereospezifität zusammen. Die Positionsspezifität beschreibt die Position der Sauerstoffinsertion auf dem Kohlenwasserstoff-Rückgrat des Substrates (1.1.1.), so dass oftmals die Namensgebung einer LOX von ihrer Positionsspezifität abhängt (1.1.2.2.). Die Stereospezifität hingegen beschreibt die räumliche Anordnung der Sauerstoffinsertion auf dem Kohlenwasserstoff-Rückgrat des Substrates nach der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention (CIP-Konvention, [RS]-System).

1.2.2.1. Determinanten der Positionsspezifität

Es liegen unterschiedliche Auffassungen vor, wie Fettsäuren in der Substratbindungstasche von LOXen ausgerichtet und gebunden werden. Ein gebräuchliches Modell, welches die Positionsspezifität von 12/15-LOXen erklärt, ist das erstmals am Kaninchenenzym beschriebene Triadenkonzept (Borngräber 1999, Vogel 2010). Bei diesem Konzept bilden drei kritische Aminosäuren, Phe-353 (Borngräber I-Determinante), Ile-418 (Sloane-Determinante) und Ile-593 (Borngräber II-Determinante), den Boden einer stiefelförmigen Substratbindungstasche (1.2.3.), in die das Substrat mit dem Methylende der Fettsäure (ω -Ende) voran hineingleitet. Arg-403 auf der Proteinoberfläche interagiert dem Modell nach mit der Carboxyl-Gruppe der Fettsäure. Durch ortsgerichtete Mutagenese an den genannten Primärdeterminanten konnte ein Zusammenhang zwischen dem Volumen der Bindungstasche und der Position der Sauerstoffinsertion in das Kohlenwasserstoff-Rückgrat der Fettsäure hergestellt werden. Wurden die kritischen Determinanten durch Aminosäuren mit kleineren Seitenketten ausgetauscht, vergrößerte sich das Volumen der Bindungstasche, so dass das Substrat tiefer in die Tasche eindringen konnte. Auf diese Weise rückte C13 weiter vom Eisen weg, während C10 dichter an das Eisen heran gelangte, so dass eine

Wasserstoffabstraktion (Abb. 1.5) vom C10 wahrscheinlicher ist. Diese veränderte Orientierung des Fettsäuremoleküls favorisiert eine Fettsäureoxygenierung an C12. Umgekehrt führte eine Vergrößerung der Aminosäurereste bei einer 12-lipoxygenierenden ALOX15 zu einer Verkleinerung der Bindungstasche und somit zu einer vorrangigen Oxygenierung an C15.

15-LOX



12-LOX

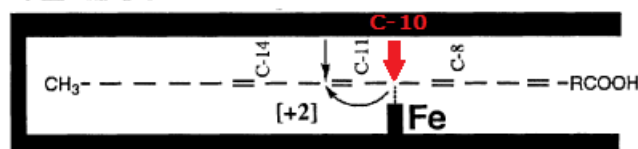


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Volumenhypothese von 12/15-LOXen. Je tiefer die Fettsäure in die Substratbindungstasche eindringen kann, desto weiter erfolgt die Wasserstoffabstraktion (roter Pfeil) in Richtung des Carboxyl-Terminus der Fettsäure. Bei einer 12-LOX (untere Skizze) gelangt das Substrat so tief in die Tasche, dass C10 (rot und roter Pfeil) eine enge Lagebeziehung zum Eisen-Elektronenakzeptor besitzt. Die Sauerstoffinsertion erfolgt dann 2 C-Atome weiter (+2) bei C12 (schwarze Pfeile), so dass 12-H(P)ETE entsteht. Bei einer 15-LOX (obere Skizze) gelangt die Fettsäure nicht so tief in die Tasche, so dass die Wasserstoffabstraktion von C13 erfolgt und 15-H(P)ETE entsteht. Modifiziert nach Walther 2001.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Volumenhypothese erarbeitet. Diese Hypothese, die nicht nur für die Kaninchen ALOX15 sondern für eine Reihe anderer ALOX15 Isoformen und für die humane ALOX12 anwendbar ist (Sloane 1995, Sloane 1991, Vogel 2010, Burger 2000, Watanabe 1993, Suzuki 1994) besagt, dass 15-lipoxygenierende ALOX15 Isoformen an den Positionen der Triadendeterminanten große Aminosäurereste haben. Im Gegensatz dazu, weisen 12-lipoxygenierende ALOX15 Isoformen kleinere Resten an diesen Positionen auf. ALOX15 Isoformen können grundsätzlich sowohl 12-H(P)ETE als auch 15-H(P)ETE bilden. Quantenmechanische Berechnungen (Toledo 2010) zur Kaninchen ALOX15 ließen vermuten, dass in den Substratbindungstaschen der ALOX15 Isoformen generell ausreichend Platz sei für solche Verschiebungen der Fettsäure-Doppelbindungen, zumal mehrfach ungesättigte Fettsäuren äußerst flexibel sind. Nach diesen Moleküldynamik-Simulationen der Fettsäurebindung sollte C10 der Arachidonsäure räumlich sogar etwas näher zum Eisen lokalisiert sein als das C13, was eigentlich eine 12-lipoxygenierung favorisieren sollte. Möglicherweise ist die Wasserstoffabstraktion von C10 in vielen Fällen jedoch thermodynamisch ungünstiger oder wird durch sonstige Effekte behindert.

Für die humane ALOX5 wurde errechnet, dass die Substratbindungstasche um etwa 20 % größer ist als die der Kaninchen ALOX15 (Walther 2001, Browner 1998). Durch Austausch der entsprechenden kritischen Aminosäuren des Triadenmodells mit sperrigeren Aminosäuren bei der 5-LOX entstand ein Enzym, welches hauptsächlich 15-H(P)ETE bildete (Schwarz 2001, Walther 2001). Dieses Ergebnis war mit der Annahme einer Verkleinerung des Bindungstaschenvolumens vereinbar, wodurch C13 in die Nähe des aktiven Eisens gedrängt wurde. Ein Problem dieses mechanistischen Konzeptes stellt jedoch die Tatsache dar, dass bei der ALOX5 die Radikalumlagerung und der Einbau des molekularen Sauerstoffs in (-2)-Richtung erfolgt. Aus diesem Grund wurde eine Ergänzung der Volumenhypothese aufgestellt, nach welcher das Substrat in umgekehrter Orientierung, also mit der Carboxylgruppe voran in die Bindungstasche eindringt (Prigge 1998, Walther 2001). Diese Substratbindung würde zwar die Stereospezifität der Produktbildung hinreichend erklären, ist jedoch aus thermodynamischen Gründen problematisch (Browner 1998, Walther 2001): Das Vordringen einer polaren Carboxylgruppe in die hydrophobe Umgebung der Substratbindungstasche weist eine hohe Energiebarriere auf. Dennoch sollte eine solche inverse Substratorientierung prinzipiell möglich sein (Walther 2001, Nethaniel 2011). Ein anderes Erklärungsmodell für 5-Lipoxygenierung könnte die große Flexibilität der Fettsäuren in einer großen Substratbindungstasche darstellen (Walther 2001) oder ein alternativer Zugang zum aktiven Zentrum (Gilbert 2011, 1.2.5.). Generell ist jedoch davon auszugehen, dass für jede LOX-Isoform ein Gleichgewicht zwischen Methyl-Terminus-voran- und Carboxyl-Terminus-voran- Ausrichtung vorliegt, welches von den jeweiligen Reaktionsbedingungen abhängig ist (Ivanov 2010).

Die Ausrichtung des Substrates am aktiven Zentrum von LOXen erklärt ferner die unterschiedlichen Reaktionsprodukte zweier Epidermis-Typ-LOXen, der humanen ALOX15B und des orthologen Mausenzym *alox15b*, das funktionell als 8-LOX zu klassifizieren ist. Beide Enzyme haben eine sehr ähnliche Primärstruktur und folgen nicht dem Triadenkonzept. Als kritische Determinanten dieser Enzyme konnten Asp-602 und Val-603 bei der humanen ALOX15B und Tyr-603 sowie His604 beim murinen Enzym identifiziert werden (Jisaka-Determinanten, Jisaka 2000). Die Grundlage für die verschiedene Positionsspezifität der orthologen Enzyme kann durch eine unterschiedliche Substratausrichtung erklärt werden: Bei der humanen ALOX15B (auch 15-LOX2 genannt) bedingt die Methyl-Terminus-voran-Ausrichtung eine Wasserstoffabstraktion von C13 mit radikalischer Umlagerung (+2), so dass 15-H(P)ETE entsteht. Bei dem Maus-Enzym bedingt die Carboxyl-Terminus-voran-Ausrichtung eine Wasserstoffabstraktion von C10 mit radikalischer Umlagerung (-2), so dass 8-H(P)ETE

entsteht. Bei der Maus ist vor allem His-604 an der Interaktion mit dem Carboxyl-Terminus beteiligt und soll dessen Vorschub gewährleisten. Weitere Untersuchungen zu diesen beiden Enzymen erfolgten durch Coffa und Brash 2004 im Rahmen der Untersuchung der Stereospezifität (1.2.2.2.).

1.2.2.2. Determinanten der Stereospezifität

Wasserstoffabstraktion, Radikalumlagerung und Sauerstoffinsertion sind grundlegende Schritte der Lipoxygenasereaktion (siehe 1.1.1.). Auf welche Weise dabei jedoch die hohe Stereospezifität der LOXen zustande kommt, ist nicht umfassend bekannt. Nach der Wasserstoffabstraktion ist das freie Radikal-Elektron über das gesamte Pentadiensystem delokalisiert, welches eine Ebene bildet. Angenommen, das katalytisch aktive Eisen und die damit verbundene Wasserstoffabstraktion erfolgt hinter dieser Ebene, so inseriert Sauerstoff vor dieser Ebene (antarafacial). Wenn Sauerstoff vor dieser Ebene inseriert, können lediglich 2 bestimmte Enantiomere in (+2)- oder (-2)-Position mit unterschiedlicher Chiralität entstehen. Ein Beispiel dazu liefert Abb 1.6, dort findet die Wasserstoffabstraktion von C10 statt.

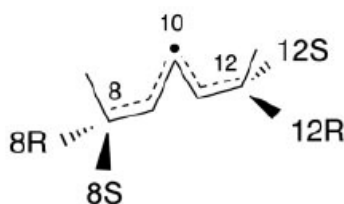


Abb. 1.6: Ausschnitt des Kohlenwasserstoff-Rückgrates eines LOX-Substrates. In diesem Fall erfolgte die Wasserstoffabstraktion von C10. Wenn die Wasserstoffabstraktion hinter der Papierebene erfolgen würde, könnte Sauerstoff nur auf der anderen Seite (antarafacial) vor der Papierebene inserieren. Für diese Insertion ergeben sich dann lediglich 2 Positionen (+2) oder (-2) mit unterschiedlicher Chiralität, 8S-H(P)ETE und 12R-H(P)ETE. Analog verhält es sich beim umgekehrten Fall, wenn die Wasserstoffabstraktion vor der Papierebene erfolgen würde. In diesem Fall könnte Sauerstoff lediglich hinter der Papierebene (antarafacial) inserieren, was zu 8R-H(P)ETE und 12S-H(P)ETE führen würde. Nach Coffa 2004.

Coffa und Brash veröffentlichen 2004 aufgrund dieses Phänomens eine Hypothese, welche die Stereospezifität von LOXen mit einem Wechsel der Positionsspezifität verband, die sogenannte „Alanin versus Glycin-Hypothese“ (A vs. G- Hypothese). Aus multiplen Alignments verschiedener LOX-Isoformen konnte eine kritische Determinante ermittelt werden, welche bei S-Lipoxygenasen als Alanin und bei R-Lipoxygenasen als Glycin konserviert ist (Coffa 2004). Diese kritische Coffa-Determinante entspricht bei der humanen ALOX15B dem Ala-416. Ortsgerichtete Mutationen an dieser Determinante konnten in unterschiedlichem Ausmaß die Hypothese bekräftigen, bei einigen LOX-Isoformen jedoch bewirkten Mutationen an dieser Determinante nur geringfügige Veränderungen der Reaktionsprodukte. So konnte beispielsweise

die Korallen 8R-LOX durch eine Gly428Ala-Mutation in eine vorrangig 12S-H(P)ETE-produzierende Enzymspezies umgewandelt werden. Die 15-lipoxygenierende humane ALOX15B wird durch einen Ala416Gly-Austausch in eine 11R-H(P)ETE-produzierende Enzymspezies (Coffa 2004) verwandelt. Die humane ALOX12 wurde in ein 8R-lipoxygenierendes Enzym verwandelt, wobei diese Umwandlung nur inkomplett war (Jansen 2011). Bei der ALOX15 Isoform von Kaninchen, Menschen, Orang-Utan, Rhesusaffen und von der Maus sowie bei der humanen 5-LOX konnten lediglich 10-30% der Reaktionsprodukte als R-Enantiomere nach Mutation der Coffa-Determinante klassifiziert werden (Jansen 2011).

Als Ursache für die Stereospezifität und die damit verbundene Positionsspezifität der A vs G-Hypothese wurde zunächst die zusätzliche Methylgruppe des Alanins verantwortlich gemacht. Diese Gruppe beanspruche den Raum auf der R-Seite des Pentadiens wodurch eine Sauerstoffinsertion von dieser Seite verhindert werden sollte. Da dem Glycin diese Methylgruppe in der Seitenkette fehlt, könnte dadurch ein gewisser Raum entstehen, wodurch der Sauerstoff in der R-Position eingebaut werden könne.

Wie zuvor dargestellt, ist die A vs G-Hypothese nicht in der Lage, die Reaktionsweise jeder tierischen LOX-Isoform hinreichend zu erklären. Daher sind für die Sauerstoffpositionierung mindestens 5 alternative mechanistische Hypothesen vorstellbar oder eine Kombination derselben (Abb. 1.7, Jansen 2011, ein weiterer Mechanismus wird bei 4.2.2. vorgeschlagen, der bei einer phylogenetisch älteren Cyanothecce sp. LOX offenbar zur Anwendung kommt, Andreou 2010):

- i) Radikal-Dislokation (Abb. 1.7 B): Wenn man davon ausgeht, dass nach Wasserstoffabstraktion das radikalische π -Elektron gleichmäßig über das Pentadien-System verteilt ist, würde Sauerstoff, der Zugang zu allen Bereich des Pentadien-Systems hat, statistisch an allen C-Atomen dieses Systems zu gleichen Anteilen inserieren. Falls jedoch eine Aminosäure im Bereich dieses Pentadien-Systems durch Exposition einer positiven Ladung die radikalische Elektronenwolke an einem der C-Atome verdichten könnte, würde dies die Wahrscheinlichkeit einer gerichteten Sauerstoffinsertion erhöhen. Allerdings wurde ein Aminosäurenrest mit dieser Funktion bisher nicht beschrieben.
- ii) Pentadien-Distorsion (Abb. 1.7 C): Nach Wasserstoffabstraktion liegt ein planares radikalisches Pentadien-System in der Substratbindungstasche vor. Falls sich dieses System räumlich asymmetrisch ausrichtet ist, es also zu einer strukturellen Distorsion kommt, könnte die Elektronendichte an einem gewissen Bereich des Pentadiensystems besser zugänglich sein für Sauerstoff. Damit könnte die

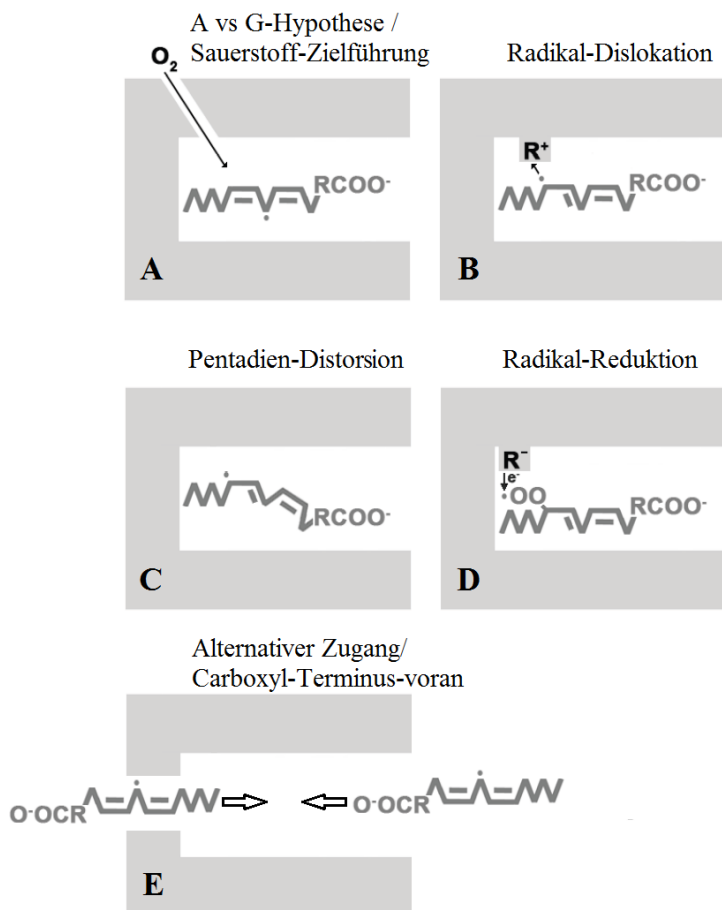


Abb. 1.7: Übersicht verschiedener Hypothesen der Stereospezifität von LOXen. (A) Die A vs G-Hypothese geht davon aus, dass Sauerstoff aufgrund der Seitenkette der Coffa-Determinante zu einem bestimmten Ziel-C-Atom geleitet wird. (B) Eine Radikal-Dislokation könnte die Elektronendichte des Radikal-Systems einseitig erhöhen, wenn positive Reste in die Nähe des Substrates gelangen würden. (C) Das radikalische Pentadien könnte sich stark verformen und somit bestimmte C-Atome priorisieren. (D) Falls die Oxygenierung der Fettsäuren rein zufällig geschehen würde, könnte eine stereospezifische Reduktion ein bestimmtes chirales Reaktionsprodukt hervorbringen. (E) Ein entgegengesetzter alternativer Zugang könnte das Substrat mit Methyl-Terminus voran in die Substratbindungstasche führen (linke Bildhälfte), außerdem könnte der klassischerweise vermutete Zugang ein Substrat mit einer umgekehrten Ausrichtung (Carboxyl-Gruppe voran, rechte Bildhälfte) passieren lassen.

Sauerstoffinsertion an ein bestimmtes Kohlenstoffatom und hier an eine bestimmte Stelle (R- oder S-Position) dirigiert werden.

- iii) Radikal-Reduktion (Abb. 1.7 D): Unter der Annahme, dass die Oxygenierung der LOX-Substrate prinzipiell reversibel ist (Kitaguchi 2005), könnte sie prinzipiell ungerichtet per Zufall erfolgen. Wenn aber die nachfolgende Reduktion der Peroxyradikale stereoselektiv erfolgt, würde sich ein spezifisches Produktmuster ergeben. Bisher ist aber völlig unklar, welcher Aminosäurerest als interner Elektronendonator wirken könnte, zumal dies klassischerweise die Funktion des LOX-Eisens darstellt (1.1.1., Abb. 1.2).
- iv) Alternativer Zugang bzw Carboxyl-Terminus-voran-Ausrichtung (Abb 1.7 E): Die Stereospezifität wird auch dadurch beeinflusst, welchen Zugangsweg das Substrat zu seiner Bindungstasche bei gegebener Ausrichtung vornimmt. Bei der humanen ALOX5 (Gilbert 2011, 1.2.5.) wurde nach Aufklärung der Kristallstruktur ein alternativer Zugangsweg vorgeschlagen, den das Substrat mit einer Methyl-Terminus-voran-Ausrichtung (ω -Ende) vornehmen könnte (Abb 1.7 E, linkes Substrat), darüber hinaus ist eine umgekehrte Ausrichtung mit Carboxyl-

Terminus-voran (α -Ende) durch den ursprünglich vermuteten klassischen Zugangsweg möglich (Abb 1.7 E, rechtes Substrat, Gilbert 2011, 1.2.5.).

1.2.3. Kristall- und Lösungsstruktur der ALOX15 des Kaninchens

Die Kaninchen ALOX15 ähnelt global gesehen einem Zylinder mit elliptischer Grundfläche (Ivanov 2010, Choi 2008, Gillmor 1997, Abb. 1.8 A). Die N-terminale Domäne enthält vornehmlich β -Faltblatt-Strukturen, während die C-terminale Domäne überwiegend aus α -Helices aufgebaut ist (Abb. 1.8 B).

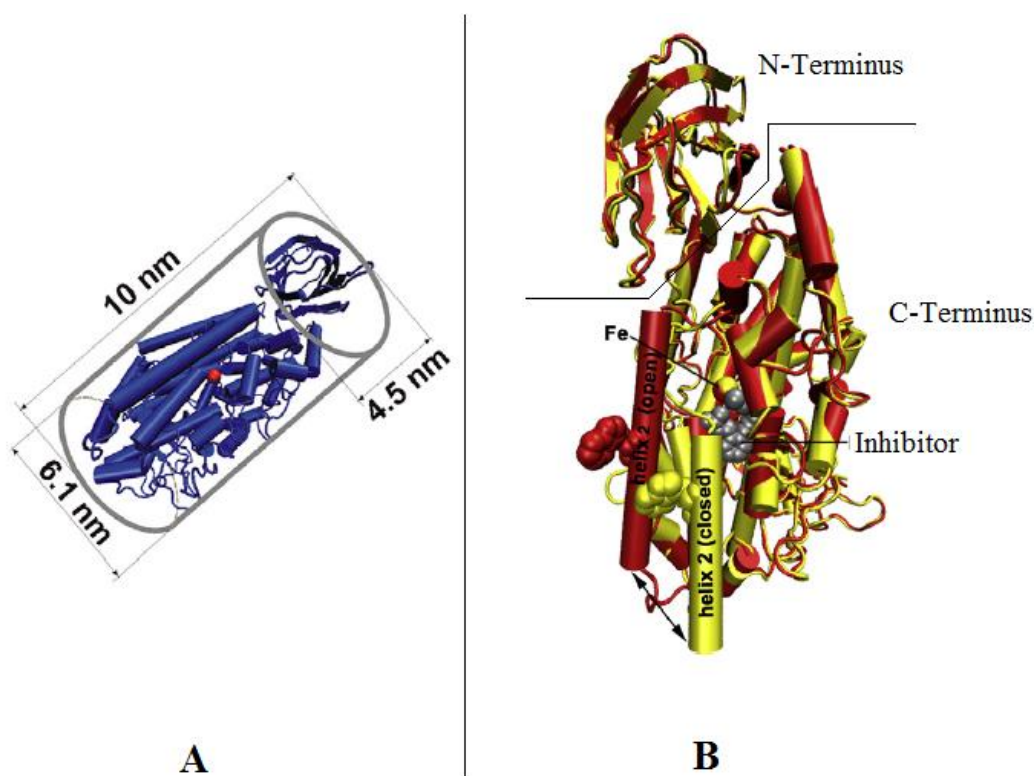


Abb 1.8: Struktur der Kaninchen ALOX15. (A) Zylindrische Form des Enzyms mit einer Höhe von 10 nm. Als roter Punkt ist das Nichthämeisen in der Tiefe des C-Terminus dargestellt. (B) Überprojektion des offenen (rot) und des geschlossenen Konformers (gelb) des Enzyms. Die α -Helix 2 umgibt unmittelbar die Substratbindungstasche und bewegt sich etwa 12 Å bei Ligandenbindung. In der Tiefe des C-Terminus befindet sich der Inhibitor innerhalb der Substratbindungstasche. Modifiziert nach Ivanov 2010.

Die C-terminale Domäne enthält das katalytisch aktive Nichthämeisen und die hydrophobe Substratbindungstasche (Abb. 1.9). Insgesamt besteht die C-terminale Domäne aus 21 α -Helices, welche parallel bzw. antiparallel zueinander verlaufen und durch eine kleine β -Faltblattsdomäne unterbrochen wird. Das katalytische Nichthämeisen im aktiven Zentrum ist insgesamt 6-fach ligandiert, wobei 5 Aminosäurereste und ein Hydroxylion als Eisenliganden fungieren. Bei der Kaninchen ALOX15 werden die proteinogenen Eisenliganden durch folgende Reste gebildet: His-361, His-366, His-541, His-545, Ile-663 (Kuban1998, Minor 1996). Die

katalytische Domäne des Enzyms ist durch eine hohe Strukturflexibilität gekennzeichnet. Bei Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung von einer offenen Form zu einer geschlossenen Form (Abb 1.8 B), bei der die Helix 2 um etwa 12 Å verschiebt wird und dadurch den Eingang in die Substratbindungstasche versperrt.

Die Substratbindungstasche wird vorrangig aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten gebildet. Der Boden dieser auch als stiefelförmig beschriebenen Tasche wird durch Phe-353 (Borngräber I-Determinante), Ile-418 und Met-419 (Sloane-Determinanten) sowie Ile-593 (Borngräber II-Determinante) gebildet (Abb 1.9). Diese Aminosäurereste bilden die strukturelle Basis des Triaden-Modells, welches die Positionsspezifität der ALOX15-Isoformen erklärt (Vogel 2010, Borngräber 1999, Borngräber 1996, Sloane 1991, 1.2.2.1). Die Substratbindungstasche erstreckt sich bis zur Proteinoberfläche, wo sich das Arg-403 befindet, dessen Guanidinogruppe mit der Carboxylgruppe der Fettsäure interagieren soll (Gillmor 1997). Auf diese Weise könnte Substratbindung zu einer Konformationsänderung des Enzyms (induced-fit) führen (Toledo 2010). Substratfettsäuren gehen am aktiven Zentrum mindestens 3 Bindungsarten ein: (i) Hydrophobe Wechselwirkung zwischen der apolaren Fettsäure und hydrophoben Seitenketten der ortsständigen Aminosäuren, (ii) ionische Wechselwirkung zwischen dem Carboxyl-Terminus der Fettsäure und Arg-403, (iii) π -Elektronen-Wechselwirkung zwischen den Doppelbindungen der Fettsäure und aromatischen Seitenketten (z.B. Phe-415).

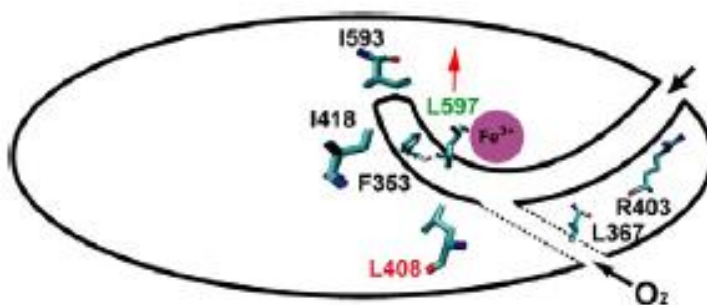


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Substratbindungstasche der Kaninchen ALOX15 mit relevanten Aminosäuren. Der schwarze Pfeil oben rechts im Bild markiert den Weg in das aktive Zentrum, die Fettsäure bewegt sich mit dem Methyl-Terminus (ω -Terminus) voran in die Tiefe des Enzyms. Während der Ligand in die Substratbindungstasche hineingleitet, bewegt sich L597, welches in der offenen Zustandsform des Enzyms einen Teil der Substratbindungstasche versperrt, vom Lumen der Tasche hinweg (roter Pfeil), so dass die Fettsäure tiefer in die Tasche hineindringen kann. Am Boden der Tasche trifft die Fettsäure auf die Determinanten des Triaden-Konzeptes F353, I418 und I593 (Vogel 2010, Borngräber 1999, Borngräber 1996, Sloane 1991, 1.2.2.1.). R403 scheint mit dem Carboxyl-Terminus der Fettsäure zu interagieren (Gillmor 1997) und initiiert womöglich eine weitere Konformationsänderung. L367 bahnt den Weg des Sauerstoffs durch die dynamischen Sauerstoffkanäle ins aktive Zentrum, L408 ist offenbar für eine regelrechte Ausrichtung des Substrates erforderlich. Modifiziert nach Ivanov 2010.

Der N-Terminus der Kaninchen ALOX15 besteht aus 115 Aminosäuren und zeigt eine Sequenzhomologie von 23 % zur C-terminalen β -Faltblattstruktur tierischer Lipasen (Winkler 1990). Daher wurde ein Zusammenhang für die Bindung an Lipoproteinen und Biomembranen postuliert und später bestätigt (Walther 2011, Walther 2002, Gillmor 1997), darüber hinaus besitzt der N-Terminus eine regulatorische Funktion (Walther 2011). Die Deletion der N-terminalen Domäne durch ortsgerichtete Mutagenese führte zu einem Enzym mit reduzierter katalytischer Aktivität und verminderter Bindung an Biomembranen (Walther 2011, Walther 2002). Außerdem bewirkt Calcium einerseits eine verbesserte Bindung sowie eine erhöhte katalytische Aktivität (Brinckmann 1998). Allerdings scheinen keine spezifischen Ca^{2+} -bindenden Aminosäuren in diesen Prozess involviert zu sein (Walther 2004).

In jüngerer Vergangenheit wurde die räumliche Beziehung zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne untersucht (Ivanov 2011). Bei diesem Enzym scheint der N-Terminus ein hohes Maß an Beweglichkeit gegenüber dem C-Terminus zu besitzen, so dass es zu einem Wegklappen der N-terminalen Domäne kommt. Mutationen am hoch konservierten Tyr-98, das als Bestandteil der Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen fungiert, verdeutlichten die Bedeutung dieses Restes für die Interdomäneninteraktion. Mutationen an diesem Rest führten zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur und zeigten zugleich Einfluss auf die katalytische Aktivität.

1.2.4. Kristallstruktur der ALOX15 des Schweins

Bei den Arbeiten von Xu et al. 2012 wurde die katalytische C-terminale Domäne der Schweine Leukozyten ALOX15 (Aminosäuren 112-663) mit einem spezifischen Inhibitor (OPP) kristallisiert (Abb. 1.10). Dieses Enzym fungiert im Schwein als orthologes Enzym der ALOX15 beim Menschen, weist aber wie der Name schon sagt eine katalytische Besonderheit auf. Arachidonsäure wird durch dieses Enzym nicht zu 15-H(P)ETE sondern zu 12-H(P)ETE umgesetzt. Es handelt sich also um eine 12-lipoxygenierende ALOX15-Isoform.

Eine exakte Übersicht der Lagebeziehung von Aminosäurenresten des U-förmigen aktiven Zentrums mit dem Inhibitor stellt Abb. 1.11 dar. Die Carboxylgruppe des Inhibitors wird mit einer Wasserstoffbrückenbindung am Gln-596 fixiert. Arg-403, das bei der Kaninchen ALOX15 mit dem Carboxyl-Terminus der Fettsäure interagieren soll (Gillmor 1997), erreicht bei dieser Schweine-LOX nicht selbst das Substrat, sondern 3 Wasser-Moleküle überbrücken den Kontakt zum Substrat. Ile-400, Leu-408, Ala-404 (Coffa-Determinante), Ile-593 (Borngräber II-Determinante) und Ile-663 interagierten mit C10-C15 des Inhibitors, die Inhibitor-Enzym-Schnittstelle machten Phe-353 (Borngräber I-Determinante), Ile-414 Phe-415, Val-418 und Val-

419 (Sloane-Determinanten) aus. Mutationen an den zuletzt genannten Aminosäuren wurden bereits 1994 durch Suzuki et al. durchgeführt. Wie bei der Kaninchen ALOX15 ist das Triaden-Model der Positionsspezifität (Vogel 2010, Borngräber 1999, 1.2.2.1.) anwendbar.

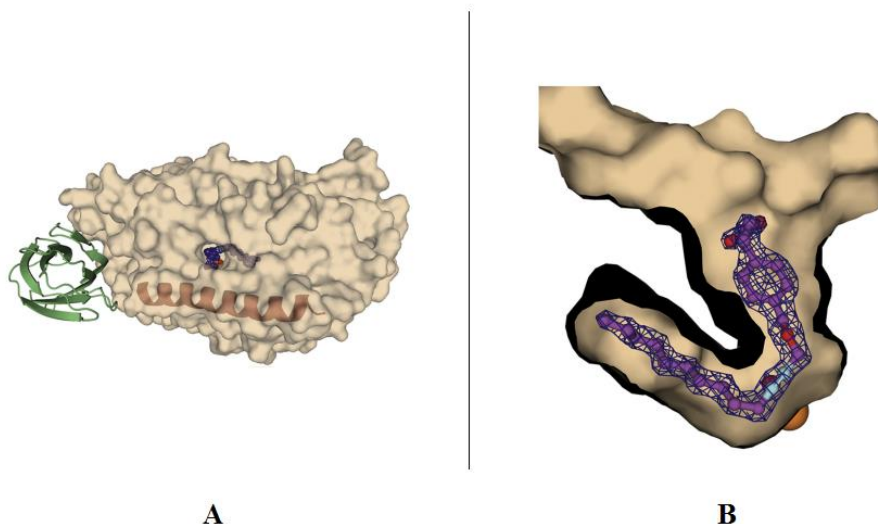


Abb. 1.10: Kristallstruktur der Schweine ALOX15 (Xu 2012). (A) Links im Bild der grüne N-Terminus wurde nachträglich anmodelliert, da bei diesem Versuch lediglich der C-Terminus mit Inhibitor kristallisiert werden konnte. Blick von der Oberfläche in die Substratbindungstasche, in deren U-förmigen Inneren (B) der Inhibitor kristallisiert ist. Im Scheitel der U-förmigen Substratbindungstasche ist das katalytisch aktive Eisen des Enzyms lokalisiert (bronzener Kreis rechts unten im Bild).

Die Wasserstoffabstraktion erfolgte nach den von Xu et al. erhobenen Daten von einer Ebene, die hinter dem Inhibitor liegt (Abb. 1.10 B). Sauerstoff gelang von vor der Ebene des Inhibitors in die Nähe des C10 der Substratfettsäure. Auf diese Weise könnte, einhergehend mit der A vs. G- Hypothese nach Coffa und Brash (Coffa 2004, 1.2.2.2.), 12S-H(P)ETE entstehen, zumal diese Schweine LOX auch das dazugehörige Ala-404 trägt. Modelberechnungen von Arachidonsäure anstelle des OPP-Inhibitors deuten darauf hin, dass Ala-404 direkt an C8 des Substrates heranreicht, so dass C8 nicht oxygeniert werden kann. Der Sauerstoff gelangt offenbar durch eine interne Lücke mit amphiphilem Charakter von der Proteinoberfläche ins aktive Zentrum, wobei in zentraler Richtung des Kanals zunehmend hydrophobe Aminosäurereste exponiert werden, wohl um den Sauerstoff zu dirigieren. Neben dem bereits erwähnten Ala-404 spielt auch bei diesem Enzym Leu-367 eine Rolle bei der Sauerstoffzufuhr, wie dies bereits bei der Kaninchen ALOX15 nachgewiesen wurde (Saam 2007).

Darüber hinaus erscheint die hier untersuchte 12-lipoxygenierende LOX interessanterweise eine vollkommen unterschiedliche Eigenschaft bezüglich allosterischer Effekte, verglichen mit der Kaninchen ALOX15 (Choi 2008, Ivanov 2010, 1.2.3.), zu besitzen. In dem Kristallmodell der Schweine-LOX liegt nach Bindung des Inhibitors an das Enzym noch

immer eine „offene“ Zustandsform vor. Offenbar reicht die Bindung dieses Inhibitors nicht aus, um den bei der Kaninchen ALOX15 beobachteten Effekt zu induzieren.

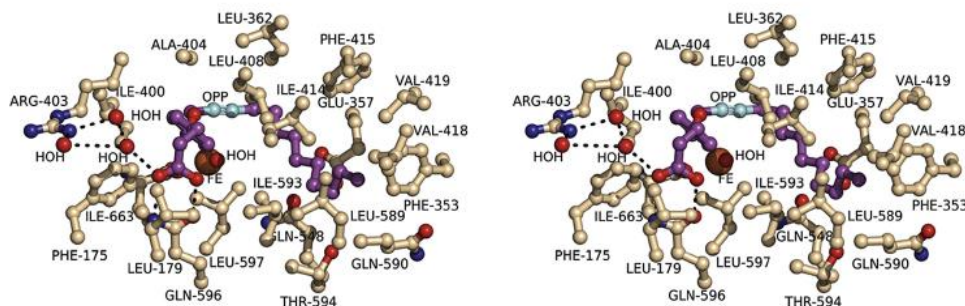


Abb 1.11: Detail-Model der relevanten Aminosäuren im aktiven Zentrum der Schweine ALOX15 (Xu 2012). Man beachte die Lage der katalytisch relevanten Reste Phe-353 (Borngräber I-Determinante), Val-418 und Val-419 (Sloane-Determinanten) und Ile-593 (Borngräber II-Determinante).

1.2.5. Kristallstruktur der humanen ALOX5

Die katalytische Domäne der humanen ALOX5 ist wie bei anderen LOX-Isoformen vornehmlich α -helikal aufgebaut und enthält das katalytisch aktive Nichthäm-isen, welches von His-367, His-372, His-550 und Ile-673 ligiert wird (Gilbert 2011). Eine bogenförmige Helix versperrt den Zugang zum aktiven Zentrum (Abb. 1.12 A und B, blaue Helix), im Scheitel dieser Helix befindet sich Leu-414, dessen Korrelat zuvor bei der Sojabohnen LOX1 im Zusammenhang mit dem Zugang von Sauerstoff zum aktiven Zentrum bzw. der Sauerstoff-Insertion diskutiert wurde (Neau 2009, Knapp 2003, Knapp 2001). Weitere Aminosäuren dieser bogenförmigen Helix sind unmittelbar am Aufbau der Substratbindungstasche beteiligt, Leu-420 und Phe-421. Ebenfalls beteiligt am Aufbau des aktiven Zentrums und am Zugang zum aktiven Zentrum ist die α 2-Helix (Abb. 1.12 A und B, rote Helix): Ihre sperrigen Seitenketten von Phe-177 und Tyr-181 sind nach innen ausgerichtet und lassen einen Raum zwischen sich frei, der einen von zwei möglichen Zugängen zur Substratbindungstasche darstellt (Abb. 1.12 B und C). Nach Gilbert et al. ist es allerdings wahrscheinlicher, dass das Substrat durch eine Rotation der Seitenkette von Trp-147 (Abb 1.12 C) in das aktive Zentrum gelangt. Wenn dem so wäre, würde dies einen genau entgegengesetzten Zugang zum aktiven Zentrum darstellen im Vergleich zur ALOX15 des Kaninchens (1.2.3.). Diese Gegebenheit könnte der zuvor postulierten Hypothese einer inversen Substratorientierung mit Carboxyl-Terminus voran (α -Ende der Fettsäure) bei dieser LOX-Isoform entsprechen (Walther 2001), wobei die Fettsäure dennoch mit dem Methyl-Terminus (ω -Ende) voran eindringen könnte, weil der Zugang bei Trp-147 ja entgegengesetzt zum damaligen Verständnis der LOX-Substratbindungstasche sein würde. Die S-Stereospezifität der humanen ALOX5 könnte also einerseits durch eine Methyl-Terminus-voran-Ausrichtung

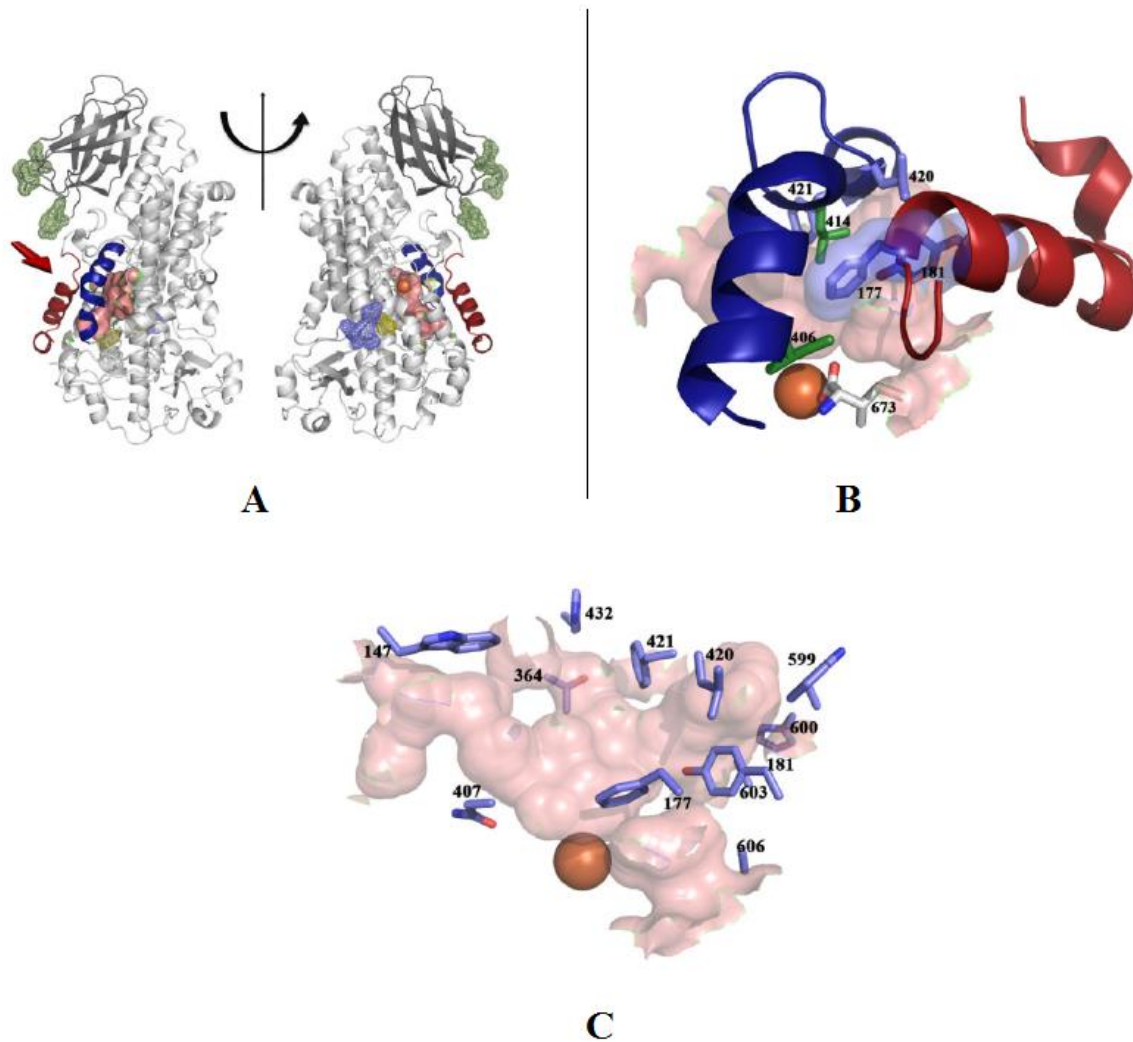


Abb. 1.12: Kristallstruktur der humanen ALOX5 (Gilbert 2011). (A) Darstellung des gesamten Enzyms mit 180°-Drehung um eine vertikale Achse, α 2-Helix in rot, bogenförmige Helix in blau. (B) Teilausschnitt mit Blick auf α 2-Helix in rot und bogenförmiger Helix in blau, die orange Kugel stellt das Nichthämeisen dar. (C) Substratbindungstasche mit angrenzenden Aminosäuren, u.a. der Borngräber II-Determinante A603.

(ω -Ende) der Fettsäure beim Zugang durch Trp-147 erklärt werden und andererseits durch eine Carboxyl-Terminus-voran-Ausrichtung (α -Ende) durch die Lücke zwischen Phe-177 und Tyr-181 (siehe auch 1.2.2.2., Abb 1.7 E).

Die humane ALOX5 folgt dem Triadenkonzept der Positionsspezifität (Schwarz 2001, 1.2.2.1.). Überraschend ist jedoch die Diskrepanz zwischen der funktionellen Bedeutung dieser Determinanten und ihrem überwiegenden Fehlen in der unmittelbaren Substratbindungstasche bei der stabilisierten Kristallform des Enzyms (Abb 1.12 C). Lediglich Ala-603 (Borngräber II-Determinante, 1.2.2.1.) ist unmittelbar am Aufbau der Substratbindungstasche beteiligt, obwohl die F359W/A424I-Doppelmutation (Borngräber I und Sloane-Determinante) beispielsweise die humane ALOX5 in eine 8-H(P)ETE produzierende Enzymspezies umwandelt. Eine mögliche

Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch könnte eine Konformationsänderung darstellen, die in den Arbeiten von Gilbert et al. nicht erfasst wurde.

Bei der humanen ALOX5 umfasst der N-Terminus etwa 120 Aminosäuren und bewirkt die Calcium-abhängige Membranbindung (Hammarberg 2000, 4.3.1., Abb. 4.3).

1.2.6. Kristallstruktur der 11R-LOX der Weichkoralle *Gersemia fruticosa*

Eine weitere aktuelle Studie beschäftigte sich mit der Kristallstruktur und funktionellen Aspekten einer Weichkorallen 11R-LOX (Eek 2012). Auch dieses Enzym ist in 2 Domänen gefaltet. Die N-terminale Domäne umfasst die Aminosäurenreste 1-115, die C-terminale Domäne die Reste 129–679 und die Verbindungsregion mit den Aminosäurenresten 116–128 (Abb. 1.13 A). Global besteht eine große Ähnlichkeit zur humanen 5-LOX, die ebenfalls kürzlich kristallisiert wurde (Gilbert 2011, 1.2.5.).

Die wesentlichen Erkenntnisse zur Korallen 11R-LOX lassen sich wie folgt zusammenfassen:

i) Das aktive Zentrum mit dem katalytisch aktiven Eisen ist umgeben von der konservierten bogenförmigen α -Helix 10- 11. ii) Der Zugang zur Substratbindungstasche ist durch 2 Öffnungen möglich, die durch Phe-185 and Tyr-154 blockiert werden (Abb. 1.13 B), so dass insgesamt eine T-förmige Substratbindungstasche entsteht (Abb 1.13 B, kleines unteres Bild). iii) Die Fettsäure bewegt sich in das aktive Zentrum des Enzyms, indem ihr Methylende voran geht. Die Carboxylgruppe kann mit Argininresten interagieren, die sich in der Nähe jeder der beiden Taschenzugänge befinden. Laut dieses Modells wird eine segmentierte Substratbindungstasche postuliert, einen Teil dieser Segmente macht dabei die bereits zuvor geforderte stiefelförmige Substratbindungstasche aus (1.2.2.1., 1.2.3.). Die konservierte bogenförmige α -Helix 10- 11 enthält auch Gly-416 als Coffa-Determinante bezüglich der Stereospezifität (Coffa 2004, 1.2.2.2.). Der Boden der Substratbindungstasche besteht aus Thr-365, Val-430 und Val-609, darüber hinaus sind Leu-431 (Sloane-Determinante, Sloane 1991, Borngräber 1999, Vogel 2010, 1.2.2.1.) und Met-606 von Bedeutung (Jisaka 2000, 1.2.2.1.). Die beiden Zugänge zur Substratbindungstasche werden ferner durch ein kappen- oder deckelartiges Segment bedeckt, welches aus α -Helix 2 hervorgeht. Dieses Kappen-Segment interagiert offenbar mit einem Teil des N-Terminus, welcher die mutmaßlichen regulatorischen Ca^{2+} -Bindungsstellen besitzt. Diese Interaktion besteht aus einer π -Kationen-Wechselwirkung zwischen Trp-107 und Lys-172 sowie einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Trp-107 und Asp-173. Auf diese Weise könnten N-Terminus und C-Terminus dieses Enzyms funktionell verknüpft sein. Die π -Kationen-

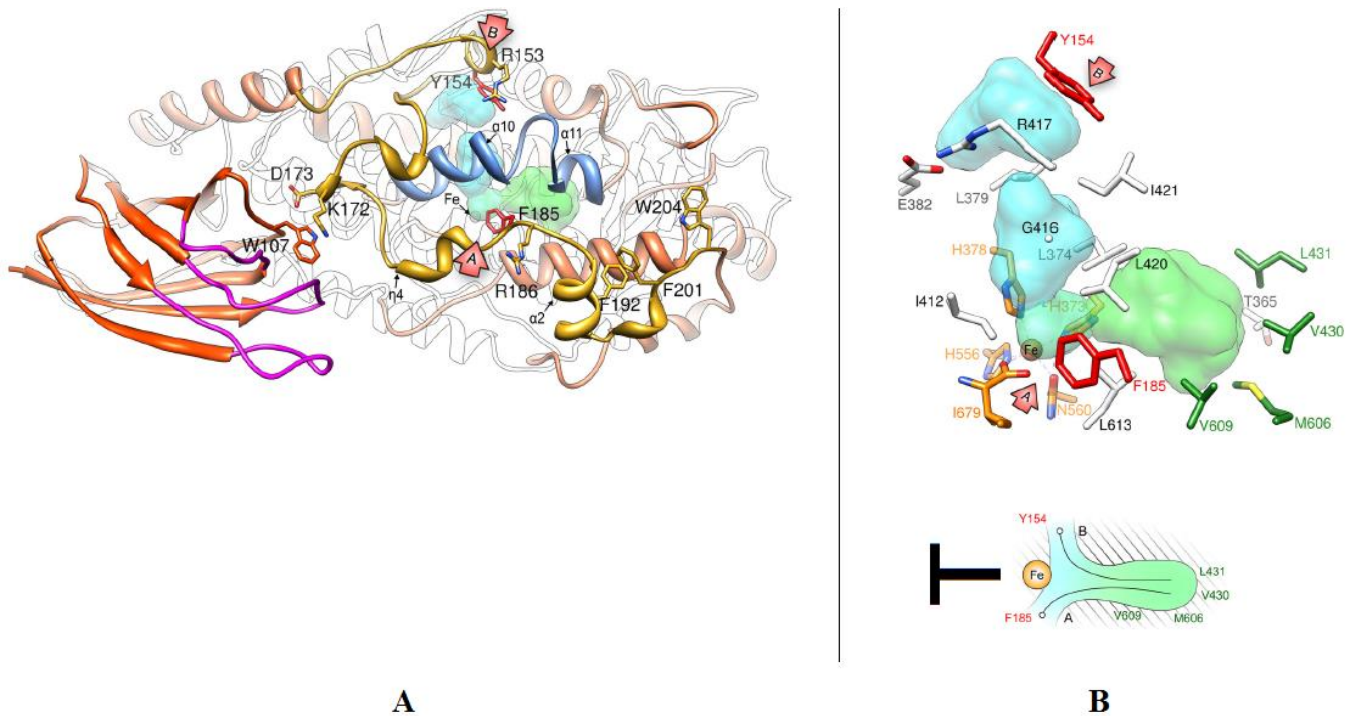


Abb. 1.13: Kristallstruktur der Weichkorallen *Gersemia fruticosa* 11R-LOX im Gesamten (A) und der Substratbindungstasche (B) nach Eek et. al. 2012. (A) In orange, N-Terminus mit Calcium-Bindungsstellen in magenta. Man beachte die räumliche Nähe der Calcium-Bindungsstellen zu dem Kappen-Segment (gelb, α -Helix 2), welches die beiden Zugänge (roter Pfeil A und B) zur Substratbindungstasche in türkis und grün bedeckt. (B) Substratbindungstasche im Detail (oben) und schematisch (unten). Die segmentartige Tasche besitzt 2 Zugänge (roter Pfeil A und B) und wird als T-förmig beschrieben.

Wechselwirkung ist im Übrigen konserviert bei sämtlichen untersuchten LOX-Isoformen.

Der N-Terminus erscheint wie ein Sandwich, das aus 2 antiparallelen β -Faltblättern besteht. Am Ende der Faltblätter in der Nähe der katalytischen Domäne befinden sich 4 Schleifen, die 2 Faltblätter miteinander verbinden. 3 dieser 4 Schleifen sind vergleichsweise lang und beinhalten die postulierten Ca^{2+} -Bindungsstellen (Abb. 1.13 A, magentafarbige Schleifen links am Enzym), insbesondere betrifft dies His-43 – Glu-47 und Gly-73 – Lys-77.

Ebenso wie bei der Kaninchen ALOX15 neigt diese Weichkorallen-LOX zur Dimerisierung. Diese läuft allerdings nur in Abwesenheit von Calcium ab. Andererseits sind sowohl Calcium als Biomembranen zwingend erforderlich für die katalytische Aktivität des Enzyms was eine Ausnahme unter bisher bekannten LOX-Isoformen darstellt. Es wurde postuliert, dass Calcium und Biomembranen gemeinsam eine Konformationsänderung initiieren und damit die Substratbindungstasche freigegeben wird.

1.3. Ziele der Arbeit

LOXen sind an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Menschen maßgeblich beteiligt (1.1.3.) und umfangreiche Studien waren in der Vergangenheit der Aufklärung der biologischen Funktionen verschiedener LOX Isoformen gewidmet. Im Gegensatz dazu gibt es bislang nur wenige Untersuchungen zur Evolution dieser Enzymklasse. So ist z.B. völlig unklar, wann im Rahmen der Evolution des irdischen Lebens LOXen erstmals in Erscheinung getreten sind und wie sich diese Urenzyme im Laufe der Evolution weiter entwickelt haben. Zur Klärung solcher Fragen wurde sich international darauf geeinigt, die Forschungsbemühungen auf bestimmte Modelorganismen zu konzentrieren, die als typisch für größere Organismusgruppen angesehen werden. So repräsentiert z.B. *E. coli* das Reich der Prokaryonten und *S. cerevisiae* eukaryontische Einzeller. *D. melanogaster* wird als Modellorganismus für Insekten, *C. elegans* für die Wirbellosen und *D. rerio* (Zebrafisch) für Wirbeltiere betrachtet. In den Genomen von *E. coli*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *C. elegans* gab es keine Hinweise auf das Vorkommen von LOX Genen und eigene Siebtestuntersuchungen mit LOX-spezifischen Gensequenzen haben diese Schlussfolgerungen bestätigt. Ähnlich wie für die oben genannten Modellorganismen lag zu Beginn der Arbeit das vollständig sequenzierte Genom des Zebrafisches vor und ein *in silico* Screening der umfangreichen Sequenzdaten ergab die Existenz von mindestens 7 LOX Genen. Es war aber noch völlig unbekannt, ob wenigstens eine dieser genomischen Sequenzen für eine katalytisch aktive LOX kodiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals überprüft werden, ob der Zebrafisch eine katalytisch aktive LOX exprimiert und ob sich bestehende Modellvorstellungen zur Positions- und Stereospezifität von LOX-Reaktionen (1.2.2.), die überwiegend an Säugetierenzymen erarbeitet wurden, auch für evolutionär entferntere Enzymspezies anwenden lassen. Zu diesem Zweck war es nötig, die cDNA einer ausgewählten LOX-Isoform des Zebrafisches zu klonieren, das rekombinante Enzym als His-Tag Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren und es hinsichtlich seiner protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften zu charakterisieren. Bei der enzymatischen Charakterisierung sollte u.a. überprüft werden, ob das Triadenkonzept der Positionsspezifität (Vogel 2010, Borngräber 1999, 1.2.2.1.), das Jisaka-Postulat (Jisaka 2000, 1.2.2.1.) und die A vs G-Hypothese (Coffa 2004 1.2.2.2.) der Reaktionsspezifität für diese LOX-Isoform angewendet werden können. Darüber hinaus sollte versucht werden, die funktionelle Bedeutung der N-terminalen β -Faltblatt-Domäne dieser Zebrafisch-LOX für die Membranbindung des Enzyms und für die Aktivitätsregulation zu erforschen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

Die verwendeten Chemikalien bzw. Biochemikalien wurden von folgenden kommerziellen Herstellern bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Ampicillin-Natrium	Roth, Karlsruhe
Antikörper RGS-His (Maus)	Qiagen, Hilden
Antikörper Anti-Maus-IgG Sigma	Sigma, Deisenhofen
Arachidonsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Fraktion V Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
dNTP-Lösung	Roth, Karlsruhe
5(R/S)-, 12(R/S)-, 15(R/S)-HETE	Cayman Chem., distr. Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
9(R/S)-, 13(R/S)-HODE	Cayman Chem., distr. Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
Imidazol	Serva, Heidelberg
IPTG (Dioxan-frei)	Roth, Karlsruhe
Linolsäure	Serva, Heidelberg
Nickelagarose	Qiagen, Hilden, Machery-Nagel, Düren
Ni-TED	Qiagen, Hilden, Machery-Nagel, Düren
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Nährböden-/medien, Puffer und sonstige Lösungen

Die verwendeten Nährmedien und Pufferlösungen wurden von folgenden kommerziellen Herstellern bezogen.

Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Detroit (USA)

LB-Nährmedium:

Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), NaCl (0,5 %), NaOH (1 mM), Ampicillin (100 mg/l)

LB-Nährboden:

Bacto-Agar (1,5 %), Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), NaCl (0,5 %), NaOH (1 mM), Ampicillin (100 mg/l)

Elutionspuffer (Affinitätschromatographie, 2.2.5.):

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH: 8,0

HEPES-Puffer (Membranbindung, 2.4.2.):

150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT, pH: 7,4

PBS:

NaCl (150 mM), Na₂HPO₄ (8 mM), KCl (3 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), pH: 7,0

TAE-Puffer (Agarose-Elektrophorese):

Tris (40 mM), CH₃COONa (20 mM), CH₃COOH (29,6 mM), EDTA (2 mM), pH: 7,8

Waschpuffer (Affinitätschromatographie, 2.2.5.):

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH: 8,0

2.1.3. Kits und Enzyme

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

DNA Ligase	Bacteriophage Roche, Mannheim
Miniprep-Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St-Leon-Rot
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
Qiaquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
Western Lightning Chemilumineszenz plus	Perkin Elmer, Boston (USA)
BD Advantage 2 PCR Enzyme System	Clonetech Laboratories (USA)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4. Plasmide und Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Plasmide bzw. Oligonukleotide wurden von folgenden kommerziellen Herstellern bezogen.

pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Darmstadt
Zebrafisch LOX1 in pCMV-Sport 6.1	LGC Standards GmbH /ATTC (GB)
Zebrafisch LOX1 in pQE-9	Qiagen, Hilden
Kaninchen ALOX15 in pQE-9	(Walther 2001)

Für die Mutationen an den Sequenzdeterminanten (2.2.3.) und für die Trunktionsarbeiten (2.4.) wurden nachfolgende Primer verwendet (Firma BioTez, Berlin). Als zweiter Primer für Punktmutationen wurde jeweils die komplementäre Sequenz verwendet, alle folgenden Primer wie üblich dargestellt in 5`-3`-Richtung:

Einfügen einer Sal I-Schnittstelle in TOPO 2.1 mit Zebrafisch LOX1 als Insert:

GCC AGT GTG CTG GAA **GTC GAC** CTT GAG TAC AAA GTG

Einfügung einer Hind III-Schnittstelle in die Zebrafisch LOX1-cDNA (Not I- und EcoR V-gespaltene cDNA, PCR mit BD Advantage 2 PCR Enzyme System):

CCC **AAG CTT** TTG TCT CTA AAT AGT GAT GCT GTT T

Mutationen der Zebrafisch LOX1 Sequenzdeterminanten:

V424I: GAG GGC ATC TTC AAA AGG **ATC** GTG TCC ACA GGT GGA GAA GG

V425M: GCA TCT TCA AAA GGG TGA **TGT** CCA CAG GTG GAG AAG G

V424I+V425M Doppelmutation: CCA GAG GGC ATC TTC AAA AGG **ATC ATG** TCC ACA GGT GGA GAA GG

F359W: GGG TTC GTC ATG CTG AAT **GGC** AGG TCT TTC AGT TGT TG

I600F: CTG TGT GCA GAT GGC **CTT** CAC ATG GCA TTT GG

G410A: CTG GAG ATT AAC TGT CGT **GCG** AGA ACA CAG CTC CTC

G410F: CAC GCT GGA GAT TAA CTG TCG **TTT** CAG AAC ACA GCT CCT C

C408S+R409I Doppelmutation: CAC GCT GGA GAT TAA **CTC TAT** TGG CAG AAC ACA GCT CCT C

T412A+Q413V Doppelmutation: CTG TCG TGG CAG **AGC AGT** GCT CCT CTC TCC AGA G

V424F: GGG CAT CTT CAA AAG **GTT** CGT GTC CAC AGG TGG AG

V425F: GCA TCT TCA AAA GGG TGT **TCT** CCA CAG GTG GAG AAG G

V424F+V425F Doppelmutation: CAG AGG GCA TCT TCA AAA GGT **TCT TCT** CCA CAG GTG GAG AAG G

I600W: CTG TGT GCA GAT GGC **CTG GAC** ATG GCA TTT GGG CC

Q597H: GCC AGT CCT GTG TGC ATA TGG CCA TCA CAT G

V596L: CAG CCA GTC CTG TCT GCA GAT GGC CAT C

Q597D: CAG CCA GTC CTG TGT GGA TAT GGC CAT CAC ATG G

Herstellung der N-Terminus-Trunkation (2.4., Einführung einer Sal I-Schnittstelle am 5`-Beginn des C-Terminus und Begrenzung des C-Terminus am 3` Ende durch Hind III-Schnittstelle):

Einführung Sal I am Beginn C-Terminus: GTC GAC AAA AAG CTG AGC GAA GAC AGT CTG C

3` Ende des C-Terminus mit Hind III: CCC AAG CTT TTG TCT CTA AAT AGT GAT GCT GTT T

2.1.5. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden von folgenden kommerziellen Herstellern bezogen:

Top-10, Invitrogen, Karlsruhe

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

2.2. Molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wurden nach Standardprotokollen durchgeführt wie in der gängigen Literatur dargestellt (Sambrook 1989). Darüber hinaus erfolgte die experimentelle Umsetzung nach Vorgabe der Hersteller:

- DNA-Spaltungen mit Restriktionsenzymen
- Ligation
- Aminosäurealignment
- reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)
- Agarosegelelektrophorese
- DNA-Aufreinigung
- analytische und präparative Plasmidpräparationen
- Transformation von verschiedenen *E. coli*- Stämmen
- Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)
- Western Blot

2.2.1. Identifizierung und Alignierung der Zebrafisch LOX1

Zunächst wurde das Zebrafisch-Genom in silico auf das Vorhandensein von Lipoxygenasesequenzen überprüft. Zu diesem Zweck wurde mittels ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2, Larkin 2007, Zugriff Februar 2008) ein multiples Alignment verschiedener LOX-Isoformen durchgeführt, um hochkonservierte Aminosäuresequenzbereiche zu identifizieren. Auf diese Weise wurde eine Aminosäuresequenz (WLLAKTWVRNAEFSFHEALTHLLHSHLL) identifiziert, die zwei der vier Histidine enthält, die als Eisenliganden dienen. Diese Histidine entsprechen bei der Kaninchen ALOX15 den Aminosäuren H361 und H366 (Gillmor 1997). Mit dieser Sequenz erfolgte eine BLASTP-Suchabfrage in der Ensembl PEP_ALL-Zebrafisch-Datenbank (www.ensembl.org, Spudich 2007, Zugriff Februar 2008). Die Treffer wurden im Falle des Vorhandenseins von hochkonservierten Bereichen als mögliche LOXen angesehen.

Um die Struktur-Funktionsbeziehung der Zebrafisch LOX1 zu untersuchen, wurde ein multiples Aminosäurealignment mit LOX-Isoformen durchgeführt, bei denen Sequenzdeterminanten der Reaktionsspezifität in der Vergangenheit charakterisiert worden waren (Tab. 2.1., Vogel 2010, Borngraber 1996, Borngraber 1999, Sloane 1991, Meruvu 2005, Coffa 2004, Jisaka 2000, 1.2.2.). Durch diesen Aminosäurevergleich konnten Aminosäuren identifiziert werden, die später als Ziele der ortsgerichteten Mutagenese (2.2.3.) dienen.

Tabelle 2.1: Multiples Alignment verschiedener LOX-Isoformen im Bereich kritischer Sequenzdeterminanten

Spezies	LOX-Isoform	Positionsdeterminante											
		Borngräber 1											
Kaninchen	ALOX15	V	R	S	S	D	F	Q	V	H	E	L	358
Maus	alox15	V	R	S	S	D	L	Q	L	H	E	L	358
Mensch	ALOX15	V	R	S	S	D	F	Q	L	H	E	L	357
<i>P. pygmaeus</i>	ALOX15	V	R	S	S	D	F	Q	L	H	E	L	357
<i>M. mulatta</i>	ALOX15	V	R	S	S	D	G	Q	L	H	E	L	357
Mensch	ALOX12	V	R	N	S	D	F	Q	L	H	E	I	357
Mensch	ALOX12B	V	R	Y	A	E	F	Y	S	H	E	A	396
Maus	alox12b	V	R	Y	A	Ê	F	Y	S	H	E	A	396
Zebrafisch	LOX1	V	R	H	A	E	F	Q	V	F	Q	L	364
		Sloane											
Kaninchen	ALOX15	G	I	F	D	Q	I	M	S	T	G	G	423
Maus	alox15	G	F	F	D	K	V	M	S	T	G	G	423
Mensch	ALOX15	G	I	F	D	Q	I	M	S	T	G	G	422
<i>P. pygmaeus</i>	ALOX15	G	I	F	D	Q	I	M	S	T	G	G	422
<i>M. mulatta</i>	ALOX15	G	V	F	D	Q	V	V	S	T	G	G	422
Mensch	ALOX12	G	I	F	D	K	A	V	S	T	G	G	422

Mensch	ALOX12B	G	L	S	A	K	G	M	S	L	G	V	460
Maus	alox12b	G	L	S	A	R	A	M	S	L	G	L	460
Zebrafisch	LOX1	G	I	F	K	R	V	V	S	T	G	G	429
Borngräber 2													
Maus	alox15	T	L	Q	I	N	V	V	W	L	L	G	598
<i>P. pygmaeus</i>	ALOX15	S	L	Q	M	S	I	T	W	Q	L	G	597
<i>M. mulatta</i>	ALOX15	S	L	Q	M	S	I	T	W	Q	L	G	597
Mensch	ALOX12	C	L	Q	M	A	I	S	W	H	L	S	598
Jisaka + Borngräber 2													
Mensch	ALOX12B	T	C	I	T	L	L	V	L	W	T	L	635
Maus	alox12b	T	C	I	V	L	L	V	L	W	T	L	635
Kaninchen	ALOX15	S	S	L	Q	M	S	I	V	W	Q	K	597
Mensch	ALOX15	A	S	L	Q	M	S	I	T	W	Q	L	596
Zebrafisch	LOX1	S	C	V	Q	M	A	I	T	W	H	L	604
Coffa													
Hase	ALOX15	E	I	N	V	R	A	R	N	G	L	V	408
Maus	alox15	E	I	N	V	R	A	R	S	D	L	I	408
Mensch	ALOX15	E	I	N	V	R	A	R	T	G	L	V	407
<i>P. pygmaeus</i>	ALOX15	E	I	N	V	R	A	R	T	G	L	V	407
<i>M. mulatta</i>	ALOX15	E	I	N	T	R	A	R	T	Q	L	I	407
Mensch	ALOX12	E	I	N	T	R	A	R	T	Q	L	I	407
Mensch	ALOX15B	H	I	N	T	L	A	R	E	L	L	I	421
Mensch	ALOX5	A	I	N	T	K	A	R	E	Q	L	I	415
Mensch	ALOX12B	Q	I	N	S	I	G	R	A	V	L	L	446
Maus	alox12b	Q	I	N	S	I	G	R	A	L	L	L	445
Koralle	8R-LOX	A	V	N	S	V	G	I	K	A	L	L	457
Koralle	8R-LOX (Fus.)	A	I	D	T	I	G	R	K	E	L	I	432
Zebrafisch	LOX1	E	I	N	C	R	G	R	T	Q	L	L	415

2.2.2. Klonierung der Zebrafisch LOX1 und Einbau in ein Expressionsplasmid

Nach der Präparation der Zebrafisch LOX1-cDNA durch RT-PCR wurde das PCR-Produkt zunächst in den Klonierungsvektor pCMV-Sport 6.1 einkloniert, danach erfolgte eine Restriktionsspaltung mit Not I und EcoRV. Anschließend wurde eine PCR mit dem BD-Advantage 2 PCR Enzyme System durchgeführt, um das LOX-Insert zu amplifizieren. Die entsprechenden Primer waren so beschaffen, dass die kodierende Sequenz von einer Sal I- und einer Hind III-Schnittstelle flankiert wurde (2.1.4., Abb 2.1). Das PCR-Produkt wurde mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigt, in den pCR 2.1-TOPO-Vektor einkloniert (Abb. 2.2) und in TOP-10 kompetente Zellen eintransformiert. Die transformierten Zellen wurden auf einer Agaroseplatte ausplattiert. Nach 12-stündiger Kultivierung wurden ausgewählte Zellklone präpariert. Von diesen wurde Plasmid-DNA hergestellt und mehrere Kontrollspaltungen mit EcoR I sowie mit Sal I und Hind III durchgeführt. Es zeigten sich die vorhergesagten Banden

(Abb. 2.2) und die anschließende komplette Sequenzierung des Expressionsplamids bestätigte eine erfolgreiche Klonierung.

Im Folgenden wurde ein Plasmid mit der Kaninchen-ALOX15 im Expressionsvektor pQE-9 sowie das zuvor beschriebene Plasmid der Zebrafisch LOX1 im TOPO 2.1-Vektor präparativ mit Sal I und Hind III gespalten, um den Expressionsvektor und das Zebrafisch-LOX1-Insert in einer präparativen Agarosegelelektrophorese zu separieren. Die Mengenbestimmung des Inserts erfolgte mit Hilfe der GIBCO Low DNA Mass Ladder, die des Vektors mit Hilfe der GIBCO High DNA Mass Ladder. Anschließend wurden Insert und Vektor mittels T4 DNA-Ligase ligiert, wobei das Start-Methionin der LOX deletiert und durch das ATG des pQE-9 Expressionsvektors ersetzt wurde.

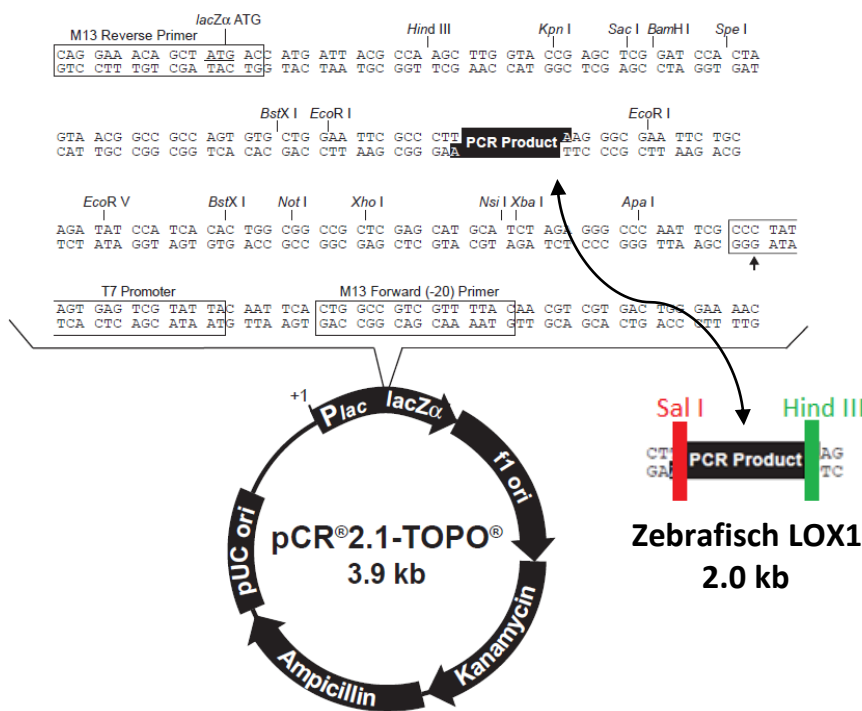


Abb. 2.1: Vektor-Karte von pCR 2.1. TOPO modifiziert nach Invitrogen, Begrenzung des LOX-Inserts durch Sal I- und Hind III- Schnittstellen.

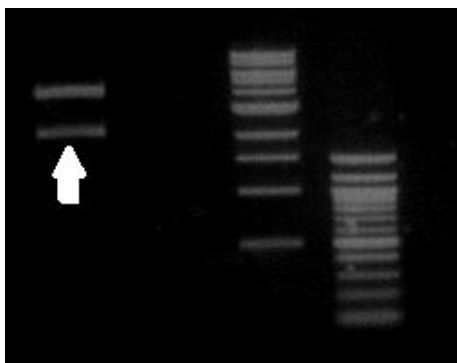


Abb. 2.2: Agarose-Gelelektrophorese nach Spaltung des in Abb. 2.1 dargestellten Plasmids mit Sal I und Hind III. Im linken Bildfeld ist ein 3879bp-Fragment zu sehen, welches den Großteil des Vektors darstellt, unter diesem Fragment zeigt sich das 2022bp Zebrafisch LOX1-Insert (weißer Pfeil). Rechts im Bild GIBCO Low DNA Mass ladder und High DNA Mass ladder.

2.2.2.1. Transformation kompetenter Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid

Das Zebrafisch LOX1-pQE9-Plasmid wurde für eine nachfolgende Expression in TOP-10 kompetente Zellen transformiert, für andere Zwecke wie DNA-Aufreinigung in XL-1 kompetente Zellen. Den kompetenten Zellen wurden nach dem Auftauen, verschiedenen Phasen auf Eis und einem Warmwasserbad von 30 sek bei 37°C SOC- oder NZY- Medium hinzugegeben. Am Ende der Transformation wurden die Bakterien auf LB_{Amp}-Platten (LB-Medium mit Zusatz von 0,1 mg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Erzeugung von Punktmutanten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Dabei wurde nach dem Standardprotokoll des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene vorgegangen. Diese Methode beruht darauf, eine Mutationsmatrize nicht 1:1 zu kopieren sondern eine gezielte genetische Veränderung in einer Kopie der Matrize zu erzeugen (Abb. 2.3). Die Veränderung wird durch speziell konstruierte Primer (2.1.4.) erzielt, die sich zwar an die entsprechende DNA-Sequenz der Matrize anlagern, sich jedoch genetisch bewusst von ihr unterscheiden durch ein oder zwei abweichende Basenpaare. Durch diese veränderten Primer wird mittels der DNA-Polymerasen des Kits, beispielweise der PfuTurbo DNA-Polymerase, ein verändertes DNA-Produkt synthetisiert. Die ursprüngliche Wildtypmatrize, die methylierte Basen enthält, wurde anschließend durch die Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Der neu synthetisierte DNA-Strang enthält durch die verwendeten Primer eine induzierte Mutation, ist nicht methyliert und wird somit nicht durch DpnI abgebaut. Danach wird der mutierte Einzelstrang verdoppelt und kann nun zur Bakterientransformation verwendet werden.

Ein wesentlicher Faktor für den Erfolg dieser Methode ist neben den Temperatur- und Zeitparametern der PCR vor allem die Sequenz der Mutageneseprimer, die laut Hersteller des Mutagenese-Kits folgender Gleichung genügen sollten:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

„T_m“=Schmelzpunkt, „%GC“= Anteil an G-/C-Basen), „N“= Länge des Primers in bp, „% mismatch“= % der abweichenden bp bezogen auf den gesamten Primer. Der Schmelzpunkt der Primer sollte bei mindestens 78°C liegen. Ein hoher GC-Anteil erhöht den Schmelzpunkt, ebenso lange Primer sowie wenige abweichende bp des Primers im Vergleich zur Matrize.

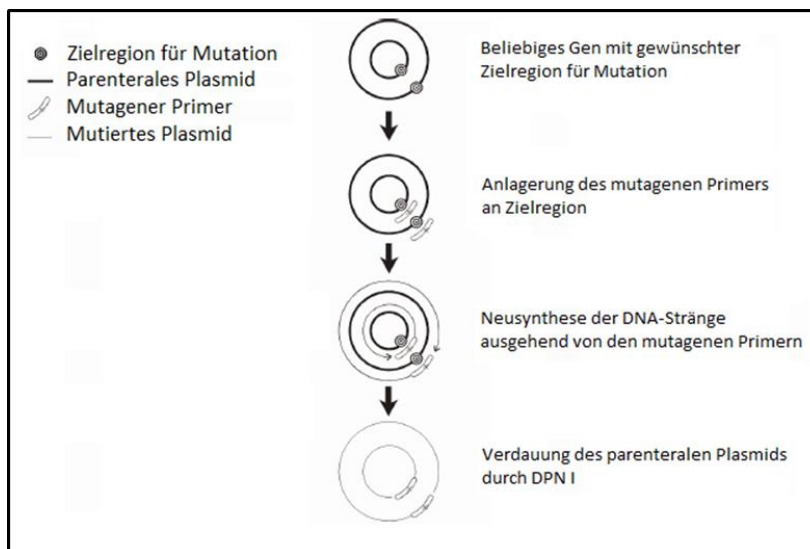


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der ortsspezifischen Mutagenese, modifiziert nach Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual. Durch individuell erstellte Primer (2.1.4.), die zwar an die Matrize binden, sich jedoch in einigen wenigen bp von ihr unterscheiden, werden neue mutierte DNA-Stränge synthetisiert. Die Matrize wird am Ende des Arbeitsablaufes spezifisch abgebaut, da sie im Gegensatz zum neu entstandenen DNA-Strang methyliert ist.

2.2.4. Expression der Zebrafisch LOX1 und der Enzymmutanten

Als Expressionsvektor diente das Plasmid pQE-9. Der Vektor beinhaltet einen N-terminalen poly-His-Tag, so dass 6 Histidine am N-Terminus des Proteins angehängt werden. Aufgrund dieser Struktur ist die Möglichkeit zur effizienten Aufreinigung des rekombinanten Proteins über Nickel-Agarose bzw. Ni-TED-Säulen (2.2.5.) gegeben. Darüber hinaus stellen die Histidine das Epitop für spezifische anti-His-Antikörper dar, die für die spezifische Färbung des rekombinanten Proteins im Western Blot verwendet werden können (2.3.3.).

Nach Transformation (2.2.2.1.) wurde eine ausgewählte Bakterienkolonie von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher abgehoben und in 5 ml LB_{Amp} über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Dieses Vorgehen war für das Wildtypenzym und die Mutanten identisch. Es wurden mindestens 5 Proben des Wildtypenzym und jeder Mutante aufgearbeitet. Nach mindestens 16 h der Kultivierung wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Im Anschluss an eine Inkubation von 4 h bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei 4°C für 10 min mit 2.000 rpm abzentrifugiert, anschließend mit PBS gewaschen und die Pellets mit einer Ultraschallsonde (Labsonic, Braun Melsungen) aufgeschlossen. Danach wurden die Proben erneut bei 4°C für 10 min mit 4.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und von diesem 50 µl als Aliquot für spätere Western Blot-Untersuchungen abgenommen. Der restliche Überstand wurde für die Aktivitätsassays (2.3.1.) aufgearbeitet.

2.2.5. Proteinreinigung (Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie)

45 mg Ni-TED (bzw. nach anderem Protokoll Ni-Agarose) wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 2x mit PBS gewaschen und bei 10°C für 4 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Die bakteriellen Lysatüberstände der Expression (2.2.4.) wurden mit dem so präparierten Ni-TED in den Eppendorfgefäßen vermischt und für 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Das für 2 min mit 2.000 rpm abzentrifugierte Ni-TED wurde nun in eine Leersäule überführt, 2x mit 320 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Säule sechsmal mit 240 µl Elutionspuffer eluiert. Die Enzymreinigung ist auf das Vorliegen des poly-His-Tags (2.2.4.) zurückzuführen. Proteine mit einer His-Tag-Region binden spezifisch an Ni-Agarose bzw. Ni-TED, da die Stickstoff-Atome des Histidins das Nickel im Sinne eines Chelatbildners komplexieren. Beim Waschvorgang werden somit möglichst viele Fremdmoleküle herausgewaschen, während Proteine mit poly-His-Tag an der Säule gebunden werden. Der Elutionspuffer hingegen verdrängt mit seinem Imidazol-Anteil die poly-His-Tag-gebundenen Proteine von der Ni-TED-Säule kompetitiv.

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH = 8,0

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

Eine weitergehende Aufreinigung des Enzyms erfolgte mit einer Resource Q-Säule (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Sweden) durch FPLC-Anionenaustauschchromatographie. Wie bei den unter 2.3.2. genannten chromatographischen Methoden kommt es zu spezifischen Wechselwirkungen einer stationären Phase, in diesem Fall des Gels im Inneren der Resource-Q-Säule, mit den vorgereinigten Enzymmolekülen, die sich in der mobilen Phase befinden. Um eine optimale Reinigungswirkung zu erzielen, erfolgte zunächst eine Equilibrierung der stationären Phase, bei der die Ladungen der stationären Teilchen durch Ionen mit Gegenladung (Chlorid) aufgehoben werden. Nun folgt das Auftragen einer Probe, so dass sich Proteine mit entgegengesetzter Ladung an die stationäre Phase binden (Verdrängung der Chloridionen), während Proteine mit anderem Ladungsmuster herausgewaschen werden. Bei der nachfolgenden Elution wird die Ladung des Laufmittels kontinuierlich durch Erhöhung des Salzgehaltes im Laufmittel erhöht. Dadurch werden die gebundenen Proteine sukzessiv von der stationären Phase kompetitiv verdrängt. Da die verschiedenen anionischen Proteine mit unterschiedlicher Affinität

an die chromatographische Matrix gebunden werden, werden sie während des Elutionsprozesses zu verschiedenen Zeiten eluiert und damit voneinander getrennt

2.3. Analytische Methoden

2.3.1. LOX-Aktivitätsassay

Der Überstand des Bakterienlysats (2.2.4.) wurde mit Arachidonsäure als Substrat versetzt (Endkonzentration 125 μM) und für 15 min bei 37°C und unter ständigem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Hydroperoxyverbindungen (HPETE) durch Zugabe von Natriumborhydrid reduziert. Nach Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure auf pH 3 präzipitierten die enthaltenen Proteine durch Zugabe von 0,5 ml Methanol. Das Präzipitat wurde für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die klaren proteinfreien Überstände wurden direkt für die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC, 2.3.2.) verwendet, wobei mindestens 5 Analysen für ein Enzym bzw. eine Enzym-Mutante angefertigt wurden.

2.3.2. Analytik der LOX-Produkte (HPLC)

Nach der Produktpräparation (2.3.1.) wurde die Menge der entstandenen Reaktionsprodukte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) quantifiziert (Abb. 2.4). Das Wesen der HPLC besteht in der Wechselwirkung von Stoffen, die sich in einer Flüssigkeit befinden (mobile Phase) mit der chromatographischen Matrix, die sich in der Trennsäule befindet (stationäre Phase).

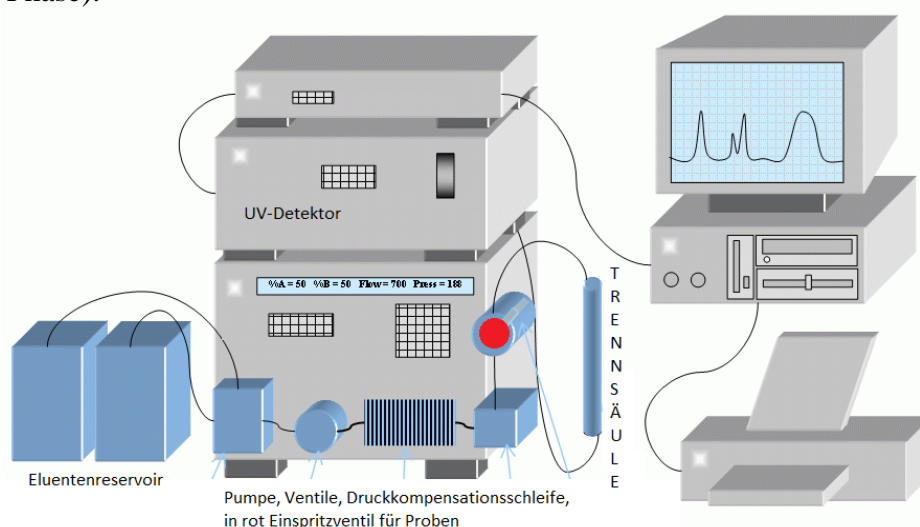


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (modifiziert, Schumacher 2003). Die Probe wird in das Einspritzventil (rot) injiziert und durchläuft unter hohem Druck die Trennsäule. An der Trennsäule ergibt sich je nach Probeninhalt eine verschiedene Verweildauer, so dass die Inhaltsstoffe zeitlich aufgetrennt werden. Nach Passage der Trennsäule misst ein UV-Detektor die Absorption der nun aufgetrennten Inhaltsstoffe und übermittelt die Daten an einen Computer. Am Ende gelangt die Probe in das Eluentenreservoir.

Je nach physikochemischer Affinität der Analytmoleküle zur stationären Phase ergeben sich unterschiedliche Retentionszeiten für die Inhaltsstoffe der zu analysierenden Probe. Eine Pumpe befördert das Elutionsmittel unter einem Druck von etwa 350 bar durch die Säule. Durch die Wechselwirkung der Analytbestandteile in der mobilen Phase (Lösungsmittel) werden die Analytmoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zur stationären Phase zu unterschiedlichen Zeiten von der chromatographischen Matrix abgelöst und gelangen mit dem Säulenefflux in den Detektor, welcher die Lichtabsorption der eluierten Produkte bei einer definierten Wellenlänge (235 nm) misst. Die gesammelten Daten werden an einen Computer übertragen, der das Chromatogramm (zeitlicher Verlauf der Lichtabsorption) erstellt. Durch den Einsatz von Standardsubstanzen kann die chromatographische Skala (Retentionszeit) geeicht werden. Dabei spiegelt die Fläche unter der Kurve die Produktmenge wieder. Produkte, die nach der analytischen HPLC noch für andere Untersuchungen benötigt werden, können nach ihrem Durchfluss durch den Detektor im Eluentenreservoir aufgefangen und damit präpariert werden. Je nach Beschaffenheit der stationären Phase lassen sich unterschiedliche HPLC-Arten unterscheiden:

i) Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC): Bei der RP-HPLC wird meistens modifiziertes Kieselgel als chromatographische Matrix verwendet. Dabei sind die polaren OH-Gruppen des Kieselgels mit langkettigen Kohlenwasserstoffen derivatisiert, so dass hydrophobe Verbindungen längere Retentionszeiten aufweisen. Die RP-HPLC wurde an einer HP-Chemstation mit einem HP 1040A Diodenarraydetektor durchgeführt. Eine Nucleosil C-18 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) diente als Trennsäule mit einer entsprechenden Vorsäule (30 x 4 mm). Die Proben wurden in einem Laufmittelgemisch aus Methanol/Wasser/Essigsäure in einem Verhältnis von 80/20/0,1 (Vol.%) gelöst und mit einer mobilen Phase gleicher Lösungsmittelzusammensetzung bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Die Detektion erfolgte beim Extinktionsmaximum der zu untersuchenden Produkte, üblicherweise bei 235 nm für die konjugierten Diene der Hydro[peroxy]fettsäuren.

ii) Normalphasen-HPLC (SP-HPLC): Bei der SP-HPLC wird überwiegend polares Kieselgel als stationäre Phase verwendet. Deshalb werden polare Substanzen mit hoher Affinität gebunden, während apolare Moleküle kaum retiniert werden. Dadurch können Substanzen, deren Retentionseigenschaften sich in der RP-HPLC nicht hinreichend voneinander unterscheiden (z.B. 12-HETE und 8-HETE), getrennt werden. Nach RP-HPLC wird das präparierte Produkt im Vakuumverdampfer getrocknet und die zurückbleibenden Lipide in n-Hexan/0,1 % Essigsäure

gelöst. Anschließend wurden die Proben mittels SP-HPLC analysiert. Dabei wurde eine Nucleosil 100-7 Säule (250 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) mit einem SPD-M6A-Detektor (Shimadzu) verwendet. Die Detektion erfolgte ebenfalls bei 235 nm Wellenlänge, als Laufmittel kam n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure im Verhältnis von 100/2/0,1 zur Anwendung (Flussrate 1 ml/min).

iii) Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC): Die oben genannten HPLC-Varianten trennen verschiedene Positionsisomere der Hydroxyfettsäuren. Eine chromatographische Trennung von Enantiomeren ist hingegen nicht möglich. Dies kann jedoch durch Chiralphasen-HPLC erreicht werden. Enzymatische Lipidperoxidation führt zu einer Produktmischung, bei der ein einzelnes Produktisomer (z.B. 12S-HETE) dominiert. Im Gegensatz dazu führen nicht-enzymatische Oxidationsreaktionen üblicherweise zu racemischen Gemischen. Auf diese Weise kann durch die Enantiomerenanalytik festgestellt werden, ob die Produkte unspezifisch durch Autoxidation entstanden sind oder gezielt durch katalytische Aktivität von LOXen gebildet wurden. Dafür wird das Vakuum-getrocknete Produkt aus RP- und/oder SP-HPLC in n-Hexan/0,1 % Essigsäure aufgenommen und der CP-HPLC zugeführt. Die Trennung erfolgte an einer chiralen stationären Phase (Chiralcel OD bzw. OB, 250 x 4,6 mm, Diacel. Chem. Industries, USA) bei einer Flussrate von 2 ml/min in Laufmitteln unterschiedlicher Zusammensetzung, z.B. n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure 100/2/0,1 oder 100/5/0,1. Die Detektion erfolgte ebenfalls bei 235 nm mit dem SPD-M6A Detektor (Shimadzu). Die LOX-Enantiomere besitzen gleiche Absorptionseigenschaften. Das Enantiomerverhältnis kann deshalb direkt aus dem Flächenverhältnis von S- und R-Isomer errechnet werden.

2.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Auftrennung und anschließender Quantifizierung der rekombinanten Proteine wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli angewandt (Laemmli 1970). Hierbei wurden 10 %ige Gele für den Massenbereich von 16 – 70 kDa hergestellt und die Elektrophorese bei 25 – 30 mA durchgeführt. Das fertige Elektropherogramm wurde schließlich weiter für einen Western Blot verwendet (Abb. 2.5).

Dazu wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (1 h bei 10 V) überführt. Anschließend wurde der Blot mit 5 % Magermilch in PBS mit einem Zusatz von 0,1 % TWEEN 20 (PBS_{TWEEN}) blockiert und 1 h mit einem anti-His-Tag Antikörper (RGS-His, 1:5000, Verdünnung Maus IgG) inkubiert. Dieser

Antikörper ist gegen den poly-His-Tag der rekombinanten LOX gerichtet. Nach Waschen mit PBS_{TWEEN} wurde der Blot 1 h mit dem 2. Antikörper (anti-Maus IgG Antikörper, 1:5000 Verdünnung) inkubiert, welcher mit einer Peroxydase markiert ist. Nach erneuter Waschung mit PBS_{TWEEN} und PBS wurde dem Blot das chromogene Substrat aus dem Western Lightning Chemilumineszenz Plus System der Firma Perkin Elmer zugefügt. Die Peroxydase des 2. Antikörpers setzt dieses Substrat um, wobei Licht freigesetzt wird. Die emittierten Lichtquanten sind proportional zur Menge des zu quantifizierenden Proteins und können direkt quantifiziert werden.

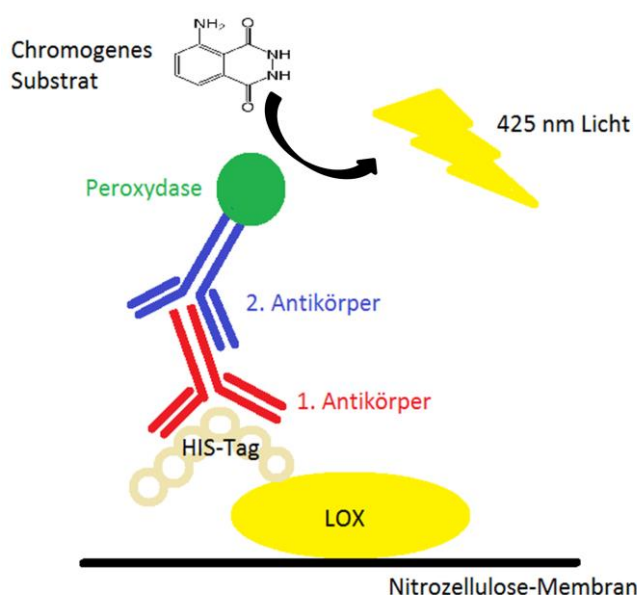


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Western Blot Analyse. Der 1. Antikörper bindet an den His-Tag der LOX, ein 2. Antikörper mit Peroxydase-Aktivität bindet an den 1. Antikörper. Die Peroxydase setzt ein chromogenes Substrat wie Luminol um, so dass elektromagnetische Wellen emittiert werden, die messbar sind.

2.3.4. Proteinquantifizierung

Die Höhe der Expression des rekombinanten Proteins wurde anhand der Chemilumineszenzintensität der Westernblotfärbung quantifiziert (2.3.3.). Zur Auswertung diente die Software TotalLab TL 100. Durch Auftragung einer definierten Proteinmenge gereinigter His-Tag-LOX konnte die Intensität dieser Bande als Referenzwert genutzt werden. Die Bandenintensität der Wildtypenzyme und der verschiedenen Mutanten wurde anschließend in die Proteinmenge umgerechnet.

2.4. Untersuchung der Membranbindungseigenschaften der Zebrafisch LOX1

2.4.1. N-Terminus Trunkation

Um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss die N-terminale Domäne der Zebrafisch LOX1 auf die Membranbindung hat, wurde eine N-terminale Trunkationsmutante angefertigt.

Dazu wurde ein 5'-Primer konstruiert, der sich unmittelbar vor der katalytischen Domäne an die nichtmutierte LOX1-cDNA anlagert und eine Sal-I Schnittstelle enthielt (2.1.4.). Als 3'-Primer wurde jenes Oligonukleotid verwendet, das schon für die Klonierung der Wildtyp-cDNA zum Einsatz kam. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den TOPO-Vektor einkloniert und in Top-10 kompetente Zellen transformiert. Nach DNA-Präparation erfolgte die präparative Spaltung mit Sal I und Hind III und die Gelextraktion der trunkierten LOX1-cDNA. Das trunkierte Insert wurde nun in den pQE-9-Vektor ligiert und als trunkiertes poly-His-Tag-Fusionsprotein exprimiert. Die dadurch neu entstandene N-terminale Trunktionsvariante war um 116 Aminosäuren verkürzt und wanderte in der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa.

2.4.2. Membranbindungsassay

Die gereinigten rekombinanten Enzymvarianten wurden zunächst für 10 min bei 4°C mit 20.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 1,3 µg der Wildtyp Zebrafisch LOX1, seiner N-terminalen Trunktionsvariante sowie zur Kontrolle der Kaninchen ALOX15 mit verschiedenen Biomembranmodellen inkubiert. Zur Anwendung kamen einerseits submitochondriale Membranen (SMP) aus Rinderkardiomyozyten, die sich aufteilen lassen in EDTA gewaschene SMP und nicht EDTA gewaschene SMP. Andererseits kamen EDTA gewaschene Membranen des endoplasmatischen Retikulums (EKRM) der Bauchspeicheldrüse vom Hund zum Einsatz (Crane 1956). Diese Modellmembranen wurden zunächst in 50 mM HEPES Puffer aufgenommen (pH = 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT) und mit den LOX-Präparationen für 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 25 µl). Die Proben wurden danach vorsichtig auf 100 µl Saccharoselösung (500 mM Saccharose in HEPES-Puffer) geschichtet und in einer Beckmann-Tabletop-Zentrifuge für 15 min bei 4°C mit 65.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet, das aufgrund der Zentrifugalkräfte durch die Saccharoselösung hindurch gedrückt wurde, enthielt den membrangebundenen Anteil der LOX, der Überstand den nicht membrangebundenen Anteil. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und mit 1 µl Ovalbuminlösung (Endkonzentration 60 µg/ml) versetzt. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 20-%iger Trichloressigsäure ausgefällt und das Proteinpräzipitat nach 20 min Inkubation auf Eis für 20 min mit 14.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinpräzipitate und der Überstand wurden in 25 µl doppelt konzentriertem Ladungspuffer (Roti-Load) aufgenommen und Aliquots von 10 µl für die Elektrophorese in 10 %igem Polyacrylamidgel verwendet. Der weitere Verlauf mit SDS-PAGE und Proteinquantifizierung

stellte sich wie bei 2.3.3. und 2.3.4 beschrieben dar. Auf diese Weise konnte der relative Anteil von membrangebundener bzw. nicht membrangebundener LOX quantifiziert werden.

2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Aktivitätsmessungen (2.3.2.) erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2013. Bei den Ergebnissen der spezifischen Aktivität von der Wildtyp-Zebrafisch LOX1 und ihrer Mutanten sind die Mittelwerte und Standardabweichung angegeben, für jede HPLC-Untersuchung (2.3.2.) wurden dabei mindestens 5 Proben einer Enzympräparation verwendet, die von 5 unterschiedlichen Bakterienklonen stammten. Die Expression dieser 5 Proben wurde jeweils im Western Blot (2.3.3.) quantifiziert. Damit konnte für jede Enzymprobe die spezifische katalytische Aktivität in der Maßeinheit $\mu\text{g H(P)ETE}/\mu\text{g Enzym und min}$ angegeben werden. Die Angaben zur Reaktionsspezifität (1.2.2.) und bei Inaktivität einer Enzymspezies beruhen ebenfalls auf der Messung jeweils 5 verschiedener Bakterienkolonien.

Bei den Untersuchungen zur Membranbindung (2.4.2.) hingegen wurde nur ein Membranbindungsassay durchgeführt und anschließend durch Western Blot (2.3.3.) quantifiziert. In diesem Fall erübrigte sich die statistische Auswertung.

3. ERGEBNISSE

3.1. Identifizierung der Zebrafisch-LOXen

3.1.1. In silico Screening genomischer Zebrafischdatenbanken nach LOX-Sequenzen

Wie unter 2.2.1. beschrieben, wurde die Ensembl PEP_ALL-Zebrafisch-Datenbank (www.ensembl.org, Spudich 2007, Zugriff Februar 2008) mit Hilfe einer typischen LOX Proteinsequenz durchsucht, um potentielle LOX-Sequenzen im Zebrafischgenom zu identifizieren. Die Suchsequenz wurde durch den Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener tierischer LOX-Isoformen definiert. Dabei ergab sich, dass die Transkriptdatenbank 10 potentielle LOX-Transkripte enthält, die aus 7 verschiedenen Genen hervorgehen. 3 der 10 Transkripte konnten als alternative Spliceprodukte einer gemeinsamen prä-mRNA identifiziert werden. Für unsere Untersuchungen konzentrierten wir uns zunächst auf die *D. rerio* LOX1 (Ensembl Transcript ID ENSDART00000101126) und *D. rerio* LOX2 (Ensembl Transcript ID ENSDART00000079884), zu deren katalytischen Eigenschaften zu Beginn der Arbeiten noch keine experimentellen Daten vorlagen.

3.1.2. Sequenzvergleich der Zebrafisch-LOXen mit den menschlichen Isoformen

Um diese Enzyme einer der 6 funktionellen humanen LOX-Isoformen zuordnen zu können, wurde ein Aminosäurevergleich beider Proteine mit allen humanen LOX-Isoformen durchgeführt (Tab. 3.1). Dabei ergab sich, dass die *D. rerio* LOX2 auf der Aminosäureebene zu 74% identisch mit der humanen 5-LOX (ALOX5) ist. Der Identitätsgrad zu den anderen humanen Isoformen variierte zwischen 37-41%. Damit kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei der *D. rerio* LOX2 um ein Enzym handelt, das funktionell am ehesten der humanen 5-LOX (ALOX5, 1.2.5.) entspricht. Spätere Untersuchungen zur Positionsspezifität dieses Enzyms haben bestätigt, dass 5-H(P)ETE das dominierende Oxidationsprodukt der Arachidonsäure ist (Adel S., persönliche Mitteilung).

Führt man einen ähnlichen Vergleich der Aminosäuresequenz der *D. rerio* LOX1 mit den humanen LOX-Isoformen durch, fällt auf, dass dieses Enzym einen ähnlichen (ca. 40%) Identitätsgrad zu allen humanen LOX-Isoformen hat. Damit kann auf der Basis der Aminosäuresequenz nicht wirklich gefolgert werden, welchem humanen Enzym die *D. rerio* LOX1 funktionell entspricht.

Humane LOX-Isoformen	% übereinstimmende Aminosäuren	
	<i>D. rerio</i> LOX1	<i>D. rerio</i> LOX2
12/15-LOX	44	37
5-LOX	45	74
platelet-type 12-LOX	45	38
epidermal 15-LOX (15-LOX2)	43	39
12R-LOX	41	40
eLOX3	41	41

Tab. 3.1: Aminosäuren-Homologie der *D.rerio* LOX1 und *D.rerio* LOX2 verglichen mit humanen LOX-Isoformen.

3.1.3. Syntenie der Zebrafisch-LOXen zu humanen und murinen Genabschnitten

Eine weitere Möglichkeit zur funktionellen Zuordnung der unter 3.1.1. genannten Zebrafisch-Isoenzyme ist der Vergleich der chromosomalen Lokalisation zwischen den LOX-Genen beim Zebrafisch und den LOX-Genen beim Menschen und bei der Maus. Die humane ALOX5 liegt auf Chromosom 10, das murine Gen in einer funktionell äquivalenten Region auf Chromosom 6. Alle anderen humanen und murinen LOX-Isoenzyme liegen in einem gemeinsamen Gencluster, das sich beim Menschen auf Chromosom 17 und bei der Maus auf Chromosom 11 befindet.

Die Zebrafisch LOX2, die wie unter 3.1.2. dargestellt, eine ähnliche Primärstruktur wie die humane ALOX5 besitzt und zugleich 5-H(P)ETE als Hauptreaktionsprodukt bildet, liegt beim Zebrafisch ebenfalls isoliert von anderen LOX-Genen auf Chromosom 13 in einer Region, die als syntenisch zu den ALOX5 Regionen des humanen Chromosoms 10 und des murinen Chromosoms 6 bezeichnet werden kann (www.ensembl.org, Spudich 2007, Zugriff 30.6.13). Das Zebrafisch LOX1-Gen liegt ebenfalls isoliert als einzelnes LOX-Gen auf Chromosom 7, während alle anderen Gene der potentiellen Zebrafisch-LOXen auf den Chromosomen 21 und 15 liegen. Als syntenische Region der Zebrafisch LOX1 beim Menschen ist am ehesten der Genabschnitt des humanen ALOX12-Gens oder ALOX15-Gens zu sehen (beide Chromosom 17), bei der Maus das Gencluster von *alox12*, *alox12e* und *alox15* (Chromosom 11).

3.1.4. Potentielle Mutationstargets (Sequenzdeterminanten der Reaktionsspezifität)

In der Vergangenheit wurden für eine Vielzahl unterschiedlicher LOX-Isoformen verschiedene Sequenzdeterminanten beschrieben, die je nach LOX-Isoform mehr oder weniger starken Einfluss auf die Positions- und Stereospezifität von LOXen besitzen (Vogel 2010, Borngraber 1996, Borngraber 1999, Sloane 1991, Meruvu 2005, Coffa 2004, Jisaka 2000, 1.2.2.). Mit der Kenntnis um diese kritischen Aminosäurereste wurde im Kapitel 2.2.1. und Tabelle 2.1 ein multiples Alignment durchgeführt, um die kritischen Aminosäuren der Zebrafisch LOX1 zu

identifizieren. Auf der Grundlage dieses Alignments erfolgte die ortsgerichtete Mutagenese des Enzyms (2.2.3. und 3.3.).

3.2. Expression und Charakterisierung der Wildtyp-Zebrafisch LOX1

3.2.1. Expression der Zebrafisch LOX1 als rekombinantes His-tag Fusionsprotein

Bis zum Beginn dieser Arbeit gab es in der Literatur noch keinerlei experimentelle Daten zur Charakterisierung von Zebrafisch-Lipoxygenasen. Auch das multiple Aminosäurealignment (2.2.1., Tab. 2.1.) und der Homologie-Abgleich zu den humanen Isoformen (3.1.2., Tab 3.1) ergaben keine eindeutigen Hinweise auf mögliche Funktionsparameter (z.B. Positionsspezifität) dieses Enzyms. Deshalb wurde im Folgenden die *D. rerio* LOX1 als rekombinantes His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert.

Zur Quantifizierung der Höhe des Expressionsniveaus erfolgte nach der Expression des rekombinanten Enzyms und nach der Präparation des Lysatüberstandes der transformierten Bakterien zunächst eine Ni-TED-Affinitätschromatographie (2.2.5.), bei der His-Tag- Proteine an der Affinitätsmatrix gebunden und dann mit einem Elutionspuffer abgewaschen wurden. Dadurch wurden Fremdproteine weitestgehend entfernt und die LOX1 in einem relativ kleinen Volumen konzentriert. Der LOX1-Gehalt der verschiedenen Ni-TED Elutionsfraktionen wurde durch Western Blot Analysen (2.3.3.) quantifiziert (2.3.4., Abb. 3.1).

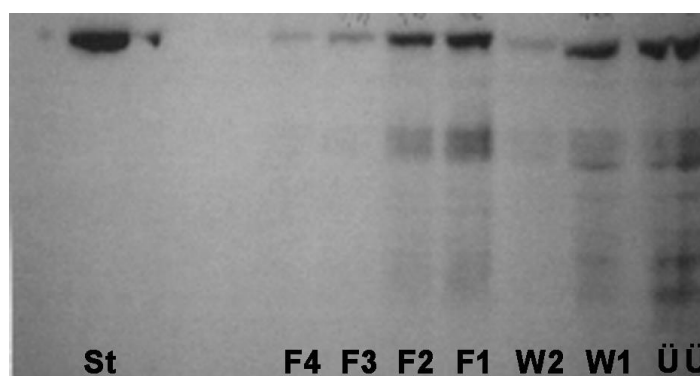


Abb. 3.1: Western Blot der Zebrafisch LOX1. Ü= Lysatüberstand , W= Waschfraktionen, F= Elutionsfraktionen, ST= 0,26 µg FPLC-gereinigter Standard der *P.pygmaeus* ALOX15 (Vogel 2010). Die F1-Fraktion entsprach 0,2 µg Zebrafisch LOX1.

Aus der quantitativen Blotanalyse geht hervor, dass die rekombinante LOX1 in *E. coli* exprimiert wurde (immunoreaktives Protein, welches in der SDS-PAGE mit einem authentischen Standard der ALOX15 von *P. pygmaeus* wandert). Die Hauptmenge des Enzyms wurde in den Elutionsfraktionen F1, F2 und F3 wiedergefunden. Leider wurde auch in der ersten

Waschfraktion (W1) und im Lysatüberstand (Ü) bereits rekombinante LOX nachgewiesen, was möglicherweise darauf zurückzuführen war, dass die Säulenkapazität (maximale LOX-Bindung) überschritten wurde. Aus der Quantifizierung des Western Blots ließ sich eine Expressionshöhe der LOX1 von ca. 2,7 µg LOX1-Protein / L Bakterienkultur ableiten. Diese Quantifizierung gilt jedoch nur unter der Annahme, dass die immunologische Reaktivität der für die Färbung verwendeten anti-His-Tag Antikörper mit der *P. pygmaeus* 12/15- LOX und der *D. rerio* LOX1 vergleichbar ist. Da beide Enzyme den gleichen His-Tag enthalten und dieser aufgrund der globalen LOX-Struktur auch sterisch nicht abgeschirmt sein sollte, ist diese Annahme durchaus plausibel.

Vergleicht man die Expressionshöhen der *D. rerio* LOX1 mit der Expressionshöhe anderer rekombinanter LOX-Isoformen, kann geschlussfolgert werden, dass das Zebrafischenzym bei gleichen Expressionssystemen deutlich geringer exprimiert wird als z.B. die humane ALOX15. Für die anstehenden Experimente zur enzymatischen Charakterisierung des Enzyms war die Expressionshöhe jedoch ausreichend, so dass keine weiteren Optimierungsversuche unternommen wurden.

3.2.2. Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Zebrafisch LOX1

Um die katalytische Aktivität der Zebrafisch LOX1 zu charakterisieren, wurde ein Aliquot der Elutionsfraktion F1 in Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 100 µM Arachidonsäure bei 37°C für 15 min inkubiert (2.3.1.) und die Reaktionsprodukte durch eine mehrstufige HPLC-Analysestrategie (2.3.2.) identifiziert (Abb. 3.2).

In der RP-HPLC zeigte sich, dass $97,7\% \pm 2\%$ der entstandenen konjugierten Diene mit einem Standard von 12-HETE cochromatographierten (Tab. 3.2). Der 15-HETE-Anteil am Produktmuster betrug im arithmetischen Mittel nur $2,3\% \pm 2\%$. Da aber in der RP-HPLC unter den verwendeten analytischen Bedingungen 12-HETE, 9-HETE und 8-HETE nicht sicher voneinander getrennt werden, wurde der 12-HETE- Peak der RP-HPLC aufgefangen und anschließend mittel SP-HPLC analysiert (Abb. 3.2, „A“, kleines Chromatogramm). Dabei zeigte sich, dass der 12-HETE Peak der RP-HPLC nicht homogen war sondern dass sich darunter sowohl 12- als auch 9-HETE befand. Die relativen Anteile der beiden Produkte ließen sich aus den quantifizierbaren Flächeninhalten ableiten. Danach entfielen ca. 83 % auf 12-HETE und 17 % auf 9-HETE. 11- und 8-HETE wurden nur in geringen Mengen nachgewiesen. Insgesamt zeigte das Wildtypenzym eine spezifische Aktivität von $0,16 \pm 0,025$ µg H(P)ETE pro µg Enzym und min. Anzumerken ist noch, dass 9-HETE ein ungewöhnliches Reaktionsprodukt für eine tierische LOX darstellt, bei LOXen anderer Taxa ist dies jedoch nicht der Fall (Hansen 2013,

Garreta 2011). Bei Haas et al. 2011 wurde gar 8-HETE als 2. Reaktionsprodukt der Zebrafisch LOX1 angeführt.

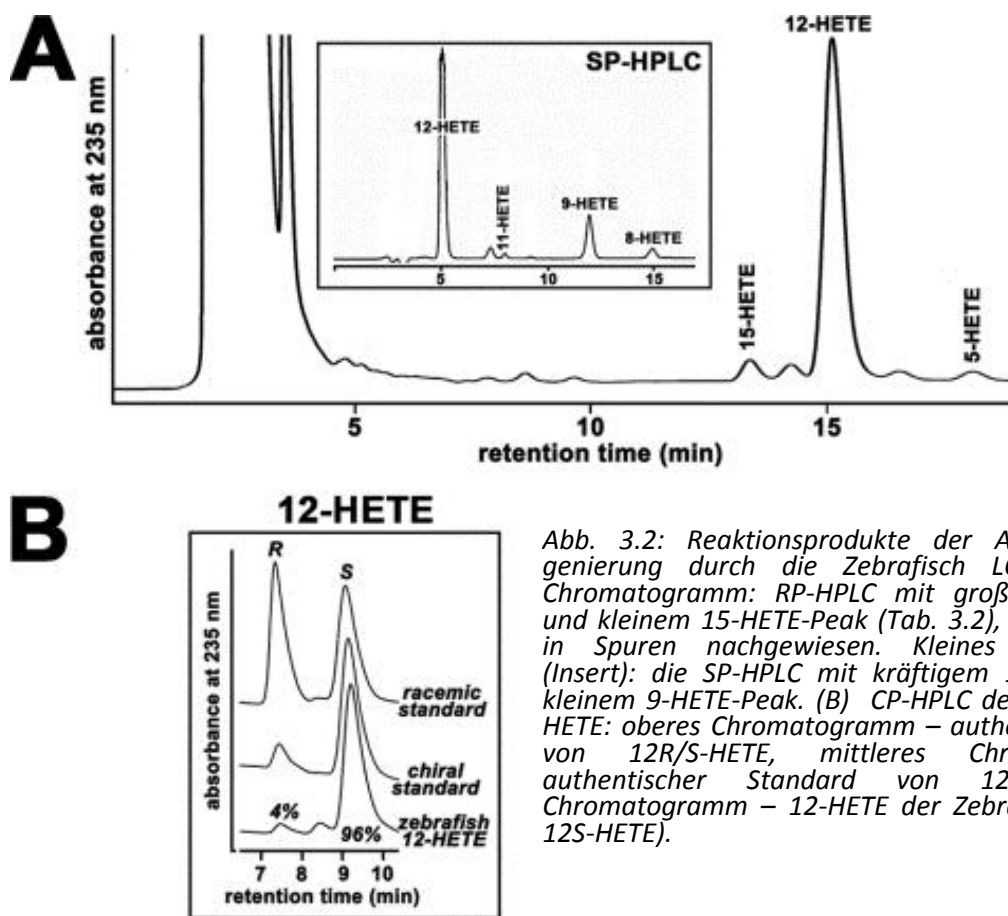


Abb. 3.2: Reaktionsprodukte der Arachidonsäureoxygenierung durch die Zebrafisch LOX1. (A) Großes Chromatogramm: RP-HPLC mit großem 12-HETE-Peak und kleinem 15-HETE-Peak (Tab. 3.2), 5-HETE wurde nur in Spuren nachgewiesen. Kleines Chromatogramm (Insert): die SP-HPLC mit kräftigem 12-HETE-Peak und kleinem 9-HETE-Peak. (B) CP-HPLC des präparierten 12-HETE: oberes Chromatogramm – authentischer Standard von 12R/S-HETE, mittleres Chromatogramm – authentischer Standard von 12S-HETE, unteres Chromatogramm – 12-HETE der Zebrafisch-LOX1 (96 % 12S-HETE).

LOXen besitzen in aller Regel eine hohe Stereoselektivität (1.2.2.2.), d.h. sie wandeln Arachidonsäure entweder zu den entsprechenden S- oder R-HETE Isomeren um. Um die Stereoselektivität der Zebrafisch LOX1 aufzuklären, wurden die dominanten Arachidonsäure-Oxygenierungsprodukte mittels Chiralphasen-HPLC (2.3.2., Abb.3.2 B) analysiert. Dabei ergab sich, dass 96% des 12-HETE in der S-Konfiguration vorlagen. 12R-HETE war hingegen nur in geringen Mengen nachweisbar. Dieses Ergebnis war vor allem deshalb überraschend, weil das Enzym entsprechend seiner Aminosäuresequenz eigentlich als R-LOX zu klassifizieren gewesen wäre, zumal es an einer kritischen Stelle seiner Sequenz (Coffa- Determinante, Coffa 2004, 1.2.2.2.) ein kleines Glycin enthält. Umfangreiche Sequenzvergleiche hatten in der Vergangenheit mehrfach gezeigt, dass LOXen mit kleinen Resten an dieser Position R-LOXen sein sollten. Im Gegensatz dazu tragen S-LOXen ein größeres Alanin an dieser Position. Damit bleibt festzuhalten, dass das A vs G- Konzept für die Zebrafisch LOX1 nicht anwendbar ist und somit keine Allgemeingültigkeit bei tierischen LOXen besitzt.

Enzymspezies	Produkt (%)	Spezifische Aktivität [$\mu\text{g H(P)ETE}/\mu\text{g Enzym x min}$]
Wildtyp Zebrafisch LOX1	12-H(P)ETE (81,3%)* 9-H(P)ETE (16,4%)* 15-H(P)ETE (2,3%)*	0,16 \pm 0,025

Tab 3.2: Reaktionsprodukte der Wildtyp-Zebrafisch LOX1 nach Inkubation mit 100 μM Arachidonsäure bei 37°C für 15 min (2.3.1.) und Quantifizierung durch RP-HPLC und SP-HPLC (2.3.2.). Das Hauptreaktionsprodukt stellt 12-H(P)ETE dar. *Standardabweichung 2%

Die Zebrafisch LOX1 kann in *E. coli* als His-Tag Fusionsprotein exprimiert werden, wobei die Expressionshöhe mit 2,7 μg LOX Protein/ L Flüssigkultur unter der Expressionshöhe anderer LOX-Isoformen liegt. Das rekombinante Enzym oxygeniert Arachidonsäure hauptsächlich zu 12S-H(P)ETE, so dass es als 12S-LOX kategorisiert werden kann. Das A vs G- Konzept ist nicht auf die Zebrafisch LOX1 anwendbar und besitzt somit keine Allgemeingültigkeit.

3.3. Ortsgerichtete Mutagenese der Zebrafisch LOX1

3.3.1. Mutagenese der kritischen Aminosäuren des Triaden-Konzepts

Aus der Kristallstruktur der Kaninchen ALOX15, aus vielfachen Mutageneseuntersuchungen an diesem Enzym und durch Experimente mit gezielt veränderten Substratfettsäuren (Walther 2001, Borngräber 1999, Vogel 2010, 1.2.2.1.) konnte geschlossen werden, dass das aktive Zentrum des Enzyms aus einer gekrümmten stiefelförmigen Substratbindungstasche besteht, welche das katalytische Eisen enthält und deren Boden durch die Seitenketten von 3 Aminosäuren gebildet wird (F353 als Borngräber 1- Determinante, I418+Met419 als Sloane- Determinanten, I593 als Borngräber 2- Determinante). Durch das Einführen von Aminosäuren mit kleineren Seitenketten an diesen 3 kritischen Positionen wird die Substratbindungstasche erweitert, so dass die Substratfettsäure tiefer in die Tasche eindringen kann (1.2.2.1., Abb. 1.5). Dadurch verschiebt sich der Ort der initialen Wasserstoffabstraktion vom C13 des Arachidonsäuremoleküls zum C10, so dass ein anderes Produktisomer (12-HETE) gebildet wird. Mit dieser Strategie kann eine 15-lipoxygenierende ALOX15 mit relativ geringem Aufwand in eine 12-lipoxygenierende Enzymspezies umgewandelt werden. Umgekehrt wäre es vorstellbar, ein 12-lipoxygenierendes Enzym durch die gezielte Einführung größerer Aminosäurereste an den Triadendeterminanten in ein 15-lipoxygenierendes Protein umzuwandeln. Für die humane ALOX12 konnte eine solche Veränderung prinzipiell gezeigt werden (Vogel 2010).

Entsprechend dem Triaden-Konzept sollte demnach das Einbringen großer Aminosäurereste an den Triadenpositionen der Zebrafisch LOX1 zur 15-Lipoxygenierung der Arachidonsäure führen, zumal die Wildtyp-Zebrafisch LOX1 ein überwiegend 12-lipoxygenierendes Enzym darstellt (3.2.2.). Allerdings führten sämtliche Versuche, größere Aminosäurereste an der Bornträger I- und II-Determinante sowie an den Sloane-Determinanten zu integrieren (F359W, V424I, V425M, V424I+V425M Doppelmutante, V424F, V425F, V424F+V425F Doppelmutante, I600F, I600W) zu Enzymmutanten, deren Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung sich in der RP-HPLC (2.3.2.) nicht vom Wildtypenzym unterscheiden ließ (Tab. 3.3). Im Western-Blot (2.3.3.) ließ sich für alle Mutanten eine immunoreaktive Bande nachweisen (Abb. 3.3), was die Expression der entsprechenden Mutanten belegte. Einige der getesteten Mutanten waren aber katalytisch inaktiv.

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zusammengefasst. Das Wildtypenzym zeigte eine spezifische LOX-Aktivität von $0,16 \pm 0,025$ μg HETE Bildung pro μg LOX Protein x min. Eine ähnliche spezifische Aktivität zeigte die V242I-Mutante. Die V425M, V424F und I600F Mutanten waren durch eine abgesenkte katalytische Aktivität charakterisiert. Die Einzellmutanten F359W, V425F und I600W sowie die Doppelmutanten V424I+V425M und V424F+V425F waren inaktiv. Die Auswertung der RP-HPLC-Profile ergab, dass der mit 12-HETE cochromatisierte Anteil bei allen Mutanten dominant war. Bei keiner Mutanten wurde ein signifikanter Anstieg der 15-HETE Bildung nachgewiesen.

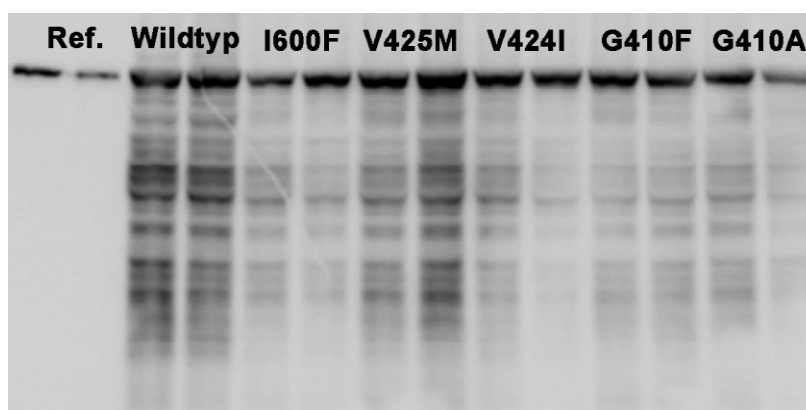


Abb. 3.3: Western Blot nach affinitätschromatographischer Aufreinigung (2.2.5.) ausgewählter Mutanten der Zebrafisch LOX1. Ref. = $0,112$ μg und $0,056$ μg FPLC- gereinigter Standard der humanen ALOX15. Von den hier dargestellten Enzymspezies waren I600F, V25M und G410F katalytisch inaktiv (Tab.3.3), obwohl sie in hinreichender Menge exprimiert wurden. Im Rahmen dieses Blots wurden lediglich 2 Proben einer Enzymspezies quantifiziert, um zeitnah einen Überblick über die Expressionshöhen möglichst vieler Mutanten auf einmal zu erhalten. Insgesamt wurden jedoch von jeder Enzymspezies 5 Proben untersucht, um die Stichprobe für statistische Zwecke aussagekräftiger zu gestalten (2.5.).

Determinante	Enzymspezies	Produkt (%)	Spezifische Aktivität [$\mu\text{g H(P)ETE} / \mu\text{g Enzym} \times \text{min}$]
	Wildtyp	12-H(P)ETE (97,7%)# 15-H(P)ETE (2,3%)#	$0,16 \pm 0,025$
Borngräber 1	F359W	Nicht aktiv	--
Sloane	V424I	12-H(P)ETE (99%)* 15-H(P)ETE (1%)*	$0,113 \pm 0,016$
	V425M	12-H(P)ETE (99%)* 15-H(P)ETE (1%)*	$0,021 \pm 0,004$
	V424I+V425M	Nicht aktiv	--
	V424F	12-H(P)ETE (99,9%)* 15-H(P)ETE (0,1%)*	$0,046 \pm 0,017$
	V425F	Nicht aktiv	--
	V424F+V425F	Nicht aktiv	--
Borngräber 2	I600F	12-H(P)ETE (97,8%)* 15-(H(P)ETE (2,2%)*	$0,026 \pm 0,013$
	I600W	Nicht aktiv	--

Tab. 3.3: Funktionelle Konsequenzen der ortsgerichteten Mutagenese der Triadendeterminanten (1.2.2.1.) in der RP-HPLC und Wildtyp-Zebrafisch LOX1 in der RP-HPLC. Es wird deutlich, dass sich die Positionsspezifität trotz zahlreicher Mutationen nicht verändern ließ. Jeweils 5 verschiedene Bakterienkolonien exprimierten eine bestimmte Enzymspezies (2.2.4.), so dass 5 Messungen in der RP-HPLC (2.3.2.) pro Enzymspezies erfolgten. Sämtliche Enzymspezies, v.a. diejenigen, die katalytisch inaktiv waren, wurden laut Western Blot hinreichend synthetisiert (Abb.3.3). *Standardabweichung <1%, #Standardabweichung 2%.

Die Triadendeterminanten haben für die Reaktionsspezifität der Zebrafisch LOX1 keine Bedeutung. Die Einführung großer Aminosäuren an diesen Positionen veränderte nicht die Reaktionsspezifität des Enzyms. Einige der hergestellten Mutanten waren katalytisch inaktiv, was auf eine Rolle dieser Aminosäurereste für die Enzymfunktion hindeutet.

3.3.2. Mutagenese der Determinanten des A vs G-Konzepts

Bei der Wildtyp-Zebrafisch LOX1 zeigte sich eine Besonderheit (3.2.2.) in ihrer Coffa-Determinante, die als Grundlage des A vs G-Konzepts dient (Coffa 2004, 1.2.2.2.): Das Wildtyp-Enzym trägt zwar die Coffa-Determinante einer R-LOX, verhält sich aber wie eine S-LOX. Daher waren Mutationen an der Coffa-Determinante besonders interessant.

Analog zu den Determinanten des Triaden-Konzepts verhielt es sich mit Mutationen der Coffa-Determinante (Tab.3.4, G410A, G410L, G410F). Die S-Stereospezifität des Wildtyps ließ sich insbesondere durch die G410A-Mutante ebenso wenig verändern wie die Positionsspezifität. Offenbar ist der prädiktive Wert des A vs G-Konzepts, die Stereospezifität allein anhand der Coffa-Brash-Determinante vorauszusehen, nicht universal anwendbar. Die G410A-Mutante war katalytisch aktiv, während die G410L- und G410F-Varianten keine Aktivität zeigten.

Um zu untersuchen, ob die benachbarten Aminosäuren der Coffa-Determinante bei diesem Zebrafisch-Enzym für die Reaktionsspezifität bedeutsam sind, wurde die C408S/R409I-Doppelmutante (N-terminal der Coffa-Stelle, mutiert zu den entsprechenden Aminosäuren der humanen ALOX12B und der murinen *alox12b*, 2.2.1. Tab.2.1) und die T412A/Q413V-Doppelmutante (C-terminal der Coffa-Stelle, mutiert zu den entsprechenden Aminosäuren der humanen ALOX12B, 2.2.1. Tab. 2.1) hergestellt. Leider zeigten auch die letztgenannten Doppelmutanten keine Aktivität in der RP-HPLC, obwohl eine ausreichende Synthese im Western Blot nachgewiesen wurde. Sie waren alle katalytisch inaktiv.

Determinante	Enzymspezies	Produkt (%)	Spezifische Aktivität [$\mu\text{g H(P)ETE} / \mu\text{g Enzym} \times \text{min}$]
Coffa	G410A	12-H(P)ETE (>99%)* 15-H(P)ETE (<1%)*	0,063 ($\pm 0,032$)
	G410L	Nicht aktiv	0
	G410F	Nicht aktiv	0
Neben Coffa (N-term)	C408S/R409I	Nicht aktiv	0
Neben Coffa (C-term)	T412A/Q413V	Nicht aktiv	0

Tab. 3.4: Funktionelle Konsequenzen der ortsgerichteten Mutagenese der Coffa-Determinante (Coffa 2004, 1.2.2.2) in der RP-HPLC (2.3.2.). Außer der G410A Mutante führten Mutationen an dieser Stelle zu einem Aktivitätsverlust. Jeweils 5 verschiedene Bakterien-Kolonien exprimierten eine bestimmte Enzymspezies (2.2.4.), so dass 5 Messungen in der RP-HPLC pro Enzymspezies erfolgten. Sämtliche Enzymspezies, insbesondere jene mit geringer Aktivität oder gar Inaktivität, wurden laut Western Blot hinreichend synthetisiert. *Standardabweichung <1%.

Die Coffa-Determinante hat für die Reaktionsspezifität der Zebrafisch LOX1 keine Bedeutung. Die Einführung eines Ala an dieser Stelle führte nicht zur Veränderung der Reaktionsspezifität des Enzyms. Der Einbau von Aminosäuren mit noch größeren Seitenketten (Leu, Phe) bewirkte katalytische Inaktivität.

3.3.3. Mutagenese der Determinanten des Jisaka-Postulates

Neben den zuvor genannten kritischen Aminosäureresten hatte sich in der Vergangenheit gezeigt, dass 2 Aminosäurereste bei bestimmten Lipoxygenasen die Ausrichtung des Substrats und damit die Reaktionsspezifität des Enzyms beeinflussen können (Jisaka 2000, 1.2.2.1.). Durch Mutation dieser beiden Jisaka-Determinanten konnte die 8-lipoxygennierende *alox15b* der Maus in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden.

Beim Zebrafisch hingegen (Tab. 3.5) bewirkten Mutationen in diesem Bereich entweder keine Veränderung der Positionsspezifität in der RP-HPLC (V596L) oder führten zu einer inaktiven Enzymspezies (Q597H und Q597D). Auch hier wurde die Expression jeder Mutante im Western-

Blot nachgewiesen. Zu erwähnen ist, dass die V596L-Mutante mit $0,215 \pm 0,014 \mu\text{g H(P)ETE}$ pro $\mu\text{g Enzym} \times \text{min}$ die Enzymspezies mit der höchsten spezifischen Aktivität darstellte. Sie lag damit um mehr als 30 % über der spezifischen Aktivität des Wildtyp-Enzyms, was für LOXen eher untypisch ist. Die strukturellen Ursachen für diese Enzymaktivierung wurden jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit nicht näher untersucht. Es könnte jedoch spekuliert werden, dass diese Mutation zu einem besseren Alignment der Substratfettsäure am aktiven Zentrum führt, so dass die initiale Wasserstoffabstraktion besser ablaufen kann.

Determinante	Enzymspezies	Produkt (%)	Spezifische Aktivität [$\mu\text{g H(P)ETE} / \mu\text{g Enzym}$]
Jisaka	V596L	12-H(P)ETE (99%)* 15-H(P)ETE (1%)*	$0,215 \pm 0,014$
“	Q597H	Nicht aktiv	--
“	Q597D	Nicht aktiv	--

Tab. 3.5: Funktionelle Konsequenzen der ortsgerichteten Mutagenese der Jisaka-Determinanten (Jisaka 2000, 1.2.2.1.) in der RP-HPLC (2.3.2.). Außer der V596L-Mutante führten Mutationen an dieser Stelle zu einem Aktivitätsverlust. Jeweils 5 verschiedene Bakterienkolonien exprimierten eine bestimmte Enzymspezies (2.2.4.), so dass 5 Messungen in der RP-HPLC pro Enzymspezies erfolgten. Sämtliche Enzymspezies, insbesondere jene mit geringer Aktivität oder gar Inaktivität, wurden laut Western Blot hinreichend synthetisiert. *Standardabweichung <1%.

Die Jisaka-Determinante hat für die Reaktionsspezifität der Zebrafisch LOX1 keine Bedeutung. Die Einführung eines Leu an dieser Stelle veränderte die Reaktionsspezifität des Enzyms nicht, erhöhte jedoch die katalytische Aktivität. Der Einbau von His und Asn in der unmittelbaren Nähe der Coffa-Stelle bewirkte eine katalytische Inaktivität, was auf eine Rolle dieser Reste für die Enzymfunktion hindeutet.

3.3.4. N-terminale Trunkation (mini-LOX)

Die Röntgenkristallanalyse der Kaninchen ALOX15 offenbarte, dass sich dieses Enzym aus einer etwa 12 kDa großen N-terminalen β -Faltblattdomäne und einer etwa 63 kDa großen C-terminalen Domäne zusammensetzt (Gillmor 1997, 1.2.3.). Die C-terminale Domäne beherbergt dem Modell nach die katalytische Aktivität, zumal sie das Nichthämeisen und die Substratbindungstasche enthält. Frühere Untersuchungen über den Einfluss der Deletion der N-terminalen Domäne auf die katalytische Aktivität dieses Enzyms haben gezeigt, dass die Trunktionsmutante katalytisch aktiv ist und sich die Reaktionsprodukte nicht wesentlich von den Produkten des Wildtypenzym unterscheiden (Walther 2002). Generell scheint bei den meisten Säugetier-LOXen die N-terminale Domäne nicht zwingend für die in vitro Aktivität der Enzyme erforderlich zu sein sondern erfüllt eher regulatorische Funktionen (Walther 2011).

Unter in vivo Bedingungen könnte dies jedoch anders sein. So scheint die N-terminale Domäne der humanen ALOX5 für die intrazelluläre Aktivität des Enzyms unabdingbar zu sein (Chen 2001), obwohl in vitro Trunkationsexperimente belegten, dass eine deutliche in vitro Aktivität nachweisbar ist und weiter, dass das Produktmuster durch N-terminale Trunkation nicht beeinflusst wird (Kühn et al., unveröffentlicht). Die N-terminale Domäne der humanen ALOX 5 enthält mehrere Calcium-Bindungsstellen und Calciumbindung scheint eine essentielle Voraussetzung für die intrazelluläre Aktivität der ALOX5 zu sein (Hammarberg 2000), für das isolierte Enzym sind die Verhältnisse jedoch andere. Die N-terminal trunkierte Version der murinen 5-LOX besitzt ebenfalls katalytische Aktivität und ist in der Lage, Arachidonsäure zu 5S-H(P)ETE umzuwandeln (Hofheinz 2013). Für die Zebrafisch LOX1 lagen bisher noch keine Untersuchungen zu den funktionellen Auswirkungen einer N-terminalen Trunkation vor.

Vor diesem Hintergrund sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluss das Fehlen des N-Terminus auf katalytische Aktivität (3.3.4.2.) und Membranbindung (3.4.) der Zebrafisch LOX1 ausübt.

3.3.4.1. Expression der N-terminalen Trunktionsmutante (mini-LOX)

Um eine N-terminale Trunktionsmutante der *D. rerio* LOX1 zu erhalten, mussten die N-terminalen 116 Aminosäuren deletiert werden. Diese Enzymvariante wurde dann in analoger Art und Weise wie das Wildtypenzym und seine Punktmutations-Varianten als N-terminales His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert (2.2.4.) und gereinigt (2.2.5.).

Aus Abb. 3.4 geht hervor, dass die N-terminale Trunktionsmutante der Zebrafisch LOX1 in *E. coli* exprimiert wird und aus dem Lysatüberstand als His-Tag Fusionsprotein in *E. coli* isoliert werden kann. Verglichen mit dem Wildtyp (3.2.1.) ließ sich die Trunktionsvariante mit einer Expressionshöhe von ca. 6,9 µg Protein / L Bakterienkultur deutlich besser herstellen. In Abb. 3.4 wird auch der Molekulargewichtsunterschied zwischen der Trunktionsmutante und dem Referenzenzym (komplette ALOX15 von *P. pygmaeus*) deutlich.

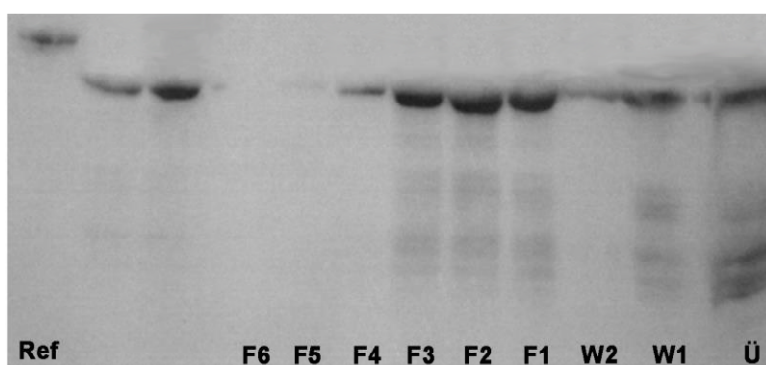


Abb. 3.4: Western Blot (2.3.3.) nach Ni-TED Aufreinigung (2.2.5.) des poly-His-Tag-C-Terminus der Zebrafisch LOX1. Ü=Überstand, W1 und W2= Waschschrte, F1-F6= Elutionsfraktionen, Ref= 0,26 µg FPLC-gereinigter Standard der ALOX15 von *P. pygmaeus*, die beiden nicht beschrifteten Banden neben der Ref-Bande sind ebenfalls Ni-TED gereinigte N-Terminus-Trunktationen der Zebrafisch LOX1 von vorhergegangenen Expressionsreihen, F1 entspricht hier 0,43 µg Protein.

3.3.4.2. Charakterisierung der N-terminalen Trunktionsmutante (mini-LOX)

Vorherige Arbeiten (Walther 2011) haben gezeigt, dass N-terminal trunkierte Lipoxygenasen in vitro katalytisch aktiv sein können. Für die trunkierte humane ALOX5 schien dies hingegen nur für die intrazelluläre Aktivität zu gelten (Chen 2001), später konnte jedoch auch eine in vitro-Aktivität nachgewiesen werden (Kühn et al., unveröffentlicht). Da die Zebrafisch LOX1 den derzeit existierenden Hypothesen zur Reaktionsspezifität von LOXen (1.2.2.) nicht folgte (3.3.1., 3.3.2., 3.3.3.), konnten keine gesicherten Vorhersagen zur katalytischen Aktivität der Trunktionsvariante dieses Enzyms gemacht werden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die N-terminale Trunktionsmutante der Zebrafisch LOX1 keine katalytische Aktivität besitzt (Tab. 3.6). Möglicherweise beherbergt die N-terminale Domäne des Enzyms für die Aktivität wichtige Strukturbestandteile. Es könnte aber auch sein, dass die regelrechte Faltung des Enzyms durch die N-terminale Trunkation beeinträchtigt wurde. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten lässt sich nicht sicher unterscheiden.

Enzymspezies	Produkte (%)	Spezifische Aktivität [$\mu\text{g H(P)ETE} / \mu\text{g Enzym} \times \text{min}$]
Wildtyp	12-H(P)ETE (97,7%) [#] 15-H(P)ETE (2,3%) [#]	0,16 \pm 0,025
N-Terminus-Trunkation	Nicht aktiv	--

Tab. 3.6: Funktionelle Konsequenzen der Deletion des N-Terminus in der RP-HPLC. Die Deletion des N-Terminus (3.3.4.1.) geht einher mit einem Verlust der katalytischen Aktivität. Jeweils 5 verschiedene Bakterien-Kolonien exprimierten (2.2.4.) diese Trunktionsvariante der Zebrafisch LOX1, so dass 5 Messungen in der RP-HPLC erfolgten. Der Erfolg der Expression wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb.3.4).
[#]Standardabweichung 2%.

Die N-terminale Trunktionsmutante (isoliert exprimierte katalytische Domäne) der Zebrafisch LOX1 ist in *E. coli* als His-Tag Fusionsprotein exprimierbar, besitzt aber keine katalytische Aktivität.

3.4. Membranbindungsassay

Vorherige Arbeiten (Walther 2002) zeigten, dass sich die Bindung der Kaninchen ALOX15 an Biomembranen in vitro deutlich verringert, wenn man die N-terminale Domäne entfernt. Jedoch zeigt die entsprechende N-terminale Trunktionsmutante immer noch die Fähigkeit einer Membranbindung, so dass die N-terminale Domäne nicht als essentiell für die in vitro Membranbindung angesehen werden kann. Die humane ALOX5 vermag intrazellulär ohne den N-Terminus nicht an die Kernmembranen zu translozieren (Chen 2001), obwohl in vitro eine Membranbindung der N-terminalen Trunktionsmutante nachgewiesen werden konnte. Diese

Literaturdaten deuten auf eine Rolle der N-terminalen β -barrel Domäne bei der Membranbindung von LOXen im Allgemeinen hin. Für die Zebrafisch LOX1 waren bislang keine experimentellen Daten zur Rolle der N-terminalen Domäne bei der Membranbindung verfügbar.

3.4.1. Membranbindung der Zebrafisch LOX1 (Wildtypenzym)

Um die Membranbindung der Zebrafisch LOX1 zu untersuchen, wurde der Wildtyp (3.2.) und die N-terminale Trunktionsmutante (3.4.2.) des Enzyms mit submitochondrialen Membranen (SMP) bzw. EDTA High Salt stripped Rough Microsomes (EKRM) als Modelmembranen inkubiert (2.4.2.). Nach Zentrifugation lag der membrangebundene Anteil der LOX im Niederschlag vor, der nicht membrangebundene Anteil befand sich hingegen im Überstand. Die jeweiligen Proteinmengen wurden anschließend im Western Blot (2.3.3.) quantifiziert.

In Abb. 3.5 ist die Verteilung der beiden unterschiedlichen Zebrafisch LOX-Enzymspezies zwischen Membranpellet und Überstand dargestellt. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass der Wildtyp der Zebrafisch LOX1 im Gegensatz zur Kaninchen ALOX15 (Walther 2002) nur eine geringe Affinität zu Biomembranen besitzt. Bei allen Membrantypen war der größte Teil der zugesetzten LOX im Überstand lokalisiert. Nur ein geringer Teil des Enzyms konnte im Membranpellet wiedergefunden werden. Nach diesem Ergebnis verhält sich das Zebrafischenzym in diesem *in vitro* Membranbindungsassay prinzipiell ähnlich wie die ALOX15 des Kaninchens und die alox5 der Maus, obwohl die Membranbindungsaffinität des Wildtypenzyms verglichen mit den anderen LOX-Isoformen deutlich geringer ist. Die relative Verteilung der membrangebundenen Zebrafisch LOX1 und der nicht membrangebundenen Zebrafisch LOX1 stellt Tab. 3.7 dar, darüber hinaus ist hier ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp und seiner N-terminalen Trunktionsmutante (mini-LOX, 3.4.2.) möglich.

3.4.2. Membranbindung der N-terminalen Trunktionsmutante (mini-LOX)

Um die Membranbindung der Zebrafisch LOX1 zu untersuchen, wurde der Wildtyp (3.4.1) und die N-terminale Trunktionsmutante (3.3.4.1) des Enzyms mit submitochondrialen Membranen (SMP) bzw. EDTA High Salt stripped Rough Microsomes (EKRM) als Modelmembranen inkubiert (2.4.2.). Nach Zentrifugation lag der membrangebundene Anteil der LOX im Niederschlag vor, der nicht membrangebundene Anteil befand sich hingegen im

Überstand. Die jeweiligen Proteinmengen wurden anschließend im Western Blot (2.3.3.) quantifiziert.

Für die N-terminale Trunktionsmutante wurden ähnliche Verhältnismäßigkeiten wie beim Wildtyp (3.4.1., Abb. 3.5) beobachtet. Auch hier konnte bei allen Membrantypen der größte Teil des Enzyms im Überstand lokalisiert werden. Vergleicht man die Fähigkeit zur Membranbindung zwischen Wildtyp Zebrafisch LOX1 und ihrer N-terminalen Trunktionsmutante (mini-LOX) miteinander, so stellt man fest, dass die N-terminale Trunktionsmutante für alle Membrantypen eine noch geringere Membranaffinität besitzt als das Wildtypenzym. Somit ist auch die isolierte katalytische Domäne der Zebrafisch LOX1 in vitro in der Lage, an Biomembranen zu binden, ebenso wie die besser untersuchte Kaninchen ALOX15 (Walther 2002). Die relative Verteilung der membrangebundenen N-terminalen Trunktionsmutante und der nicht membrangebundenen N-terminalen Trunktionsmutante stellt Tab. 3.7 dar, darüber hinaus ist hier ein direkter Vergleich zwischen Wildtyp (3.4.1.) und seiner N-terminalen Trunktionsmutante möglich.

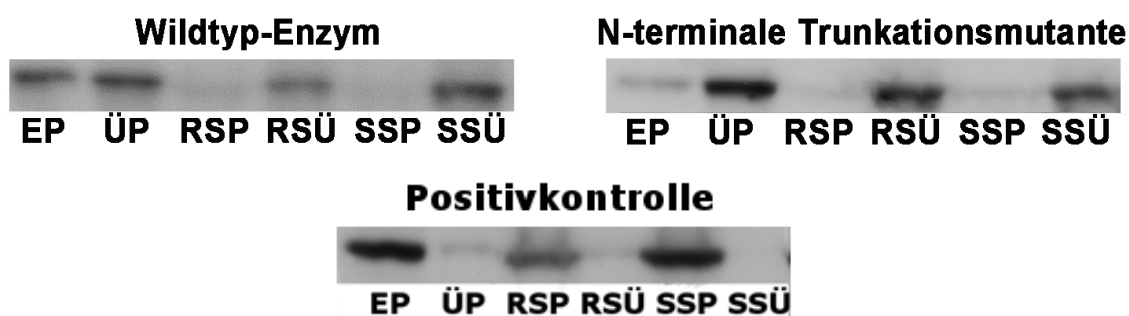


Abb. 3.5: Western Blot (2.3.3.) nach Membranbindungsassay (2.4.2.) mit ECRM- und SMP-Membranen. Der Wildtyp und noch deutlicher das trunkierte Enzym liegen größtenteils nicht membrangebunden vor, da die jeweiligen Banden der Überstände intensiver waren als die dazugehörigen Pellets. SSÜ=Überstand der nicht EDTA gewaschenen submitoch. Membranen SSP= Pellet der nicht EDTA gewaschenen submitoch. Membranen, RSÜ= Überstand der EDTA gewaschenen submitoch. Membranen, RSP= Pellet der EDTA gewaschenen submitoch. Membranen, ÜP= Überstand der endoplasm. Membranen, EP= Pellet der endoplasm. Membranen. Als Positivkontrolle diente die Kaninchen Retikulozyten ALOX15, die überwiegend membrangebunden vorliegt (Walther 2002). Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen dieser Arbeit wurde lediglich ein Membranbindungsassay durchgeführt.

Modelmembran	Wildtyp		N-terminale Trunkation	
	Überstand (%)	Pellet (%)	Überstand (%)	Pellet (%)
EKRM	58,3	41,7	78,3	21,7
EDTA gewasch. SMP	52,7	47,3	59,1	40,9
Nicht EDTA gewasch. SMP	63,4	36,6	77,7	22,3

Tab 3.7: Relative Verteilung der Zebrafisch LOX1 und ihrer N-terminalen Trunktionsmutante nach Membranbindungsassay (2.4.2) und Western Blot (Abb. 3.5). Es wird deutlich, dass die N-terminale Trunktionsmutante eine geringere Membranaffinität besitzt als der Wildtyp, da der prozentuale Anteil der Überstände größer ist als beim Wildtyp. EKRM= Endoplasm. Retikulum-Membranen, SMP= Submitoch. Membranen. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen dieser Arbeit wurde lediglich ein Membranbindungsassay durchgeführt.

Die Zebrafisch LOX1 besitzt, verglichen mit der Kaninchen ALOX15, eine geringere Membranbindungsaffinität. Diese scheint bei der N-terminalen Trunktionsmutante noch deutlicher verringert zu sein.

4. DISKUSSION

4.1. Charakterisierung eines bisher unbekanntes Enzyms vom Zebrafisch

4.1.1. Eigenschaften der Zebrafisch LOX1

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten funktionelle Untersuchungen zu einer bisher nicht untersuchten LOX-Isoform des Modelorganismus Zebrafisch. Bisher waren zwar aus dem Zebrafischgenomprojekt eine große Anzahl von Sequenzdaten für LOX-Gene dieses Modelorganismus verfügbar und es existierte eine umfangreiche Transkriptomdatenbank, es war aber bislang nicht gelungen, eines der LOX-Isoenzyme aus nativen und/oder rekombinanten Quellen zu isolieren und hinsichtlich seiner Eigenschaften zu charakterisieren. Die Zebrafisch LOX1, verschiedene Mutanten sowie eine N-terminal trunke Enzymspezies (Mini-LOX) konnten rekombinant als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden (2.4.2.). Anschließend erfolgte eine Affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine über Ni-TED-Säulen (2.2.5). Dadurch war es erstmals möglich, das Enzym als Protein zu isolieren und dessen wesentliche enzymatische Eigenschaften zu bestimmen. Diese Eigenschaften, vor allem die Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure sind für die Klassifizierung des Enzyms von großer Bedeutung und erlaubten erstmals einen Vergleich mit anderen LOX-Isoformen.

Auf der Basis der Aminosäuresequenz wurde unter Berücksichtigung der bisher verfügbaren Strukturdaten von LOXen ein 3D-Modell der Zebrafisch LOX1 erstellt (Abb. 4.1). Dabei ergab sich, dass trotz des relativ geringen Identitätsgrades der Aminosäuresequenz die 3D-Struktur sehr ähnlich zu bisher kristallisierten LOXen ist. Auch dieses Enzym besteht aus einer einzelnen Peptidkette, die sich in zwei Domänen faltet. Auch hier wird die N-terminale Domäne aus mehreren β -Faltblattstrukturen gebildet, während die katalytische Domäne vor allem aus α -Helices besteht.

Direkte Strukturuntersuchungen wie Kristallisationsstudien oder Experimente zur Eisenligandensphäre oder zum Dimersierungsverhalten des Enzyms konnten nicht durchgeführt werden, da die Menge des rekombinant exprimierten Enzyms nicht ausreichte (3.2.1.). Sollten in der Zukunft Experimente dieser Art geplant werden, müsste zunächst das Expressionssystem optimiert werden, um deutlich höhere Expressionsraten zu erreichen. Dies könnte u.a. durch eine Kodonoptimierung erreicht werden, so dass zumindest ähnliche Expressionsraten erreicht würden, wie das für andere LOX-Isoformen in vergleichbaren Expressionssystemen der Fall ist (z.B. ALOX15 mit 2-3 mg/ L Kulturflüssigkeit). Alternativ sollte man an einen Wechsel des Expressionssystems denken. So konnten in der Vergangenheit z.B. die Schweine Leukozyten

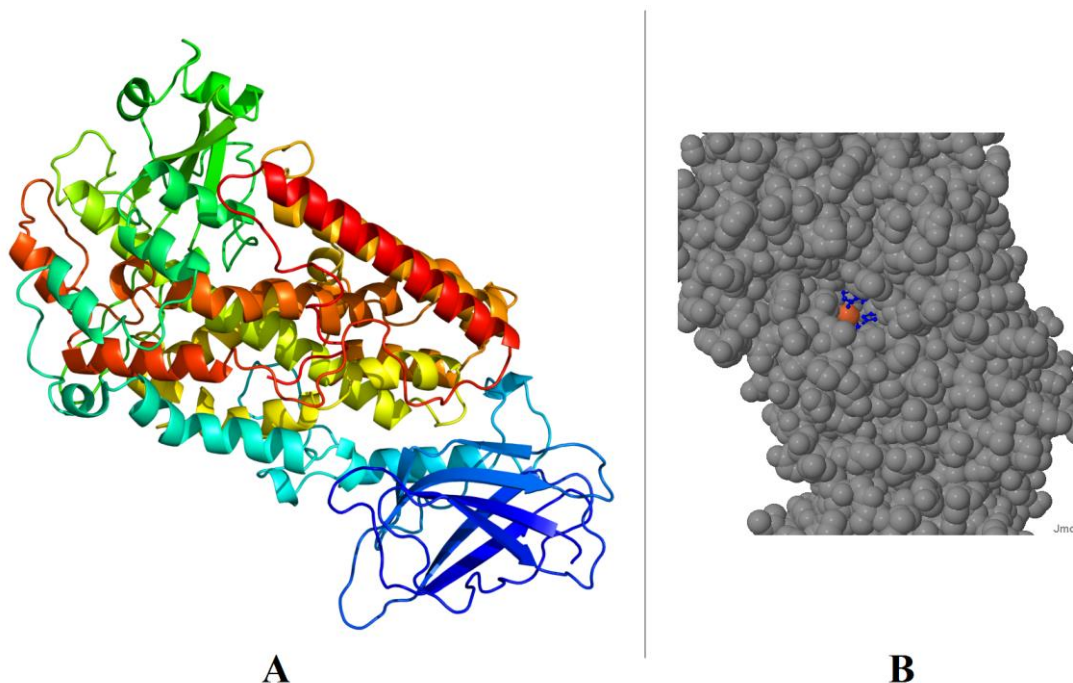


Abb. 4.1: 3D-Modell der Zebrafisch LOX1. (A) Rechts unten im Bild der konstruierte N-Terminus in blau mit β -Faltblättern, über diesem vorwiegend α -helikale Sekundärstrukturen des C-Terminus. Abmessungen in Å: X:72.024; Y:56.652; Z:91.739; Molekulargewicht 77.002 kDa. (B) Konstruierter Zugang zum aktiven Zentrum mit Nichthämeisen (orange) und seinen vermutlichen proteinogenen Liganden His-367, His-372, His 547, Asn-551, Ile-670 (blau). Quellenangabe (A): Kelley LA, Sternberg MJE. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 2009;4: 363 – 371. Quellenangabe (B): Wass M.N., Kelley L.A. and Sternberg MJ. 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures. *NAR* 2010;38: W469-73.

ALOX15 (Reddy 1994) als rekombinantes Protein im Baculovirus-Insektenzell-System exprimiert und isoliert werden.

Ein besonderes Problem bei der Expression von rekombinanten LOXen stellt die Eisenversorgung des Expressionssystems dar. Hochexprimierende Systeme führen manchmal dazu, dass der Eisengehalt der finalen Enzympräparation sich deutlich vom Idealwert (1:1 Fe:Apoproteinverhältnis) unterscheidet. Da ein nachträglicher Eiseneinbau in das exprimierte Apoenzym nicht möglich ist, führt der relative Eisenmangel zu einer strukturellen Mikroheterogenität der rekombinanten LOXen. Für die Expression der Zebrafisch LOX1 wurde der relative Eisengehalt des finalen Enzympräparates nicht exakt quantifiziert. Dies lag zum einen darin begründet, dass die Expressionshöhe des Enzyms so gering war, dass eine verlässliche Eisenbestimmung nicht möglich war, zum anderen konnte selbst bei der Anwendung der FPLC als Proteinreinigungstechnik (2.2.5.) keine homogene Enzympräparation erreicht werden (nicht gezeigte Daten). Es waren im Elektropherogramm immer noch nicht-LOX-Proteinbanden zu sehen und es konnte nicht geklärt werden, ob die dominante Proteinbande bei 75 kDa vollständig auf LOX-Protein zurückzuführen war. Um dies zu überprüfen, hätte eine Bestimmung der N-terminalen Heterogenität der entsprechenden Elektrophoresebande

durchgeführt werden müssen, was mit Blick auf die geringe Expressionshöhe unrealistisch erschien, auch die Coomassie-Färbungen der finalen LOX-Präparationen zeigten Hintergrund-Banden an (nicht gezeigte Daten).

Nach unseren Erfahrungen mit der Expression anderer LOX-Isoformen beeinflusst der Eisengehalt der finalen Enzympräparationen zwar die spezifische Aktivität des Enzyms, nicht aber dessen Reaktionspezifität. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die hier erhaltenen Daten zur Reaktionsspezifität der Zebrafisch LOX1 (3.2.) unabhängig vom Eisengehalt der finalen Enzympräparation sein sollten.

4.1.2. Zuordnung der Zebrafisch LOXen zu humanen Isoformen

Ein Homologie-Abgleich mit humanen LOX-Isoformen (3.1.2., Tab 3.1) erlaubte keine nähere Zuordnung der Zebrafisch LOX1 zu den humanen Isoformen. Unter der Prämisse, dass die humane ALOX5 bereits der Zebrafisch LOX2 entspricht (3.1.2., 3.1.3.), wäre die Rolle einer ALOX5 bereits vergeben, da bisher bekannte Wirbeltiere nur eine einzige 5-lipoxygenierende LOX-Isoform besitzen. Folglich blieben bei einer Übertragung des Systems der 4 phylogenetisch verwandten LOX-Subfamilien von Säugetieren (1.1.2.1.) noch 3 LOX-Isoformen übrig. Die Zebrafisch LOX1 könnte eine 12-lipoxygenierende ALOX15 darstellen, eine Plättchentyp 12-LOX oder eine der Epidermis-Typ-LOXen. Aufgrund der Verteilung der Zebrafisch LOX1 in Haut und Schleimhaut bei Zebrafisch-Embryonen (Haas 2011) erscheint eine Klassifizierung als Epidermis-Typ-LOX plausibel. Auch in Hinblick auf die knock-out induzierten Dottersack- und Perikardödeme der Zebrafisch-Embryonen (Haas 2011) ist eine Einteilung als Epidermis-Typ-LOX hypothetisch nachvollziehbar, da Epidermis-Typ-LOXen die Barrierefunktion dermalen Strukturen beeinflussen können (Krieg 2013, 1.3.5.). Möglicherweise besteht sogar eine Überschneidung zwischen den autosomal rezessiven congenitalen Ichthyosen (ARCI), bei denen einige Formen auf einem Funktionsverlust der humanen ALOXE3 und ALOX12B (Krieg 2013, Osório 2013) beruhen und den bei Haas et al. 2011 entdeckten schweren embryonalen Fehlbildungen der Zebrafisch-Embryonen: Die Beschreibung der Zebrafisch-Embryonen mit Barrierestörung, Fehlentwicklung der Augen etc. ähnelt den schweren Unterformen der autosomal rezessiven congenitalen Ichthyosen. Wenn es diesbezüglich Überschneidungen geben sollte, liegt die Vermutung nahe, dass die Zebrafisch LOX1 auch der humanen ALOX12B entsprechen könnte, zumal dieses Enzym funktionell sowieso mit der ALOXE3 gekoppelt ist (Krieg 2013). Wie bei 3.1.3. dargestellt, liegt das Gen der Zebrafisch LOX1 jedoch in einer syntenischen Region der humanen Gene ALOX12 und ALOX15, nicht jedoch in einer syntenischen Region der Gene der humanen Epidermis-Typ-LOXen. Diese

Diskrepanz zwischen Funktion der Zebrafisch LOX1 beim Zebrafisch und ihrer Genlokalisierung könnte einer phylogenetischen Dynamik dieser LOX-Isoform bei niederen Wirbeltieren wie dem Zebrafisch entsprechen (4.4.2.), eine eindeutige Zuordnung der Zebrafisch LOX1 zu einer humanen Isoform kann an dieser Stelle jedoch nicht erfolgen.

Um weitere LOXen aus den 10 potentiellen LOX-Transkripten des Zebrafisches zuzuordnen, wäre deren Expression und enzymatische Charakterisierung hilfreich.

4.2. Die Zebrafisch LOX1. Ein Enzym, das Modelvorstellungen untergräbt

4.2.1. Unvereinbarkeit mit dem Triadenkonzept der Positionsspezifität

In der Vergangenheit wurde ein Zusammenhang zwischen dem Volumen der Substratbindungstasche und der Positionsspezifität von Säugetier 12/15-LOXen erkannt (1.2.2.1., Vogel 2010, Borngräber 1996, 1999, Sloane 1991). Das Wesen dieser Volumen-Hypothese besteht aus der Modifizierung dreier kritischer Aminosäurenreste (Triaden-Konzept), die den Boden einer stiefelförmigen Substratbindungstasche ausmachen und nach ihren Erstbeschreibern Borngräber I- und Borngräber II- Determinante und Sloane-Determinante genannt werden. Je kleiner die Seitenketten der 3 kritischen Determinanten, desto tiefer dringt die Fettsäure mit dem Methyl-Terminus (ω -Ende) voran in die Tasche hinein, desto näher am Carboxyl-Terminus (α -Ende) erfolgt die Oxygenierung (1.2.2.1. Abb. 1.5).

Die Triadendeterminanten der Zebrafisch LOX1, Phe-359 (Borngräber I), Val-424 bzw. Val-425 (Sloane) und Ile-600 (Borngräber II) ließen eine dominante 15-Lipoxygenierung der Arachidonsäure vermuten, da sich die Kaninchen ALOX15 lediglich in der Sloane-Determinante Ile-418 von den Triadendeterminanten der Zebrafisch LOX unterscheidet (2.2.1., Tab. 2.1). Alle Mutationen an den Triadenresten veränderten die Reaktionsspezifität des Enzyms jedoch nicht signifikant (3.3.2.). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Triadenkonzept nicht auf die Zebrafisch LOX1 anwendbar ist. Einschränkend muss dabei erwähnt werden, dass einige der hergestellten Triadenmutanten katalytisch inaktiv waren. Das Volumen der mutmaßlichen Substratbindungstasche scheint folglich zwar eine Rolle für die Enzymaktivität zu spielen, zu der Bildung alternativer Oxygenierungsprodukte kam es allerdings nicht. Ähnliche Resultate wurden auch bei Mutationen im Bereich der Jisaka-Determinante (Jisaka 2000, 3.3.3.) erzielt. Die Jisaka-Determinante beeinflusst offenbar die Substratausrichtung am aktiven Zentrum der humanen und murinen ALOX15B und bestimmt somit die unterschiedliche Reaktionsspezifität der beiden Enzyme. Als molekulare Ursache dafür wird ein inverses Alignment des Substrats am Enzym diskutiert. Bei der Zebrafisch LOX1 hingegen führte eine Vergrößerung der Jisaka-

Determinante (V596L) zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität, nicht aber zu einer Änderung der Reaktionsprodukte in der RP-HPLC. In diesem Fall scheint also die möglicherweise einzige Reaktionsspezifität des Enzyms gefördert worden zu sein. Natürlich ist es auch denkbar, dass die entscheidenden Determinanten der Struktur-Funktionsbeziehung für dieses Enzym in den vorliegenden Untersuchungen nicht erfasst wurden. In diesem Fall jedoch wäre die Zebrafisch LOX1 die erste Wirbeltier-LOX, die keinem dargestellten Erklärungsmodell folgt. Dies könnte daran liegen, dass die Zebrafisch-LOX phylogenetisch älter ist als andere besser untersuchte Wirbeltier-LOXen (4.4.). Auch die Weichkorallen 11R-LOX (Eek 2012, 1.2.6.) ist phylogenetisch älter als die Wirbeltier-LOXen (nicht gezeigte Daten) und Mutationen der Triadendeterminanten und der Jisaka-Determinante konnten das Muster der Reaktionsprodukte nur geringfügig verändern, die größte Veränderung wurde mit der Borngräber II-Determinante (V609W der Weichkoralle) erreicht.

Für die noch älteren LOX-Isoformen der Bakterien sind ebenfalls keine Konzepte für die Positionsspezifität bekannt. Daher sind weitere funktionelle Untersuchungen, wie in dieser Arbeit erfolgt, an phylogenetisch älteren LOX-Isoformen unentbehrlich, um ein alternatives Modell der Positionsspezifität zu entwickeln. Die funktionellen Ergebnisse könnten dann mit neuen Kristallstrukturen dieser LOX-Isoformen in Zusammenhang gebracht werden. Darüber hinaus ist bei einigen LOX-Isoformen der Mechanismus der Positionsspezifität mit der Stereospezifität verbunden, so dass für diese Enzyme auch die Inhalte von 4.2.2. gelten.

4.2.2. Unvereinbarkeit mit dem A vs G-Konzept der Stereospezifität

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass zwei Epidermis-Typ-LOXen (Maus alox15b und humane ALOX15B) einerseits sowie die humane ALOX12B und die Korallen 8R-LOX einen kritischen Aminosäurenrest enthalten, der in unterschiedlichem Ausmaß die Stereospezifität der Enzyme beeinflusst (Coffa 2004, 1.2.2.2.). Diese Coffa-Determinante ist bei vielen S-LOXen als Alanin konserviert und bei vielen R-LOXen als Glycin. Dem Modell nach liegt das Wesen der Stereospezifität darin begründet, dass Sauerstoff bei den Alanin-konservierenden LOX-Isoformen eine andere Zugangsstelle zum Substrat besitzt als bei Glycin-konservierenden Enzymen. In beiden Fällen greift dem Modell nach zwar Sauerstoff auf der gleichen Ebene des Substrats an, aber an unterschiedlichen Positionen des Kohlenwasserstoffrückgrates der Fettsäure. Nun sind die verfügbaren unterschiedlichen Positionen des Kohlenwasserstoffrückgrates aber automatisch verknüpft mit einer unterschiedlichen Stereokonfiguration (1.2.2.2. Abb. 1.6). Bei einer gegebenen LOX-Isoform, beispielsweise einer 12-LOX, sei daher von den Reaktionsprodukten 12S-H(P)ETE und 8R-

H(P)ETE auszugehen, oder falls Sauerstoff von der gegenüberliegenden Ebene angreifen würde, 12R-H(P)ETE und 8S-H(P)ETE. Das Model basiert also stets auf dem Unterschied von 4 C-Atomen und gleichzeitigem Wechsel der Stereokonfiguration: Die zusätzliche Methylgruppe des Ala blockiert bei S-LOXen die Sauerstoffinsertion an der S[+2]-Position des Pentadienylradikals, so dass nur eine R[-2]-Sauerstoffinsertion möglich ist. Ist ein kleines Gly an der Coffa-Determinante vorhanden, ist hingegen eine Sauerstoffinsertion an der S[-2]-Position möglich. Auch vor diesem Hintergrund ist die Formierung von 9-HETE als 2. Reaktionsprodukt der Wildtyp-Zebrafisch LOX1 (3.2.2.) zwar ungewöhnlich, jedoch nachvollziehbar wenn man bedenkt, dass bisherige Modelvorstellungen von diesem Enzym ebenfalls nicht befolgt wurden.

Ein möglicher Kritikpunkt der A vs G-Hypothese ist, dass das Volumen einer Methylgruppe (etwa 20 \AA^3) im Van-der-Waals-Model den entscheidenden Unterschied ausmachen soll. Das Van-der-Waals-Volumen des molekularen Sauerstoffs beträgt jedoch etwa 50 \AA^3 . Aufgrund dieser Diskrepanz ist der Unterschied der Methylgruppe von etwa 20 \AA^3 nur genau dann relevant, wenn zusätzlich bereits ein Hohlraum in der Substratbindungstasche von mindestens 30 \AA^3 präformiert wäre. Für einen solchen Hohlraum gibt es aktuell kein strukturelles Korrelat, möglicherweise ist dieser jedoch nicht permanent vorhanden sondern bedingt durch flüchtige Konformationsänderungen schwierig zu erfassen. Darüber hinaus gibt es einige bekannte Erweiterungen und Ausnahmen des A vs G-Konzeptes: Bei der *alox12b* der Maus konnte durch Veränderung der Borngräber II-Determinante Val-631 (V631A) ebenfalls eine vermehrte 8S-H(P)ETE-Bildung erreicht werden, so dass hier ein neuer Mechanismus und die A vs G-Hypothese gemeinsam zutreffen (Meruvu 2005). Als Ursache für den stereospezifischen Effekt der Borngräber II-Determinante wurde erneut eine andere Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum angenommen. Eine weitere Ergänzung des A vs G-Konzeptes ist für die murine *alox12* nötig, Dieses Enzym trägt an der Position der Coffa-Determinante ein deutlich größeres Serin und arbeitet als S-LOX (Coffa 2004). Die Anwendbarkeit der A vs G-Hypothese ist noch deutlicher eingeschränkt, wenn prokaryotische LOX-Isoformen betrachtet werden. Gleich mehrere Quellen belegen, dass bei bakteriellen LOXen der prädiktive Wert der A vs G-Hypothese, die Stereospezifität allein anhand eines Aminosäurenrestes vorherzusehen, nicht gegeben ist (Hansen 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Reaktionsprodukte der Mini 9R-LOX von *Nostoc sp.* PCC 7120 9R- und 13R-HODE sind; das Enzym besitzt jedoch ein Alanin als Coffa-Determinante und sollte damit als S-LOX fungieren (Andreou 2008). Noch vor der Einführung der A vs G-Hypothese zeigten zwei LOX-Isoformen des Cyanobakteriums *Anabaena variabilis* (ATCC 29413 / PCC 7937) 9R-lipoxygenierte Fettsäuren, obwohl beide LOXen ein Alanin als Coffa-Determinante tragen (Murakami 1992).

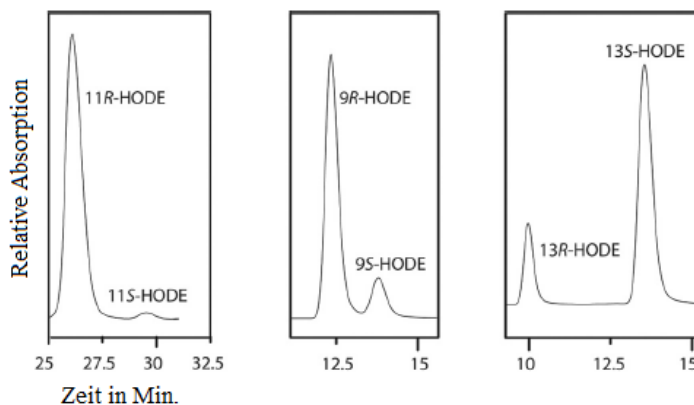


Abb. 4.2: Reaktionsprodukte der *Cyanothece sp. Csplox2* (Andreou 2010) in der CH-HPLC. Linolsäure wurde vornehmlich zu 11R-HODE, 9R-HODE und 13S-HODE oxygeniert. Im Vergleich zu anderen LOX-Isoformen ist das Produktmuster vor allem deshalb bemerkenswert, da jedes Reaktionsprodukt nahezu 30% zur Gesamtproduktmischung beiträgt und trotzdem deutlich chiral ist.

Eine jüngere Untersuchung identifizierte eine LOX-Isoform in *Cyanothece sp.*, die von den Beschreibern *Csplox2* genannt wurde und die Modelvorstellung der A vs. G-Hypothese noch tiefgreifender herausfordert (Andreou 2010). *Csplox2* katalysiert die Reaktion von Linolsäure zu drei unterschiedlichen Oxygenierungsprodukten (13S-HODE, 11R-HODE, 9R-HODE, Abb. 4.2), wobei jedes Reaktionsprodukt etwa 30% der Gesamtprodukte ausmacht (11-HODE 39,2%, 9-HODE 33,5%, 13-HODE 27,3%). *Csplox2* trägt ein Alanin als Coffa-Determinante. Die Bildung von 9R-HODE und 13S-HODE wäre mit der A vs G-Hypothese noch bedingt vereinbar, obwohl nach dem klassischen Coffa-Konzept Ala enthaltende Enzyme eigentlich als S-LOXen qualifiziert werden sollten. Die zusätzliche Bildung von 11R-HODE in dieser Quantität erfordert jedoch einen besonderen Reaktionsmechanismus. Offenbar hat Sauerstoff wie bei den meisten LOX-Isoformen Zugang zu lediglich einer Seite des Pentadienylradikals (eine Ausnahme stellt wohl eine manganhaltige LOX des Pilzes *Gaeumannomyces graminis* dar, bei der offenbar Sauerstoffkanäle von beiden Seiten an das Pentadienylradikal reichen, Oliw 2002) und nach Wasserstoffabstraktion von C11 inseriert O₂ relativ gleichmäßig verteilt an die S[+2]- und die R[-2]-Position und die R[0]-Position (11R-HODE). Nun stellt sich jedoch die Insertion von O₂ an der S[+2]- und der R[-2]-Position als irreversibel dar, während die Insertion von O₂ an der R[0]-Position (11R-HODE) bei diesem Enzym reversibel ist und kinetisch kontrolliert zu sein scheint:

Bietet man der *Csplox2* modifizierte Linolsäure als Substrat, welche an ihrem C11-Atom ein pro(S)-Deuterium-Atom trägt anstatt eines gewöhnlichen H-Atoms, so wird nahezu gar kein 11R-HODE formiert, während die anderen Reaktionsprodukte aus Abb 4.2 zunehmen. Offenbar beruht die reduzierte Bildung von 11R-HODE auf einem Isotopeneffekt des Deuterium pro(S)-

Atoms an C11, der die Wasserstoffabstraktion derart verlangsamt, dass 99% des Sauerstoffes für die Bildung der anderen Reaktionsprodukte verbraucht wird. Auf diese Weise wurde eine kinetisch kontrollierte Formierung von 11R-HODE postuliert. Führt man dem Enzym hingegen 11R-HODE selbst als Substrat zu, wird nahezu äquimolar 9R- und 13S-HODE gebildet, so dass 11R-HODE als reversibles Oxygenierungsprodukt betrachtet werden kann.

Die Zebrafisch LOX1 katalysiert die stereospezifische Reaktion von Arachidonsäure zu 12S-H(P)ETE (3.2.2.), obwohl sie einen Glycin-Rest an der Coffa-Determinante trägt (2.2.1., Tab.2.1). Von allen bisher untersuchten tierischen LOX-Isoformen ist die Zebrafisch LOX1 somit die erste LOX, welche dem A vs G- Konzept exakt widerspricht. Zwar konnte auch für andere tierische S-LOXen gezeigt werden, dass ein Ala-zu-Gly Austausch nur geringe Veränderungen in der Stereospezifität induziert und somit das A vs G- Konzept nicht wirklich allgemeine Gültigkeit aufweist. Die Zebrafisch-LOX1 ist jedoch das erste Enzym, das an der Coffa-Determinante ein Gly trägt und zugleich eine reine S-LOX darstellt. Nun ist Glycin jedoch die kleinste aller proteinogenen Aminosäuren, so dass nicht überprüft werden konnte, ob ein noch kleinerer Rest an dieser Stelle vielleicht eine R-Spezifität erzwingen würde. Die Einführung eines größeren Ala hatte jedoch keine Wirkung auf die Reaktionspezifität. Wenn man mögliche Ursachen der Stereospezifität diskutiert, erscheint es sinnvoll, die 5 unterschiedlichen Mechanismen aus Kapitel 1.2.2.2., Abb. 1.7 zu verwenden:

Unter der Annahme, dass die gerichtete Wegbahnung des Sauerstoffs bei einigen LOX-Isoformen den entscheidenden Spezifitätsmechanismus darstellt (Abb 1.7 A), könnte bei der Zebrafisch LOX1 eine andere Seitenkette als die Methylgruppe des Alanins die Leitfunktion für den Sauerstoff übernehmen. Um eine solche Ersatz-Seitenkette zu identifizieren, wäre jedoch eine hochauflösende Kristallstruktur des Enzyms ebenso notwendig wie Beweglichkeitsuntersuchungen, die mögliche Konformationsänderungen berücksichtigen. Bei solchen Konformationsänderungen des Zebrafischenzyms könnte das Trp-102 (4.3.) eine Rolle spielen. Dieser Rest scheint dem Trp-107 der Weichkoralle (Eek 2012, 1.2.6.) zu entsprechen, der maßgeblich an einer Konformationsänderung dieses Enzyms beteiligt sein soll. Allerdings ist dieser Rest bei sämtlichen LOX-Isoformen konserviert und müsste deshalb auch bei allen Isoformen eine ähnliche Funktion ausüben. Das ist aber offensichtlich nicht der Fall. Die Schweine ALOX15 (Xu 2012, 1.2.4.) scheint, verglichen mit der Kaninchen ALOX15 (Choi 2008, 1.2.3.), bei Ligandenbindung keiner nennenswerten Konformationsänderung zu unterliegen, weil der kristallisierte Komplex aus Enzym und Inhibitor in der offenen Zustandsform vorliegt. Dennoch trägt auch das Schweine-Enzym ein alignierendes Trp-100. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch könnte darin liegen, dass bei der

Schweine ALOX15 nicht das komplette Enzym sondern nur die C-terminale katalytische Domäne kristallisiert wurde. Die N-terminale Domäne wurde gentechnisch deletiert. Möglicherweise kristallisiert die C-terminale Domäne dieses Enzyms besser, weil die bewegliche N-terminale Domäne nicht mehr vorhanden ist. Damit könnte die Möglichkeit zur Bildung verschiedener Konformere eingeschränkt worden sein.

Nach Abb 1.7 B könnte ein anderer Grund für die 12S-H(P)ETE-Bildung des Zebrafisch-Enzyms darin liegen, dass Aminosäuren im aktiven Zentrum positive Ladungen exponieren, welche die Elektronendichte im Pantienradikal einseitig auslenken. Um derartig beschaffene Seitenketten wie Lysin und Arginin zu identifizieren, die sich während der Katalyse in direkter Nähe des Substrates befinden, wäre jedoch eine hochauflösende Kristallstruktur des Enzyms ebenso notwendig wie Untersuchungen, welche mögliche Konformationsänderungen berücksichtigen.

Abb. 1.7 C postuliert, dass eine von der Struktur der Substratbindungstasche regelmäßig herbeigeführte Distorsion der Substrate einen relevanten Einfluss auf die Stereospezifität ausübt. Diese Hypothese ist ebenso schwierig zu beweisen wie zu verwerfen und hängt ebenso von der tatsächlichen räumlichen Struktur der Substratbindungstasche während der Katalyse ab, zumal mehrfach ungesättigte Fettsäuren sehr flexibel sind. Darüber hinaus würde auch die Polarität der angrenzenden Aminosäuren von Bedeutung sein. Die im vorhergehenden Absatz diskutierten Lysine und Arginine beispielsweise würden bei gegebenem pH-Wert keine Adhäsion der hydrophoben Fettsäuren bewirken sondern eher abstoßend wirken. Die Coffa-Determinanten sind bei einigen LOX-Isoformen von Bedeutung und räumlich sehr nahe am Substrat. Möglicherweise blockiert die Methylgruppe des Alanins nicht den Zugang des Sauerstoffs zu einem bestimmten Bereich des Substrats, wie das Model postuliert, sondern verformt das Pentadien in einer Art und Weise, die das andere Ende des Pentadienylradikals bevorzugt zur Oxygenierung freigibt.

Abb. 1.7 D hebt die mögliche Bedeutung eines stereospezifischen Elektronendonators hervor. Bisher wurde noch keine Aminosäure bei LOXen identifiziert, die anstelle des Eisens als Reduktionsmittel fungieren könnte. Wenn dem so wäre, müsste ein Teil der Oxygenierungsprodukte auch ohne das Nichthämeisen im Enzym gebildet werden können, falls sich ohne das Eisenatom nicht der strukturelle Aufbau des aktiven Zentrums derart verändern würde, dass lediglich katalytisch inaktive Enzymspezies entstehen. Wenn man dem Expressionssystem sukzessiv Eisen entziehen würde und trotzdem ein bestimmtes stereospezifisches Oxygenierungsprodukt formiert würde, könnte dies auf einen alternativen proteinogenen Elektronendonator zurückzuführen sein.

Bei Abb. 1.7 E wird ein alternativer Zugang bzw. eine Carboxyl-Terminus-voran-Ausrichtung des Substrates als mögliche Ursache der Stereospezifität vorgeschlagen. Um diesen Mechanismus für die Zebrafisch LOX1 zu bestätigen, wären Untersuchungen mit artifiziellen Substraten wie bei Walther et al. 2001 notwendig. Auf diese Weise könnte man versuchen, eine Ausrichtung von einem der beiden Fettsäure-Pole (α - und ω -Ende) zu erzwingen und somit erfahren, welche Orientierung der 12S-H(P)ETE-Bildung zugrunde liegt. Zur Identifizierung des Zugangs zur Substratbindungstasche wäre erneut eine hochauflösende Kristallstruktur des Enzyms ebenso notwendig wie Untersuchungen, welche mögliche Konformationsänderungen berücksichtigen.

Die Zebrafisch-LOXen sind, verglichen mit den besser erforschten Säugetier-LOXen, phylogenetisch älter (4.4., Abb. 4.5). Für die noch älteren LOX-Isoformen der Bakterien sind ebenfalls keine Konzepte für die Stereospezifität bekannt. Daher sind funktionelle Untersuchungen, wie in dieser Arbeit erfolgt, an phylogenetisch älteren LOX-Isoformen unentbehrlich, um ein umfassenderes Modell der Stereospezifität zu entwickeln. Für die *Cyanothece sp. csplox2* (Andreou 2010, s.o.) wurde u.a. eine kinetische Kontrolle der stereospezifischen Oxygenierung als Reaktionsmechanismus aufgeführt, auch hier wäre eine Modifizierung der Substrate notwendig, um einen derartigen Mechanismus für die Zebrafisch LOX1 zu verifizieren.

4.3. Bedeutung der N-terminalen β -Domäne der Zebrafisch LOX1

Aufgrund der β -Faltblatt-haltigen Struktur des N-Terminus wurde zunächst eine Bedeutung dieser Domäne für die Membranbindung vermutet, analog zur C-terminalen β -Faltblattstruktur tierischer Lipasen (Winkler 1990). Mittlerweile ist bekannt, dass der N-Terminus vieler LOXen zwar die in vitro Membranbindung verbessert, aber nicht zwingend erforderlich für diese Funktion ist (Walther 2011). Vielmehr ergeben sich sukzessiv neue mögliche Funktionen für diese Domäne, die bei der Kaninchen ALOX15 beispielweise 115 Aminosäuren umfasst.

4.3.1. Rolle der β -Domäne für die Aktivitätsregulation

Die Aktivität der humanen ALOX5 ist auf verschiedenen Ebenen reguliert, u.a. durch ATP. Trp-75 der N-terminalen Domäne der ALOX5 gilt als mögliche Bindungsstelle für ATP. Bei der Weichkorallen *Gersemia fruticosa* 11R-LOX (Eek 2012, 1.2.6.) scheint der N-Terminus noch bedeutungsvoller für die Enzymfunktion zu sein: Um überhaupt katalytisch aktiv zu sein, muss das Enzym an Biomembranen binden und diese Membranbindung ist Ca^{2+} -abhängig.

Andererseits verhindert Calcium die Aggregation der Enzyme zu Dimeren. Da sich die spezifischen Calciumbindungsstellen in Schleifen zwischen β -Faltblattstrukturen der N-terminalen Domäne befinden, ist dieses Strukturelement für die katalytische Aktivität dieser LOX-Isoform offenbar essentiell. Ein solches Verhalten wurde bisher noch für keine andere LOX beschrieben. Vermutlich wird auch die Membranbindung per se durch den N-Terminus dieses Weichkorallen-Enzyms beeinflusst, was allerdings bisher weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Die Abhängigkeit der Katalyse vom N-Terminus wird dem Model nach bei Eek et al. 2012 dem konservierten Trp-107 zugeschrieben, welches durch π -Kationen-Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindung eine Konformationsänderung der katalytischen Domäne bewirkt, so dass der Zugang zur Substratbindungstasche freigegeben wird. Wenn dem so ist, sollte die isoliert exprimierte katalytische Domäne auch in Abwesenheit von Biomembranen katalytisch aktiv sein. Leider wurde dieses Experiment als plausible Bestätigung der Arbeitshypothese nicht durchgeführt. Vorherige Arbeiten (Walther 2011) haben gezeigt, dass mehrere N-terminal trunkierte Säugetier-Lipoxygenasen, darunter auch die *alox5* der Maus, katalytisch aktiv sind, wenngleich mit deutlich reduzierter katalytischer Aktivität. Die molekularen Ursachen für die reduzierte Aktivität sind weitgehend unklar, aber vielleicht sind diese Enzyme v.a. deshalb katalytisch weniger aktiv, weil der N-Terminus eine Konformationsänderung einleitet, die für die Substratbindungstasche relevant ist. Der C-Terminus der Schweine ALOX15 (Xu 2012, 1.2.4.) kristallisiert mit dem Inhibitor in einer offenen Konformation. Möglicherweise kann eine kondensierte Struktur, wie sie bei der Kaninchen-LOX15 der Fall ist (Choi 2008, 1.2.3.) nicht eingenommen werden, eben weil die N-terminale Domäne deletiert wurde.

Auch die Zebrafisch LOX1 ist in ihrer Aktivität offenbar auf die N-terminale Domäne angewiesen, da das trunkierte Enzym keine katalytische Aktivität aufweist (3.3.4.2.). Bei der Interpretation von Mutagenesestudien, die zu inaktiven Enzymformen führen, ist aber Vorsicht geboten. Es ist durchaus möglich, dass die katalytische Inaktivität vor allem dadurch hervorgerufen wird, dass sich ein N-terminal trunkiertes Enzym nicht regelgerecht faltet. In diesem Fall wäre die fehlende Aktivität nicht primär auf das Fehlen der N-terminalen Domäne zurückzuführen sondern auf eine globale Fehlfaltung des Enzyms. Erfahrungen bei der N-terminalen Trunkation der murinen (*alox5*) und humanen ALOX5 haben gezeigt, dass es bei der N-terminalen Trunkation von LOXen darauf ankommt, die Trunkation an der richtigen Stelle vorzunehmen. Wird z.B. die murine *alox5* um 114 Aminosäuren N-terminal verkürzt, ergibt sich eine katalytisch aktive Trunkationsmutante, die eine verringerte Aktivität und eine reduzierte Substrataffinität aufweist (Hofheinz 2013). Wird die Trunkationsstelle jedoch nur wenige

Aminosäuren nach N- oder C-terminal verlagert, resultiert ein inaktives Enzym. Da bei allen genannten Trunktationsmutanten die N-terminalae Domäne nicht vorhanden ist, kann die fehlende Aktivität nicht einfach auf die Abwesenheit dieses Strukturanteils zurückgeführt werden. Bei inaktiven Enzymmutanten besteht immer die Gefahr, dass die katalytische Inaktivität nicht durch die spezifische Mutation sondern durch einen Expressionsartefakt verursacht wird.

Die humane ALOX5 besitzt, ähnlich wie die Weichkorallen LOX, spezifische Ca-Bindungsstellen in der N-terminalen Domäne (Hammarberg 2000 und 1.2.5., Eek 2012 und 1.2.6.). Diese Aminosäuren, die bei der ALOX15 von Kaninchen und Menschen nicht durchgehend auftreten, sind in der Zebrafisch LOX1 größtenteils konserviert (Abb. 4.3 und Abb. 4.4). Bei der Zebrafisch LOX1 sind aufgrund der Modellberechnungen der 3D-Struktur (Abb. 4.4.) v.a. Tyr-14, Asn-39, Asp-43, Asp-50 und Asn-78 mögliche Calciumbindungsstellen.

Ferner ist anzumerken, dass sich die isolierte katalytische Domäne der Zebrafisch-LOX1 deutlich besser exprimieren ließ als das Wildtyp-Enzym (3.4.4.1.). Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Expression könnte das Fehlen toxischer Reaktionsprodukte für die kompetenten Zellen darstellen. Darüber hinaus könnte die Inaktivität der isolierten C- terminalen Domäne daran liegen, dass das Fehlen des N-Terminus zu einer Fehlfaltung des Enzyms mit Aktivitätsverlust führte.

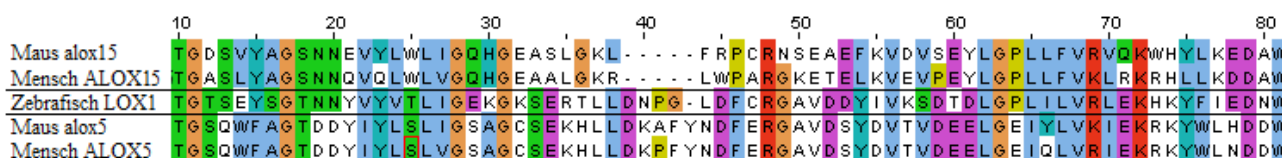


Abb. 4.3: Multiples Alignment möglicher Calcium-Bindungsstellen am N-Terminus verschiedener LOX-Isoformen mit Clustal Omega (www.ebi.ac.uk, Sievers 2011, Zugriff am 26.6.13). Die Nummerierung ist lediglich eine grobe Orientierung und nicht direkt anwendbar auf die LOX-Isoformen, bei der Zebrafisch LOX1 entspricht die Nummerierung +1 oder +2 der exakten Position in der Primärstruktur. Asn-78 der Zebrafisch LOX1, hier Nummerierung 80, aligniert beispielsweise mit der Calciumbindungsstelle Asp-79 der humanen 5 LOX (Hammarberg 2000), die hier Nummerierung 80 trägt. Die ALOX15-Isoformen hingegen tragen an dieser Stelle aliphatische Reste.

Bei der Weichkoralle scheint das hochkonservierte Trp-107 an ausgedehnten Konformationsänderung beteiligt zu sein, Trp-102 des Zebrafisch-Enzyms aligniert mit Trp 107 der Weichkoralle (nicht gezeigte Daten). Möglicherweise wird wie bei Weichkoralle anhand dieses Restes eine katalytisch relevante Konformationsänderung ausgelöst. Dennoch drängt sich die Frage auf, warum der N-Terminus für einige LOX-Isoformen essentiell ist und für andere nicht. Vielleicht gibt es einen Zusammenhang zwischen Komplexität der Regulierung einer LOX-Isoform und ihrer Abhängigkeit vom N-Terminus, je komplexer die Regulierung, desto mehr wird der N-Terminus benötigt. Die Zebrafisch LOX1 ist obligat für eine lebensfähige

Entwicklung eines Zebrafisches (Haas 2011, 1.1.3.6., 4.4.2.), womöglich deshalb vielfältig reguliert und hochgradig abhängig von ihrem N-Terminus. Bei höher entwickelten Säugetieren wie beispielsweise der Maus ist anhand von knock-out-Studien belegt, dass die ausgeschaltete 12/15-LOX die Lebensfähigkeit dieser Organismen nicht gefährdet (Funk 2002, Sun 1996). Möglicherweise besteht daher eine weniger umfangreiche Regulierung und somit könnte der N-Terminus für die reine Katalyse weniger relevant sein.

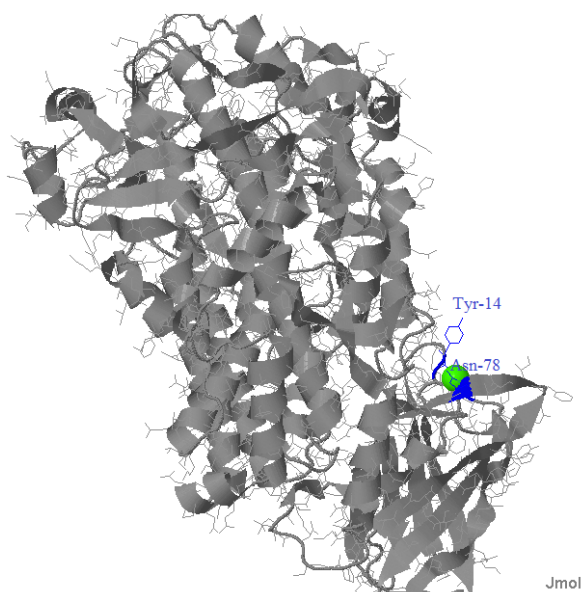


Abb. 4.4: 3D-Model der Zebrafisch LOX1 mit einer Auswahl möglicher Calcium-Bindungsstellen am N-Terminus. Man beachte die räumliche Nähe zum C-Terminus, auf welchen eine mögliche Konformationsänderung weitergegeben werden könnte. Anders gedreht würde man erkennen, dass die dargestellten Calcium-Bindungsstellen, wie bei der Weichkorallen 11R-LOX (Eek 2012, 1.2.6.), in den Schleifen zwischen den β -Faltblättern liegen, hier gezeigt Tyr-14 und Asn-78. Quellenangabe: Wass MN, Kelley LA, Sternberg MJ. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. NAR 2010;38:W469-73.

Ein anderes Beispiel für eine regulatorische Bedeutung der N-terminalen Domäne für die Katalyse stellt die Sojabohnen LOX-1 dar (Maccarrone 2001). Proteolytische Verkürzung dieser LOX führte zu einer mini-LOX mit einer deutlich erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit, obwohl die Affinität zum Substrat (Linolsäure) im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindert wurde. Für dieses Enzym scheint die N-terminale Domäne die katalytische Aktivität des Enzyms zu vermindern, was bisher für keine tierische LOX gezeigt werden konnte.

4.3.2. Rolle der β -Domäne für die Membranbindung

Neben der katalytischen Aktivität der N-terminal trunkierten LOX-Isoformen ist noch das Membranbindungsverhalten von Interesse. Die trunkierte Kaninchen ALOX15 ist weiterhin in der Lage, an Biomembranen zu binden (Walther 2002, Walther 2011), obwohl das Bindungsverhalten deutlich herabgesenkt ist. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne nicht essentiell für die in vitro Membranbindung von LOXen ist. In der katalytisch aktiven C-terminalen Domäne wurden oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren identifiziert, die als potentielle Membrananker der C-terminalen Domäne dieses Enzyms fungieren (Walther 2004).

Auch die Zebrafisch LOX1 bedarf generell nicht ihres N-Terminus, um in vitro mit Biomembranen zu interagieren (3.4.). Allerdings bindet das trunkierte Enzym, ähnlich wie ALOX15-Isoformen, in geringem Umfang an Membranen. Für die in vitro Membranbindung ist der N-Terminus der Zebrafisch LOX1 also entbehrlich, für die Katalyse jedoch nicht. Prokaryotische LOXen besitzen erst gar keine β -Faltblätter am N-Terminus (Hansen 2013), obwohl ihre Funktion u.a. die Beeinflussung der Membranzusammensetzung bzw. Regulation der Membranfluidität sein soll (1.1.3.6.).

4.4. Evolutionäre Aspekte der LOX

4.4.1. Vorkommen von LOXen in irdischen Lebensformen

LOXen wurden bisher in 2 der 3 Domänen belebter Natur und 5 Königreichen nachgewiesen (Ivanov 2010, 1.1.2. Abb 1.3), jüngst wurde von Kuhn et al. jedoch eine potentielle LOX-Sequenz bei einem Archaeobakterium gefunden (Kühn et al., unveröffentlicht). Wenn sich diese Vermutung bestätigen sollte, wären alle Domänen des irdischen Lebens mit LOXen versehen. Zu ergänzen ist, dass das Auffinden von LOX-Sequenzen in entsprechenden Datenbanken erschwert wird durch die strukturelle Heterogenität. Wie auch in dieser Arbeit wird oftmals eine Protein-Sequenz in der Nähe von Eisen-bindenden Liganden gewählt (2.2.1.). Doch selbst die Anwesenheit von LOX-Sequenzen im Genom eines beliebigen Organismus ist kein Garant für das Vorhandensein aktiver Enzymspezies, derartige Beweise sind funktionell per HPLC (2.3.2.) zu führen.

Womöglich entwickelten sich pro- und eukaryotische LOXen aus einem gemeinsamen Vorläufer. Alternativ könnten LOXen auch durch horizontalen Gentransfer nach ihrer Entstehung in Eukaryonten in Prokaryonten eingeführt worden sein. Die große strukturelle Heterogenität der LOXen zwischen den irdischen Domänen des Lebens und die unterschiedliche Anzahl an LOX-Genen in verschiedenen Lebensformen ist jedoch mit der Theorie des horizontalen Gentransfers nicht hinreichend zu erklären. Die bisher ältesten Organismen, bei denen LOXen vermutet werden, sind Cyanobakterien, die u.a. im Rahmen der Endosymbiontentheorie als Ursprung der Chloroplasten dienen (Sagan 1967, Mereschkowski 1905). Nun ist bekannt, dass Plastid-Gene in das nukleäre Genom integriert werden können (Huang 2003, Maliga 2003, Timmis 2004, Martin 1998) und weiter, dass einige LOX-Sequenzen bei Pflanzen in den Plastiden lokalisiert sind (Barsan 2010). Auf diese Weise könnte das Vorkommen von LOXen bei Pflanzen erklärt werden, analoge Rückschlüsse auf tierische Organismen auf dem Boden der Endosymbiose von Rickettsien und Alphaproteobakterien zu Mitochondrien sind allerdings nicht begründet, da in beiden Organismen keine LOX-Sequenzen

nachzuweisen sind. Wie schon zuvor (Garreta 2011) festgestellt, bilden bakterielle, tierische und pflanzliche LOXen in aller Regel klar voneinander zu trennende Verwandtschaftsverhältnisse. Einige Ausnahmen wurden mit horizontalem Gentransfer in Verbindung gebracht. Die Akkumulierung von Variationen ist bei bakteriellen LOXen außerdem abgeschlossen, bei eukaryotischen LOXen nicht. Offensichtlich waren prokaryotische LOX-Gene über einen längeren Zeitraum keinem hohen Selektionsdruck ausgeliefert (Hansen 2013). Vergleichende Untersuchungen der bisher bekannten prokaryotischen LOX-Sequenzen kamen zu dem Ergebnis, dass bakterielle LOXen in drei Enzym-Subfamilien eingruppiert werden können, die häufig nicht der A vs G-Hypothese (Coffa 2004) folgen (Hansen 2013, Andreou 2008, 4.2.2.).

Die hier untersuchte LOX des Modelorganismus Zebrafisch zeigt in einem Spezies-bezogenen LOX-Phylogramm mit Bakterien-LOXen, Pflanzen-LOXen, Pilz-LOXen und Wirbeltier-LOXen die größte verwandtschaftliche Beziehung zu den Wirbeltier-LOXen (Abb.4.5, Garreta 2011). Die Homologie der Zebrafisch LOX1 zu humanen LOX-Isoformen lag nur knapp über 40% (3.1.2., 4.1.2.). Trotz ihrer phylogenetischen Nähe zu Wirbeltier-LOXen folgt die Zebrafisch LOX1 nicht den Modelvorstellungen, die beispielweise für die humane ALOX15 bzw. ALOX5 erarbeitet wurden. Demnach besitzt das Zebrafischenzym eine andere Struktur-Funktionsbeziehung als die besser untersuchten Säugetier-LOXen. Wie aus Abb. 4.5 ersichtlich, sind die Zebrafisch LOX-Gene unter Wirbeltieren phylogenetisch alt. Scheinbar folgen die phylogenetisch jüngeren LOXen eher den bisherigen Modellvorstellungen der LOX-Reaktion. Eine Ausnahme bildet z.B. die Korallen 8R-LOX, die wie in Abb. 4.5 gezeigt, wohl durch horizontalen Gentransfer den bakteriellen LOXen sehr nahe steht und zugleich dem A vs G-Konzept folgt (Coffa 2004, 1.2.2.2.). Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich dieses Enzym stark in der Koralle *Plexaura homomolla* weiterentwickelte, da die Korallen 8R-LOX einen β -Faltblatt- haltigen N-Terminus besitzt (Neau 2009), prokaryontische LOXen aber eher eine α -helikale Struktur der N-terminalen Domäne (Hansen 2013). Die Weichkorallen 11R-LOX (1.2.6.) hingegen steht laut eines nicht dargestellten Phylogrammes den tierischen LOXen wiederum näher.

Um funktionelle Konzepte für phylogenetisch ältere LOX-Isoformen wie die Zebrafisch LOX1 zu entwickeln, bedarf es künftig sowohl funktioneller Untersuchungen der entsprechenden LOXen als auch ihrer Kristallstrukturen. Bisher wurde lediglich eine LOX von *Pseudomonas aeruginosa* kristallisiert (Garetta 2011).

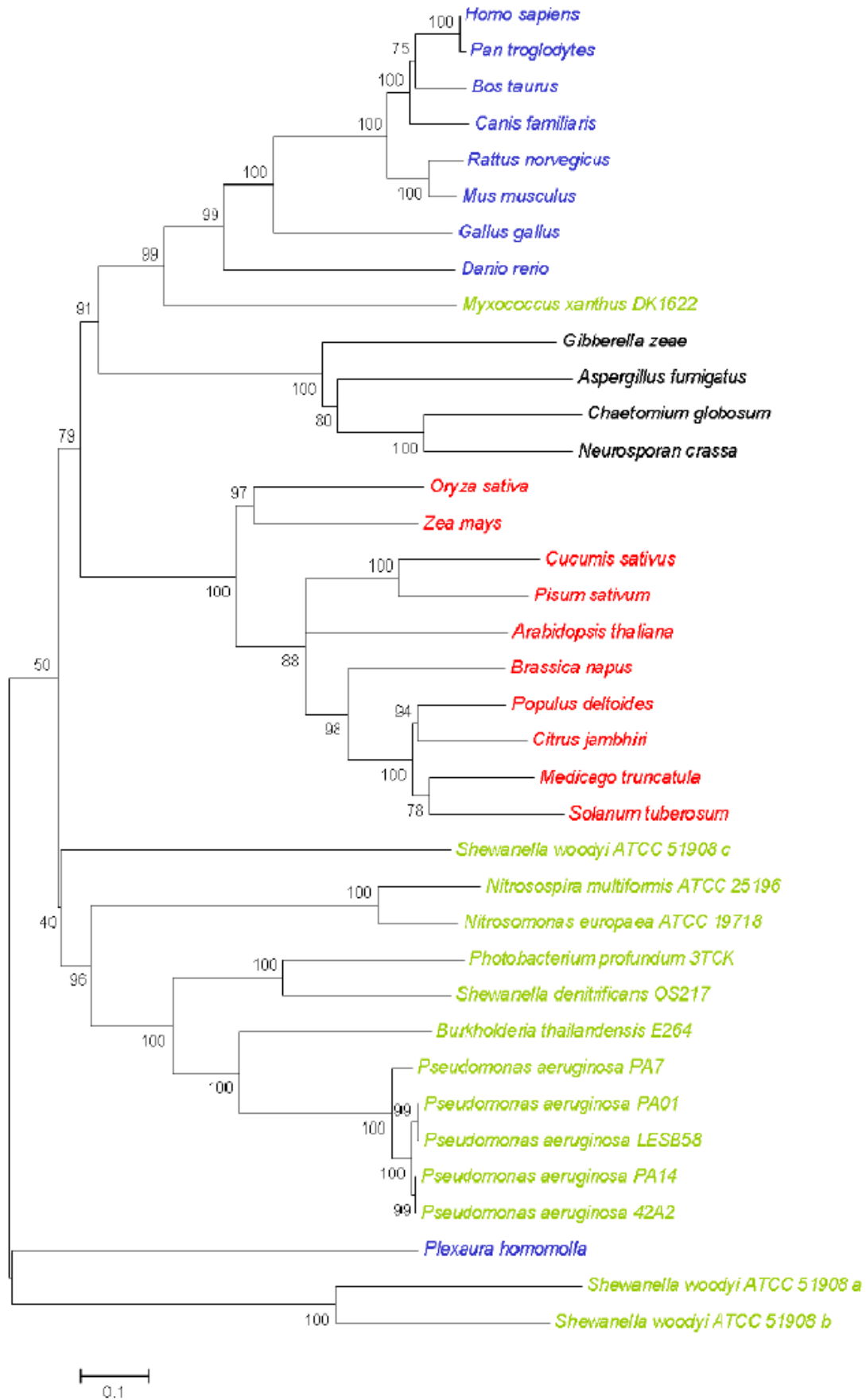


Abb. 4.5: Phylogramm verschiedener LOX-Isoformen aus 2 Domänen und 5 Königreichen der belebten Natur (Garetta 2011). Die Zebrafisch LOXen (blaue Gruppe, Tiere) sind verwandtschaftlich den Wirbeltier-LOXen am nächsten. Schwarze Gruppe=Pilze, rote Gruppe=Pflanzen, grüne Gruppe=Bakterien. Bis auf einige wenige Ausnahmen sind tierische LOXen, pflanzliche LOXen und bakterielle LOXen klar voneinander getrennt. Das Phylogramm ist nicht als repräsentativ zu erachten.

4.4.2. Multiplizität von 12-lipoxygenierenden LOXen bei Wirbeltieren

Die Gesamtanzahl an aktiven LOX-Isoformen variiert in der belebten Natur zwischen verschiedenen Spezies, ebenso die Anzahl von 12-lipoxygenierenden LOXen. Im menschlichen Genom sind die Gene ALOX12, ALOX12B und ALOXe12 enthalten, wobei letztgenanntes Gen ein inaktives Pseudogen darstellt. Womöglich waren die Transkripte von ALOXe12 nicht mehr essentiell für unsere Spezies, weil ALOX12B deren Funktion übernahm, zumal ALOX12B und ALOXe3 bei uns funktionell verbundene Stoffwechselwege aufweisen (Krieg 2013, Epp 2007). Laut Haas et al. 2011 sei die Zebrafisch LOX1 die einzige 12-lipoxygenierende LOX-Isoform des Zebrafisches, wobei dies lediglich anhand multipler Alignments abgeleitet wurde. Laut eines Alignments hätte die Zebrafisch LOX1 auch eine R-LOX sein müssen (Coffa 2004, 1.2.2.2.), so dass diese Vermutung wage erscheint. Wenn dies allerdings zutreffen sollte, arbeitet die Zebrafisch LOX1 als 12S-lipoxygenierende LOX, entspricht aber funktionell einer 12R-lipoxygenierenden LOX aufgrund der schweren Ausfallserscheinungen nach knock-out-Versuchen (4.1.2.). Möglicherweise ist die Zebrafisch LOX1 also eine Wegmarke der stammesgeschichtlichen Entwicklung 12-lipoxygenierender LOXen in Richtung einer höheren Multiplizität von 12-lipoxygenierender LOX-Isoformen oder falls die LOX-Verbreitung in der belebten Natur von höher entwickelten Lebensformen in Richtung niederer Lebensformen verlaufen sollte, könnte die Zebrafisch LOX1 auch eine Rationalisierung von zwei 12-lipoxygenierenden LOXen zu einer LOX-Isoform darstellen. Tatsächlich positioniert sich die Zebrafisch LOX1 in einem phylogenetischen Baum genau zwischen die ALOX 12- und ALOX12B- Isoformen von Säugetieren (Abb. 4.6) und somit zwischen rezente 12S- und 12R-lipoxygenierende LOXen von Säugetieren. Bereits zuvor (Ivanov 2010, 1.1.2., 4.4.1.) wurde erörtert, dass die weitläufige Verbreitung von LOXen in der Natur vermutlich nicht von höheren Lebensformen in Richtung der niederen Lebensformen verlaufen ist. Demnach stellt sich die Frage, ob die Zebrafisch LOX1 als Repräsentant der niederen Wirbeltiere einen phylogenetischen Entwicklungsschritt in Richtung der Säugetier 12R-lipoxygenierenden LOXen darstellt. Bei diesem Gedanken würde sich ergeben, dass das Zebrafisch-Enzym zuerst die Funktion einer Säugetier 12R-lipoxygenierende LOX wie der humanen ALOX12B oder einer Epidermis-Typ-LOX übernahm (4.1.2.), ohne die stereospezifischen Reaktionsprodukte einer rezenten Säugetier 12R-lipoxygenierende LOX (ALOX12B) zu bilden. Die Lokalisation des Zebrafisch LOX1-Gens in einer syntenischen Region der humanen ALOX12- und ALOX15-Gene (3.1.3.) deutet also darauf hin, dass die Säugetier ALOX12B-Isoenzyme und/oder die Epidermis-Typ-LOXen aus den Säugetier ALOX12- oder ALOX15-Genen hervorgegangen sein

könnten und weiter, dass die Zebrafisch LOX1 einen Zwischenschritt bei dieser Entwicklung darstellen könnte, welcher offenbar bei niederen Wirbeltieren stattfand.

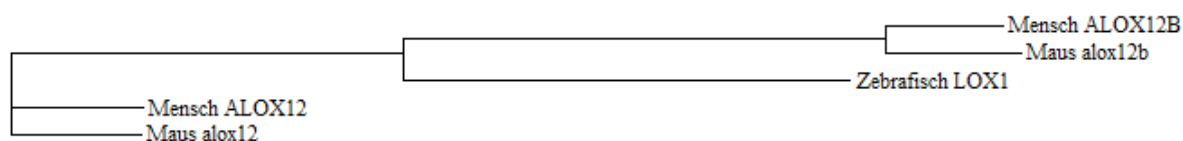


Abb. 4.6: Phylogramm von Säugetier ALOX12- und ALOX12B-Isoformen und der Zebrafisch LOX1 mit Clustal Omega (www.ebi.ac.uk, Sievers 2011, Zugriff am 26.6.13). Da die Zebrafisch LOX1 genau zwischen den 12S-lipoxygenierenden LOXen (ALOX12) und 12R-lipoxygenierenden LOXen (ALOX12B) eingeordnet ist, stellt sich die Frage, ob die Zebrafisch LOX1 einen Vorläufer der rezenten 12R-lipoxygenierenden LOXen von Säugetieren darstellt.

4.4.3. 12-lipoxygenierende LOXen bei anderen marinen Lebensformen

Zuvor (3.1.2.) wurde bereits festgestellt, dass die Zebrafisch LOX1 Homologiegrade von knapp über 40% zu den humanen LOX-Isoformen besitzt. Die höchsten Homologiegrade bestehen jedoch zu bisher uncharakterisierten LOXen anderer Fische (www.uniprot.org, The UniProt Consortium 2013, Zugriff am 26.5.13): 76% Homologie zu einer mutmaßlichen LOX des Buntbarsches *Oreochromis niloticus*, 75% zu den mutmaßlichen LOXen des Stichlings *Gasterosteus aculeatus* und des Zahnkärpflings *Xiphophorus maculatus*, 72% zu einer mutmaßlichen LOX des Reisfisches *Oryzias latipes*. Die hohen Homologiegrade lassen ebenfalls 12-lipoxygenierende LOX-Isoformen erwarten, allerdings wurde noch kein Enzym funktionell untersucht.

Bereits 1987 wurde von Hawkins et al. eine 11R- und 12R- produzierende LOX-Isoform beim Purpur-Seeigel *Strongylocentrotus purpuratus* beschrieben, die bei der Reifung von Oozyten mitwirkt. Bei der Regenbogenforelle wurde eine 12-lipoxygenierende LOX in Thrombozyten und Kiemen nachgewiesen (Hill 1999, German 1986), außerdem soll 12-HETE der Forelle zusammen mit anderen lokalen Gewebsmediatoren bei der Phagozytose und der Mobilisierung von Calcium mitwirken (Knight 1993). Bei letztgenannten Studien standen eher die inhaltlichen Aussagen zu den Gewebetypen im Vordergrund und keine funktionellen Charakteristika der LOX-Isoformen, auch erfolgten keine knock-out-Versuche, so dass die Zebrafisch LOX1 momentan zusammen mit der Korallen 8R-LOX (Coffa 2004) und der Weichkorallen 11R-LOX (Eek 2012, 1.2.6.) als am besten untersuchte LOX-Isoformen des Meeres gelten dürfte.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Andreou AZ, Vanko M, Bezakova L, et al. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. *Phytochemistry* 2008;69(9):1832-1837.

Andreou A, Feussner I. Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 2009;70(13-14):1504-1510.

Andreou A, Göbel C, Hamberg M, et al. A bisallylic mini-lipoxygenase from cyanobacterium *Cyanothece* sp. that has an iron as cofactor. *J Biol Chem* 2010;285(19):14178-86.

Barrett NA, Rahman OM, Fernandez JM, et al. Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208:593-604.

Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, et al. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J Exp Bot* 2010;61(9):2413-2431.

Berger W, De Chandt MT, Cairns CB. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract* 2007;61(4):663-676.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000;28: 235-242.

Borngraber S, Kuban RJ, M. Anton, et al. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol* 1996;264(5):1145-1153.

Borngraber S, Browner M, Gillmor S, et al. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem* 1999;274(52):37345-37350.

Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* 1993;260(5113):1482-1486.

Brash AR. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999;274(34):23679-23682.

Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, et al. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* 1998;91(1):64-74.

Browner MF, Gillmor SA, Fletterick R. Burying a charge. *Nature Structural Biology* 1998;5(3):179-179.

Bürger F, Krieg P, Marks F, et al. Positional- and stereo-selectivity of fatty acid oxygenation catalysed by mouse (12S)-lipoxygenase isoenzymes. *Biochem J* 2000;348 Pt 2:329-35.

Canny GO, Lessey BA. The role of Lipoxin A4 in endometrial biology and endometriosis. *Mucosal Immunol* 2013;6(3):439-50.

Chen XS, Funk CD. The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* 2001;276(1):811-818.

Choi J, Chon JK, Kim S, et al. Conformational flexibility in mammalian 15-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* 2008;70(3):1023-1032.

Coffa G, Brash AR. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(44):15579-15584.

Crane FL, Glenn JL, Green DE. Studies on the electron transfer system. IV. The electron transfer particle. *Biochim Biophys Acta* 1956;22(3):475-87.

Cyrus T, Pratico D, Zhao L, et al. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103(18):2277-2282.

Di Gennaro A, Wagsater D, Mayranpaa MI, et al. Increased expression of leukotriene C4 synthase and predominant formation of cysteinyl-leukotrienes in human abdominal aortic aneurysm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010;107:21093–21097.

Di Gennaro A, Haeggström JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. *Adv Immunol* 2012;116:51-92.

Dilly AK, Ekambaram P, Guo Y, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase induces MMP9 expression and cellular invasion via activation of PI3K/AKT/NF- κ B. *Int J Cancer* 2013;doi:10.1002/ijc.28165.

Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, et al. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 2011;50(1):115-31.

Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* 2009;64(6):823-839.

Eek P, Järving R, Järving I, et al. Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem* 2012;287(26):22377-86.

Eling TE, Glasgow WC. Cellular proliferation and lipid metabolism: importance of lipoxygenases in modulating epidermal growth factor-dependent mitogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:397–410.

Epp N, Fürstenberger G, Müller K, et al. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol* 2007;177(1):173-82.

Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2002;53:275-297.

Funk CD, Chen XS, Johnson EN, et al. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:303-12.

Garreta A, Carpena X, Busquets M, et al. Crystallization of the lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, evolution and phylogenetic study of the subfamilies of the lipoxygenases. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences* 2011;247-273.

George J, Afek A, Shaish A, et al. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2001;104(14):646-1650.

German JB, Bruckner GG, Kinsella JE. Lipoxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Biochim Biophys Acta* 1986;875:12–20.

Gertow K, Nobili E, Folkersen L, et al. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis* 2011;215(2):411-6.

Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, et al. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science* 2011;331(6014):217-9.

Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, et al. The structure of mammalian 15- lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* 1997;4(12):1003-1009.

Gimbrone MA, Brock AF, Schafer AI. Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;74(4):1552-1555.

Glickman MH, Klinman JP. Nature of rate-limiting steps in the soybean lipoxygenase-1 reaction. *Biochemistry* 1995;34(43):14077-14092.

Godson C, Mitchell S, Harvey K, et al. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 2000;164(4):1663-1667.

Graeber JE, Glaser BM, Setty BN, et al. 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates migration of human retinal microvessel endothelium in vitro and neovascularization in vivo. *Prostaglandins* 1990;39:665–673.

Gutiérrez MC, Castillo AM, Pagaling E, et al. *Halorubrum kocurii* sp. nov., an archaeon isolated from a saline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2008;58: 2031–2035

Haas U, Raschperger E, Hamberg M, et al. Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51):20479-84.

Häfner AK, Cernescu M, Hofmann B, et al. Dimerization of human 5-lipoxygenase. *Biol Chem* 2011;392(12):1097-111.

Haeggstrom JZ, Rinaldo-Matthis A, Wheelock CE, et al. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(1):135-139.

Hansen J, Garreta A, Benincasa M, et al. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(11):4737-47.

Hammarberg T, Provost P, Persson B, et al. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* 2000;275(49):38787-38793.

Harats D, Shaish A, George J, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(9):2100-2105.

Hau HH, Gralnick JA. Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:237-258.

Hawkins DJ, Brash AR. Eggs of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity. *J Biol Chem* 1987;262(16):7629-34.

Higashi Y, Peng T, Du J, et al. A redox-sensitive pathway mediates oxidized LDL-induced downregulation of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Lipid Res* 2005;46:1266-1277.

Hill DJ, Griffiths DH, Rowley AF. Trout thrombocytes contain 12- but not 5-lipoxygenase activity. *Biochim Biophys Acta* 1999;1437:63-70.

Hofheinz K, Kakularam KR, Adel S, et al. Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. *Arch Biochem Biophys* 2013;530(1):40-7.

Hofmann B, Steinhilber D. 5-Lipoxygenase inhibitors: a review of recent patents (2010 - 2012). *Expert Opin Ther Pat* 2013. [Epub ahead of print]

Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, et al. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(1):18-36.

Houard X, Touat Z, Ollivier V, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovascular Research* 2009;82:532-541.

Hu T, Hu Z, Qu X, et al. [Advances in plant lipoxygenases research]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2009;25(1):1-9.

Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 2003;422(6927):72-76.

Hui R, Kameda H, Risinger JJ, et al. The linoleic acid metabolite, 13-HpODE augments the phosphorylation of EGF receptor and SHP-2 leading to their increased association. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999;61:137-143.

Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, et al. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys* 2010;503(2):161-174

Ivanov I, Di Venere A, Horn T, et al. Tight association of N-terminal and catalytic subunits of rabbit 12/15-lipoxygenase is important for protein stability and catalytic activity. *Biochim Biophys Acta* 2011;1811(12):1001-10.

Ivanov I, Shang W, Toledo L, et al. Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes? *Proteins*. 2012;80(3):703-12.

Jansen C, Hofheinz K, Vogel R, et al. Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *J Biol Chem* 2011;286(43):37804-12.

Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, et al. Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275(2):1287-1293.

Kenchegowda S, Bazan HE. Significance of lipid mediators in corneal injury and repair. *J Lipid Res* 2010;51(5):879-91.

Kitaguchi H, Ohkubo K, Ogo S, et al. Direct ESR detection of pentadienyl radicals and peroxy radicals in lipid peroxidation: mechanistic insight into regioselective oxygenation in lipoxygenases. *J Am Chem Soc* 2005;127:6605-6609.

Knapp MJ, Seebeck FP, Klinman JP. Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1. *J Am Chem Soc* 2001;123(12):2931-2.

Knapp MJ, Klinman JP. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1 *Biochemistry* 2003;42(39):11466-75.

Knight J, Lloyd-Evans P, Rowley AF, et al. Effect of lipoxins and other eicosanoids on phagocytosis and intracellular calcium mobilisation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes *J Leukocyte Biol* 1993;54:518-522.

Krieg P, Rosenberger S, Juanes de S, et al. Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J Invest Dermatol* 2013;133(1):172-80.

Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Role of LOX/COX pathways in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms in rats: protective effect of licofelone. *Br J Pharmacol* 2011;164(2b):644-54.

Kundumani-Sridharan V, Dyukova E, Hansen DE, et al. 12/15-Lipoxygenase mediates high-fat diet-induced endothelial tight junction disruption and monocyte transmigration: A new role for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in endothelial cell dysfunction. *J Biol Chem* 2013b [Epub ahead of print]

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.

Lang I, Göbel C, Porzel A, et al. A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120. *Biochem J*. 2008;410(2):347-57.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23(21):2947-8.

Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, 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* 1989;77(2):195-203.

Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2013a;pii: 1471-4892.

Li H, Horke S, Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci* 2013b;pii: S0165-6147.

Li SL, Dwarakanath RS, Cai Q, et al. Effects of silencing leukocyte-type12/15-lipoxygenase using short interfering RNAs. *J Lipid Res* 2005;46:220–229.

Maccarrone M, Salucci ML, Zadelhoff van G, et al. Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* 2001;40(23):6819-6827.

Maddox JF, Serhan CN. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med* 1996;183(1):137-146.

Maderna P, Godson C. Lipoxins: revolutionary road. *Br J Pharmacol* 2009;158(4):947-959.

Maliga P. Plant biology: Mobile plastid genes. *Nature* 2003;422(6927):31-32.

Martin W, Stoebe B, Goremykin V, et al. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts." *Nature* 1998;393(6681):162-165.

Martínez-Clemente M, Clària J, Titos E. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in obesity, insulin resistance, and fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14(4):347-53.

Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6525-6530.

Mereschkowski KS. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl* 1905;Bd.25:593–604,689-691.

Meruvu S, Walther M, Ivanov I, et al. Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: targeted substrate modification and sitedirected mutagenesis. *J Biol Chem* 2005;280(44):36633-36641.

Minor W, Steczko J, Stec B, et al. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 1996;35(33):10687-10701.

Moore K, Lovercamp K, Feng D, et al. Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice. *Cell Tissue Res* 2010;340(3):569-581.

Murakami N, Shirahashi H, Nagatsu A, et al. Two unsaturated 9R-hydroxy fatty acids from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* f. *flos-aquae*. *Lipids* 1992;27:776–778.

Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, et al. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 2011;50(2):152-92.

Nasser SM, Lee TH. Products of 15-lipoxygenase: are they important in asthma? *Clin Exp Allergy* 2002;32(11):1540-1542.

Natarajan R, Reddy MA, Malik KU, et al. Signaling mechanisms of nuclear factor-kappaB-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1408-1413.

Neau DB, Gilbert NC, Bartlett SG, et al. The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity. *Biochemistry* 2009;48(33):7906-7915.

Nohgawa M, Sasada M, Maeda A, et al. Leukotriene B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. *J Leukoc Biol* 1997;62(2):203-209.

O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res* 2001;88:12-21.

O'Flaherty JT, Hu Y, Wooten RE, et al. 15-lipoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid inhibit prostate cancer cell proliferation and survival. *PLoS One* 2012;7(9):e45480.

O'Flaherty JT, Wooten RE, Samuel MP, et al. Fatty Acid metabolites in rapidly proliferating breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(5):e63076. doi: 10.1371/journal.pone.0063076. Print 2013.

Oliw EH. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:313-323.

Osório F, Leão M, Azevedo F, et al. Lamellar Ichthyosis Due to ALOX12B Mutation *Actas Dermosifiliogr* 2013;104(5):443-4.

Paruchuri S, Tashimo H, Feng C, et al. Leukotriene E₄-induced pulmonary inflammation is mediated by the P2Y₁₂ receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 2009;206:2543-2555.

Piasecka B, Lichocki P, Moretti S, et al. The hourglass and the early conservation models --co-existing patterns of developmental constraints in vertebrates. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003476.

Pirillo A, Uboldi P, Bolego C, et al. The 15-lipoxygenase-modified high density lipoproteins 3 fail to inhibit the TNF-alpha-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Immunol* 2008;181(4):2821-2830.

Porta H, Rocha-Sosa M. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology* 200;147(Pt 12):3199-200.

Porta H, Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* 2002;130(1):15-21.

Prigge ST, Gaffney BJ, Amzel ML. Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases. *Nat Struct Biol* 1998;5(3):178-179.

Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(21):8161-6.

Rao GN, Baas AS, Glasgow WC, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by arachidonic acid and its metabolites in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994;269:32586–32591.

Rao NL, Riley JP, Banie H, et al. Leukotriene A4 hydrolase inhibition attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010;181:899–907.

Rao JS, Rapoport SI, Kim HW. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. *Transl Psychiatry* 2011;1:e31.

Rao CV, Janakiram NB, Mohammed A. Lipoxygenase and Cyclooxygenase Pathways and Colorectal Cancer Prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2012;8(4):316-324.

Reddy RG, Yoshimoto T, Yamamoto S, et al. Expression of porcine leukocyte 12-lipoxygenase in a baculovirus/insect cell system and its characterization. *Arch Biochem Biophys* 1994;312(1):219-26.

Reddy MA, Thimmalapura PR, Lanting L, et al. The oxidized lipid and lipoxygenase product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces hypertrophy and fibronectin transcription in vascular smooth muscle cells via p38 MAPK and cAMP response element-binding protein activation. Mediation of angiotensin II effects. *J Biol Chem* 2002;277:9920–9928.

Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. Darmkrebs. Berlin 2008.

(Zugriff 13.5.2013,

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html;jsessionid=DFB3ECB419811A821CE60A07DD35C76C.2_cid292)

Rodgers K, McMahon B, Mitchell D, et al. Lipoxin A4 modifies platelet-derived growth factor-induced pro-fibrotic gene expression in human renal mesangial cells. *Am J Pathol* 2005;167(3):683-694.

Rubbo H, O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology* 2005;208:305–317.

Saam J, Ivanov I, Walther M, et al. Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(33):13319-24.

Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 1967;14(3):255-274.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

Sarveswaran S, Ghosh J. OXER1, a G protein-coupled oxoeicosatetraenoid receptor, mediates the survival-promoting effects of arachidonate 5-lipoxygenase in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2013;pii:S0304-3835.

Schaible AM, Traber H, Temml V, et al. Potent inhibition of human 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E2 synthase-1 by the anti-carcinogenic and anti-inflammatory agent embelin. *Biochem Pharmacol* 2013; pii: S0006-2952

Schneider C, Pratt DA, Porter NA, et al. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* 2007;14(5):473-488.

Schumacher C. Typischer Aufbau einer HPLC-Apparatur. Berlin 2003.
(Zugriff 4.1.2013, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif>)

Schwarz K, Walther M, Anton M, et al. Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 2001;276(1):773-779.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, et al. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* 1995;34(44):14609-14615.

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005a;73(3-4):141-162.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005b;6(12):1191-1197.

Setty BN, Graeber JE, Stuart MJ. The mitogenic effect of 15- and 12- hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *J Biol Chem* 1987;262:17613-17622.

Shen J, Herderick E, Cornhill JF, et al. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest* 1996;98:2201-2208.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011;7:539.

Sloane DL, Leung R, Craik CS, et al. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* 1991;354(6349):149-152.

Sloane DL, Leung R, Barnett J, et al. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Eng* 1995;8(3):275-282.

Spudich G, Fernández-Suárez XM, Birney E, et al. Genome Browsing with Ensembl: a practical overview *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007; 6: 202-219.

Starowicz K, Makuch W, Korostynski M, et al. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. *PLoS One* 2013;8(4):e60040.

Steinhilber D, Fischer AS, Metzner J, et al. 5-lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. *Front Pharmacol* 2010;1:143.

Sun D, Funk CD. 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):24055-62.

Suzuki H, Kishimoto K, Yoshimoto T, et al. Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1994;1210(3):308-316.

Takano T, Clish CB, Gronert K, et al. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest* 1998;101(4):819-826.

Tang Y, Wang MT, Chen Y, et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor and induction of tumor dormancy by 15-lipoxygenase-2 in prostate cancer. *Int J Cancer* 2009;124(7):1545-1551.

The UniProt Consortium. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013;41: D43-D47.

Vance RE, Hong S, Gronert K, et al. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(7):2135–2139.

Viita H, Sen CK, Roy S, et al. High expression of human 15-lipoxygenase induces NF-kappaB-mediated expression of vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and T-cell adhesion on human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 1999;1:83–96.

Vogel R, Jansen C, Roffeis J, et al. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* 2010;285(8):5369-5376.

Walch L, Norel X, Gascard JP, et al. Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 2):107-111.

Walther M, Ivanov I, Myagkova G, et al. Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *Chem Biol* 2001;8(8):779-790.

Walther M, Anton M, Wiedmann 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):27360-27366.

Walther M, Wiesner R, Kuhn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. *J Biol Chem* 2004;279(5):3717-3725.

Walther M, Hofheinz K, Vogel R, et al. The N-terminal β -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions. *Arch Biochem Biophys* 2011;516(1):1-9.

Wan M, Godson C, Guiry PJ, et al. Leukotriene B₄/antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A₄ and resolvin E₁. *FASEB J* 2011;25(5):1697-705.

Wang ZJ, Zhou B, Mao WW, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase increases the neuronal vulnerability of PC12 cells to A β ₄₂. *Yakugaku Zasshi* 2011;131(12):1843-53.

Wasilewicz MP, Kolodziej B, Bojulko T, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int J Colorectal Dis* 2010;25(9):1079-1085.

Wasternack C, Hause B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 2002;72:165–221.

Watanabe T, Haeggström JZ. Rat 12-lipoxygenase: mutations of amino acids implicated in the positional specificity of 15- and 12-lipoxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192(3):1023-9.

Wecksler AT, Jacquot C, Donk van der WA, et al. Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid. *Biochemistry* 2009;48(26):6259-6267.

Wen ZH, Su YC, Lai PL, et al. Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis. *Oncogene* 2013;32(2):160-70.

Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 1990;343(6260):771-774.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(12):4576-9.

Wolle J, Welch KA, Devall LJ, et al. Transient overexpression of human 15-lipoxygenase in aortic endothelial cells enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:310–314

Xu S, Mueser TC, Marnett LJ, et al. Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. *Structure* 2012;20(9):1490-7.

Tabellarischer Lebenslauf

Geboren, Familienstand	Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.
Schule Nebenberuf	
Zivildienst Ausbildung	
Studium Nebenberuf	
Unveröffentlichte wissenschaftliche Arbeit Promotionsvorhaben	
Berufliche Tätigkeit	
Sprachen	

Publikationsliste

Walther M, Roffeis J, Jansen C, et al. Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(8):827-35.

Vogel R, Jansen C, Roffeis J, et al. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* 2010;285(8):5369-5376.

Jansen C, Hofheinz K, Vogel R, et al. Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *J Biol Chem* 2011;286(43):37804-12.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Christian Andreas Jansen, geboren am 21.5.82 in Essen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung der Stereospezifität und Positionsspezifität von Wirbeltier-Lipoxygenasen

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.

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Christian Andreas Jansen hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Walther M, Roffeis J, Jansen C, et al. Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(8):827-35.

- Konzeption und Durchführung aller Versuche mit der Zebrafisch LOX1
- Mitwirkung an der Konzeption der gesamten experimentellen Strategie
- Mitwirkung an der Erstellung des Publikationsmanuskripts (alle Manuskriptteile)

Vogel R, Jansen C, Roffeis J, et al. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* 2010;285(8):5369-5376.

- Methodische Anleitung bei der Versuchsdurchführung
- Mitwirkung an der Konzeption der gesamten experimentellen Strategie
- Mitwirkung an der Erstellung des Publikationsmanuskripts (alle Manuskriptteile)

Jansen C, Hofheinz K, Vogel R, et al. Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *J Biol Chem* 2011;286(43):37804-12.

- Konzeption und Durchführung aller Versuche mit der Zebrafisch LOX1.
- Mitwirkung an der Konzeption der gesamten experimentellen Strategie
- Mitwirkung an der Erstellung des Publikationsmanuskripts (alle Manuskriptteile)

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Hartmut Kühn für die Überlassung des Promotionsthemas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die hochwertige Betreuung. Das ebenso freundschaftliche wie produktive Arbeitsklima der gesamten Arbeitsgruppe machte es erst möglich, aus einem Neuling der Laborpraxis eine eigenständige Arbeitskraft zu formen. Insbesondere möchte ich mich ausdrücklich bei folgenden Mitarbeitern bedanken:

Monika Anton, die mich einige Monate als einen Schatten ihrer selbst erlebt haben muss, um die wesentlichen Arbeitsabläufe zu erlernen. Von Frau Antons langjähriger Erfahrung konnte ich als quasi Auszubildender stets profitieren.

Sabine Stehling und Dr. Igor Ivanov für die Unterstützung bei den Western Blots, der Proteinaufreinigung und den HPLC-Anlagen.

Heike Schiebel und Dr. Christoph Ufer, Dr. Astrid Borchert und Dr. Dagmar Heydeck für die allgegenwärtige Hilfsbereitschaft und die vielen kleinen Ratschläge, die sich im Laufe der Arbeit angesammelt haben.

Dr. Matthias Walther für die Unterstützung bei der Optimierung der Expression, den störanfälligen N-terminalen Trunkationsarbeiten, den Arbeiten für die pH-Abhängigkeit der Enzymfunktion sowie weitere beratende Momente. Darüber hinaus war ich selbst Student von Dr. Matthias Walther und Prof. Dr. Kühn bei Biochemie-Seminaren, so dass es eine Ehre für mich war, mit den ehemaligen Dozenten für eine gemeinsame Sache arbeiten zu dürfen.

Nur auf dem Papier zuletzt, gilt mein besonderer Dank vor allem meinen Eltern, Harri und Inge Jansen, die mir diesen Werdegang erst ermöglichten. Ohne eine unbesorgte Kindheit mit einer Fülle von Freiheiten wäre mein persönlicher Werdegang gewiss anders verlaufen und es wäre wohl kaum möglich gewesen, in diesem Umfang Bildung erfahren zu dürfen.