

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

DISSERTATION

Mechanistische Aspekte der Evolution von Lipoxygenasen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susan Adel

aus Köln

Datum der Promotion: 09.12.2016

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abstrakt.....	7
Abstract.....	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	16
1.1 Definition von Lipoxygenasen und biologische Wirkprinzipien	16
1.2 Lipoxygenase-Reaktion.....	17
1.3 Eigenschaften von Lipoxygenasen	18
1.3.1 Struktur von Lipoxygenasen.....	18
1.3.2 Kinetische Besonderheiten von Lipoxygenasen.....	19
1.3.3 Regulation von Lipoxygenasen	20
1.3.4 Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen	22
1.4 Klassifizierung von Lipoxygenasen und Enzymnomenklatur.....	25
1.4.1 Spezifitätsbasiertes Klassifizierungskonzept.....	25
1.4.2 Sequenzbasiertes Klassifizierungskonzept	26
1.5 Evolution von Lipoxygenasen	27
1.5.1 Einteilung irdischer Lebewesen	27
1.5.2 Lipoxygenasen in Bakterien	27
1.5.3 Mögliches Vorkommen von Lipoxygenasen in Archaeen.....	28
1.5.4 Lipoxygenasen in Eukaryonten	29
1.5.4.1 Vorkommen von Lipoxygenasen in pflanzlichen Organismen.....	29
1.5.4.2 Vorkommen von Lipoxygenasen in Protozoen und niederen Metazoen	30
1.5.4.3 Vorkommen von Lipoxygenasen in Chordaten	31
1.5.4.3.1 Entwicklung der ALOX15 während der Säugetierevolution.....	34
1.5.4.3.2 Vorkommen von Lipoxygenasen in Hominiden und Menschen.....	35
1.6 Biologische Rolle von Lipoxygenasen.....	36
1.6.1 Physiologische Funktionen von Lipoxygenasen.....	37
1.6.1.1 Zelldifferenzierung und Organogenese	37
1.6.1.2 Zellproliferation und Apoptose	39
1.6.1.3 Hirnentwicklung und interneuronale Kommunikation	40
1.6.1.4 Hämostase	40
1.6.2 Pathophysiologische Funktionen von Lipoxygenasen.....	41

1.6.2.1 Entzündungsreaktion	41
1.6.2.2 Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, ARDS)	43
1.6.2.3 Nierenerkrankungen.....	44
1.6.2.4 Herz-Kreislauf-Erkrankungen	45
1.6.2.5 Karzinogenese	46
1.6.2.6 Neurologische Erkrankungen.....	49
1.6.2.7 Metabolische Erkrankungen.....	51
1.7 Fragestellung	52
2 Materialien und Methoden	54
2.1 Materialien	54
2.1.1 Chemikalien	54
2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen	55
2.1.3 Enzyme und Kits	57
2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide.....	57
2.1.5 Nukleotid- und Proteinsequenzen	60
2.1.6 Bakterienstämme	61
2.1.7 Eukaryontische Zellstämme	61
2.1.8 Geräte	61
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	62
2.2.1 Klonierungen und Ligationen	62
2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese	64
2.2.3 Transformation von E. coli	65
2.2.4 Prokaryontische Expressionen mit E. coli	65
2.2.5 Eukaryontische Expressionen der zbfALOX5 in HEK293-Zellen	67
2.2.6 Enzymaufreinigung	67
2.2.7 Western Blot	68
2.2.8 Membranbindungsassay	69
2.2.9 Aktivitätsassay	70
2.3 Analytische Methoden.....	71
2.3.1 Analyse des Produktspektrums mittels HPLC	71
2.3.2 Statistische Datenauswertung.....	72
2.4 Recherchestrategien	72
3 Ergebnisse	75
3.1 Bakterielle Lipoxygenasen	75

3.2 Lipoxygenasen in Archaeen.....	77
3.3 Charakterisierung der <i>zbfALOX5</i>	77
3.3.1 Expression der <i>zbfALOX5</i> in pro- und eukaryontischen Expressionssystemen	82
3.3.1.1 Reaktionsspezifität der bakteriell exprimierten <i>zbfALOX5</i>	83
3.3.1.2 Reaktionsspezifität der eukaryontisch exprimierten <i>zbfALOX5</i>	84
3.3.2 Versuche zur Anwendbarkeit Volumenhypothese auf die <i>zbfALOX5</i>	85
3.3.2.1 Sloane-Mutanten.....	86
3.3.2.1.1 Einfachmutante A424F.....	87
3.3.2.1.2 Einfachmutante N425M.....	88
3.3.2.1.3 Einfachmutante N425F.....	89
3.3.2.1.4 Zweifachmutante A424I+N425M.....	91
3.3.2.1.5 Normalphasen-HPLC interessanter Sloane-Mutanten.....	92
3.3.2.1.6 Enantioselektivität dominant 8-lipoxygenierender <i>zbfALOX5</i> -Mutanten.....	93
3.3.2.2 Kombinierte Mutationen der Sloane- und Borngräber-Determinanten.....	94
3.3.2.2.1 Zweifachmutante F359W+N425M.....	95
3.3.2.2.2 Dreifachmutante F359W+A424I+N425M.....	95
3.3.2.2.3 Vierfachmutante F359W+A424I+N425M+A603I.....	97
3.3.2.3 Enantioselektivität der 15-lipoxygenierenden <i>zbfALOX5</i> -Mutanten.....	98
3.3.2.4 Übersicht über das Produktmuster der <i>zbfALOX5</i> -Triadenmutanten.....	99
3.3.3 Phosphorylierungsmimetische Mutationen.....	100
3.3.4 Expressionsprofile Leukotrien-relevanter Enzyme in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs.....	104
3.4 Charakterisierung der 15-Lipoxygenase höherer Primaten.....	106
3.4.1 Phylogenetische Aspekte der <i>ALOX15</i> -Produktspezifität.....	106
3.4.2 Sequenzhomologie der <i>hum-</i> , <i>pan-</i> und <i>gibALOX15</i>	108
3.4.3 Vorhersage der Positionsspezifität von <i>pan-</i> und <i>gibALOX15</i>	110
3.4.4 Biochemische Charakterisierung der <i>ALOX15</i> -Orthologe.....	112
3.4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	112
3.4.4.2 HPLC-Analytik der <i>ALOX15</i> -Produkte höherer Primaten.....	113
3.4.5 Mechanistische Grundlage der Evolution der <i>ALOX15</i> -Spezifität.....	117
3.4.6 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts.....	118
3.4.6.1 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts für die <i>panALOX15</i>	119
3.4.6.2 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts für die <i>gibALOX15</i>	120
3.5 Untersuchungen der Membranbindung.....	121

3.6 Leukotriensignalwege ausgestorbener Verwandte des modernen Menschen ...	122
3.6.1 Leukotriensignalwege des <i>H. neanderthalensis</i>	123
3.6.2 Leukotriensignalwege des <i>H. denisovans</i>	127
4 Diskussion	131
4.1 Bakterielle Lipoxygenasen	131
4.2 Eikosanoidstoffwechsel beim Zebrafisch	134
4.2.1 Expressionsprofile Leukotrien-relevanter Enzyme	136
4.2.2 Die genomische Vielfalt der Zebrafisch-Lipoxygenasen.....	137
4.2.3 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts auf die Zebrafisch- <i>ALOX5</i>	138
4.2.4 Phosphorylierungsmimetische Mutanten der <i>zbfALOX5</i>	139
4.3 <i>ALOX15</i> -Orthologe während der Primatenentwicklung.....	140
4.3.2 Der biologische Sinn und evolutionäre Triebkraft der Spezifitätsänderung	142
4.3.2.1 12-HETE- vs. 15-HETE-Rezeptor (mögliche Koevolution mit <i>ALOX15</i>).....	143
4.3.2.2 Die evolutionäre Optimierung der Lipoxinsynthese	144
4.3.2.3 Die evolutionäre Optimierung der Membranoxygenierung	147
4.4 Volumenhypothese	148
4.5 Membranbindungsstudien.....	150
4.5.1 Unterschiede im Mechanismus der Membranbindung (<i>ALOX15</i> , <i>ALOX5</i>).....	150
4.5.2 Biologische Rolle der Membranbindung.....	151
4.5.3 Strukturveränderungen bei Membranbindung.....	151
4.6 Untersuchungen der Leukotriensignalwege von Hominiden	152
4.6.1 Leukotriensignalwege des <i>H. neanderthalensis</i>	152
4.6.2 Leukotriensignalwege des <i>H. denisovans</i>	153
5 Literaturverzeichnis	157
6 Abbildungsverzeichnis	181
7 Tabellenverzeichnis	183
8 Eidesstattliche Versicherung	184
9 Lebenslauf.....	190
10 Publikationsliste	191
11 Danksagung.....	193

Abstrakt

Einleitung: Lipoxygenasen (LOXn) bilden eine Familie lipidperoxidierender Enzyme, die bei Pflanzen und Tieren weit verbreitet vorkommen, zu deren biologischer Funktion es jedoch noch kein allgemein gültiges Konzept gibt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Aspekte der Evolution von LOXn untersucht, wobei folgende Fragen beantwortet werden sollten: 1. In welcher Verbreitung kommen LOXn in den drei Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, Archaeen, Eukaryonten) vor? 2. Besitzt der Zebrafisch, der als Modellorganismus für frühe Vertebraten angesehen wird, eine funktionelle ALOX5 und einen intakten Leukotriensignalweg? 3. Gab es eine systematische Evolution der Reaktionsspezifität der ALOX15 im Laufe der späten Primatenentwicklung von 12- zu 15-lipoxygenierenden Isoformen? 4. Exprimierten die ausgestorbenen menschlichen Vorfahren (*H. neanderthalensis* und *H. denisovan*) funktionsfähige LOXn und andere Enzyme und Rezeptoren der Leukotriensignaltransduktion?

Methodik: Um das Vorkommen von LOXn in ausgewählten Organismen zu erforschen, welche die Entwicklung der Lebewesen auf verschiedenen Evolutionsniveaus repräsentieren, wurden Genomdatenbanken mit speziellen Suchstrategien auf das Vorkommen von LOX-Genen untersucht und die Eigenschaften der rekombinanten Enzyme unter Verwendung von ortsgerichteter Mutagenese charakterisiert.

Ergebnisse: 1. LOXn kommen in < 1% der sequenzierten bakteriellen Genome vor. In Archaeen wurden bisher keine funktionellen LOX-Gene nachgewiesen. 2. Das Zebrafischgenom enthält mehrere LOX-Gene. Das Gen mit der höchsten Sequenzhomologie zur humALOX5 kodiert für eine funktionelle ALOX5, die durch Mutagenese in eine 15-lipoxygenierende Enzymspezies umwandelbar ist. Phosphorylierungsmimetische Mutanten verändern nicht die Reaktionsspezifität dieses Enzyms. 3. Im Laufe der späten Primatenenevolution kam es zu einer Veränderung der Reaktionsspezifität der ALOX15 (12-lipoxygenierend bei niederen Primaten, 15-lipoxygenierend bei höheren Primaten), wobei die Gibbon-ALOX15 eine Übergangsform mit ausgeprägter dualer Reaktionsspezifität darstellt. Als evolutionäre Triebkraft dafür kann die Optimierung der Membranoxygenase- und der Lipoxinsynthaseaktivität angesehen werden. 4. Im Genom ausgestorbener Frühmenschen (*H. neanderthalensis*, *H. denisovan*) konnten intakte Gene für alle wichtigen Enzyme und Rezeptoren der

Leukotriensignalkaskade nachgewiesen werden. Detaillierte Sequenzvergleiche und Mutageneseuntersuchungen belegen deren Funktionalität.

Schlussfolgerungen: Trotz der großen Verbreitung von LOXn in höheren Lebewesen sind diese Enzyme in Bakterien nur spärlich vorhanden und wurden in Archaeen bislang nicht nachgewiesen. Diese Daten sprechen dafür, dass es bei primitiven Lebewesen keine systematische Evolution von LOXn gegeben hat, sondern dass die Enzyme durch horizontalen Gentransfer sporadisch ins Genom niederer Organismen eingeführt wurden. Auf der Grundlage der derzeit verfügbaren Daten lässt sich der Beginn einer systematischen LOX-Evolution und die Einführung des Leukotriensignalweges bei höheren Lebewesen nicht sicher datieren. Einen funktionellen Leukotriensignalweg gab es jedoch bereits beim Zebrafisch, was auf deren Existenz bei Knochenfischen im Allgemeinen hindeutet.

Abstract

Introduction: Lipoxygenases (LOXn) form a family of lipid peroxidizing enzymes, which are widely distributed in plants and animals. Unfortunately, there is no unifying concept for their biological role. Here, selected aspects of LOX evolution were explored and the following questions were addressed: 1. How frequently do LOXs occur in the three domains of terrestrial life (*bacteria*, *archaea*, *eucarya*)? 2. Does the zebrafish, which is a vertebrate model organism, exhibit functional leukotriene signaling? 3. Was there a targeted change in the reaction specificity of ALOX15-orthologs during late primate evolution from 12- to 15-lipoxygenating enzymes? 4. Did extinct human subspecies (*H. neanderthalensis*, *H. denisovan*) express functional ALOX5-orthologs and other constituents of leukotriene signaling?

Methodology: To explore the existence of LOXs in selected organisms representing different evolutionary levels, we searched genomic databases for the presence of true LOX-genes employing specially designed screening strategies and characterized selected recombinant enzymes employing site-directed mutagenesis.

Results: LOXs occur in < 1% of all bacterial genomes but no true LOX sequences have been detected in archaea. 2. The zebrafish genome involves several LOX genes and one of them encodes for a functional zbfALOX5. This enzyme can be converted to a 15-lipoxygenating LOX by site-directed mutagenesis of its triade determinants. Phosphorylation mimicking mutations did not alter the reaction specificity of zbfALOX5. 3. During late primate evolution there was an evolutionary switch in the reaction specificity of ALOX15-orthologs (12-lipoxygenting in lower primates, 15-lipoxygenating in higher primates) and gibbons express an ALOX15 with pronounced dual specificity. As driving force for this targeted alteration improved membrane oxygenase- and lipoxin A4 synthase-activities were identified. 4. The genomes of extinct human subspecies (*H. neanderthalensis*, *H. denisovan*) involve intact genes for all enzymes and receptors of leukotriene signaling. Detailed sequence comparisons and mutagenesis studies suggested their functionality.

Conclusions: Although LOXs frequently occur in higher plants and animals, they are not widely distributed in bacteria and have not been detected so far in archaea. These data suggest that there has not been a systematic evolution of LOX isoforms in primitive organisms. In contrast, the enzymes characterized in lower species were most likely

introduced by horizontal gene transfer. On the basis of the currently available data it is impossible to precisely date the introduction of LOXs and leukotriene signaling during the evolution of higher organisms. However, leukotriene signaling was already present in zebrafish suggesting a wider distribution of this pathway in bony fish.

Abkürzungsverzeichnis

1

12-HETE *12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure*

12-HpETE *12-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure*

12-LOX *Siehe ALOX12*

13(S)-HODE *13(S)-Hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure*

15-HETE *15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure*

15-HpETE *15-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure*

15-LOX *Siehe ALOX15*

15-LOX-2 *Siehe ALOX15B*

5

5-HETE *5-Hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

5-HpETE *5-Hydroperoxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

5-LOX *Siehe ALOX5, Siehe ALOX5*

8

8-HETE *8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

8-HpETE *8-Hydroperoxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

8-LOX *Siehe ALOX8*

A

AA *Arachidonsäure*

ALOX12 *Arachidonsäure 12-Lipoxygenase; 12-LOX*

ALOX12B *Arachidonsäure 12-Lipoxygenase, 12R-Typ; 12R-LOX*

ALOX12P2 *Arachidonsäure 12-Lipoxygenase Pseudogen 2*

ALOX15 *Arachidonsäure 15-Lipoxygenase, Isoform 1; 15-LOX-1*

ALOX15B *Arachidonsäure 15-Lipoxygenase, Isoform 2; 15-LOX-2*

ALOX5 *Arachidonsäure 5-Lipoxygenase; 5-LOX*

ALOX8 *Arachidonsäure 8-Lipoxygenase; 8-LOX*

ALOXE3 *Arachidonsäure Lipoxygenase 3; ALOXe3; eLOX3;*

Amp *Ampicillin*

ARCI *Autosomal rezessive kongenitale Ichtyose*

ARDS *Akutes Respiratorisches Disstress-Syndrom*

AS *Aminosäure(n)*

ATP *Adenosintri-phosphat*

B

BG-I *Borngräber I-Determinante – Triadendeterminante der Positionsspezifität*

BG-II *Borngräber II-Determinante – Triadendeterminante der Positionsspezifität*

BLT1 *Leukotrien B₄-Rezeptor 1, auch LTB₄R1*

BLT2 *Leukotrien B₄-Rezeptor 2, auch LTB₄R2*

C

CA *Chloramphenicol*

cDNA *"complementary DNA" - zur RNA komplementäre DNA*

CED *Chronisch entzündliche Darmerkrankung*

CIE *(nichtbullöse) kongenitale ichtyosiforme Erythrodermie*

COX-1 *Cyclooxygenase-1*

COX-2 *Cyclooxygenase-2*

cysLTR1 *Cysteinylleukotrien-Rezeptor 1*

cysLTR2 *Cysteinylleukotrien-Rezeptor 2*

D

den „denisovan“ – *Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit (H. denisovan)*

DHA *Docosahexaensäure*

DNA *Desoxyribonukleinsäure*

E

EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*

eLOX3 *Siehe ALOXE3*

EPA *Eicosapentaensäure*

F

FLAP *5-Lipoxygenase aktivierendes Protein*

G

gor „gorilla“ – *Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit*

GPCR *G-Protein-gekoppelter Rezeptor*

GSH *Glutathion*

H

HpETE *Hydroperoxyeicosatetraensäure*

HETE *Hydroxyeicosatetraensäure*

HPLC *"high performance liquid chromatography" – hochauflösende Flüssigkeitschromatografie*

hum „human“ – Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit

I

ICS *inhalatives Kortikosteroid*

IPTG *Isopropyl- β -thiogalactopyranosid*

K

kDa *Kilodalton – atomare Masseneinheit (1 kDa = 1000 Da)*

K_m *Michaelis-Menten-Konstante*

KRK *Kolorektales Karzinom*

L

LA *Linolsäure*

LABA *“long acting β_2 -agonist” – langwirksames β_2 -Sympathomimetikum*

LAMA *“long acting muscarinic antagonist” – langwirksames Anticholinergikum*

LB-Medium *Luria Bertani-Medium*

LeA *Linolensäure*

LOX *Lipoxygenase*

LOXn *Lipoxygenasen*

LOXs *“lipoxygenases”*

LT *Leukotrien(e)*

LTA₄ *Leukotrien A₄ - 5-trans-5,6-epoxy-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

LTA₄H *Leukotrien A₄-Hydrolase*

LTB₄ *Leukotrien B₄ - 5,12-dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-eicosatetraensäure*

LTC₄ *Leukotrien C₄ - 5-hydroxy-6-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

LTC₄S *Leukotrien C₄-Synthase*

LTD₄ *Leukotrien D₄ - 5-hydroxy-6-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

LTE₄ *Leukotrien E₄ - 5-hydroxy-6R-(S-cysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure*

LTRA *Leukotrien-Rezeptorantagonist*

LUCA *last universal common ancestor – hypothetische Urform des irdischen Lebens*

LxA₄ *Lipoxin A₄ - 5(S),6(R),15(S)-TriHETE*

M

MeOH *Methanol*

mou „mouse“ – Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit

N

NaBH₄ *Natriumborhydrid*

NFκB *Nuclear Factor kappa-B - Transkriptionsfaktor*

NMD *nonsense-mediated mRNA decay*

O

OD *Optische Dichte*

P

PBS *“phosphate buffered saline” – phosphatgepufferte Salzlösung*

PC *Phosphatidylcholin*

PCR *„polymerase chain reaction” – Polymerasekettenreaktion*

PPARγ *Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma – Transkriptionsfaktor*

PUFAs *“polyunsaturated fatty acids” – Mehrfach ungesättigte Fettsäuren*

R

RA *Rheumatoide Arthritis*

rab *„rabbit“ – Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit*

RNA *Ribonukleinsäure*

RP-HPLC *“Reversed Phase-HPLC” – Umkehrphasen-HPLC*

rpm *„revolutions per minute“ – Umdrehungen pro Minute*

RT *Raumtemperatur*

S

SABA *“slow acting β₂-agonist” – kurzwirksames Sympathomimetikum*

SAMA *“slow acting muscarinic antagonist“ – langwirksames Anticholinergikum*

SBT *Substratbindungstasche*

SDS *Sodiumdodecylsulfat*

SDS-PAGE *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

SL *Sloane-Determinante – Triadendeterminante der Positionsspezifität*

SP-HPLC *“Straight Phase-HPLC” – Normalphasen-HPLC*

SRS-A *„slow reacting substance of anaphylaxis“ – Gemisch von LTC₄ und LTD₄*

T

TAE *Tris-Acetat-EDTA*

TGF-β *„Transforming growth factor beta“*

W

WT *Wildtyp*

Z

Zsfg. *Zusammenfassung*

zbf *„zebrafish“ – Dreibuchstabencode zur Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit*

Nukleinsäurebasen-Abkürzungen

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

Aminosäure-Abkürzungen

Ala	A	<i>Alanin</i>
Asn	N	<i>Asparagin</i>
Arg	R	<i>Arginin</i>
Asp	D	<i>Aspartat</i>
Glu	E	<i>Glutamat</i>
Gly	G	<i>Glycin</i>
His	H	<i>Histidin</i>
Ile	I	<i>Isoleucin</i>
Leu	L	<i>Leucin</i>
Lys	K	<i>Lysin</i>
Met	M	<i>Methionin</i>
Phe	F	<i>Phenylalanin</i>
Ser	S	<i>Serin</i>
Trp	W	<i>Tryptophan</i>
Tyr	Y	<i>Tyrosin</i>

1 Einleitung

1.1 Definition von Lipoxygenasen und biologische Wirkprinzipien

Lipoxygenasen (LOXn) bilden eine Klasse Nüchthämeisen enthaltender Enzyme, welche Polyenfettsäuren (PUFAs) mit 1-cis,4-cis-Pentadienstruktur durch die Einführung von molekularem Sauerstoff stereospezifisch zu Hydroperoxyfettsäuren oxygenieren. Sie gehören somit zur Familie der Dioxygenasen (Haeggström and Funk, 2011) und werden in vielen Eukaryonten (Pflanzen, Tieren, Protozoen) und ausgewählten Prokaryonten (einigen Bakterienspezies) exprimiert (Brash, 1999). Als Substrate dienen den pflanzlichen Lipoxygenasen vor allem Linol- ($C_{18}: \Delta^{9,12}, \omega 6$) und α -Linolensäure ($C_{18}: \Delta^{9,12,15}, \omega 3$). Linolsäure (LA) als einfachste Polyenfettsäure kann abhängig von der Enzymisoforn an den Kohlenstoffatomen 9 und 13 peroxidiert werden, sodass unterschiedliche Positionsisomere von Hydroperoxyfettsäuren entstehen (Hamberg and Samuelsson, 1967). Bei Säugetieren fungieren vor allem Arachidonsäure (AA) ($C_{20}: \Delta^4, \omega 6$), Eicosapentaensäure (EPA) ($C_{20}: \Delta^{5,8,11,14,17}, \omega 3$) und Docosahexaensäure (DHA) ($C_{22}: \Delta^{4,7,10,13,16,19}, \omega 3$) als LOX-Substrat. Bei diesen Organismen stellt der Lipoxygenaseweg neben dem Cyclooxygenaseweg einen wichtigen Teil des PUFA-Stoffwechsels dar. Prinzipiell werden freie PUFAs als Substrate bevorzugt. Da die zelluläre Konzentration freier Polyenfettsäuren in eukaryontischen Zellen sehr gering ist, müssen die LOX-Substrate bei Zellaktivierung aus Membranphospholipiden freigesetzt werden. Diese Reaktion erfolgt durch die zytosolische Phospholipase A₂ (Mancini and Di Battista, 2011). Die primären LOX-Produkte, die Hydroperoxyfettsäuren (HETEs), können in Folgereaktionen zu anderen bioaktiven Lipidmediatoren, wie Leukotrienen (Savari et al., 2014), Resolvinen (Yoo et al., 2013), Lipoxinen (Romano, 2010), Hepoxilinen (Pace-Asciak, 2009), Eoxinen (Sachs-Olsen et al., 2010) und Protektinen (Serhan and Petasis, 2011) umgesetzt werden.

LOXn entfalten ihre biologische Wirkung jedoch nicht nur über die Synthese bioaktiver Mediatoren. Es existieren mindestens zwei alternative Szenarien, die mögliche Wirkprinzipien repräsentieren: i) Manche LOXn sind in der Lage, veresterte PUFAs als Bestandteile von Phospholipiden (Schewe et al., 1975) oder Cholesterolestern (Belkner et al., 1991) zu oxygenieren, auch wenn diese in Biomembranen und Lipoproteinen integriert sind. Dadurch verändern sich die Eigenschaften dieser hochmolekularen Lipid-Protein-Aggregate, was biologische Konsequenzen haben sollte (Kuhn et al., 2014). ii)

Als Dioxygenasen sind LOXn Schlüsselenzyme der Redoxhomöostase biologischer Systeme. Da der zelluläre Redoxstatus ein bedeutsamer regulierender Faktor der Genexpression ist (Kim et al., 2013), beeinflusst die katalytische Aktivität von LOXn das zelluläre Genexpressionsmuster und damit den Funktionzustand von Zellen.

1.2 Lipoxygenase-Reaktion

Der Reaktionsmechanismus der enzymatischen Lipidperoxidation lässt sich formal in die folgenden vier Elementarreaktionen unterteilen (**Abb. 1**) (Ivanov et al., 2010, Haeggström and Funk, 2011), wobei das enzymgebundene Nichthämeisen einem Wertigkeitswechsel unterliegt.

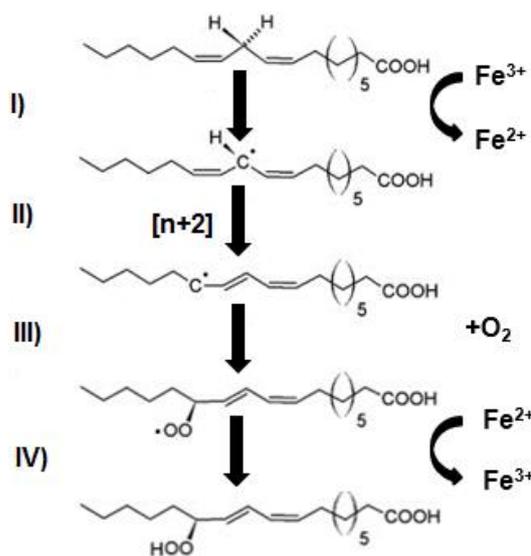


Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen. In der oben stehenden Abbildung sind die vier elementaren Reaktionsschritte aufgeführt.

- i) Wasserstoffabstraktion,
- ii) Radikalrearrangement,
- iii) Sauerstoffinsertion und
- iv) Reduktion des entstehenden Peroxyradikals.

i) Wasserstoffabstraktion: Der katalytische Zyklus der LOX-Reaktion wird eingeleitet durch die positions- und stereospezifische Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einer doppelallylständigen Methylengruppe der Substratfettsäure. Das zu abstrahierende Wasserstoffatom wird in Form eines Protons und eines Elektrons abgespalten, wobei das Elektron das dreiwertige Nichthämeisen des Enzyms reduziert.

ii) Radikalverschiebung: In dieser Teilreaktion wandert das radikalische Elektron, das bei der

Wasserstoffabstraktion entsteht, in Abhängigkeit von der Enzymspezifität formal entweder um zwei Kohlenstoffatome in Richtung der Carboxylgruppe (n-2 Verschiebung) oder in Richtung des Methylendes (n+2 Verschiebung). Dabei entsteht ein konjugiertes Doppelbindungssystem welches den primären LOX-Produkten ein charakteristisches UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm verleiht. *iii) Sauerstoffinsertion:* Durch die Insertion molekularen Sauerstoffs entsteht aus dem umgelagerten kohlenstoffzentrierten Fettsäureradikal ein sauerstoffzentriertes Peroxyradikal. Auch diese Teilreaktion verläuft positions- und stereospezifisch und erfolgt entsprechend der

Reaktionsspezifität des Enzyms. *iv) Radikalreduktion:* In der letzten Elementarreaktion wird das Peroxyradikal zum Peroxyanion reduziert. Dazu wird ein Elektron des zweiwertigen Nichthämeisens auf das Peroxyradikal übertragen, sodass das Enzym wieder in der katalytisch aktiven dreiwertigen Form vorliegt und den nächsten katalytischen Zyklus initiieren kann.

1.3 Eigenschaften von Lipoxygenasen

1.3.1 Struktur von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die meist in zwei Domänen gefaltet vorliegt. Bei niederen Organismen ist die Zweidomänenstruktur teilweise aufgehoben (Garreta et al., 2013) und manchmal kommen die Enzyme auch als Fusionsproteine vor (Koljak et al., 1997, Löhelaid et al., 2008, Oldham et al., 2005). Bei den Enzymen höherer Pflanzen und Tiere besteht die kleinere N-terminale Domäne aus einer Anzahl parallel und antiparallel angeordneter β -Faltblätter und wird mit der Regulation der Enzymaktivität und der Membranbindung assoziiert (Walther et al., 2011). Die größere C-terminale Domäne ist hauptsächlich alpha-helikaler Struktur und enthält das katalytische Nichthämeisen. Derzeit liegen Kristallstrukturen für drei der sechs verschiedenen humanen LOX-Isoformen [ALOX12 (Tresaugues et al., unpublished), ALOX5 (Gilbert et al., 2011) und ALOX15B (Kobe et al., 2014)] vor. Für die humane ALOX12B, die ALOXE3 und die ALOX15 gibt es noch keine Kristalldaten. Dafür wurde die Kristallstruktur der Kaninchen-ALOX15 (Choi et al., 2008), die ein gutes Modell für die Struktur des menschlichen Orthologs darstellt, aufgeklärt. Weiterhin existiert ein kompletter Datensatz für eine phosphorylierungsmimetische Mutante (Ser663Asp) der humanen ALOX5 (Gilbert et al., 2012). Für einige Pflanzenlipoxygenasen wurden ebenfalls Kristallstrukturen aufgeklärt (Boyington et al., 1993, Minor et al., 1996, Skrzypczak-Jankun et al., 2004).

Neben den Kristallstrukturen liegen Röntgenstreudaten zu den Lösungsstrukturen für die Kaninchen-ALOX15 (Hammel et al., 2004), die humane ALOX12 (Aleem et al., 2008) und für die Sojabohnen-LOX1 vor (Dainese et al., 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass das Kaninchenenzym strukturell deutlich flexibler ist als die pflanzliche LOX. Obwohl die experimentellen Rohdaten der Röntgenstreuung unterschiedlich interpretiert werden können (Hammel, 2012), scheinen MD-Simulationen

(Moin et al., 2011) und thermische Inaktivierungsstudien (Mei et al., 2008) die hohe strukturelle Flexibilität des Kaninchenenzym zu bestätigen.

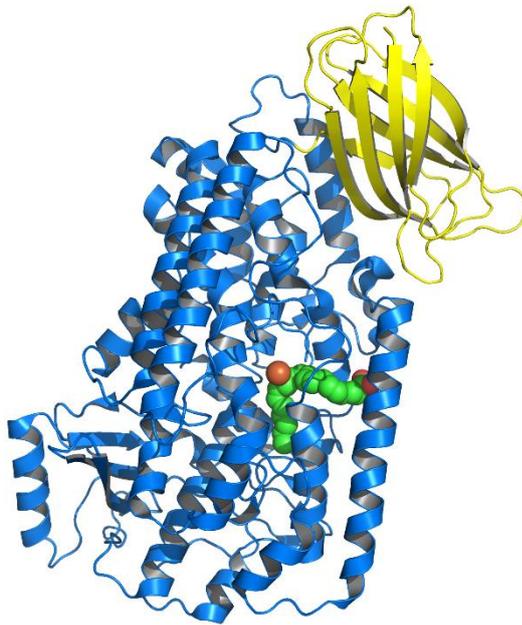


Abb. 2: Kristallstruktur der ALOX15 des Kaninchens. In Blau abgebildet ist die α -helikale katalytische Domäne mit dem in Orange dargestellten Nichteisen. Am aktiven Zentrum des Enzyms ist die AA (Grün) gebunden, wobei die Carboxylgruppe Rot markiert ist. Die N-terminale β -Faltblattdomäne ist in Gelb dargestellt. Die Proteinstruktur wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Horn (AG Prof. Kühn) modelliert und zur Verfügung gestellt.

Lange Zeit wurde vermutet, dass LOXn als Enzymmonomere katalytisch aktiv sind. Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die ALOX15 (Ivanov et al., 2012), die ALOX12 (Aleem et al., 2008) und die ALOX5 (Häfner et al., 2011) in wässrigen Lösungen als katalytisch aktive Dimere vorliegen. Für die Kaninchen-ALOX15 scheint ein reversibles Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorzuliegen, wobei die Lage des Gleichgewichtes durch die Anwesenheit von Liganden beeinflusst wird (Ivanov et al., 2012).

1.3.2 Kinetische Besonderheiten von Lipoxygenasen

LOXn sind Zweisubstratenzyme, die nur unter bestimmten Voraussetzungen der Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Bei sättigenden Sauerstoffkonzentrationen wurden für verschiedene isolierte LOXn K_M -Werte für Fettsäuren im mittleren μM Bereich (5-500 μM) bestimmt (Ludwig et al., 1987, Van Os et al., 1981, Aharony and Stein, 1986). Die K_M -Werte für Sauerstoff liegen dagegen im unteren μM Bereich (Knapp and Klinman, 2003), was auf eine hohe Affinität der Enzym-Substratkomplexe für Sauerstoff schließen lässt. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass der Sauerstoff nicht direkt am Enzymprotein bindet, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit vom enzymgebundenen Fettsäureradikal aufgenommen wird. Die molekularen Umsatzraten von LOXn sind sehr verschieden. Für die Sojabohnen-LOX1 wurde eine Umsatzrate von 300 s^{-1} bestimmt (Van Os et al., 1981).

Für die Kaninchen- bzw. die menschliche ALOX15 liegt dieser Wert in Abhängigkeit von der Qualität der Enzympräparationen zwischen 5-50 s⁻¹ (Ludwig et al., 1987, Kühn et al., 1993).

Die Reaktionskinetik von LOXn ist durch eine Reihe von Besonderheiten gekennzeichnet. Bei der Verwendung sauberer Fettsäurepräparationen als LOX-Substrate wird eine kinetische Latenzphase sichtbar, die durch den Zusatz von H(p)ETEs oder H(p)ODE-Isomeren unterdrückt werden kann (Ludwig et al., 1987, Zheng and Brash, 2010, Suzuki et al., 1997, Cho et al., 2007). Diese sogenannte kinetische *lag*-Phase ist darauf zurückzuführen, dass LOXn in ihrer zweiwertigen Form katalytisch inaktiv sind und erst durch Oxidantien in die katalytisch aktive dreiwertige Form überführt werden müssen. Die im Verlauf der LOX-Reaktion gebildeten Fettsäurehydroperoxide fungieren als solche Oxidantien, sodass man in der initialen Phase der LOX-Reaktion von einem autokatalytischen Charakter sprechen kann.

In höheren Konzentrationen führen H(p)ETEs zur Inaktivierung von LOXn (Härtel et al., 1982, Rapoport et al., 1986, Aharony et al., 1987). Dabei induziert die Wechselwirkung der Enzyme mit ihren Reaktionsprodukten noch nicht näher charakterisierte Strukturveränderungen, die mit einem irreversiblen Aktivitätsverlust einhergehen. Der molekulare Mechanismus dieser Selbstinaktivierung ist derzeit noch nicht bekannt. Biologisch gesehen ist diese Enzymeigenschaft für ein destruierendes Enzym jedoch sinnvoll, da damit eine überschüssige Destruktion (z.B. exzessiver Membranabbau) verhindert wird.

1.3.3 Regulation von Lipoxygenasen

Lipoxygenasen können wie alle Enzyme durch Modifikationen auf transkriptionaler, post-transkriptionaler und post-translationaler (Rakonjac et al., 2006) Ebene reguliert werden. Aus Platzgründen kann auf diese Mechanismen nicht umfassend eingegangen werden. Im Folgenden sollen exemplarisch zwei Beispiele für die Regulation der ALOX5 (Expressionsregulation, post-translationaler Modifizierung), diskutiert werden.

In der ALOX5-Promotorregion der humanen ALOX5 sind u.a. acht GC-Boxen als regulatorisches Element beschrieben worden, an welche die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Egr-1 binden können (Schnur et al., 2007). Auf post-transkriptionaler Ebene gibt es Hinweise darauf, dass alternatives Splicing und Kontrollmechanismen, welche trunkierte

Transkripte erkennen und deren Expression verhindern [sog. *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)], in die Regulation der 5-LOX-Aktivität involviert sind (Ochs et al., 2012). Ein zweiter Mechanismus betrifft die Beeinflussung der spezifischen Enzymaktivität. Diese erfolgt durch allosterische Mechanismen, durch post-translationale Modifikationen sowie durch direkte Rückkopplungsschleifen, wie z.B. Substrathemmung oder suizidale Inaktivierung (siehe 1.3.2).

Als allosterische Effektoren sind in der Literatur verschiedene Substanzen beschrieben. So wird die gereinigte humane ALOX5 durch Calcium-Ionen (Ca^{2+}) aktiviert (Aharony and Stein, 1986, Puustinen et al., 1988). Ca^{2+} scheint als Co-Faktor für die Bindung von Stimulationsfaktoren wie Coactosin-like Protein oder Phosphatidylcholin notwendig zu sein (Basavarajappa et al., 2014). Allerdings scheint die Stress-induzierte Aktivierung der ALOX5 in polymorphkernigen Leukozyten nicht Ca^{2+} -abhängig abzulaufen (Werz et al., 2002). Die ALOX15 (Walther et al., 2004) und die ALOX5 (Wong et al., 1988) werden außerdem durch Translokation an Biomembranen aktiviert. Die molekularen Mechanismen für diesen Vorgang sind nicht vollständig geklärt. Allerdings wird für die ALOX15 ein Zusammenhang zwischen der Membranbindungsfähigkeit und der strukturellen Flexibilität des Enzyms auf der Ebene der Tertiärstruktur vermutet (Di Venere et al., 2013). Für die allosterische Wirkung von Ca^{2+} konnte auch eine positive Beeinflussung der ALOX5-Enzymkinetik bezüglich der Metabolisierung von AA gezeigt werden (K_M -Senkung). Für die maximale Enzymaktivität scheint außerdem auch die stabilisierende Wirkung von ATP hilfreich zu sein. Der allosterische Charakter von LOXn ist neben der humALOX5 auch für andere Isoformen (humALOX15, humALOX15B, soyLOX1) (Falgueyret et al., 1995, Weckler et al., 2008, Weckler et al., 2009b, Weckler et al., 2009a) beschrieben worden. Allerdings sind Bindungsstellen der allosterischen Effektoren derzeit noch nicht für alle Enzyme aufgeklärt und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind nach wie vor unklar. Möglicherweise ist die Enzymdimerisierung, wie es bereits für die COX-Isoformen gezeigt worden ist, eine strukturelle Voraussetzung für das allosterische Verhalten von LOXn (Häfner et al., 2011, Ivanov et al., 2012).

Als ein weiterer Mechanismus der post-translationalen Modifikation gilt die Enzymphosphorylierung. In der Struktur der humALOX5 sind drei Phosphorylierungsstellen (Ser271, Ser523 und Ser663) bekannt, welche nach Aktivierung der entsprechenden Signalkaskade durch unterschiedliche Proteinkinasen (MAPKAP-Kinase 2, Proteinkinase A und ERK2) phosphoryliert werden und die nukleäre

Translokation der ALOX5 beeinflussen (Rådmark et al., 2015). Details zu den molekularen Mechanismen der Phosphorylierungsreaktionen und die molekularen Ursachen der funktionellen Konsequenzen sind noch nicht vollständig untersucht worden. Es gibt in der Literatur jedoch einen Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der Reaktionsspezifität durch die Phosphorylierung von Ser663. Diese Daten belegen, dass eine phosphorylierungsmimetische Mutante der humALOX5 (Ser663Asp) eine dominierende ALOX15 Aktivität aufweist (Gilbert et al., 2012). Röntgenkristallografische Daten scheinen eine mögliche Erklärung für das Phänomen zu bieten. Demnach könnte eine umgekehrte Orientierung der AA in der Substratbindungstasche eine mögliche Erklärung für die beobachtete Veränderung der Reaktionsspezifität darstellen (Gilbert et al., 2012). Angesichts der Tatsache, dass eine 15-Lipoxygenierung von AA (Bedeutung bei der Synthese von antiinflammatorischen Eikosanoiden) als funktioneller Gegenspieler der proinflammatorischen 5-Lipoxygenierung interpretiert werden kann, würde diese Beobachtung auf eine Inversion der biologischen Funktion der ALOX5 durch Phosphorylierung hindeuten. Diese Beobachtungen sind insofern bedeutsam, als sie mehrere experimentelle Daten zu den biologischen Wirkungsmechanismen der ALOX5 in einem anderen Licht erscheinen lassen würden. Dieser Punkt wird im experimentellen Teil der Dissertation wieder aufgegriffen (siehe 3.3.3).

In zellulären Systemen ist die Expression der ALOX5 nicht ausreichend, um Leukotriene zu synthetisieren. Dazu bedarf es eines Aktivatorproteins, des 5-Lipoxygenase aktivierenden Proteins (FLAP). Dieses kleine Membranprotein (Dixon et al., 1990), das durch membranspannende Helices in der Kernmembran verankert ist (Ferguson et al., 2007), sorgt nach der derzeitigen Auffassung dafür, dass freigesetzte Arachidonsäure aus den Membranlipiden für die ALOX5 zugänglich wird. Die FLAP-Expression wird durch Entzündungsmediatoren wie IL-5 und LPS induziert und geht mit einer verstärkten ALOX5 Translokation an die Kernmembran einher, ohne dabei die ALOX5 Expression zu beeinflussen. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Aktivitätsregulation der ALOX5 durch FLAP sind noch nicht gänzlich verstanden (Rådmark et al., 2015).

1.3.4 Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen

LOXn können verschiedene Polyenfettsäuren als Substrate verwenden. Neben LA, AA, EPA und DHA, die für die tierischen LOXn als Hauptsubstrate fungieren, werden

auch alpha- und gamma-Linolensäure (LeA) und andere PUFAs akzeptiert. Allerdings bevorzugen verschiedene LOX-Isoformen bestimmte Fettsäuren, während andere PUFAs weniger gut als Substrate geeignet sind. Diese als Substratspezifität bezeichnete Enzymeigenschaft hängt von der Struktur der Enzyme ab, wobei die genauen Zusammenhänge noch offen sind.

Neben der Substratspezifität spielt für LOXn die Reaktionsspezifität eine wichtige Rolle. Diese ist dafür verantwortlich, dass eine bestimmte Substratfettsäure durch ein Enzym selektiv in ein bestimmtes Produktisomer umgewandelt wird, obwohl prinzipiell die Synthese mehrerer Oxygenierungsprodukte möglich ist. Die Reaktionsspezifität einer LOX ergibt sich aus zwei Teilspezifitäten, der Positionsspezifität und der Enantioselektivität, die bei verschiedenen LOXn unterschiedlich sein können. Unter Positionsspezifität versteht man die Eigenschaft einer LOX, Sauerstoff an ein bestimmtes Kohlenstoffatom einer Fettsäure einzuführen. Wenn zum Beispiel durch ein Enzym Sauerstoff an das Kohlenstoffatom C₁₅ der Arachidonsäure eingeführt wird, spricht man von einer 15-Lipoxygenierung. Da Fettsäureoxygenierungsprodukte ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthalten, existieren für jedes Produktpositionsisomer prinzipiell zwei optische Isomere, das S- bzw. R-Enantiomer. Im Unterschied zu nicht-enzymatischen Oxygenierungen bilden LOXn selektiv nur eines der beiden Enantiomere und diese Enantioselektivität von LOXn entscheidet darüber, ob von einem gegebenen Enzym Produkte der S- oder R-Klasse gebildet werden.

Die molekulare Basis für die Reaktionsspezifität von LOXn wurde für mehrere Isoenzyme untersucht. Sie hängt von der Orientierung der Substratfettsäure am aktiven Zentrum und vom Weg des Sauerstoffs innerhalb des Enzymmoleküls ab. Obwohl vor allem zum Schicksal des Sauerstoffs während der LOX-Reaktion noch wenig bekannt ist, wurden für verschiedene LOX-Isoformen Hypothesen entwickelt, die deren Reaktionsspezifität erklären: i) Triadenmodell: Für die Kaninchen-ALOX15 wurde das Triadenmodell entwickelt, das durch umfangreiche Mutageneseuntersuchungen gestützt wird (Borngräber et al., 1999, Sloane et al., 1995). Dieses Modell geht davon aus, dass der Boden der Substratbindungstasche von ALOX15-Isoformen durch die drei kritischen Aminosäureregionen um Phe353, um Ile418/Met419 und um Ile593 gebildet wird. Der Raumbedarf der Seitenkette dieser Aminosäuren bestimmt das Volumen der Substratbindungstasche und damit die Eintauchtiefe der Fettsäure (Volumenhypothese). Werden diese Positionen durch kleine Aminosäuren okkupiert, resultiert wegen der größeren Eindringtiefe des Substrats ein 12-lipoxygenierendes Enzym. Sind große

Aminosäuren an diesen Stellen vorhanden, wird Arachidonsäure am C₁₅ oxygeniert (**Abb. 3**).

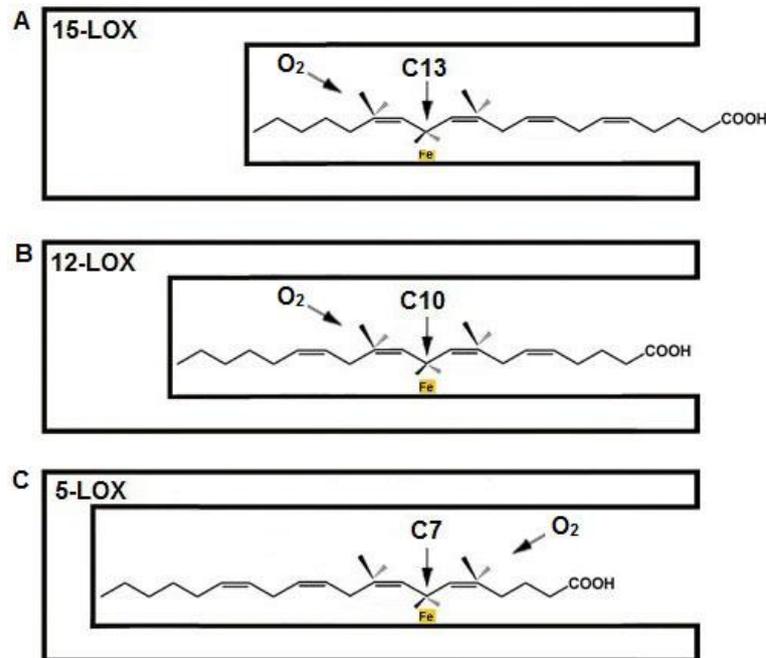


Abb. 3: Volumenhypothese zur Erklärung der Reaktionsspezifität von 5-, 12- und 15-lipoxygenierenden LOX-Isoformen. In der Abbildung sind schematisch die Substratbindungstaschen (SBT) von 5-, 12- und 15-lipoxygenierenden LOX-Isoformen mit dem gebundenen Substrat AA dargestellt. **(A)** Ist die Substratbindungstasche (SBT) wie bei der ALOX15 aufgrund großer Triaden-determinanten klein, befindet sich das katalytische Nicht-Hämeisen in räumlicher Nachbarschaft zum C₁₃ der AA und es resultiert eine Oxygenierung an C₁₅. **(B)** Bei einer etwas größeren SBT kann die AA mit dem Methylende ihrer Kohlenwasserstoffkette weiter in die SBT eindringen und die Oxygenierung erfolgt am C₁₂. **(C)** Bei ALOX5-Orthologen ist die SBT am größten und die Oxygenierung kann bei C₅ erfolgen. Unklar bleibt bei diesem Mechanismus allerdings die Erklärung der Enantioselektivität der ALOX5.

Das Triadenmodell kann auf alle bisher charakterisierten ALOX15-Orthologe angewandt werden (Vogel et al., 2010). Außerdem verändern Mutationen der Triadendeterminanten auch die Reaktionsspezifitäten der humanen ALOX12 und der humanen (Schwarz et al., 2001) und murinen ALOX5 (Schwarz et al., 2001, Hofheinz et al., 2013). Für die Reaktionsspezifität der humanen ALOX5 sind vor allem Phe359, Ala424/Asn425 und Ala603 von Relevanz (Schwarz et al., 2001). Auf die humane ALOX15B und die murine ALOX12B ist das Konzept jedoch nicht anwendbar. Neben der Triadentheorie existieren noch zwei weitere Modelle, welche die Reaktionsspezifität bestimmter LOXn erklären. ii) Das Jisaka-Konzept (Jisaka et al., 2000) erklärt die Unterschiede in der Reaktionsspezifität zwischen humaner und muriner ALOX15B, ist aber für andere Säugetierorthologe dieser Enzymunterklasse nicht relevant. iii) Das Coffa-Konzept (Coffa and Brash, 2004, Schneider et al., 2007) beschreibt den strukturellen Unterschied zwischen R- und S-LOXn. Es besagt, dass R-LOXn an einer bestimmten

Position ihrer Aminosäuresequenz ein Gly tragen, während S-LOXn an dieser Stelle ein Ala oder einen anderen größeren Aminosäurerest enthalten. Solche größeren Reste blockieren entsprechend dieser Hypothese die R-Oxygenierung, sodass selektiv das entsprechende S-Isomer gebildet wird. Der molekulare Hintergrund dieser Blockade ist noch weitgehend unklar und das Konzept kann auf die Zebrafisch-LOX1 (zbfLOX1) nicht angewandt werden. Letztere enthält ein Gly an dieser kritischen Stelle, fungiert aber als S-LOX (Jansen et al., 2011, Haas et al., 2011).

1.4 Klassifizierung von Lipoxygenasen und Enzymnomenklatur

LOXn bilden eine heterogene Enzymfamilie und Vertreter dieser Familie kommen in vielen Organismen vor. Aufgrund dieser Vielfalt ist es aus Verständnisgründen nötig, Klassifizierungskonzepte zu erarbeiten, aus denen sich eine leicht verständliche Enzymnomenklatur ableitet. Die derzeit existierenden Klassifizierungskonzepte sind kompliziert, nicht eindeutig und verwirrend.

1.4.1 Spezifitätsbasiertes Klassifizierungskonzept

Zu Beginn der Forschungen zu tierischen LOXn wurden diese Enzyme entsprechend ihrer Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure in 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX eingeteilt. Dieses Konzept war einfach und verständlich, wurde aber mit der ansteigenden Vielfalt charakterisierter LOXn unpraktikabel. Außerdem berücksichtigt das Konzept die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse der Enzyme nicht. Dies führte in der jüngeren Vergangenheit zunehmend zu Missverständnissen und Fehlinterpretationen experimenteller Ergebnisse bei der Verwendung von isoformspezifischen LOX-Hemmstoffen (Horn et al., 2015, Kuhn et al., 2015). An dieser Stelle seien nur 3 Probleme kurz skizziert, die sich aus der alleinigen Verwendung des spezifitätsbasierten Klassifizierungskonzeptes ergeben: i) Die humane ALOX15 setzt Arachidonsäure vor allem zu 15(S)-H(p)ETE (Sloane et al., 1991) um und wird damit als 15-LOX klassifiziert. Das orthologe Enzym der Maus bildet jedoch vorwiegend 12-H(p)ETE und ist damit eine 12-LOX (Sun and Funk, 1996). Es ist eine wesentliche Nomenklaturschwäche, dass orthologe Enzyme verschiedener Spezies, die aufgrund ihres orthologen Charakters ähnliche biologische Funktionen ausüben sollten, in verschiedene Enzymklassen eingeteilt werden. Ähnliche Probleme ergeben sich bei der Klassifizierung der humanen und murinen ALOX15B (Jisaka et al., 2000). Hier produziert die humane ALOX15B 15-

H(p)ETE, während 8-H(p)ETE Hauptprodukt der murinen Alox15b ist. ii) Für einige pflanzliche LOXn ist Arachidonsäure ein schlechtes Substrat und das Muster der entsprechenden Oxygenierungsprodukte ist sehr komplex. Auf diese Enzyme lässt sich die Arachidonsäure-basierte Nomenklatur nicht sinnvoll anwenden und deshalb werden Linolsäure-basierte Klassifizierungskonzepte für pflanzliche LOXn bevorzugt (Feussner and Wasternack, 2002, Andreou and Feussner, 2009). iii) Die Reaktionsspezifität von LOXn ist außerdem keine absolute Enzymeigenschaft, sondern hängt von der Substratstruktur (Kühn et al., 1990) und den Reaktionsbedingungen (Gardner, 1989, Walther et al., 2009) ab.

1.4.2 Sequenzbasiertes Klassifizierungskonzept

Um einige dieser Probleme zu vermeiden, wurden in der jüngsten Vergangenheit alternative Klassifizierungskonzepte entwickelt, die auf dem Vergleich der Genstrukturen basieren. Das Mausgenom enthält sieben (Alox15, Alox15b, Alox12, Alox12b, Alox5, Alox3, Alox12) unterschiedliche LOX-Gene, die für unterschiedliche Isoenzyme kodieren. Eine vergleichbare Genstruktur findet man auch bei anderen Nagetieren (Ratten) und bei höheren Primaten (Horn et al., 2015). Das menschliche Genom enthält sechs (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOX5, ALOXE3) unterschiedliche LOX-Gene. Hier liegt das ALOXE12 Gen als funktionsloses Pseudogen vor (Funk et al., 2002). Um Säugetier-LOXn eindeutiger zuordnen zu können und vor allem den orthologen Charakter verschiedener Gene bei unterschiedlichen Tierspezies aufzuzeigen, sollten heute die Genbezeichnungen für die Benennung der entsprechenden Enzyme verwendet werden. Bisher hat sich zur eindeutigen Kennzeichnung der Spezieszugehörigkeit etabliert, dass humane Orthologe groß- und murine Orthologe kleingeschrieben werden. Da dieses Vorgehen allerdings auf zwei Spezies beschränkt ist, kann durch einen zusätzlichen Dreibuchstabencode, welcher der Genbezeichnung voran gestellt wird, die entsprechende Tierspezies gekennzeichnet werden. Um Enzyme von den entsprechenden Genen abzugrenzen, könnten die Enzymnamen kursiv geschrieben werden. So wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Enzym, das durch die Expression des menschlichen ALOX15-Gens synthetisiert wird, als *humALOX15* bezeichnet. Entsprechend wird die LOX, die aus dem Maus-Alox12 Gen hervorgeht als *mouAlox12* bezeichnet. Obwohl auch diese Nomenklatur nicht frei von Problemen ist (so ist es z.B. nicht möglich eine LOX zu klassifizieren, die in ihrer

Genstruktur nicht eindeutig einem humanen LOX-Gen zugeordnet werden kann), ermöglicht sie zumindest bei Säugetier-LOXn meist eine eindeutige Zuordnung.

1.5 Evolution von Lipoxygenasen

1.5.1 Einteilung irdischer Lebewesen

Das Leben auf unserem Planeten begann vor geschätzten 3,5-4 Milliarden Jahren und hat seitdem eine große Artenvielfalt hervorgebracht. Seit mehr als 2000 Jahren versucht man diese Vielfalt entsprechend unterschiedlicher Konzepte zu systematisieren, wobei alle Systeme auf subjektiv ausgewählten Kriterien beruhen, die nach Auffassung der Autoren wichtiger sind als andere. Ein heute häufig angewandtes Klassifizierungsmodell ist das Dreidomänenmodell des irdischen Lebens (**Abb. 4**). Es basiert auf dem strukturellen Vergleich der Gene, die für die verschiedenen Arten ribosomaler RNA kodieren (Woese et al., 1990). Es gibt durchaus laufende Debatten bezüglich der biologischen Sinnhaftigkeit dieses Klassifizierungskonzeptes (Gupta, 1998) und alternative Vorschläge zur Kategorisierung der irdischen Lebensformen wurden ebenfalls entwickelt (Cavalier-Smith, 1998). Trotzdem wird das Dreidomänenkonzept häufig verwendet und erfreut sich einer breiten Akzeptanz.

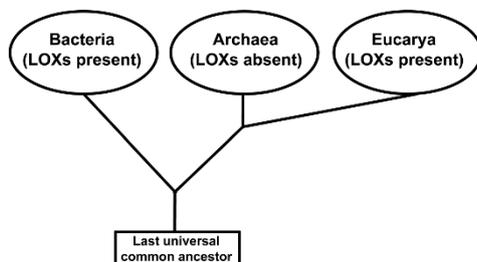


Abb. 4: Dreidomänenmodell des irdischen Lebens und Vorkommen von LOXn in den Domänen. LOXn kommen in 2 der 3 Domänen des irdischen Lebens vor. LUCA (last universal common ancestor) bezeichnet eine hypothetische Urform des irdischen Lebens, aus der alle heute existierenden Lebensformen hervorgegangen sind [modifiziert nach (Horn et al., 2015)].

Nach dem derzeitigen Wissensstand kommen Lipoxygenasen in zwei der drei Domänen des irdischen Lebens, nämlich in Eukaryonten und Bakterien, vor.

1.5.2 Lipoxygenasen in Bakterien

Bakterien lassen sich in die fünf Subgruppen (Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, CFB-Gruppe) unterteilen (Wu et al., 2009). Lange Zeit wurde vermutet, dass LOXn in Bakterien nicht vorkommen. Erst zu Beginn des jetzigen Jahrtausends wurden vereinzelt LOXn in verschiedenen Bakterienstämmen

nachgewiesen. So konnte eine LOX im γ -Proteobacterium *Pseudomonas aeruginosa* (Busquets et al., 2011) oder im Cyanobacterium *Nostoc punctiforme* (Koeduka et al., 2007) charakterisiert werden. Die biologischen Funktionen bakterieller LOXn sind allerdings heute noch völlig unklar. Zwar wurde eine Beziehung der LOX zum Infektionsmechanismus von *P. aeruginosa* vermutet (Garreta et al., 2013), Beweise dafür gibt es allerdings noch nicht. Für Cyanobakterien ist eine Rolle der LOXn bei der Modifizierung von Weizenproteinen im Rahmen der Pflanzeninfektion postuliert worden (Zhang et al., 2012) und jüngere experimentelle Befunde unterstützen diese Hypothese (Wang et al., 2014b, Wang et al., 2014c). Für Stickstoff-metabolisierende Bakterien wurde eine Beziehung zum Stickstoffstoffwechsel vermutet (Koeduka et al., 2007), aber hier ist die Beweislage eher dürftig. In den letzten Jahren war es aufgrund der steigenden Anzahl komplett sequenzierter Bakteriengenome möglich, auch in anderen Bakterien Sequenzen nachzuweisen, die eine Ähnlichkeit mit LOXn (*LOX-like sequences*) aufweisen. Eine systematische Recherche nach möglichen Lipoxygenase-Sequenzen in Bakterien-Genomen ist bisher allerdings noch nicht erfolgt und wird in dieser Arbeit durchgeführt.

1.5.3 Mögliches Vorkommen von Lipoxygenasen in Archaeen

Archaeen bilden mit Bakterien die Superdomäne der Prokaryonten und ähneln Bakterien hinsichtlich ihres prinzipiellen Aufbaus. Auf molekularem Niveau sind sie jedoch näher mit Eukaryonten verwandt (Woese et al., 1990). Man findet sie häufig in extremen Lebensräumen (hohe Temperaturen, saurer pH, hohe Salzkonzentrationen), allerdings kommen Archaeen auch unter weniger extremen Bedingungen, z.B. am Meeresboden, im menschlichen Kolon und am menschlichen Zahnfleisch vor (DeLong, 1998, Nguyen-Hieu et al., 2013). Kürzlich wurden in den Genomen dreier Archaeenspezies (*Methanococcus voltae*, *Methanococcus jannaschii* und *Halorubrum kocurii*) genomische Sequenzen nachgewiesen, die für echte LOXn kodieren könnten (Horn et al., 2015). Aufgrund mangelnder funktioneller Daten bleibt derzeit aber noch unklar, ob es sich dabei wirklich um LOX-kodierende Sequenzen handelt. Das Fehlen der für viele LOXn charakteristischen Eisenbindungscluster spricht eher gegen eine LOX-Identität (Horn et al., 2015).

1.5.4 Lipoxygenasen in Eukaryonten

Zu den Eukaryonten gehören alle ein- bzw. mehrzelligen Organismen, die einen Zellkern besitzen. Dazu zählen auf der einen Seite Algen, Pilze und höhere Pflanzen, auf der anderen Seite alle tierischen Organismen wie Protozoen, Metazoen, Wirbellose und Wirbeltiere. Letztere umfassen auch alle Säugetiere inklusive der Primaten und des Menschen.

1.5.4.1 Vorkommen von Lipoxygenasen in pflanzlichen Organismen

Algen bilden eine Gruppe primitiver pflanzenähnlicher Organismen, die aufgrund ihrer Diversität nicht immer eindeutig von anderen pflanzlichen Lebensformen abgegrenzt werden können. Es gibt einzellige und mehrzellige Algen, die sich sexuell und/oder asexuell vermehren können. Die meisten Algenarten haben einen autotrophen Metabolismus, es gibt jedoch auch heterotrophe Algen. Algen haben einen aktiven PUFA-Stoffwechsel und sind zur Synthese von Oxylipinen fähig (Gerwick, 1994, Gerwick et al., 1999). Daran sind neben LOXn auch andere Enzyme wie Diolsynthasen, Peroxygenasen und CYP450-Hydroxylasen beteiligt (Garscha et al., 2007, Hörnsten et al., 1999).

Auch viele Pilzarten können Oxylipine synthetisieren (Van Dyk et al., 1994) und funktionelle LOXn sind in einigen Pilzarten wie z.B. *Saprolegnia parasitica* (Hamberg, 1986), *Thermomyces lanuginosus* (Li et al., 2001), *Pleurotus ostreatus*, *Terfezia claveryi* (Pérez-Gilabert et al., 2005), *Aspergillus flavus* (Horowitz Brown et al., 2008) und *Fusarium oxysporum* (Brodhun et al., 2013) nachgewiesen worden. Eine der gut charakterisierten fungalen LOXn ist die Mn-enhaltende LOX aus *Gaeumannomyces graminis* (Hamberg et al., 1998, Su and Oliw, 1998), die sich im Reaktionsmechanismus von anderen LOXn unterscheidet. Trotzdem kommen LOXn nicht ubiquitär in Pilzen vor. So sind z.B. in den Genomen von *Saccharomyces cerevisiae* (eukaryontischer Modellorganismus) und von *Candida albicans* (humanpathogener Pilz) keine LOX-Sequenzen enthalten. Auch bei Pilzen ist die biologische Rolle von Oxylipinen und der an deren Synthese beteiligten Enzyme noch nicht wirklich verstanden. Diskutiert wird eine Beteiligung an der Sporulation, der Biosynthese von Myco- und Aflatoxinen und der Sklerotienbildung (Scarpari et al., 2014).

Das Genom des Moosmodellorganismus *Physcomitrella patens* enthält LOX-ähnliche Sequenzen und das zugehörige Enzym wurde hinsichtlich seiner enzymatischen

Eigenschaften charakterisiert (Wichard et al., 2004, Senger et al., 2005). Diese Daten belegen, dass auch in Moosen echte LOXn vorkommen.

In höheren Pflanzen sind LOXn weit verbreitet und metabolisieren bevorzugt C₁₈-Fettsäuren wie LS, alpha-LeS und gamma-LeS. Ihre biologischen Funktionen sind sehr vielfältig und reichen von der Regulation der Germination (Feussner et al., 2001), über die Geschlechtsdeterminierung (Acosta et al., 2009), die Stressantwort (Grebner et al., 2013), Wachstums- und Abwehrmechanismen (Vellosillo et al., 2007), Seneszenz (Prakash et al., 1990), den Reifungsprozess (Zhang et al., 2006), bis hin zur Bildung von Aromastoffen (Shen et al., 2014). Im Gegensatz zu den meisten Tieren haben höhere Pflanzen häufig eine größere Anzahl unterschiedlicher LOX-Isoformen, die meist durch Genduplikationen und Transpositionen (Kong et al., 2007) entstanden sind. LOXn höherer Pflanzen können hinsichtlich ihrer Positionsspezifität in Bezug auf LS in 9- und 13-oxygenierende Isoformen unterteilt werden. LS 13-LOXn werden auf der Grundlage ihrer Sequenzeigenschaften in zwei Subtypen unterteilt: Typ I-13-LOXn enthalten kein Transitpeptid für Chloroplasten und weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf. Typ II 13-LOXn enthalten ein solches Transpeptid, weisen aber untereinander nur einen geringen Grad an Sequenzhomologie auf (Feussner and Wasternack, 2002). Ein Sequenzvergleich einer großen Anzahl pflanzlicher LOXn deutet darauf hin, dass die LOXn niederer Pflanzen evolutionär eine eigene Gruppierung darstellen (Horn et al., 2015).

1.5.4.2 Vorkommen von Lipoxygenasen in Protozoen und niederen Metazoen

Protozoen sind einzellige tierische Lebewesen, die entsprechend der Art ihrer Fortbewegung in vier Gruppen (Ciliata, Flagellata, Sporozoa, Rhizopodia) unterteilt werden können. LOX-Sequenzen konnten bisher nur in zwei *Ciliata*-Spezies nachgewiesen werden (Horn et al., 2015), was darauf hindeutet, dass LOXn in Protozoen nicht weit verbreitet vorkommen.

Als Metazoen werden alle vielzelligen Tiere zusammengefasst. Heute sind ca. 1,2 Millionen Metazoenarten bekannt, ihre Gesamtzahl wird aber auf 10 bis 20 Millionen geschätzt. Gliederfüßer (*Arthropoda*), Weichtiere (*Mollusken*) und Wirbeltiere (*Vertebrata*) tragen zu 80%, 10% bzw. 5% zu den Metazoen bei. In verschiedenen niederen Metazoen sind in der Vergangenheit funktionelle LOXn beschrieben worden. So wurden in Oozyten von Seesternen (Brash et al., 1991), Eiern von Seeigeln (Hawkins

and Brash, 1987), einigen Muschel- (Coffa and Hill, 2000) und Korallenarten (Eek et al., 2012, Koljak et al., 1997) LOXn entdeckt. Weiterhin sind LOX-Sequenzen bei Krebstieren (Hampson et al., 1992) und anderen Wirbellosen (Yuan et al., 2014) nachgewiesen worden. Die Genome der Modellorganismen *Drosophila melanogaster* (Modellorganismus für Athropoden) und *Caenorhabditis elegans* (Modellorganismus für Nematoden) hingegen enthalten keine LOX-Sequenzen (Horn et al., 2015).

1.5.4.3 Vorkommen von Lipoxygenasen in Chordaten

Chordaten zählen zu den höheren Metazoen. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein der namensgebenden *Chorda dorsalis*, einem elastischen Strang aus speziell differenzierten mesodermalen Zellen, der als Endoskelett wirkt, aus und schließen *Tunicata* (Manteltiere), *Cephalochordata* (Schädellose) und *Vertebrata* (Wirbeltiere) ein. Das Lanzettfischchen (*Branchiostoma*) ist der einzige überlebende Stamm der *Cephalochordata* (Putnam et al., 2008) und gilt heute als lebendes Fossil. Im Genom von *Branchiostoma belcheri* und *Branchiostoma floridae* wurden je zwei LOX-ähnliche Sequenzen gefunden. Im Genom von *Ciona intestinalis* (Modellorganismus von *Tunicata*) wurden sieben LOX-ähnliche Sequenzen gefunden (Horn et al., 2015, Yuan et al., 2014).

Zu den *Vertebrata* zählen Knorpel- und Knochenfische, Vögel, Reptilien, Amphibien und Säugtiere. In den Genomen der meisten Modellorganismen, die als Repräsentanten für diese Tiergruppen charakterisiert wurden, lassen sich LOX-ähnliche Sequenzen nachweisen. Im Genom des Neunauges (Modellorganismus für *Cyclostomata*) wurde eine LOX-ähnliche Sequenz identifiziert, die eine hohe Sequenzhomologie zur humanen ALOX5 aufweist (Horn et al., 2015). Im Genom der Seekatze (*Callorhinchus milii*), die als Modellorganismus für Knorpelfische betrachtet wird, können ebenfalls einige ALOX5-ähnliche Sequenzen gefunden werden (XM_007904532.1, XM_007911833.1). Knochenfische lassen sich in Strahlenflosser (*Actinopterygii*) und Fleischflosser (*Sarcopterygii*) einteilen. Zu den Strahlenflossern gehört der Zebrafisch (*Danio rerio*), welcher aufgrund der Lichttransparenz seiner Embryos als Modellorganismus für die Embryonalentwicklung von Wirbeltieren genutzt wird. Das komplette Zebrafisch-Genom ist seit mehr als einem Jahr bekannt (Howe et al., 2013) und Datenbankrecherchen deuten auf die Existenz von mindestens neun verschiedenen LOX-Genen hin. Bisher wurde jedoch nur eine der Zebrafisch-LOXn

(zbfLOX1) näher charakterisiert. Für die auf Chromosom 7 befindliche zbfLOX1 konnte auf der Basis ihrer Sequenz keine eindeutige Zuordnung zu einer humanen Isoform getroffen werden (Jansen et al., 2011). Die gezielte Inaktivierung der Expression des entsprechenden Gens induziert bei Zebrafischembryonen eine Deformation von Gehirn, Auge und Schwanzflosse und daraus schlossen die Autoren, dass es sich bei diesem Enzym um das Ortholog der humALOX12B oder der ALOXE3 handeln könne (Haas et al., 2011). Das Enzym wurde als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert und hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften charakterisiert (Jansen et al., 2011), wobei sich einige Besonderheiten hinsichtlich seiner Reaktionsspezifität ergaben.

Der den Fleischflossern zugehörige Quastenflosser (*Latimeria chalumnae*), der sich in seiner Urform in der geochronologischen Periode des Devons entwickelte, stellt eines der ersten Lebewesen dar, das mit seinen vier durch Knochen gestützten Flossen Anpassungsversuche an ein Leben auf festem Grund aufweist. Er wird als interessanter Modellorganismus für die Landbesiedlung der Fische als evolutionäres Schlüsselereignis angesehen und bildet gemeinsam mit den uns näher verwandten und letztlich erfolgreicher angepassten Lungenfischen die Ausgangsgruppe der Landwirbeltiere. Mit dem Vorhandensein einer ALOX5-ähnlichen Sequenz scheint er zur Biosynthese von Leukotrienen in der Lage zu sein. Die Vermutung der Existenz eines funktionsfähigen LOX-Stoffwechsels wird durch die Identifizierung von LOX-Metaboliten in Makrophagen und Blutplättchen von Knochenfischen bestätigt (Pettitt et al., 1991).

Amphibien sind unmittelbare Nachfahren der Lungenfische und repräsentieren damit die stammesgeschichtlich ältesten Tetrapoden. Der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* wird als Modellorganismus für Amphibien angesehen und sein Genom enthält eine ALOX5-ähnliche Sequenz (XM_004915925.1) sowie Gene für LT-Rezeptoren (XM_004910745.1, XM_002934324.2, XM_004916899.1). Außerdem weisen metabolische Daten, die mit Zellen anderer Froscharten erhalten wurden, darauf hin, dass Amphibien einen aktiven LOX-Stoffwechsel aufweisen (Shen and Herman, 2000). Über die funktionelle Bedeutung des LOX-Weges in Amphibien liegen nur wenige Daten vor, wobei eine Rolle bei Geweberegeneration und Wundheilung (Menger et al., 2011), sowie bei der Oozytenreifung (Ortiz et al., 2013) postuliert wurde. Zu den Reptilien gehören auch Schildkröten, Schlangen und Krokodile. Letztere enthalten drei LOX-ähnliche Sequenzen, die für Orthologe der humanen ALOX5 und epidermalen LOXn kodieren könnten (XM_006263694.1, XM_006272396.1, XM_006038032.1).

Auch bei Vögeln wurden LOX-ähnliche Sequenzen gefunden und Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass es sich dabei um Orthologe der ALOX5 (XM_003641512.2) und der epidermalen humanen LOX-Isoformen (XM_423676.4) handelt. Diese Daten wurden durch Metabolituntersuchungen an Thrombozyten und Gefäßzellen (Einzig et al., 1985) sowie an neuronalem Gewebe (Greenberg-Levy et al., 1992) und Muskelzellen (Grossman et al., 1988) bestätigt. Obwohl auch in diesen Organismen die biologische Rolle von LOXn nur wenig untersucht ist, wurde eine Rolle beim Knochenstoffwechsel postuliert (Flynn et al., 1999).

Säugetiere gibt es seit ca. 270 Millionen Jahren auf der Erde. Sie können in die drei Subgruppen der Kloakentiere (*Monotremata*), Beuteltiere (*Marsupiala*) und die Plazentatiere (*Eutheria*) untergliedert werden. Das Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*) dient als Modellorganismus für Kloakentiere und der Tasmanische Teufel (*Sarcophilus harrisii*) repräsentiert die Beuteltiere. Die Genome beider Spezies enthalten LOX-ähnliche Sequenzen (XM_003430106.1, XM_003768728.1, XM_003768727.1), die sich aufgrund ihrer Sequenzhomologie verschiedenen menschlichen Isoformen zuordnen lassen. Mangels fehlender Aktivitätsnachweise bleibt jedoch unklar, ob aus den vorhandenen Genen wirklich funktionsfähige LOXn hervorgehen (Horn et al., 2015). Zu den Plazentatieren gehören u.a. Nager, Primaten und letztlich auch der Mensch. Im Genom der Maus (*Mus musculus*) existieren sieben LOX-Gene: Alox5, Alox3, Alox12, Alox12B, Alox12, Alox15 und Alox15B (Waterston et al., 2002). Trotz einer hohen Sequenzhomologie zu den Isoformen des Menschen (*Homo sapiens*) unterscheiden sich die enzymatischen Eigenschaften teilweise von denen der menschlichen Enzyme (siehe 1.4.1). Das Vorhandensein einer funktionellen murinen *Alox5* (Balcarek et al., 1988) sowie der Leukotrien-Rezeptoren BLT1/2 und cysLTR1/2 (Martin et al., 2001, Hui et al., 2001) deuten darauf hin, dass LT in Mäusen ähnlich wie beim Menschen eine physiologische bzw. pathophysiologische Rolle spielen.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, warum bei höheren Pflanzen und Tieren eine so große Vielfalt unterschiedlicher LOX-Isoformen vorkommt, warum sich diese Vielfalt entwickelt hat und weshalb sie in der Evolution bewahrt wurde. Diese Strukturvielfalt der LOX-Genfamilie sollte jedoch nicht ausschließlich als Zeichen funktioneller Redundanz gewertet werden. So führt z.B. die vollständige Inaktivierung eines LOX-Gens bei der Maus nur selten zur Hochregulation der Expression einer anderen LOX, wie es bei echter funktioneller Redundanz zu erwarten wäre. Weiterhin besitzen die menschlichen LOX-Isoformen so deutlich unterschiedliche enzymatische

Eigenschaften, dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass sie sich funktionell ersetzen können. So ist die *ALOX5* für die Biosynthese proinflammatorischer LT der 5,6-Serie essenziell und diese Funktion kann nicht von anderen Isoformen übernommen werden. Weiterhin führt der Knockout des *Alox5*-Gens zu einem völlig anderen Phänotyp (Chen et al., 1994) als die Inaktivierung des *Alox12*- (Johnson et al., 1999, Bleich et al., 1999), *Alox12b*- (Epp et al., 2007) oder *Aloxe3*-Gens (Krieg et al., 2013).

1.5.4.3.1 Entwicklung der *ALOX15* während der Säugetierevolution

Die *ALOX15* des Menschen, als am höchsten entwickelter Säuger, zeigt eine duale Positionsspezifität (Kühn et al., 1993). Ähnliches gilt für die *ALOX15* des Orang-Utans (*Pongo pygmaeus*) (Vogel et al., 2010). Niedere Säugetiere hingegen wie Maus (Sun and Funk, 1996), Ratte (Watanabe and Haeggström, 1993, Watanabe et al., 1993), Rind (De Marzo et al., 1992), Schwein (Yoshimoto et al., 1990), Fledermaus (Brash, 1999), aber auch niedere Primaten wie Rhesusaffen (*M. mulatta*) exprimieren 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe (Vogel et al., 2010). Die Kaninchen-*ALOX15* ist entsprechend ihrer Sequenz als 15-lipoxygenierendes Enzym einzustufen und Metabolituntersuchungen am isolierten Enzym aus Retikulozyten bestätigen diese Schlussfolgerung (Bryant et al., 1982). In peripheren Monozyten wird dieses Enzym jedoch als 12-lipoxygenierendes Protein exprimiert (Berger et al., 1998), wobei die molekulare Basis für die unterschiedliche Reaktionsspezifität noch unklar ist. Die Beobachtung, dass niedere Säugetiere und Makaken 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe exprimieren, während höhere Primaten 15-lipoxygenierende Orthologe besitzen, lässt vermuten, dass es während der späten Primatenevolution zu einer gezielten Veränderung der Reaktionsspezifität der *ALOX15* gekommen ist (**Abb. 5**). Für eine Verifikation dieser Hypothese fehlen allerdings für eine Reihe von *ALOX15*-Orthologe verschiedener Spezies experimentelle Daten zur Positionsspezifität der rekombinanten Enzyme. Die Betrachtung der phylogenetischen Verhältnisse von Primaten unter der Berücksichtigung der bisher bekannten *ALOX15*-Positionsspezifitäten lässt vermuten, dass der Übergang der *Cercopithecoidea* (z.B. *M. mulatta*) zu den *Hominoidea* einen wichtigen Entwicklungsschritt darstellt. Der Erforschung der *ALOX15* des Gibbons (*N. leucogenys*) als nächsthöhere Spezies nach den Makaken (*M. mulatta*) mit 12-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Für die Schimpansen-*ALOX15* wäre rein evolutionär betrachtet ein 15-

lipoxygenierendes *ALOX15*-Ortholog plausibel. Sollte die *ALOX15* des Schimpansen ein jedoch 12-lipoxygenierendes Enzym sein, wäre die postulierte Beziehung von LOX-Spezifität und phylogenetischer Stellung der Primatenspezies (Johannesson et al., 2010) nicht mehr zu halten.

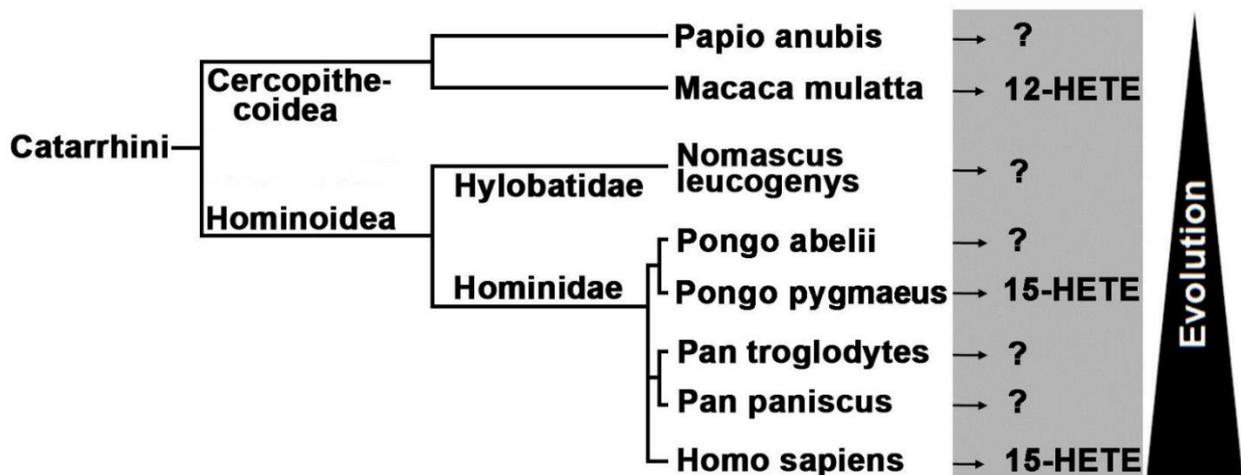


Abb. 5: Phylogenetische Systematik der Primaten und bisher bekannte *ALOX15*-Reaktionsspezifitäten. Die Verwandtschaftsverhältnisse der Primaten mit ihren *ALOX15*-Produktspezifitäten sind dargestellt, soweit funktionelle Daten zur Reaktionsspezifität der entsprechenden Enzyme vorliegen. Die lateinischen Namen der Spezies sind im Folgenden erläutert. *Catarrhini*: Altweltaffen oder Schmalnasenaffen; *Cercopithecoidea*: Meerkatzenverwandte; *Hominoidea*: Menschenartige; *Hylobatidae*: Gibbons; *Hominidae*: Menschenaffen; *Papio anubis*: Pavian; *Macaca mulatta*: Makake/Rhesusaffe; *Nomascus leucogenys*: Nördlicher Weißwangen-Schopfgibbon „Gibbon“; *Pongo abelii* und *Pongo pygmaeus*: Orang-Utans; *Pan troglodytes* und *Pan paniscus*: Schimpansen; *Homo sapiens*: Mensch. Die Fragezeichen visualisieren fehlende Daten zur Reaktionsspezifität der *ALOX15*-Orthologe.

1.5.4.3.2 Vorkommen von Lipoxygenasen in Hominiden und Menschen

Wie Charles Darwin bereits 1871 in seinem Werk „The Descent of Man“ (Loy, 1997) vermutete, hat der heute lebende moderne Mensch, *Homo sapiens*, seine Ursprünge im tropischen Afrika. Von dort migrierten die ersten modernen Menschen vor 40.000-60.000 Jahren nach Eurasien und ersetzten mit der Zeit ihre dort lebenden Vorfahren (Hershkovitz et al., 2015). Als nächste evolutionäre Verwandte des Menschen sind unter den Hominiden der „Neandertaler“ (*Homo neanderthalensis*) und der „Denisovan-Mensch“ (*Denisova hominin* oder *Homo denisovan*) bekannt. Unterschiedliche Fossilienfunde des Neandertalers belegen, dass er bereits vor 400.000 Jahren Westasien besiedelte. Seit 30.000 Jahren gilt der *H. neanderthalensis* als ausgestorben (Krause et al., 2007). Aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten und durch Genomvergleiche der beiden menschlichen Subspezies (*H. sapiens* vs. *H. neanderthalensis*) wurde eine mögliche Kreuzung vermutet und seitdem kontrovers

diskutiert (Gibbons, 2014a, Gibbons, 2014b, Lohse and Frantz, 2014). Der Kreuzungszeitpunkt wird auf einen Zeitraum vor 50.000-60.000 Jahren geschätzt und ein 55.000 Jahre alter Fossilienfund von *H.sapiens* in Israel belegt, dass moderne Menschen zu dieser Zeit neben Neandertalern am gleichen Ort gelebt haben müssen (Hershkovitz et al., 2015). Erste Fossilien des *H. denisovans* wurden 2010 in einer Höhle in Südsibirien gefunden und das extrahierte Genom eines *H. denisovan*-Individuums wurde in hoher Qualität sequenziert (Reich et al., 2010). Auch für den Denisovan-Menschen wird eine mögliche Kreuzung mit einer anderen Hominidenart, die jedoch nicht *H. sapiens* oder *H. neanderthalensis* ist, postuliert. Die Genome des Neandertalers und des Denisovan-Menschen wurden in dieser Arbeit auf das Vorkommen von LOX-Sequenzen durchsucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 dargestellt.

Das menschliche Genom enthält fünf funktionelle LOX-Gene auf dem kurzen (p) Arm des Chromosom 17 (ALOX12, ALOX12B, ALOX15, ALOX15B und ALOXE3) sowie ein ALOX5-Gen auf dem langen Arm (q) von Chromosom 10 (Funk, 2001). Weiterhin existiert im LOX-Gencluster auf dem Chromosom 17 das funktionslose ALOX12P2-Pseudogen. Deren biologischen Funktionen sind im Folgenden dargestellt.

1.6 Biologische Rolle von Lipoxygenasen

LOXn haben in verschiedenen biologischen Systemen unterschiedliche biologische Funktionen und auf die mögliche biologische Rolle der Enzyme in Pflanzen und niederen tierischen Organismen wurde im Kapitel 1.5 bereits eingegangen. An dieser Stelle sollen die derzeitigen Kenntnisse zur biologischen Rolle von LOXn bei höheren Säugetieren und beim Menschen zusammengefasst werden. Diese Ergebnisse basieren vor allem auf Experimenten mit Isoform-spezifischen LOX-Inhibitoren und derzeit verfügbaren LOX-Knockout-Mäusen. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass die Isoformspezifität der meisten LOX-Inhibitoren noch nicht wirklich geklärt ist, und dass Ergebnisse von Experimenten mit LOX-Knockout-Mäusen aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften von murinen und humanen LOX-Orthologen nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar sind.

1.6.1 Physiologische Funktionen von Lipoxygenasen

1.6.1.1 Zelldifferenzierung und Organogenese

LOXn spielen bei der Differenzierung verschiedener Zellen (erythroide und epidermale Differenzierung) (Schewe and Kühn, 1991, Eckl et al., 2009) eine wichtige Rolle. So scheint die *ALOX15* während der Differenzierung von Kaninchenretikulozyten am reifungsabhängigen Abbau der Mitochondrien beteiligt zu sein (Schewe et al., 1986). *Alox15*-Knockout-Mäuse zeigen allerdings keine Zeichen einer dysregulierten Erythropoiese (Sun and Funk, 1996), sodass dieser Reifungsvorgang auch in Abwesenheit des Enzyms ohne signifikante Ausfallerscheinungen abläuft. Dazu sollte die Tatsache beitragen, dass es neben dem LOX-abhängigen zytosolischen Mitochondrienabbau noch andere Mechanismen (z.B. Extrusion) gibt, die zur Eliminierung der Mitochondrien während der Retikulozyten-Erythrozyten-Transition beitragen. Biologisch wichtige Prozesse, wie es der Mitochondrienabbau während der Retikulozytenreifung einer ist, werden evolutionär sehr häufig mehrfach abgesichert, sodass der Ausfall eines Mechanismus nicht gleich zum Tod des gesamten Organismus führt (Schewe et al., 1986).

Bei der Entwicklung des Skelettsystems korreliert die Aktivität der *ALOX15* in Tierversuchen invers mit der Knochendichte. Eine Hemmung des Enzyms auf enzymatischer und genetischer Ebene führt zu einer gestörten Osteoklastenreifung, die durch eine Substitution mit den *Alox15*-Metaboliten 12- und 15-HETE behoben werden kann (Krönke et al., 2009b). Obwohl die *in vivo*-Wirkung der verwendeten LOX-Hemmstoffe nicht genau quantifiziert werden konnte, deuten die Ergebnisse auf eine Rolle des Enzyms bei der Osteogenese hin. Beim Menschen konnten Polymorphismen im *ALOX12*-Gen mit der postmenopausalen Osteoporose assoziiert werden (Urano et al., 2005, Ichikawa et al., 2006). Demnach könnten Inhibitoren der *ALOX12* Einzug in die Behandlung der Osteoporose und Osteopenie-assoziiierter Erkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis (RA), finden.

Die funktionelle Inaktivierung der Gene *Alox12b* und *Aloxe3* führen bei der Maus zu einer gestörten epidermalen Differenzierung (Krieg et al., 2013, Epp et al., 2007). Neugeborene von *Alox12b*-defizienten Mäusen sterben innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt an exzessiver Dehydratation. Dies liegt vor allem an einer ungenügenden kovalenten Verknüpfung der epidermalen Ceramide, welche der Haut ihre barrierebildende Eigenschaft verleiht (Brash et al., 2007). Bei Menschen führen

Mutationen der ALOX12B und ALOXE3-Gene zu einer Hauterkrankung, die als ARCI (autosomale rezessive kongenitale Ichthyose) bezeichnet wird (Eckl et al., 2009). Traditionell wurde diese Gruppe in die lamellenäre Ichthyosen (LI) und die (nichtbullöse) kongenitale ichtyosiforme Erythrodermie (CIE) eingeteilt, für die die ALOX12B und ALOXE3 ursächlich sind. Allerdings werden heute unter ARCI noch andere ichtyosiforme Hauterkrankungen eingeschlossen, mit denen insgesamt Mutationen in sechs verschiedenen Genen (TGM1, ALOXE3, ALOX12B, NIPAL4, CYP4F22, und ABCA12) assoziiert werden (Rodríguez-Pazos et al., 2013). Der Knockout des Alox12-Gens führt ebenfalls zu einem hohen epidermalen Wasserverlust, wobei die Symptome weniger gravierend sind (Johnson et al., 1999).

Es gibt auch Hinweise auf eine Beteiligung von LOXn in der Adipozytenreifung. Adipozyten, als der wesentliche Zelltyp des Fettgewebes, entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen in einem komplexen hormongesteuerten Prozess, der die sequentielle Aktivierung verschiedenster Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren einschließt. Ein wesentlicher Transkriptionsfaktor der Adipogenese ist der Peroxysomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR γ), der für die Regulation und Expression einer Reihe von Enzyme des anabolen und katabolen Lipidstoffwechsels verantwortlich ist (Janani and Ranjitha Kumari, 2015). Dem LOX-Pathway wird eine Bedeutung für die Synthese PPAR γ -aktivierender Liganden zugeschrieben. Hinweise darauf ergaben sich aus Experimenten mit den LOX-Inhibitoren Baicalein und Nordihydroguajaretsäure (NDGA), welche *in vitro* die Differenzierung muriner 3T3-L1-Präadipozyten zu insulinempfindlichen reifen Adipozyten hemmen. Eine Zugabe des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon zu diesen Zellen führte zu einer erfolgreichen Induktion der Adipozytenreifung, was eine essenzielle Rolle von PPAR γ in diesem Prozess impliziert (Madsen et al., 2003). Dieser nukleäre Transkriptionsfaktor wird scheinbar durch Produkte des Alox12-, Alox15- und Alox3-Stoffwechsels aktiviert, was sich beschleunigend auf die Adipozytendifferenzierung auswirkt (Hallenborg et al., 2010). Diese Schlussfolgerung wird durch weitere *in vitro*-Untersuchungen gestützt, die einerseits die Akkumulation von Hepoxilinen in der frühen Phase der Adipozytenreifung und andererseits eine direkte Bindung an PPAR γ nachgewiesen haben (Hallenborg et al., 2010). Die Genexpressionsprofile von braunem und weißem Fettgewebe belegen die Expression der Alox12, der Alox15 und der Alox3, wobei die mRNA-Spiegel der Alox3 am höchsten sind. Weiterhin kann durch eine forcierte Alox3-Expression oder Zugabe von Alox3-Produkten (Hepoxilinen) zu Zellkulturen die Adipogenese stimuliert werden

(Hallenborg et al., 2010). Leider liegen derzeit noch keine detaillierten *in vivo*-Untersuchungen zur Adipogenese bei *Alox15*- und *Alox12*-defizienten Mäusen vor und auch die Rolle der *Aloxe3* konnte bisher aufgrund des letalen Phänotyps der *Alox3e^{-/-}*-Mäuse noch nicht detailliert *in vivo* untersucht werden.

Für Knock-out oder Knock-down-Experimente nicht-epidermaler LOXn im Mausmodell konnten bisher keine gravierenden Funktionsverluste bei erwachsenen Tieren nachgewiesen werden. Ein Knockdown der Expression des Zebrafisch-LOX1-Gens, das für eine 12-lipoxygenierende LOX-Isoform kodiert, führt zu Defekten in der Embryonalentwicklung. Der mittels Morpholino-Oligonukleotiden herbeigeführte *zbfLOX1*-Expressionsarrest führte in der frühen Embryonalentwicklung zu Entwicklungsstörungen, die sich vor allem im Bereich des Kopfs und der Schwanzregion manifestierten. Als Entwicklungsdefizite konnten im Myelzephalon und im Mesenzephalon weniger Neuronen-Zellschichten nachgewiesen werden. Dadurch ergab sich eine retardierte Entwicklung des Myelzephalons. Zudem konnten für *LOX1*-defiziente Zebrafische kleinere Augen und eine fast vollständige Aplasie der Retina aufgezeigt werden. Es kam außerdem zu einer Entwicklungsstörung der Basalplatte, einer gestörten Organisation der Somiten sowie zu Perikardergüssen und Dottersacködemen im Bereich der späteren Darm- und Nierenregion (Haas et al., 2011).

1.6.1.2 Zellproliferation und Apoptose

Lipoxygenasemetaboliten beeinflussen in einer Reihe von zellulären *in vitro*-Systemen die Proliferationsrate von Zellen, wobei sowohl pro- als auch antiproliferative Effekte beschrieben worden sind (Kuhn et al., 2015). Ob diese *in vitro*-Effekte von biologischer Relevanz in Ganztiermodellen sind, ist häufig jedoch nicht untersucht worden. Außerdem bleibt oft unklar, ob die für die Proliferationsregulation nötigen Konzentrationen der LOX-Metaboliten *in vivo* überhaupt erreicht werden. Als Beispiel für einen *in vitro* proliferationsfördernden LOX-Metaboliten kann 12-HETE genannt werden, der bei Mäusen durch die *Alox12*, *Alox12b* und die *Alox15* gebildet wird. Antiproliferative Eigenschaften wurden für Metabolite der *ALOX15B* beschrieben (Bhatia et al., 2003), obwohl auch hier der zugrunde liegende Mechanismus noch unklar ist.

Verschiedene antiinflammatorische LOX Metabolite wie Resolvine (Yoo et al., 2013), Lipoxine (Romano, 2010) und Protektine (Serhan and Petasis, 2011) sind in der Lage, in Zielzellen Apoptose zu induzieren. Ähnliche Daten liegen für den

Linolsäuremetaboliten 13(S)-HODE vor, der über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PPAR γ (Cimen et al., 2011) und PPAR δ (Shureiqi et al., 2003) zur Apoptoseinduktion fähig ist.

1.6.1.3 Hirnentwicklung und interneuronale Kommunikation

Die *ALOX15* (Watanabe et al., 1993, Nishiyama et al., 1992) und *ALOX12B* (Sun et al., 1998) werden im Gehirn verschiedener Säugetierspezies exprimiert und ihre Metaboliten 12/15-H(p)ETE und 12/15-H(p)ETE spielen bei der Gehirnentwicklung eine regulatorische Rolle. Sie fungieren als Mediatoren des Axonwachstums und modulieren die Wirkung des zentralen Botenstoffs Semaphorin 3A (Mikule et al., 2002).

Zusätzlich zu diesen Effekten beeinflussen *ALOX15*- und *ALOX12*-Metabolite die synaptische Transmission (Normandin et al., 1996, Piomelli et al., 1987) über eine durch die 12-H(p)ETE vermittelte Regulation der Leitfähigkeit von L-Typ Calciumkanälen (DeCostanzo et al., 2010). Weder *Alox15*- noch *Alox12*-Knockout-Mäuse zeigen jedoch neuronale Defizite und diese Daten deuten auf die Existenz bisher nicht bekannter Kompensationsmechanismen hin. Da beide Enzyme zur Bildung von 12-H(p)ETE in der Lage sind, könnte der Knockout eines Isoenzym durch die Hochregulation anderer 12-lipoxygenierender muriner LOX-Isoformen kompensiert werden. Da bei der Maus mit Ausnahme der *Alox5*, der *Alox3* und der *Alox15b* alle LOX-Isoformen 12-lipoxygenierend wirken, könnten theoretisch alle diese Isoformen einen *Alox12*- bzw. *Alox15*-Knockout kompensieren. Diese Hypothese wird durch den Nachweis von 12-H(p)ETE im Gehirn von *Alox15*-defizienten Mäusen unterstützt (Feinmark et al., 2003). Leider wurden die Gehirne von Mehrfach-LOX-Knockout-Mäusen noch nicht hinsichtlich ihrer Funktionalität und ihres 12-H(p)ETE-Gehalts getestet.

1.6.1.4 Hämostase

Die *Alox12*, die in großen Mengen in Blutplättchen vorkommt, scheint bei der Regulation der Hämostase bedeutsam zu sein (Kaur et al., 2010). Die Thrombozyten von *Alox12*-Knockout-Mäusen zeigen ein abgeschwächtes Aggregationsverhalten, wenn sie mit AA, Kollagen oder Thrombin stimuliert werden (Johnson et al., 1998). Trotzdem zeigen die Tiere keine signifikant verzögerte Blutgerinnung, sodass man schlussfolgern

muss, dass ein Defekt der *Alox12* durch andere metabolische Veränderungen gegenreguliert wird.

1.6.2 Pathophysiologische Funktionen von Lipoxygenasen

LOXn spielen bei der Pathogenese inflammatorischer, hyperproliferativer, neurodegenerativer und metabolischer Erkrankungen eine wichtige Rolle, wobei verschiedene Organsysteme (Lunge, Knochen, Blutgefäße, Geschlechtsorgane, Fettgewebe, ZNS etc.) betroffen sein können.

1.6.2.1 Entzündungsreaktion

Unter einer Entzündung versteht man die lokale oder systemische Reaktion des Organismus auf innere oder äußere Reize mit dem Ziel, diese Reize zu eliminieren. Dabei handelt es sich um einen komplexen Prozess der Aktivierung des Immunsystems, der durch eine Vielzahl von Botenstoffen (Entzündungsmediatoren) reguliert wird. Eikosanoide bilden eine Klasse entzündlicher Botenstoffe, wobei über den LOX-Weg der Arachidonsäurekaskade sowohl pro- als antiinflammatorische Mediatoren gebildet werden (Savari et al., 2014, Yoo et al., 2013, Romano, 2010, Pace-Asciak, 2009, Sachs-Olsen et al., 2010, Serhan and Petasis, 2011). Unabhängig von ihrer Rolle bei der Mediatorsynthese sind LOXn auch durch die Beeinflussung des Redoxstatus im entzündeten Gewebe an der Pathogenese der Entzündungsreaktion beteiligt (Forman et al., 2014).

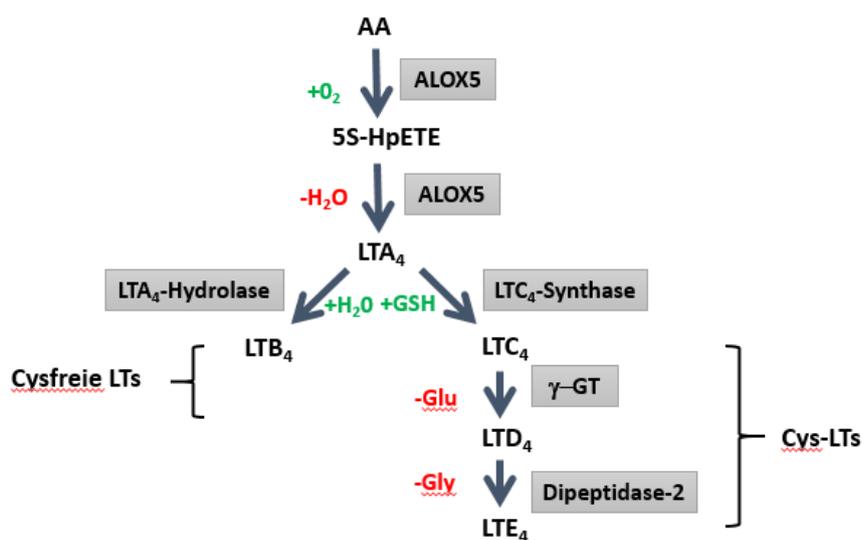


Abb. 6: Biosynthese der Leukotriene. Durch zweimalige katalytische Aktivität der ALOX5 entsteht über das Zwischenprodukt 5S-H(p)ETE LTA₄. Dieses kann über die LTA₄H zu den cysteinylfreien LT (LTB₄) hydrolysiert werden, oder mittels der LTC₄S durch Kopplung von Glutathion (GSH) zum cysteinylhaltigen LTC₄. Durch Abspaltung der AS Glu und Gly werden LTD₄ und LTE₄ gebildet. Abb. modifiziert nach (Kuhn et al., 2015).

Leukotriene (LT) sind proinflammatorische Eikosanoide, die über den ALOX5-Weg der AA-Kaskade gebildet werden (Haeggström and Funk, 2011). In der obigen Abbildung (**Abb. 6**) ist die Biosynthese und die Einteilung der LT zusammengefasst, welche man in zwei Hauptklassen, die cysteinylfreien LT (Cysfreie LT) und die Cysteinyl-LT (Cys-LT) untergliedern kann. Die Cysteinyl-LT sind an der Pathogenese des Asthma bronchiale (Singh et al., 2013, Cobanoğlu et al., 2013) und anderer allergischer Atemwegserkrankungen beteiligt und werden in Kapitel 1.6.2.2 thematisiert. LTB₄ ist ein starker proinflammatorischer Mediator, der über die Bindung an G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren (BLT1 und BLT2) chemotaktisch auf Entzündungszellen wirkt (Palmlad et al., 1981) und den Stoffwechsel von Immunzellen aktiviert (Yokomizo, 2011).

In den meisten Fällen heilt eine akute Entzündung nach der Eliminierung des entzündungserregenden Reizes vollständig aus (*Restitutio ad integrum*), kann aber auch in eine chronische Entzündung übergehen. Die Entzündungshelung ist aber mehr als das einfache Nachlassen des entzündungserregenden Reizes. Es ist ein hochgradig regulierter aktiver Prozess, der durch ein komplexes Muster von Regulatoren beeinflusst wird. In der akuten Entzündungsphase kommen im entzündeten Gewebe vor allem neutrophile Granulozyten und M1-Makrophagen vor, während in der Heilungsphase M2-Makrophagen dominieren. Ähnliche Veränderungen lassen sich im Muster der Entzündungsmediatoren nachweisen. Im entzündeten Gewebe wird vor allem das proinflammatorische LTB₄ nachgewiesen, während in der Heilungsphase Resolvine (Yoo et al., 2013), Lipoxine (Romano, 2010) und Protektine (Serhan and Petasis, 2011) vorherrschen. Diese werden aus AA, EPA und DHA über den LOX-Weg gebildet und binden ebenfalls an G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren (GPCR). Sie vermitteln eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Entzündungszellen, normalisieren veränderte vaskuläre Permeabilitätseigenschaften, induzieren Apoptose in neutrophilen Granulozyten und aktivieren M2-Makrophagen, die zur Phagozytose von nekrotischem Gewebe und apoptotischen Granulozyten befähigt sind (Headland and Norling, 2015). Auch für andere Produkte des LOX-Weges [15(S)-HETE, 13(S)-HODE] sind antiinflammatorische Wirkungen beschrieben worden (Kühn, 1996). Ein alternatives Konzept für die Erklärung der antiinflammatorischen Wirkung bestimmter LOX_n stellt die Hypothese dar, dass durch die LOX-katalysierte Oxygenierung von Membranphospholipiden das proinflammatorische Signaling über toll-like Rezeptoren (TLRs) gehemmt wird, was in einer verminderten Immunantwort resultiert (Oskolkova et

al., 2010).

Akute und chronische Entzündungen können in allen Organsystemen auftreten und führen dort zu organspezifischen Funktionsverlusten. So konnte bei der Analyse resezierter Darmabschnitte von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) ein Defizit an antientzündlichen Lipidmediatoren nachgewiesen werden (Mangino et al., 2006). Weiterhin zeigten Mausexperimente im DSS-induzierten Colitismodell einen signifikant schlechteren Krankheitsverlauf unter Behandlung mit einem *ALOX15*-Hemmstoff, was auf die Hemmung der Biosynthese resolutorischer LOX-Produkte zurückgeführt werden könnte (Mangino et al., 2006).

Knochen- und Gelenkentzündungen spielen eine zunehmende Rolle in Morbiditätsstatistiken der entwickelten Industrieländer. In zwei unabhängigen Mausarthritismodellen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des *ALOX15*-Gens zu einer unkontrollierten Entzündung führt (Krönke et al., 2009a). Zwar konnten die diesen Effekten zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht aufgeklärt werden, eine Herunterregulation der Biosynthese resolutorischer Eikosanoide scheint jedoch möglich.

1.6.2.2 Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, ARDS)

Die „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) spielt bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen der Atemwege, vor allem beim Asthma bronchiale, eine wichtige Rolle (Liu and Yokomizo, 2015). SRS-A ist ein Gemisch der Leukotriene C₄ und D₄. Diese Mediatoren induzieren eine starke Bronchokonstriktion (Dahlén et al., 1980), erhöhen die Gefäßpermeabilität postkapillärer Venolen und führen damit zum Bronchialödem (Dahlén et al., 1981). Außerdem fördert LTC₄ die bronchiale Mukussekretion und erhöht die Viskosität des Bronchialschleims (Peatfield et al., 1982). Antileukotriene Medikamente, wie der Leukotrienrezeptorantagonist Montelukast (Matsuse and Kohno, 2014, Amlani et al., 2011), und Hemmstoffe der *ALOX5*, wie Zileuton, das in den USA als Antiasthmatikum zugelassen ist (Rossi et al., 2010), werden derzeit zur Pharmakotherapie des Asthma bronchiale eingesetzt. Dabei muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass eine Antileukotrientherapie nicht bei allen Formen des Asthma bronchiale klinisch sinnvoll zu sein scheint. Die aktuelle Therapieempfehlung in Deutschland sieht diese Medikamente als Add-on-Medikation in Kombination mit inhalativen Kortikosteroiden (ICS) und Langzeitbetasymphathomimetika (LABA) vor, wenn

durch die beiden anderen Therapieoptionen keine ausreichenden Effekte erzielt werden. Aufgrund der vorhandenen Studienlage gilt die Empfehlung, im Kleinkindalter LTRA und im Schul- bzw. Jugendalter LABA als Add-on-Therapie zu ICS zu bevorzugen. Als Monotherapie besteht eine Zulassung von Montelukast für Anstrengungsasthma bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen (Bundesärztekammer et al., 2009, zuletzt geändert: August 2013).

Neben dem Asthma bronchiale, bei dem der *ALOX5*-Weg der AA-Kaskade im Vordergrund steht, spielt die *ALOX15* eine Rolle bei der Pathogenese des Akuten Respiratorischen Disstress-Syndroms (ARDS). Diese heterogene Lungenerkrankung, die durch ein akutes Lungenversagen infolge eines plötzlichen Lungenödems (schlagartiger Anstieg der Kapillarpermeabilität) und durch eine Abnahme der Lungencompliance gekennzeichnet ist, entwickelt sich bei *ALOX15*-Knockout Mäusen weniger stark als bei entsprechenden Kontrolltieren (Zarbock et al., 2009). Untersuchungen an knochenmarkchimären Mäusen deuteten darauf hin, dass die Expression der *ALOX15* in hämatopoietischen Zellen, vor allem in Monozyten/Makrophagen, für diesen Effekt eine wesentliche Rolle spielt (Zarbock et al., 2009, Rossaint et al., 2012).

1.6.2.3 Nierenerkrankungen

Im Bereich der Nierenerkrankungen scheint weniger der proinflammatorische Effekt der Leukotriene als vielmehr die protektiven Funktionen der Lipoxine von Bedeutung zu sein. Lipoxine können über mehrere transzelluläre Wege der Biosynthese unter Mitwirkung verschiedener LOX-Isoformen gebildet werden, wobei mindestens ein 5- und ein 15-lipoxygenierender Reaktionsschritt beteiligt ist. Zu ihren Wirkungen gehören sowohl antiinflammatorische (z.B. Hemmung der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, Modulation der Vasomotorik, Regulation der Zytokinfreisetzung), als auch proresolutorische Funktionen (z.B. Clearance apoptotischer Neutrophiler und Antiproliferation des Mesangiums) (Kieran et al., 2004). In einem experimentellen Glomerulonephritismodell der Ratte konnte gezeigt werden, dass ein somatischer Gentransfer der *ALOX15* zu einer signifikanten Abschwächung der Entzündungssymptome führt und die Nierenfunktion deutlich verbessert werden kann (Munger et al., 1999). Der molekulare Mechanismus für die gemessenen Effekte wurde nicht näher untersucht. Es scheint jedoch durchaus möglich zu sein, dass durch den

Gentransfer die Produktion antiinflammatorischer und proresolutorischer LOX-Produkte hochreguliert wird (siehe 1.6.2.1). Beim akuten Nierenversagen ischämischer Genese konnte im Tiermodell der protektive Effekt eines stabilen Lipoxin-Analogons nachgewiesen werden (Leonard et al., 2002). Der gleiche Effekt scheint auch durch das Triggern der Lipoxinsynthese mittels Aspirin erzielt werden zu können. Der Mechanismus der Aspirin-getriggerten Lipoxinsynthese (ATL) beruht auf der 15-Lipoxygenaseaktivität der acetylierten COX-2 (Serhan, 2005). Bei der Nierenfibrose (Börgeson et al., 2011) werden ebenfalls Assoziationen zu Lipoxinen hergestellt und der Mechanismus einer Lipoxin A₄-vermittelten Hemmung des TGF- β -Signalwegs beschrieben (Brennan et al., 2013).

Nierenzellkarzinome (NCC) als häufigste Nierentumoren im Erwachsenenalter weisen eine erhöhte Expression der *ALOX5* und der *ALOX12* auf (Gohara et al., 2012). Während die *ALOX15B* beim Prostatakarzinom als Tumorsuppressor (DuBois, 2003) angesehen wird, scheint dieses Enzym beim NCC zur Tumor-assoziierten Entzündung und Immunevasion beizutragen und damit prokarzinogen zu wirken. Obwohl vereinzelte experimentelle Daten zur molekularen Basis dieses prokarzinogenen Effektes der *ALOX15B* vorliegen (z.B. Erhöhung der Expression des Makrophagen-Chemoattraktorproteins-1 und von IL-10 in tumorassoziierten Makrophagen sowie Erhöhung der CTLA4- und FOXP3-Expression), bleiben die genauen Mechanismen weiterhin unklar (Daurkin et al., 2011).

1.6.2.4 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Die *ALOX15* und *ALOX15B* scheinen bei der Blutdruckregulation und damit bei der Pathogenese hypertensiver Erkrankungen eine Rolle zu spielen (Chawengsub et al., 2009, Zhu and Ran, 2012), wobei besonders Trihydroxyeikosanoide als Mediatoren fungieren (Pfister et al., 1998). *ALOX15*-Knockout Mäuse zeigen zwar, verglichen mit entsprechenden Kontrolltieren, keine erhöhten systemischen Blutdruckwerte, zeichnen sich aber durch eine erhöhte Resistenz gegenüber der Induktion einer Hypertonie durch L-NAME-Injektion bzw. Salzbelastung aus (Kriska et al., 2012).

Die Atherosklerose ist die häufigste Gefäßerkrankung und hauptverantwortlich für Herzinfarkt und Schlaganfall. Drei LOX-Isoformen (*ALOX5*, *ALOX15* und *ALOX15B*) scheinen zur Pathogenese dieser Erkrankung beizutragen. Expressionsprofile von fortgeschrittenen humanen atherosklerotischen Läsionen belegen die Expression der drei

LOX-Isoformen, wobei die *ALOX15* nur in geringen Mengen nachweisbar ist (Gertow et al., 2011). Wenn *Alox5*-Knockout-Mäuse mit einer fettreichen Diät gefüttert werden, entwickeln sie zwar keine ausgeprägteren atherosklerotischen Läsionen als entsprechende Kontrolltiere, zeigen jedoch eine deutlich höhere Tendenz zur Aneurysmabildung (Zhao et al., 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass die *ALOX5* weniger an der Plaquebildung per se beteiligt zu sein scheint, sondern mehr für das kompensatorische Gefäßwandremodeling bedeutsam ist (Kuhn et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird die Aneurysmabildung in einem anderen Mausmodell durch genetische und pharmakologische Beeinflussung der Leukotrienbiosynthese nicht beeinflusst (Cao et al., 2007).

Alox15-Knockout-Mäuse sind in mehreren murinen Atherosklerosemodellen vor der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen geschützt (Cyrus et al., 1999, George et al., 2001, Cyrus et al., 2001, Huo et al., 2004, Zhao et al., 2005, Poeckel et al., 2009). Auf der anderen Seite konnte in zwei Kaninchen- und einem Mausmodell, in welchen die *ALOX15* überexprimiert wurde, ebenfalls ein atheroprotektiver Effekt beschrieben werden (Shen et al., 1996, Trebus et al., 2002, Merched et al., 2008). Die möglichen molekularen Ursachen für die kontroversen Effekte des *ALOX15*-Knockouts und der Überexpression des Enzyms in tierischen Atherosklerosemodellen wurden eingehend diskutiert (Kühn et al., 2005, Wittwer and Hersberger, 2007). Auch für die *ALOX15B* wurde eine Rolle bei der Atherogenese postuliert. Diese Hypothese beruht u.a. auf der Tatsache, dass das Enzym in humanen Läsionen exprimiert wird (Gertow et al., 2011, Hultén et al., 2010), und dass ein Polymorphismus im Gen der menschlichen *ALOX15B* mit der Häufigkeit der koronaren Herzerkrankung korreliert (Wuest et al., 2014).

1.6.2.5 Karzinogenese

Wie bei den entzündlichen Erkrankungen scheint die Rolle der verschiedenen LOX-Isoformen bei der Karzinogenese sehr komplex zu sein und sowohl prokarzinogene als auch antipkarzinogene Effekte werden bei verschiedenen LOXn und Tumorentitäten beschrieben (Faronato et al., 2007, Hayashi et al., 2006, Wen et al., 2014, Matsuyama and Yoshimura, 2008, Celenk et al., 2013, Krzyzankova et al., 2014). Die *ALOX5* und ihre Metaboliten gelten als prokarzinogen (Meng et al., 2013, DuBois, 2003), da sie die Zellproliferation erhöhen, die Neoangiogenese fördern (Romano et al., 2001) sowie die Migration (Magi et al., 2014) und Invasion metastasierender Tumorzellen verbessern

(Bishayee and Khuda-Bukhsh, 2013). Ähnliche Effekte wurden dem *ALOX12*- bzw. *ALOX12B*-Metaboliten 12-HETE zugeschrieben (Nie et al., 1998, Liu et al., 1996).

Die Rolle der *ALOX15* und *ALOX15B* wird bei verschiedenen Krebsarten kontrovers diskutiert. Beim kolorektalen Karzinom sowie beim Prostata- und Ösophaguskarzinom wird eine antikarzinogene Wirkung der *ALOX15B* vermutet (Tang et al., 2007, Shappell et al., 1999, Xu et al., 2003). Die Überexpression der *ALOX15* in einer Prostatakrebszelllinie steigert die Proliferationsrate, sodass ein prokarzinogener Effekt der *ALOX15* postuliert wurde (Kelavkar et al., 2001).

Besonders gut wurde bisher die Rolle von LOXn bei der Pathogenese kolorektaler Karzinome (Bhattacharya et al., 2009, Janakiram and Rao, 2014) und beim Prostatakarzinom (Gao et al., 1997, Matsuyama and Yoshimura, 2008) untersucht. Aus Platzgründen wird an dieser Stelle nur näher auf das kolorektale Karzinom (KRK) eingegangen. Im Vergleich zu gesundem Gewebe konnte bei Kolonkarzinomen eine Überexpression an *ALOX5*-mRNA gezeigt werden und die Behandlung von Tumoren *in vivo* und *in vitro* mit dem *ALOX5*-Inhibitor Zileuton resultiert in einem signifikant verringerten Tumorwachstum (Melstrom et al., 2008). Diese prokarzinogenen Wirkungen werden den Lipidmediatoren LTB₄ und 5-HETE zugeschrieben. Ein Knockdown der entsprechenden Rezeptoren und eine Hemmung der *ALOX5* führen *in vitro* zu einer Suppression der Zellproliferation und zur Zunahme der Apoptose (Ihara et al., 2007). Außerdem korrelieren der Plasmaspiegel von LTB₄ und die Expression des LTB₄-Rezeptors 1 (BLT1), wie auch der zelluläre Gehalt an *ALOX5*-mRNA mit dem Malignitätsgrad der veränderten Darmmukosa (Wasilewicz et al., 2010, Ihara et al., 2007). Weiterhin wird die Aktivierung bestimmter wachstumsrelevanter Transkriptionsfaktoren (PPARs, NFκB) durch *ALOX5*-Produkte im Sinne einer prokarzinogenen Aktivität reguliert (Michalik et al., 2004, Li et al., 2013).

Die Rolle der *ALOX15* bei der Kanzerogenese wird kontrovers diskutiert. In Kolonkarzinomzellen wird die Zellproliferation durch die Expression des Enzyms herunterreguliert, was auf einer vermehrten nukleären Translokation der Tumorsuppressorproteine p65 und p50, einer verringerten NFκB-Aktivität und einer Aktivierung von PPARγ durch 13-HODE beruhen könnte (Cimen et al., 2011). Diese Daten implizieren eine antikarzinogene Wirkung der *ALOX15*. Andererseits induziert die Behandlung der gleichen menschlichen KRK-Zelllinie (HCT-116) mit dem LOX-Inhibitor NDGA einen Anstieg des Tumorsuppressorproteins p21 und dieser Effekt lässt sich durch die Behandlung der Zellen mit dem *ALOX15* Metabolit 13(S)-HODE unterdrücken. Eine

Überexpression der *ALOX15* induziert vermehrtes Zellwachstum durch Aktivierung des MEK-ERK-1/2-Signalwegs und einen damit einhergehenden Abfall des Tumorsuppressorproteins p21 (Yoshinaga et al., 2004). Diese Daten hingegen implizieren prokarzinogene Wirkungen der 15-LOX.

Maligne Tumore werden häufig von einer entzündlichen Umgebungsreaktion begleitet, die Ausdruck einer Immunreaktion gegen den Tumor ist. Andererseits können chronische Entzündungen zur malignen Entartung normaler Zellen führen, sodass die Entzündung sowohl Ursache als auch Folge der Tumorentwicklung sein kann. Deshalb können chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CEDs) wie Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) als Präkanzerosen angesehen werden und eine Metaanalyse ermittelt ein proportional zur Erkrankungsdauer ansteigendes Kumulativrisiko für die Entwicklung eines KRK bei CU-Patienten (Eaden et al., 2001). Demnach werden für CED-Patienten mit einer Mindesterkrankungsdauer von acht Jahren prophylaktische Koloskopien empfohlen. Allerdings sei erwähnt, dass diese Ansichten durch neuere Studien, deren Ergebnisse von bisherigen Erwartungen abweichen, durchaus infrage gestellt werden (Jess et al., 2012, Nguyen and Bressler, 2012). Durch den wechselseitigen Zusammenhang von Entzündung und Tumor kommt allen Entzündungsmediatoren demnach potentiell auch eine Rolle bei der Karzinogenese zu. Unter diesem Aspekt können auch die antikanzerogenen Effekte verschiedener resolutorischer Lipidmediatoren diskutiert werden (Wendel and Heller, 2009). Demnach könnte eine verminderte Synthese proresolutorischer Eikosanoide an der Entstehung von Tumoren als Langzeitkomplikation chronischer Inflammationszustände beteiligt sein. Wesentliche Quelle der proresolutorischen Eikosanoide bzw. Dokosanoide sind omega-3-Fettsäuren, deren Hauptvertreter DHA und EPA vor allem in Fischölen enthalten sind. Karzinoprotektive Wirkungen einer Fischöl-reichen Ernährung wurden mehrfach beschrieben (Lovegrove et al., 2015, Abel et al., 2014). Dieser Zusammenhang geht ursprünglich auf die Entdeckung zurück, dass Grönland-Inuits eine signifikant geringere kardiovaskuläre Mortalität aufweisen (Leaf, 2008). Für fat-1-transgene Mäuse, welche endogen erhöhte Spiegel an omega-3-Fettsäuren aufweisen, konnte in einem chemisch induzierten Kolontumormodell (Azoxyethan) eine signifikant erniedrigte Tumorstadiumsrate gemessen werden (Nowak et al., 2007). Dies ging mit einer verstärkten zellulären NFκB-Aktivität, höheren systemischen TGF-β-Spiegeln und einer verringerten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase in den Tumoren einher. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass omega-3-Fettsäuren die Effizienz und

Verträglichkeit herkömmlicher Chemotherapiekonzepte im Rahmen der Krebstherapie verbessern (Cockbain et al., 2014).

1.6.2.6 Neurologische Erkrankungen

Die Expression verschiedener LOX-Isoformen im ZNS ist stark speziesabhängig. Im Gehirn von Ratten (Watanabe et al., 1993) und Hunden (Nishiyama et al., 1992) wird die *ALOX15* exprimiert, während die *ALOX12* bei Ratten (Hada et al., 1994) kaum nachweisbar ist. Obwohl einige Hinweise zur biologischen Rolle verschiedener LOX-Isoformen bei der Gehirnfunktion existieren (Pekcec et al., 2013, Kang and Vanderhoek, 1998), wurden diese Funktionen bislang noch nicht systematisch untersucht. Das liegt vor allem auch daran, dass Knockout-Mäuse mit dysfunktionellen *Alox15*-, *Alox12*-, *Alox5*-, *Alox12b*- und *Alox3*-Genen keine Auffälligkeiten in der embryonalen Gehirnentwicklung und im Falle von *Alox15*-, *Alox12*- und *Alox5*-defizienten Mäusen auch keine Funktionsverluste bei erwachsenen Tieren aufweisen.

Bei der periventrikulären Leukomalazie und bei zerebraler Ischämie (Schlaganfall) scheinen jedoch die *ALOX5* und die *ALOX15* von pathophysiologischer Relevanz zu sein. Die periventrikuläre Leukomalazie ist eine Erkrankung der weißen Hirnsubstanz, die als häufige Ursache motorischer und kognitiver Defekte bei Frühgeborenen auftritt. Sie manifestiert sich durch nekrotische Läsionen der weißen Substanz und führt zu einer Vermehrung der Mikroglia. In diesen Läsionen kommt es zu einer verstärkten Expression der *ALOX15* (Haynes and van Leyen, 2013). Obwohl die genauen Zusammenhänge zwischen der *ALOX15*-Expression und der Pathogenese der Erkrankung noch nicht eindeutig geklärt sind, deutet die zelluläre Verteilung des Enzyms darauf hin, dass durch die *ALOX15*-Expression der apoptotische Untergang der Zellen eingeleitet wird, was der *ALOX15* als proapoptisches Enzym eine pathogenetische Bedeutung zuweist.

Bei zerebraler Ischämie scheint die *ALOX5* keine wichtige Rolle zu spielen, da Experimente mit *Alox5*-defizienten Mäusen in zwei unabhängigen Ischämie-Modellen keine signifikanten Unterschiede zu entsprechenden Kontrolltieren ergaben (Kitagawa et al., 2004). Demgegenüber wurde in verschiedenen epidemiologischen Korrelationsuntersuchungen ein statistischer Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im Gen des *ALOX5*-aktivierenden Proteins (FLAP) und einem erhöhten Schlaganfallsrisiko postuliert (Helgadottir et al., 2004) und dieser Zusammenhang wurde

in der Folge mehrfach bestätigt (Domingues-Montanari et al., 2010, Kostulas et al., 2007, Wang et al., 2014a, Bevan et al., 2008). Es gab jedoch auch Untersuchungen, bei denen diese Korrelationen nicht oder nur teilweise nachvollzogen werden konnten (Barral et al., 2012, Kaushal et al., 2007).

Die *ALOX15* scheint hingegen bei der Pathogenese des Schlaganfalls, insbesondere bei der Entwicklung der Sekundärveränderungen, eine größere Bedeutung zu haben (van Leyen, 2013). Die Expression des Enzyms wird in den Hirnregionen deutlich hochreguliert, die den unmittelbaren Infarktbereich umgeben. *ALOX15*-defiziente Mäuse entwickeln deutlich reduzierte Sekundärschäden im Verlaufe einer experimentellen zerebralen Ischämie (van Leyen et al., 2006, Khanna et al., 2005) und dieser protektive Effekt konnte auch bei der Ischämie-induzierten Verschlechterung der Blut-Hirn-Schranke und der Hirnödembildung nachgewiesen werden (Jin et al., 2008). Pharmakologische Interventionen mit neuen *ALOX15*-Hemmstoffen, die keine antioxidativen Eigenschaften besitzen, reproduzieren die protektiven Effekte des *ALOX*-Knockouts, auch wenn die Hemmstoffe erst vier Stunden nach Initiation der zerebralen Ischämie gegeben werden (Yigitkanli et al., 2013). Obwohl bisher unklar ist, welchen molekularen Mechanismen der protektive Effekt der Ischämie-induzierten *ALOX15*-Expression folgt, wurde auch hier die Synthese neuroprotektiver *ALOX15*-Metaboliten (z.B. Neuroprotektin D1) diskutiert (Bazan, 2009). Unterstützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass die Infusion von DHA, die als Substrat für die Neuroprotektin D1-Synthese fungiert, ebenfalls protektive Konsequenzen hat (Bazan et al., 2012).

Bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielen die *ALOX5*, *ALOX12* und *ALOX15* eine Rolle (Rao et al., 2011), wobei auch hier kontroverse Daten vorliegen. Die *ALOX15* wird im Gehirn von Alzheimer-Patienten verstärkt exprimiert (Praticò et al., 2004) und erhöhte Mengen der *ALOX15*-Metaboliten 12-HETE und 15-HETE wurden im Liquor entsprechender Patienten gefunden (Yao et al., 2005). Im Gegensatz dazu, scheint die Expression der *ALOX5* im Hippocampus von Alzheimer-Patienten herunterreguliert zu sein. In einer anderen Untersuchung wurde eine verringerte *ALOX15*-Expression bei Alzheimer-Patienten gefunden und diese Daten korrelierten mit einer geringeren Neuroprotektin D1-Synthese (Lukiw et al., 2005). Auch in zellulären Alzheimermodellen gibt es widersprüchliche Daten hinsichtlich der Expression und der Funktion der *ALOX15* (Lebeau et al., 2004, Lebeau et al., 2001, Zhao et al., 2014).

Auch bei der Multiplen Sklerose scheinen die *ALOX15* und *ALOX5* eine pathophysiologische Rolle zu spielen. In einem murinen *in vivo*-Modell dieser Erkrankung

konnte sowohl für Alox5-, als auch für Alox15-Knockout-Mäuse eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere nachgewiesen werden (Emerson and LeVine, 2004). Es blieb in dieser Studie jedoch völlig unklar, warum der Knockout der beiden Enzyme ähnliche Wirkungen verursacht, da *ALOX5* und *ALOX15* sich sonst häufig gegenläufig verhalten.

1.6.2.7 Metabolische Erkrankungen

Die *ALOX15* scheint bei der Pathogenese des Diabetes mellitus (Typ-1 und Typ-2) beteiligt zu sein. Die Expression des Enzyms ist in Diabetestiermodellen hochreguliert (Dobrian et al., 2011) und Alox15-Knockout-Mäuse sind gegenüber der Entwicklung diabetischer Symptome geschützt, wenn sie mit NOD-Mäusen (*nonobese diabetic mice*) gekreuzt werden (McDuffie et al., 2008). Weiterhin sind Alox15^{-/-}-Mäuse resistenter gegenüber der Induktion von Typ-1 Diabetes mellitus (T1DM) durch Streptomycin (Bleich et al., 1999), was ebenfalls für einen pro-diabetischen Effekt der *ALOX15* spricht. Aufgrund der unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften von humanen und murinen *ALOX15*-Orthologen sind diese in Mausmodellen erhaltenen Daten aber nur bedingt auf den Menschen zu übertragen. In menschlichen Systemen gibt es bisher noch keine systematischen Untersuchungen zur Rolle der *ALOX15* beim T1DM.

Die *ALOX15* ist an der Adipozytendifferenzierung beteiligt (Chakrabarti et al., 2009). Die Produkte der murinen *Alox15* (12-H(p)ETE) induzieren bei 3T3-Präadipozyten eine Insulinresistenz, ein charakteristisches Merkmal peripherer Zellen beim Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM). Diese Daten deuten darauf hin, dass die *ALOX15* auch bei der Pathogenese des T2DM, der Adipositas und beim metabolischen Syndrom eine Rolle spielt. Neben dieser LOX-Isoform scheinen aber auch die *ALOX5*, *ALOX12* und die *ALOXE3* bedeutsam zu sein, da alle vier Enzyme im weißen Fettgewebe exprimiert werden (Hallenborg et al., 2010, Cole et al., 2013). In einer begrenzten (1215 Teilnehmer) Korrelationsstudie konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im *ALOX12*-Gen (rs2073438) mit der totalen und relativen Fettmasse signifikant korreliert (p=0.007 und p=0.012). Da die Adipositas derzeit als eine chronisch entzündliche Erkrankung des Fettgewebes angesehen wird, sollten klassische proinflammatorische Enzyme wie die COX-2 und die *ALOX5* bedeutsam für deren Pathogenese sein. In der Tat gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass das LT-Signaling bei der Adipozytendifferenzierung bedeutsam zu sein scheint (Iyer et al., 2010, Hirata et al.,

2012). Aber auch die Produkte des *ALOX15*-, *ALOX12*- und *ALOX12B*-Stoffwechsels, besonders die Hepoxiline spielen dabei eine wichtige Rolle (Pace-Asciak, 2009).

1.7 Fragestellung

Lipoxygenasen bilden eine Familie lipidperoxidierender Enzyme, die in vielen irdischen Lebensformen vorkommen. Leider gibt es aber noch kein Konzept hinsichtlich der Evolution dieser Enzyme. So konnte bisher nicht geklärt werden, auf welchem Entwicklungsniveau Lipoxygenasen evolutionär erstmalig aufgetreten sind, welche Verwandtschaftsbeziehungen sie untereinander aufweisen und über welche konkreten Mechanismen sich die Vielfalt dieser Enzymfamilie entwickelt hat. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Aspekte der Evolution von LOXn untersucht, wobei vier konkrete Fragen beantwortet werden sollten.

1. In welcher Verbreitung kommen funktionelle LOXn in den drei Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, Archaeen und Eukaryonten) vor? Für diese Untersuchungen wurden genomische Sequenzen ausgewählter Modellorganismen nach LOX-ähnlichen Sequenzen durchsucht und deren Funktionalität durch ein mehrstufiges Filtrationskonzept abgeschätzt.

2. Besitzt der Zebrafisch, der ein Modellorganismus für Vertebraten darstellt, eine funktionelle *ALOX5*, die für die Leukotrienbiosynthese essenziell ist? Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine *ALOX5*-Isoform des Zebrafisches kloniert, exprimiert und hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert. Ein Vergleich mit den orthologen Enzymen höherer Vertebraten offenbarte trotz großer evolutionärer Distanz markante Ähnlichkeiten.

3. Besaßen die ausgestorbenen menschlichen Subspezies *H. neanderthalensis* und *H. denisovan* funktionelle LOXn und welchen Ähnlichkeitsgrad wiesen die verschiedenen LOX-Isoformen der Frühmenschen mit denen des modernen Menschen auf? Für die Beantwortung dieser Fragen wurden LOX-Sequenzen aus den Genomen der Frühmenschen extrahiert und die cDNA-Sequenzen der humanen Enzyme durch ortsgerechte Mutagenese neandertalisiert bzw. denisovanisiert.

4. Gab es eine systematische Evolution der Reaktionsspezifität der *ALOX15* im Laufe der späten Primatenentwicklung? Hoch entwickelte Primaten (z.B. Menschen) exprimieren 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoformen, während weniger weit entwickelte Säuger (z.B. Maus) über 12-lipoxygenierende Orthologe verfügen. Aus diesen Daten ergab sich die Frage, ob diese Unterschiede in der Reaktionsspezifität das Ergebnis einer

systematischen Proteinevolution ist oder rein zufälligen Charakter aufweist. Sollte sich im Ergebnis der initialen Arbeiten herausstellen, dass es sich hierbei um einen systematischen Evolutionsprozess handelt, bestand für weiterführenden Untersuchungen die Aufgabe darin, den Zeitpunkt der evolutionären Veränderung und dessen Triebkraft näher zu charakterisieren. Es sollte herausgefunden werden, welchen Evolutionsvorteil eine 15-lipoxygenierende *ALOX15* gegenüber einem 12-lipoxygenierenden Enzym hat.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese 30)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Promega (Mannheim, Deutschland)
Ampicillin-Natrium	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Antifoam 204	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Antikörper Anti-His G-HRP	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Arachidonsäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
ATP	Roche (Mannheim, Deutschland)
β -Mercaptoethanol-Probenpuffer (Roti-Load)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fraktion V Serva (Heidelberg, Deutschland)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cobalt-Sepharose (TALON Metal affinity Resin)	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
Diazald (zur Herstellung von Diazomethan)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
dNTP-Lösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
ETYA (5,8,11,14-eicosatetraynoic acid)	Sigma (St Louis, MO, USA).
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glucose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Hexan	Baker (Deventer, Niederlande)
HPLC-Standards 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-HETE (R/S)	Cayman Chem., Ann Arbor, USA, per Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Imidazol	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Isopropanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumborhydrid	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ovalbumin	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
Phosphatidylcholin	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
Ponceau S	Sigma (Dreisenhofen, Deutschland)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Tris	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Tryptanblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Nährmedien:

EnPresso Tablet Set	BioSilta (Berlin, Deutschland)
LB-Agar	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Opti-MEM I Reduced-Serum Medium	Life Technologies (Carlsbad, USA)
TransIT-LT1 Transfection Reagent	Mirus (Madison, USA)
Zellkulturmedium	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)

Pufferzusammensetzungen und Lösungen:

CP-HPLC-Laufmittel	Hexan (100%), Isopropanol (5%), Essigsäure (0,1%) und Hexan (100%), Isopropanol (4%), Essigsäure (0,1%)
HEPES-Puffer A	HEPES (50 mM; pH=7,4), NaCl (150 mM), CaCl ₂ (0,1 mM), DTT (0,1 M)
LB-Medium	Bacto-Trypton (1%), Hefe-Extrakt (0,5%), Natriumchlorid (0,5%), Natronlauge (1 mM)
LB-Agar	Bacto-Agar (1,5%), Bacto-Trypton (1%), Hefe-Extrakt (0,5%), Natriumchlorid (0,5%), Natronlauge (1 mM)
PBS	Natriumchlorid (150 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (8 mM), Kaliumchlorid (3 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (1,5 mM), pH=7,0
RP-HPLC-Laufmittel	Methanol (85%), Wasser (15%), Essigsäure (0,05%)
SOC-Medium	Hefeextrakt (0,5%), Trypton (2%), Natriumchlorid (10 mM), Kaliumchlorid (2,5 mM), Magnesiumchlorid (10 mM), Magnesiumsulfat (10 mM), Glucose (20 mM)
SDS-PAGE Stackinggel 4%	(37% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid) (14%), Stackinggelpuffer (0,5 M Tris (30,285 g/500 ml) pH 6,75; 0,4% SDS) (25%), Ammoniumpersulfatlösung 10% (1%), TEMED (0,2%), Wasser (60%)
SDS-PAGE Trenngel 10%	(37% Acrylamid + 0,8% Bisacrylamid) (33%), Trenngelpuffer (1,5 M Tris (90,855 g/500 ml) pH 8,8; 0,6% SDS) (25%), TEMED (0,2%), Ammoniumpersulfatlösung 10% (1%), Wasser (41%)
SDS-Puffer	Tris (24,93 mM), Glycin (192 mM), SDS (3,47 mM), pH=8,3
SP-HPLC-Laufmittel	Hexan (100%), Isopropanol (2%), Essigsäure (0,1%)
TAE-Puffer (für Agarose-Gele)	Tris (40 mM), Natriumacetat (20 mM), Essigsäure (29,6 mM), EDTA (2 mM), pH=7,8

Puffer für die Cobalt-Sepharose-Affinitätschromatografie:

Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH= 8,0
-------------	---

Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8,0
----------------	---

Zusätze für Aktivitätsassays mit der ALOX5

ATP/EDTA	1 mM ATP, 1 mM EDTA
CaCl/PC	4 mM CaCl ₂ , 14 µg/ml PC

2.1.3 Enzyme und Kits

Advantage PCR-Mix	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
Blut-RNA-Extraktions-Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
DNA Ligase, Bacteriophage T4	Roche (Mannheim, Deutschland)
DNA Polymerase Thermus aquaticus (Taq)	Promega (Madison, USA)
EnPresso Tablet Cultivation Set	BioSilta (St. Ives, Großbritannien)
GeneJET Gel extraction kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
LigaFast™ rapid DNA Ligation	Promega (Madison, USA)
Plasmid DNA Purification Nucleobond XtraMidi	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Premium Reverse Transkriptase	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
QIA RNeasy KIT	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Restriktionsendonukleasen	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Roti-Quant	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer Inc. (Boston, USA)

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

pET-28b	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pME	Biomatik (Cambridge, Canada)

pRSET A	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
TOPO 2.1	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Oligonukleotide/Primer	BioTez (Berlin, Deutschland)

Alle Primer für die ortsgerichtete Mutagenese und reverse Transkription von mRNA wurden durch die Firma BioTez (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzierungen erfolgten durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Folgende Primer wurden zur Insertion der Xho-I-Schnittstelle in den pET-15b-Vektor verwendet, um die Umklonierung der Zebrafisch ALOX5 vom pET-15b Vector in den pRSET-A-Vektor zu ermöglichen.

Up-Primer 5' CGC GGC AGC CAT ATG **CTC GAG** ATG CCC AGC TAC ACG 3'
Dw-Primer 5' CGT GTA GCT GGG CAT **CTC GAG** CAT ATG GCT GCC GCG 3'

Folgende Primer wurden zur Erstellung der Zebrafisch ALOX5-Mutanten für die Versuche zur Untersuchung der Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes verwendet:

Up A603I 5' TGG CAT CTG GGA **ATA** GTT TGG GCC CTC 3'
Dw A603I 5' GAG GGC CCA AAC **TAT** TCC CAG ATG CCA 3'
Up N425M 5' TTT GAC AAG GCT **ATG** GGG ACA GGT GGA 3'
Dw N425M 5' TTC ACC TGT CCC **CAT** AGC CTT GTC AAA 3'
Up A424I+N425M 5' GGA CTC TTT GAC AAG **ATA ATG** GGG ACA GGT GGA GGT 3'
Dw A424I+N425M 5' ACC TCC ACC TGT CCC **CAT TAT** CTT GTC AAA GAG TCC 3'
Up F359W 5' AGA TCT TCA GAC **TGG** CAC GTC CAT CAG 3'
Dw F359W 5' CTG ATG GAC GTG **CCA** GTC TGA AGA TCT 3'
Up A424F 5' GGA CTC TTT GAC AAG **TTT** AAT GGG ACA GGT GG 3'
Dw A424F 5' CC ACC TGT CCC ATT **AAA** CTT GTC AAA GAG TCC 3'
Up A425F 5' CTC TTT GAC AAG GCT **TTT** GGG ACA GGT GGA GG 3'
Dw A425F 5' CC TCC ACC TGT CCC **AAA** AGC CTT GTC AAA GAG 3'

Folgende Primer wurden zur Erstellung der Zebrafisch ALOX5-Phosphorylierungsmutanten verwendet:

Up T271D 5' T CTG GAG AGG GGT CTC **GAT** CTG GAA GAG GAG CTC AAG 3'
Dw T271D 5' CTT GAG CTC CTC TTC CAG **ATC** GAG ACC CCT CTC CAG AC 3'
Up S663D 5' TG CCT TAC TAC TAT CTG **GAT** CCA GAC AGA ATC CCA A 3'
Dw S663D 5' T TGG GAT TCT GTC TGG **ATC** CAG ATA GTA GTA AGG CA 3'

Folgende Primer wurden zur spezifischen Amplifikation der Primaten-ALOX15 per PCR verwendet:

Up-Primer 5' CCC **CGT CGA CAT** GGG TCT CTA CCG C 3'
Dw-Primer 5' CCC **CAA GCT TTT** AGA TGG CCA CAC TGT T 3'

Die folgenden Primer wurden zum Entfernen der internen Hind III-Schnittstelle im Insert der ALOX15 des Schimpansen verwendet:

Up-Primer 5' CCT ATC TTC AAG CTC ATA ATT CCC CAC 3'
Dw-Primer 5' GTG GGG AAT TAT GAG CTT GAA GAT AGG 3'

Die folgenden Primer wurden verwendet, um die humALOX15 zu gibbonisieren. Dabei wurden die sich aus den Sequenzalignments ergebenden unterschiedlichen Aminosäuren der gibALOX15 durch ortsgerichtete Mutagenese in das humane Enzym eingeführt.

Up M419T 5' TTC GAC CAG ATA **ACG** AGC ACT GGT GGG 3'
Dw M419T 5' CCC ACC AGT GCT **CGT** TAT CTG GTC GAA 3'
Up T593V 5' T CTC CAG ATG TCC ATC **GTT** TGG CAG CTG GGC AGA C 3'
Dw T593V 5' G TCT GCC CAG CTG CCA **AAC** GAT GGA CAT CTG GAG A 3'

Die folgenden Primer wurden für die Erstellung der Primaten-Mutanten für die Versuche zur Untersuchung der Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes verwendet:

Für den Gibbon:

Up-Primer 5' G GGA ATT TTC GAC CAG **GCA** ACG AGC ACT GGT GGG G 3'
I417A

Dw-Primer 5' C CCC ACC AGT GCT CGT **TGC** CTG GTC GAA AAT TCC C 3'
I417A

Up-Primer 5' G GGA ATT TTC GAC CAG **TTT** ACG AGC ACT GGT GGG G 3'
I417F

Dw-Primer 5' C CCC ACC AGT GCT CGT **AAA** CTG GTC GAA AAT TCC C 3'
I417F

Für den Schimpansen:

Up-Primer 5' G GGA ATT TTC GAC CAG **GCA** ATG AGC ACT GGT GGG G 3'
I417A

Dw-Primer 5' C CCC ACC AGT GCT CAT **TGC** CTG GTC GAA AAT TCC C 3'
I417A

2.1.5 Nukleotid- und Proteinsequenzen

Die folgenden Sequenzen wurden aus der NCBI- und ENSEMBL-Genomdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ensembl.org>) extrahiert:

Spezies	Enzym-Isoform	Nukleotidsequenz	Proteinsequenz
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	ALOX5a	XM_005156644.2	ENSDARG00000057273; NP_001290191.1
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	ALOX15	NM_001140.3	NP_001131.3
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	ALOX5	NM_000698.3	NP_000689.1
<i>Mus musculus</i> (Maus)	ALOX15	NM_009660.3	NP_033790.3
<i>Mus musculus</i> (Maus)	ALOX5	NM_009662.2	NP_033792.1
<i>Nomascus leucogenys</i> (Gibbon)	ALO15	XM_003277854.1	ENSNLET00000022140.1
<i>Pan troglodytes</i> (Schimpanse)	ALOX15	XM_003315313.2	XP_003315361.1

Die Sequenzen (ALOX12, ALOX12B, ALOX15, ALOX15B, ALOX5, ALOX5AP, ALOXE3, ALOXe12, COX-1/PTGS1, COX-2/PTGS2, CLTR1, CLTR2, LTA4H, LTB4R, LTB4R2, LTC4S) des *H. neanderthalensis* und *H. denisovan* wurden aus der UCSC-Genomdatenbank (<http://genome.ucsc.edu/>) extrahiert.

2.1.6 Bakterienstämme

XL-1 Blue	Stratagene (La Jolla, USA)
BL21(DE3)pLysS	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

2.1.7 Eukaryontische Zellstämme

HEK-293	LGC Standards (Wesel, Deutschland)
---------	------------------------------------

2.1.8 Geräte

2050 MIDGET Electrophoresis Unit	Hofer (Sulzbach, Deutschland)
BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Fastblot B44	Biometra (Göttingen, Deutschland)
HPLC-Autoinjektor	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
HPLC-CP-Säule: Chiralcel OB (12-HETE)	Daicel Chem. (Tokyo, Japan)
HPLC-CP-Säule: Chiralcel OD (15-HETE)	Daicel Chem. (Tokyo, Japan)
HPLC-Diodenarray-Detektor 1040 A	Hewlett-Packard (Berlin, Deutschland)
HPLC-RP-Säule: Nucleosil C18	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
HPLC-SP-Säule: Zorbax-SIL	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Inkubationsschüttler	Gallenkamp (Loughborough, Großbritannien)
Inkubationsschüttler	Infors HT (Einsbach, Deutschland)
Laminarflow/Sterilwerkbank	Antares (Haag, Deutschland)
Liquid Chromatograph LC-10AD	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Niederspannungs-Power Pack P25	Biometra (Göttingen, Deutschland)

Pipet-aid XL	Drummond Sci. (Philadelphia, USA)
PS500XT DC Power Supply	Hofer (Sulzbach, Deutschland)
Protran BA85 Nitrozellulosemembran	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Sonifier W-250 D/Ultraschall-Desintegrator	Branson (Dietzenbach, Deutschland)
Sonorex Super RK 512 H	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Sorvall Evolution RC Superspeed Centrifuge	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
Sorvall SS-34-Rotor	Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
TL100 Tabletop-Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten erfolgten nach Standardprotokollen aus der Literatur bzw. entsprechend der Herstellerangaben. Hierzu zählen

- die (RT-)PCR
- die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen
- die Agarosegelelektrophorese
- die Präparative und analytische DNA-Präparation
- die Ligation
- die punktgerichtete Mutagenese und Transformation mit E. coli.

2.2.1 Klonierungen und Ligationen

2.2.1.1 Klonierung der Zebrafisch-ALOX5

Die initiale Klonierung der zbfALOX5 erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter der AG Kühn. Dafür wurde aus dem Homogenisat einer kommerziellen Zebrafisch-Präparation (ImaGenes GmbH, Berlin, Deutschland; Cat. No. LOC573013) GesamtmRNA extrahiert und revers transkribiert. Aus der gewonnenen cDNA wurde unter Verwendung spezifischer Primer gezielt die ALOX5 mRNA per PCR amplifiziert und in den Vektor TOPO 2.1 subkloniert. Die dazu verwendeten Primer wurden anhand der

Zebrafisch-Datenbanksequenz (XM_005156644.2) ermittelt und durch BioTez (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Durch die Verwendung einer *Taq*-Polymerase, welche die Bildung eines 3'-Poly-A-Endes fördert, wird die Klonierung in den TOPO-Vektor erleichtert. Da Klonierungsvektoren auf Grund ihrer Struktur nicht für eine effiziente Expression rekombinanter Proteine geeignet sind, erfolgte zur rekombinanten Expression des Enzyms eine Umklonierung in den Expressionsvektor pET-15b. Dieses Konstrukt wurde durch Eurofins MWF-Operon (Ebersberg, Deutschland) komplett sequenziert und die Klonierungsartefakte wurden an die genannte Datenbanksequenz der zbfALOX5 durch ortsgerichtete Mutagenese angepasst.

2.2.1.2. Umklonierung der Zebrafisch ALOX5 vom pET-15b in den pRSET-A-Vektor

Um eine bessere Ausbeute bei den prokaryontischen Expressionen zu erzielen, wurde die im Vektor pET-15b vorliegende zbfALOX5 in den Vektor pRSET-A umkloniert. Dieser enthält den Phagen-Promotor T7, der nach Induktion der T7-RNA-Polymerase mittels IPTG eine hohe Expressionsrate des Inserts ermöglicht. Außerdem ist dem Insert ein N-terminaler Polyhistidin-*tag* vorgeschaltet, welcher mit der LOX als Fusionsprotein exprimiert wird. Dadurch wird einerseits die einfache Aufreinigung des Proteins per Affinitätschromatografie und andererseits dessen Detektion im Western Blot durch einen Anti-His-*tag*-Antikörper ermöglicht. Für die Umklonierung der zbfALOX5 durch präparative Plasmidspaltung musste zuerst per ortsgerichteter Mutagenese (siehe 2.2.2) die fehlende *Xho*-I-Restriktionsschnittstelle vor das Startcodon der zbfALOX5 im pET-15b eingefügt werden.

Daraufhin erfolgte ein Restriktionsverdau der zbfALOX5 im pET-15b und eines leeren pRSET-A Vektors mittels *Xho* I und *Hind* III. Es folgte eine präparative Agarose-Gelelektrophorese mit Gelextraktion des Inserts zbfALOX5 und des Leervektors mit Hilfe des GeneJET Gel extraction kits (Thermoscientific - Dreieich, Deutschland). Die Ligation dieser extrahierten DNA-Fragmente erfolgte mittels des LigaFast™ rapid DNA Ligation-Kits von Promega (Madison, USA).

2.2.1.3. Umklonierung der Zebrafisch ALOX5 in pRSET-A in pcDNA 3.1

Für die Expressionen im eukaryontischen Expressionssystem musste eine Umklonierung der im pRSET-A vorliegenden zbfALOX5 und ihrer Mutanten in einen dafür geeigneten Vektor, den pcDNA 3.1, erfolgen. Hierzu bediente man sich ebenfalls der

präparativen Plasmidspaltung und Ligation nach dem oben beschriebenen Schema. Als Restriktionsendonukleasen dienten ebenfalls *Xho I* und *Hind III*.

2.2.1.4. Klonierung der Schimpansen-ALOX15 und der Gibbon-ALOX15 in pET-28b

Die initiale Klonierung der Schimpansen-*ALOX15* in den TOPO-Vektor erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter der AG Kühn. Dafür erfolgte zunächst die Isolation von Gesamt-RNA mittels des Blut-RNA-Kits von Qiagen (Venlo, Niederlande) aus Schimpansenblut. Anschließend wurden alle RNA-Moleküle durch reverse Transkription in die entsprechenden cDNAs umgeschrieben. Die *ALOX15*-cDNA wurde unter Verwendung spezifischer Amplifizierungsprimer mittels PCR gezielt vervielfacht und nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in den TOPO-Vektor einkloniert. Für die Umklonierung der *ALOX15* in den gewünschten Expressionsvektor pET-28b musste durch eine stumme Mutation eine interne *Hind III*-Schnittstelle, welche sich in der *ALOX15*-Sequenz des Schimpansen befand, eliminiert werden. Dies geschah durch einen gezielten Nukleotidaustausch (siehe 2.2.2), der zwar die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym verändertete, nicht aber die Aminosäuresequenz des Enzyms beeinflusste.

Die *ALOX15* des Gibbons wurde anhand der in der Datenbank PubMed/Medline veröffentlichten Sequenz (XM_003277854.1) von der Firma Biomatik durch chemische Totalsynthese hergestellt. Bei der Synthese wurde vor dem Startmethionin eine *Sal I*- und nach dem Stopkodon eine *Hind III* Stelle eingefügt. Nach Spaltung des gelieferten Plasmids mit *Sal I* und *Hind III* wurde das resultierende Restriktionsfragment in den Expressionsvektor pET-28b eingefügt. Zum Ausschluss von Sequenzierungs- und Klonierungsartefakten sind beide Plasmide durch Eurofins MWG-Operon (Ebersberg, Deutschland) komplett sequenziert und mit der Datenbanksequenz abgeglichen worden.

2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurden DNA-Primer konstruiert, die am gewünschten Codon einen *mismatch* aufweisen, sich jedoch trotzdem an die DNA anlagern und durch die *Pfu* Turbo Polymerase transkribiert werden. Der PCR-Ansatz für die Mutagenese erfolgt nach Herstellerangaben (QuickChange, Stratagene, La Jolla, USA) und enthält nach einer Anzahl von durchlaufenen PCR-Zyklen eine Mischung von DNA-Doppelsträngen maternalen Herkunft und solchen, die die gewünschte Mutation

enthalten. Letztere unterscheiden sich von den parentalen Strängen durch ihre Eigenschaft, nicht wie die ursprünglich bakteriell synthetisierte DNA methyliert zu sein. Durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn-I* kann gezielt nur die methylierte Mutterstrang-DNA, welche die gewünschte Mutation nicht enthält, verdaut werden. Dieser Ansatz steht anschließend zur Transformation von kompetenten Bakterien zur Verfügung.

2.2.3 Transformation von *E. coli*

Für die weitere molekulargenetische Verwendung der DNA-Konstrukte (Kontrollspaltung und Agarose-Gelelektrophorese, Sequenzierung, DNA-Aufreinigung etc.) ist eine Vervielfältigung der DNA nötig. Für diesen Zweck erfolgt eine Transformation der DNA mit XL1-blue kompetenten *E. coli*-Bakterien. Dafür werden 8 µl der mit *Dpn-I* gespaltenen DNA zu ca. 100 µl Bakterien gegeben und für 20-30 min. auf Eis inkubiert. Daraufhin folgt ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 45°C und weitere 3 min. Inkubation auf Eis. Dadurch wird die als Plasmid mit Ampicillin-Resistenz vorliegende DNA in die Bakterien aufgenommen. Diese werden auf LB-Agarplatten mit 100 mg/ml Ampicillin (Amp) als Selektionsfaktor ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Amp dient der Selektion jener Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen haben. Am nächsten Tag können Klone isoliert und als Flüssigkultur mit ebenfalls 100 mg/ml Amp angezüchtet werden.

Für die rekombinante Expression der Proteine bereits molekulargenetisch gesicherter DNA erfolgt die Transformation ebenfalls nach dem oben beschriebenen Protokoll mit kompetenten *E. coli*-Bakterien des Stamms BL21LysS. Diese enthalten zusätzlich ein bakterieneigenes Plasmid mit einer Chloramphenicol(CA)-Resistenz. Die Selektion erfolgt demnach mit Amp und CA.

2.2.4 Prokaryontische Expressionen mit *E. coli*

2.2.4.1 Expression der Zebrafisch-ALOX5 in *E. coli*

Nach Transformation von BL21LysS-*E. coli* mit dem rekombinanten Expressionsplasmid werden die Bakterien vereinzelt und auf einer Agarplatte mit je 100 mg/ml der Antibiotika Amp (Amp-Resistenz auf dem Vektor pRSET-A) und Chloramphenicol (mitgebrachte Resistenz der kompetenten Zellen BL21LysS) als Selektionsmarker

angezüchtet. Am nächsten Morgen werden einzelne Klone von der Agar-Platte isoliert und eine 1 ml-Vorkultur mit LB-Medium und den gleichen Antibiotika angesetzt. Es folgt eine Inkubationszeit von 6h bei 37°C unter ständigem Schütteln. Danach wird entsprechend der Informationen des Herstellers des EnPresso-Expressionssystems je 50 ml steriles Wasser mit den Vorkulturen beimpft. Weitere Zugaben sind 100 µl 1:20 verdünntes Antifoam 204 gegen Schaumentwicklung in der Kultur, EnBase-Nährmediumtabletten und 50 µl EnZ l'm-Lösung (600 U/L). Diese enthält sterilfiltrierte Enzyme, welche während der folgenden Inkubationszeit limitiert Glucose aus den gelösten Polysacchariden freisetzen, die im Nährmedium enthalten sind. Die Hauptkultur wird über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert, sodass nach ca. 18 Stunden einer Zelldichte von OD₆₀₀ (photometrische Messung bei 595 nm) um die 14 erreicht wird. Dann erfolgt die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins mit 50 µl 1 M IPTG und die Zugabe einer Booster-Tablette für die Regulation des pH-Wertes in der Kultur sowie weiteren 250 µl EnZ l'm. Während einer weiteren 24h dauernden Inkubationsperiode (bei RT und 250 rpm) wird das rekombinante Protein synthetisiert. Mit diesem enzymkontrollierten Prinzip der Proteinexpression sollen Sauerstoffdepletion und pH-Entgleisungen in den Kulturen besser kontrolliert werden, sodass hohe Zelldichten und Zellproduktivitäten erreicht werden können (Krause et al., 2010). Nach Beendigung der Kultivierung lässt sich eine Zelldichte von OD₆₀₀ um die 12-24 sowie mittels Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) eine Gesamtproteinkonzentration von 20-50 mg/ml im Zelllysate herstellen. Dieses erhält man durch Aufarbeitung der Kulturen. Dafür werden die Ansätze nach Beendigung der Inkubationszeit zunächst bei 4°C und 4500 rpm für 15 min zentrifugiert und die Pellets in je 4 ml PBS resuspendiert (Waschschritt). Anschließend werden die Zellmembranen mittels einer Ultraschallsonde zerstört, sodass man ein Zelllysate erhält. Bei 14.000 rpm und 4°C werden die Zelltrümmer für 30 min. abzentrifugiert. Aus den klaren Lysateüberständen wurde das rekombinante ALOX5-Protein anschließend mittels Affinitätschromatographie (siehe 2.2.6) aufgereinigt.

2.2.4.2 Expression der Primaten-ALOX15-Orthologe in E. coli

Die Expression der Primaten-ALOX15 erfolgte analog zur Expression der zbfALOX5, jedoch wurde als Selektionsmarker für erfolgreich transformierte Bakterienstämme 100 mg/l Kanamycin statt Ampicillin verwendet, da das Expressionsplasmid pET28b der ALOX15 ein Resistenzgen für Kanamycin enthält. Die Proteinausbeute der ALOX15-Expressionen war stets besser, als die der ALOX5-

Expressionen, was den unterschiedlichen biologischen Funktionen geschuldet sein könnte. Durch die relativ hohen Expressionsraten enthält der Zellysatsüberstand eine hohe Konzentration gelösten *ALOX15*-Proteins und kann ohne Konzentrierung für weitere analytische Methoden, wie z.B. Western Blots (siehe 2.2.7) oder Aktivitätsassays (siehe 2.2.9) verwendet werden.

2.2.5 Eukaryontische Expressionen der zbfALOX5 in HEK293-Zellen

Die eukaryontischen Expressionen für die zbfALOX5 erfolgte in der humanen Zelllinie HEK 293 (Human Embryonic Kidney), welche ein Transformationsprodukt menschlicher embryonaler Nierenzellen mit dem Adenovirus 5 darstellen. Es handelt sich dabei um hypotriploide Epithelzellen, die adhärent wachsen und tumorigen sind.

Einen Tag vor der Transfektion der Zellen mit dem rekombinanten Plasmid erfolgt die Einsaat von je $2-4 \times 10^5$ Zellen pro 2 ml Kompletmedium in 6-well-Platten. Die Zellen sollen sich für die Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und idealerweise zu 50-70% konfluent sein. Die Transfektion erfolgt am darauffolgenden Tag nach einem Mediumwechsel mit einem zuvor in serumfreiem Medium hergestellten LT1/DNA-Komplex mit einem Mischungsverhältnis von 6:2 (6 μ l LT1 und 2 μ g DNA in einem Endvolumen von 200 μ l). Die Zellen werden bei 37°C für 48h inkubiert und nach einem Waschschrift in 500 μ l PBS abgelöst und für einen Aktivitätsassay (siehe 2.2.9) verwertet.

2.2.6 Enzymaufreinigung

Durch eine Affinitätschromatographie an einer mit Cobalt-Ionen beladenen chromatographischen Matrix besteht die Möglichkeit, Multi-His-Tag-Fusionsproteine aufzureinigen. Dies erfolgte in dieser Arbeit für die in *E. coli* exprimierte rekombinante *ALOX5*. Dafür wurde Zellysats-Überstand einer 50 ml-Flüssigkultur für 45 min in einem Überkopfschüttler bei 4°C mit 0,4 ml Cobalt-Sepharose inkubiert. An diese binden sich die rekombinanten Proteine mit ihrem Multi-His-Tag-Peptid. Anschließend wird eine chromatographische Säule unter Fluss mit der beladenen Cobalt-Sepharose gepackt. In zwei Waschschriften mit je 0,8 ml Waschpuffer ohne Imidazol werden nur schwach gebundene Proteine von der Cobalt-Sepharose abgelöst und gewaschen. Anschließend werden die stark gebundenen rekombinanten Proteine mittels Imidazol-

haltigem Puffer (250 mM) in fünf Elutionsfraktionen (E1-E5) à 0,2 ml eluiert. Zur Kryoprotektion wird so viel Glycerin zugegeben, dass eine Endkonzentration von 10% eingestellt wurde. Die Aufreinigung erfolgt im Kühlraum bei 3°C und die Lagerung der Enzyme bei -80°C.

2.2.7 Western Blot

Der Western Blot dient der Quantifizierung der ALOX5-Expression unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Dazu bedarf es zuerst einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Größentrennung der enthaltenen Proteine (Laemmli, 1970). Dafür wird Zelllysat oder eine Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie in 4-fach konzentriertem Probenpuffer mit reduzierendem β -Mercaptoethanol aufgenommen, 5 min bei 95°C erhitzt und auf ein 10%-Polyacrylamidgel (für Proteine um die 70 kDa geeignet) aufgetragen. Anschließend wird ein elektrisches Feld angelegt, welches die denaturierten Proteine bei 90-120 V nach ihrer Molekülmasse auftrennt. Anschließend kann das Gel mit Commassie angefärbt oder im Western Blot weiterverarbeitet werden. Dafür wird in einer Blotkammer ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld angelegt, durch welches die Proteine 1h bei 10 V auf eine in Richtung der Anode befindliche Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Diese lässt sich temporär mit 0,2% Ponceau S anfärben und gibt Aufschluss über das in der Probe vorhandene Gesamtproteinmuster. Vor der Immundetektion werden die freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran durch Inkubation mit 5% Magermilch/1x PBS/Tween 20 (0,1%) blockiert. Anschließend wird die Blotmembran mit einem Anti-His-HRP-Antikörper (1:5.000) in 5% Magermilch für eine Stunde bei RT inkubiert. Dieser Antikörper bindet mit hoher Affinität die in den Enzympräparaten enthaltenen His-tag Fusionsproteine und enthält selbst eine konjugierte Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Dieses Markerenzym katalysiert bei Behandlung des Blots mit *Western Lightning Plus*-Reagenz eine Chemilumineszenzreaktion, bei der Luminol oxidiert und Licht im blauen Spektralbereich (425 nm) emittiert wird. Dieses lässt sich im Fotolabor durch Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak) oder mit einem Imager digital visualisieren. So kann selektiv das LOX-Protein in einer komplexen Proteinmischung nachgewiesen werden. Da die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional der LOX-Menge ist, kann durch densitometrische Auswertung des Blots die Mengen an exprimierten LOX-Proteins quantifiziert werden.

2.2.8 Membranbindungsassay

Der in dieser Arbeit angewandte Membranbindungsassay quantifiziert die Membranbindungseigenschaften von LOXn. Dafür wurden als Multi-His-Tag-Fusionsproteine exprimierte *ALOX15*-Isoformen verwendet. Vor den Membranbindungsexperimenten wurde zunächst die rekombinante *ALOX15* (2,2 μ M) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des LOX-Hemmstoffs ETYA für 5 min bei RT in CaCl_2 -haltigem HEPES-Puffer (pH 7.4) inkubiert. Die Hemmstoffkonzentration wurde so gewählt, dass im Vorinkubationsansatz ein molares Verhältnis zwischen *ALOX15* und ETYA von 1:5 und 1:50 eingestellt wurde. Anschließend wurden 15 μ l dieser Vorinkubationsansätze für weitere fünf Minuten bei RT mit 10 μ l einer 20 mg Protein/ml enthaltenen Suspension von Rinderherzmitochondrien als Modellmembranen inkubiert. Während dieser Inkubationszeit kann die *ALOX15* an die Membran binden. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 0,1 ml eines HEPES Puffers unterschichtet, der 500 mM Saccharose enthielt, und anschließend für 20 min bei 60.000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert. Der Sucrose-haltige Puffer diente als Dichtebarrriere, sodass der Überstand des Inkubationsansatzes durch Zentrifugation sicher vom Membranpellet abgetrennt werden konnte. So lassen sich die Membranpartikel mit den gebundenen LOXn vom Überstand abgrenzen, welcher die nicht membrangebundenen LOX-Anteile enthält. Der Überstand der Zentrifugationsproben wurde abpipettiert und die Proteine durch Zugabe von 200 μ l 20%iger Trichloressigsäure präzipitiert. Um die zur erfolgreichen Proteinfällung notwendige Gesamt-Proteinkonzentration zu erreichen, erfolgte zuvor die Anreicherung des Überstands mit 75 μ l einer 0,3 mg/ml Ovalbumin-Lösung. Das Proteinpräzipitat wurde nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und das Überstand-Pellet, ebenso wie das Membranpellet, in 4x-Probenpuffer mit reduzierendem β -Mercaptoethanol resuspendiert. Mit den vorbereiteten Proben erfolgte anschließend eine PAGE mit 10%igem SDS mit darauffolgendem Western-Blot, um die *ALOX15*-Verteilung zwischen Membranpellet und Membranüberstand zu quantifizieren. Die Quantität der unterschiedlich mit dem Hemmstoff ETYA behandelten LOXn im Membranpellet und im Überstand gibt Aufschluss darüber, inwiefern sich die durch ETYA induzierte Enzyminaktivierung auf die Membranbindungsfähigkeit der *ALOX15* auswirkt. Die Quantifizierung der Immunoblots erfolgte mithilfe des Programms Adobe Photoshop.

2.2.9 Aktivitätsassay

Der Aktivitätsassay stellt einen standardisierten Reaktionsansatz dar, in dem die zu untersuchende LOX unter definierten Umweltbedingungen mit einem Substrat inkubiert wird und ihre katalytische Aktivität ausüben kann. Die gebildeten Reaktionsprodukte können mittels HPLC quantifiziert werden, woraus sich die enzymatische Aktivität errechnen lässt (Produktmenge pro Zeiteinheit).

2.2.9.1 Aktivitätsassay der *zbfALOX5* aus prokaryontischer Expression

Die Aktivitätsmessungen der *ALOX5* erfolgten mit einem Aliquot von je 25 µl aufgereinigten LOX-Proteins in 450 µl PBS-Lösung, in der 0,4 mM Calciumchlorid (CaCl_2), 0,1 mM EDTA, 0,1 mM Adenosintriphosphat (ATP) und 1,4 µg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin (PC) enthalten waren. Die Reaktion wird mit Zugabe von 2,2 µl 33 mM AA gestartet und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur RT inkubiert. Daraufhin erfolgt die Reduktion der entstandenen H(p)ETEs mittels NaBH_4 zu den stabileren HETEs und die Ansäuerung des Testansatzes mit 50 µl Essigsäure auf einen pH-Wert von ca. 3,5. Durch die abschließende Zugabe von 500 µl Methanol (MeOH) werden die Proteine ausgefällt und der klare Überstand kann direkt zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte mittels HPLC eingesetzt werden.

2.2.9.2 Aktivitätsassay der *zbfALOX5* aus eukaryontischer Expression

Dieser Assay erfolgt analog zum unter 2.2.9.1. beschriebenen *ALOX5*-Aktivitätsassay. Allerdings fand die Zugabe von 2,2 µl AA und der Additiva (PC, CaCl_2 , ATP, EDTA) zu den in PBS resuspendierten HEK-Zellen (500 µl) statt. Die Reaktion beginnt mit der Homogenisierung der Zellen per Ultraschallsonde. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT werden die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren reduziert, der Ansatz angesäuert und die Proteine mittels Zugabe von 0,5 ml MeOH ausgefällt. Der klare Überstand der Proteinfällung wurde direkt für die HPLC Analyse verwendet.

2.2.9.3 Aktivitätsassay der *ALOX15* aus prokaryontischer Expression

Für die Aktivitätsmessungen der Primaten-*ALOX15*-Ortholge sind außer der Zugabe von AA keine weiteren Zusätze nötig. Die Reaktion wird mit Zugabe von 2,2 µl 33 mM AA (entspricht einer Endkonzentration des Substrats von 0,145 mM im Reaktionsansatz) zu

250 µl Lysatüberstand mit 250 µl PBS gestartet und der Ansatz für 15 min bei 30°C im Thermomixer inkubiert. Die Beendigung der Reaktion erfolgt durch Zugabe von NaBH₄, Ansäuerung mit Essigsäure und Proteinfällung (0,5 ml MeOH).

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Analyse des Produktspektrums mittels HPLC

Die Analyse der Enzymaktivität erfolgte durch die Quantifizierung der Oxygenierungsprodukte mittels *High Performance Lipid Chromatography* (HPLC). Nach erfolgtem Aktivitätsassay wird das Proteinpräzipitat abzentrifugiert und Aliquots des klaren Überstandes werden an einer Nucleosil C18-Säule von Macherey und Nagel in der *reverse-phase*-HPLC (Umkehrphasen-HPLC, RP-HPLC) mit einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Dabei können die verschiedenen Produktisomere aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten identifiziert und voneinander getrennt werden. Die verschiedenen HPLC-Trennprinzipien unterscheiden sich durch ihre Trennsäule und der Zusammensetzung des verwendeten Lösungsmittelgemisches. Letztere sind im Kapitel 2.1 näher aufgezeigt. So lässt sich in der RP-HPLC der relative Anteil von 5-, 8/12- und 15-HETE in einem komplexen Produktgemisch bestimmen. Da die Absorption bei 235 nm mit der Menge der HETEs korreliert, ist die Quantifizierung der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte durch Integration der chromatographischen Peaks möglich. Diese wurden in dieser Arbeit stets durch Subtraktion entsprechender Integrale der Negativkontrollen (nichtenzymatische Oxygenierungsprodukte, die bei der Lagerung der AA entstanden sind) korrigiert.

Um bestimmte Produkte mit anderen HPLC-Verfahren weiter analysieren zu können, wurden die Peaks der RP-HPLC präpariert. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum verdampft und die zurück gebliebenen HETEs wurden in Laufmittel aufgelöst, das für die anschließende HPLC-Methode geeignet war. Da 8- und 12-HETE in der RP-HPLC unter unseren analytischen Bedingungen ähnliche Retentionszeiten aufweisen, bedurfte es für die Differenzierung dieser beiden HETE-Isomere einer zusätzlichen Analyse mittels *straight-phase*-HPLC (Normalphasen-HPLC, SP-HPLC). Für dieses Verfahren wird eine Zorbax-SIL-Säule verwendet. So kann der relative Anteil von 8- und 12-HETE am gemeinsamen 8/12-HETE Peak der RP-HPLC getrennt quantifiziert werden.

Zur Ermittlung der R/S-Enantiomerenverteilung innerhalb der HETE-Peaks wurde die *chiral-phase*-HPLC (Chiralphasen-HPLC, CP-HPLC) eingesetzt. Für die Ermittlung der Enantiomerenverteilung von 5- und 8-HETE mussten die Positionsisomere zuvor mit Diazomethan methyliert werden. Die Trennung der Enantiomere erfolgte dann an einer Chiralcel OB-Säule von Daicel Chem. (Tokyo, Japan). Für die Enantiomerentrennung von 15-HETE ist der zusätzliche Methylierungsschritt nicht notwendig. Die CP-HPLC kann in diesem Fall ohne Methylierung an einer Chiralcel OD-Säule von Daicel Chem. (Tokyo, Japan) erfolgen.

2.3.2 Statistische Datenauswertung

Für die statistische Auswertung der Analysedaten erfolgten pro Enzymvariante je vier bis fünf voneinander unabhängige Expressionen mit jeweils zwei Aktivitätsmessungen pro Expression. Bei den Expressionen wurde stets ein Wildtyp-Enzym als Positivkontrolle mitexprimiert sowie bei den jeweiligen Aktivitätsassays eine weitere Positivkontrolle (aktives Enzym) und Negativkontrolle (Zugabe von PBS bei prokaryontischer Expression oder Lysat einer mock-Transfektion bei eukaryontischer Expression statt Enzym-Probe) durchgeführt. Vor den statistischen Auswertungen wurden von allen ermittelten Flächeneinheiten der Proben die Flächeneinheiten der jeweiligen Negativkontrollen subtrahiert, um Resultatsverfälschungen durch nichtenzymatisch entstandene Autoxidationsprodukte im Substrat auszuschließen. Es erfolgte die Bestimmung der relativen Anteile, Mittelwerte und Standardabweichungen mittels Microsoft Excel 2013 und nach Überprüfung der Varianzgleichheit zweier Stichproben mittels Levene-Test oder F-Test die Anwendung des zweiseitigen T-Tests für zwei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz (heteroskedatisch) mittels SPSS (IBM, Version 22). Bei einem p-Wert von $<0,05$ wird von statistischer Signifikanz ausgegangen.

2.4 Recherchestrategien

Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei systematische Recherchen im Zeitraum Oktober 2013 bis August 2014 zum Vorkommen möglicher Lipoxygenasesequenzen in Bakterien und in Archaeen erfolgt. Dafür wurde, wie im unten stehenden Flussdiagramm dargestellt ist (**Abb. 7**), mit dem Suchbegriff „lipoxygenase“ und der Beschränkung auf die Taxonomie-Gruppe „bacteria“ in unterschiedlichen Datenbanken nach möglichen, für Lipoxygenasen kodierenden Sequenzen recherchiert. Die durchsuchten Datenbanken

umfassten die NCBI-Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), die UniProt-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) und die EnsemblBacteria-Genomdatenbank (<http://bacteria.ensembl.org/index.html>) und lieferten zunächst 1091 Treffer. Die zahlreichen Ergebnisse dieser Suche wurden gesichtet und Gen- bzw. Proteinsequenzen mit der genauen Zuordnung zu einer LOX-Isoform (z.B. ALOX5), bzw. solche mit den Bezeichnungen „lipoxygenase“, „lipoxygenase-family“, „probable lipoxygenase“ und „putative lipoxygenase“ in die Liste der möglicherweise für LOXn kodierenden Sequenzen eingeschlossen.

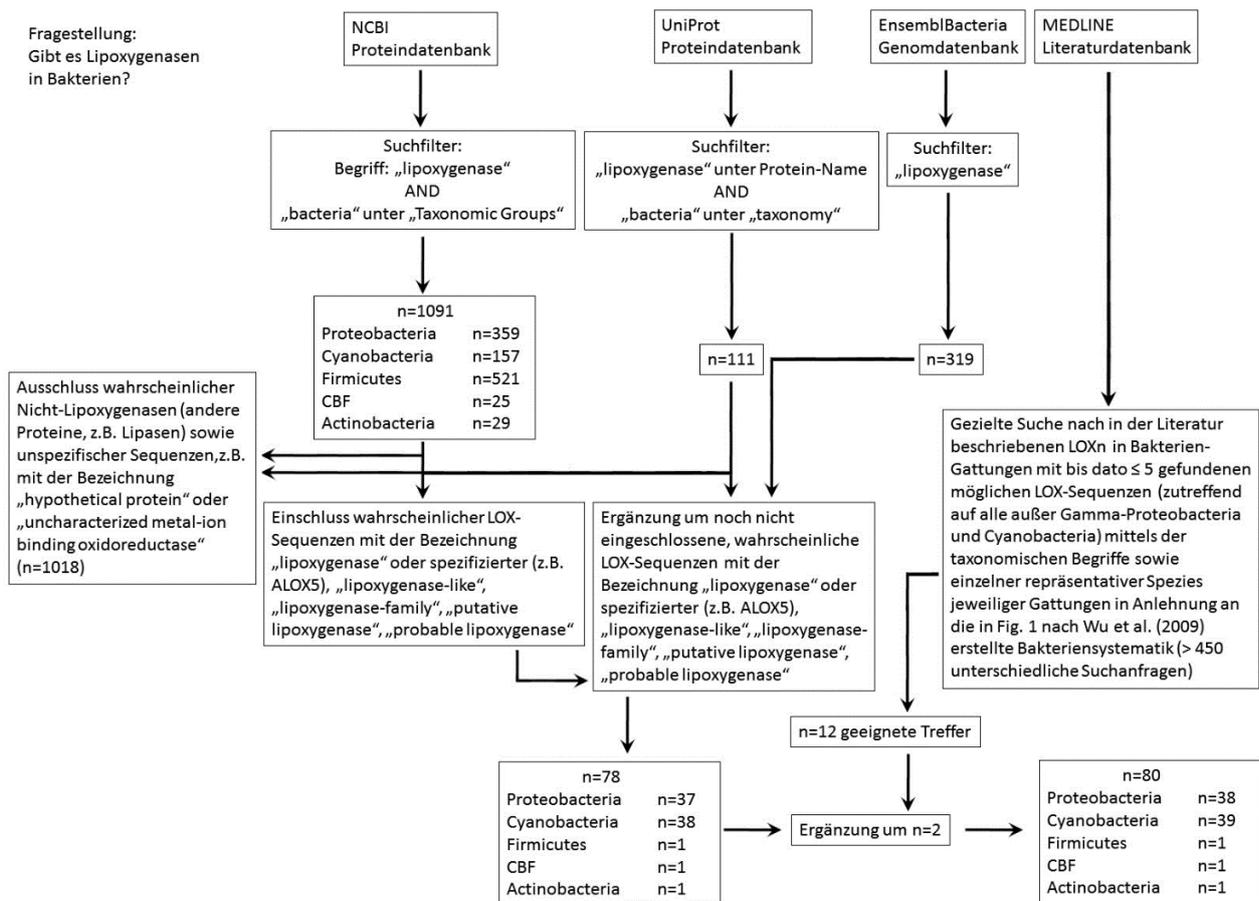


Abb. 7: Suchstrategie zum Vorkommen von Lipoxygenasen in Bakterien.

Unspezifischer bezeichnete Sequenzen mit den Bezeichnungen „uncharacterized metal-ion binding oxidoreductase“ und „hypothetical protein“ wurden aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit der falsch positiven Einteilung als LOX von der Registrierung als mögliche LOX ausgeschlossen. Außerdem wurde die Literatur in MEDLINE über PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) zusätzlich nach möglichen bakteriellen Lipoxygenasen durchsucht. Dafür wurde mittels des Begriffs „lipoxygenase“ mit dem Booleschen Operator „AND“ und jeweils den taxonomischen Begriffen

„Alphaproteobacteria“, „Betaproteobacteria“, „Deltaproteobacteria“, „Epsilonproteobacteria“, „Acidobacteria“, „Acuificae“, „Bacteroidetes“, „Chlorobi“, „Chlamydiae“, „Verrucomicrobia“, „Planctomycetes“, „Spirochaetes“, „Actinobacteria“, „Cyanobacteria“, „Chloroflexi“, „Firmicutes“, „Tenericutes“, „Fusobacteria“, „Synergistetes“, „Thermotogae“, „Deinococcus“ und „Thermus“, sowie allen in Fig. 1 nach Wu et. al. (Wu et al., 2009) ausgewählten repräsentativen Spezies der jeweiligen Bakterien-Subgruppen, nach möglichen Beschreibungen von LOXn in der Literatur oder möglichen Verweisen auf solche recherchiert. Diese Suche ergab 12 geeignete Veröffentlichungen, welche auf bakterielle Lipoxygenasen hindeuten. Die Ergebnisse aller Recherchen wurden vereint und eine Liste mit Bakterienspezies, welche mögliche für LOXn kodierende Sequenzen enthalten, erstellt. Bei unterschiedlichen Bezeichnungen derselben Genom-Sequenzen bestimmter Spezies in unterschiedlichen Datenbanken wurde für die Darstellung die am meisten spezifizierte Bezeichnung ausgewählt. Nach dem gleichen Suchschema wurden dieselben Protein- und Genomdatenbanken mittels des Begriffs „lipoxygenase“ und der Beschränkung auf die taxonomische Gruppe „Archaeen“ sowie die Literaturdatenbank MEDLINE über PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) mittels der Suche „lipoxygenase AND archaea“ nach möglicherweise für LOXn kodierenden Sequenzen in der Gruppe der Archaeen durchsucht. Diese Suchen ergaben insgesamt drei Treffer für mögliche LOXn in einer Spezies und bedurften keiner systematischen Organisation.

3 Ergebnisse

3.1 Bakterielle Lipoxygenasen

Die systematische Recherche nach möglichen Bakterien-Lipoxygenasen in den Protein- und Genomdatenbanken EnsemblBacteria, UniProt und NCBI Protein sowie der Literaturdatenbank MEDLINE lieferte nach der Selektion geeigneter Treffer (siehe 2.4) die in der folgenden Abbildung tabellarisch aufgezeigten Bakterienspezies mit möglichen Lipoxygenase-Sequenzen (**Abb. 8**). Die Organisation gefundener Treffer erfolgte nach der Bakterienklassifikation in die fünf Gruppen der *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* und die *CFB-Gruppe* (*Bacteroidales*, *Flavobacteriales*, *Cytophagales* und *Sphingobacteriales*). Insgesamt konnten 80 mögliche LOX-Sequenzen in allen durchsuchten Datenbanken gefunden werden. Im Hinblick darauf, dass bis dato ca. 13.000 Bakterien-Genome sequenziert und bei der Recherche nach möglichen LOX-Sequenzen berücksichtigt worden sind, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in weniger als 1% der bakteriellen Genome potentielle LOX-Gene vorhanden sind. Wenn man davon ausgeht, dass bei diesen Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch falsch positive Treffer vertreten sind, wird der relative Anteil LOX enthaltender bakterieller Genome noch geringer. Diese Daten deuten darauf hin, dass LOXn für Bakterien keine zum Überleben notwendigen Enzyme zu sein scheinen. 96% der gefundenen möglichen Lipoxygenase-Sequenzen sind den beiden Gruppen der *Proteo-* und *Cyanobacteria* zuzuordnen. In den Gruppen der *Firmicutes*, *Actinobacteria* und *CFB* konnte jeweils nur eine potentielle LOX-Sequenz gefunden werden. Unter diesen Bakterienspezies befindet sich interessanterweise *Bacillus cereus*, der beim Menschen Lebensmittelvergiftungen hervorrufen kann. Die Suche bei Proteobacterien lieferte 38 Treffer für LOX-ähnliche Sequenzen, die bei näherer Bezeichnung am ehesten als mögliche ALOX15-Orthologe klassifiziert werden. Darunter befindet sich der mit opportunistischen Infektionen assoziierte humanpathogene Erreger *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser enthält mehrere potentielle LOX-Sequenzen, die zum Teil als mögliche ALOX15-Orthologe klassifiziert werden können, und eine experimentell charakterisierte LOX-Isoform, die Linolsäure in 13(S)-H(p)ODE umwandelt (Lu et al.,

2013). Unter der Vielzahl von Cyanobakterien enthalten ebenfalls nur wenige Spezies potentielle LOX-Sequenzen.

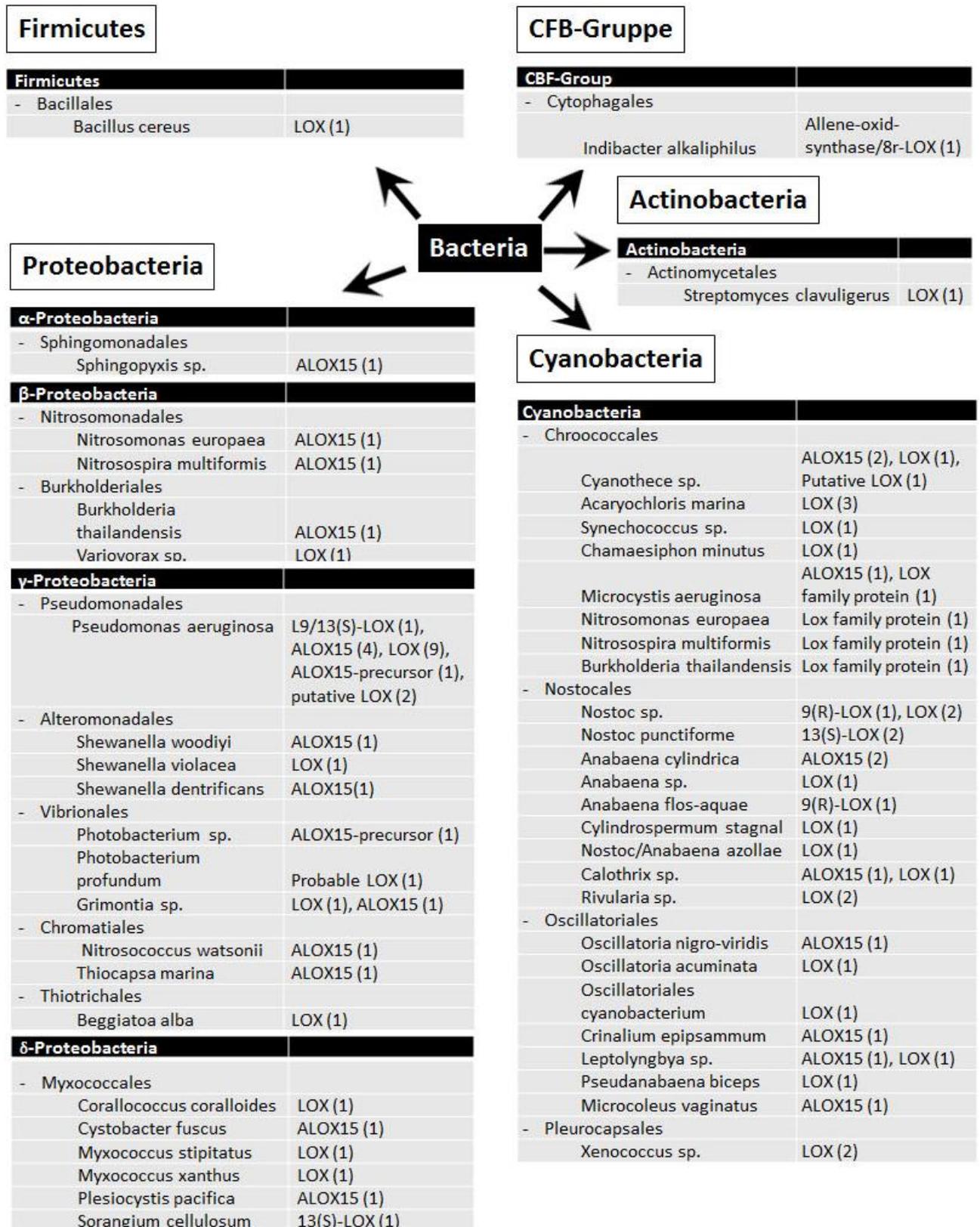


Abb. 8: Mögliche bakterielle Lipoxygenasen.

Experimentelle Untersuchungen der LOX des *Cyanobacteria*-Phylum *Nostoc sp.* weisen diese als Linolsäure-9(R)-lipoxygenierende Isoform aus (Andreou et al., 2008). Die Charakterisierung zweier LOXn von *Nostoc punctiforme* zeigten hingegen Pseudomonas-ähnliche 13(S)-Lipoxygenaseaktivitäten (Koeduka et al., 2007). Auch die LOX der Cyanobakterien-Spezies *Anabaena flos-aque* ist experimentell charakterisiert worden. Diese zeigt allerdings substratabhängig unterschiedliche Positionsspezifitäten (Wang et al., 2014b). Bei Anaerobiern sind LOXn verständlicherweise nicht nachweisbar, da der für die Lipoxygenasereaktion notwendige Sauerstoff für diese Spezies toxisch ist.

3.2 Lipoxygenasen in Archaeen

Mithilfe der oben beschriebenen Suchstrategie, die bei der systematischen Recherche nach bakteriellen Lipoxygenasen zur Anwendung kam, wurde in den Datenbanken auch nach möglichen LOX-Sequenzen in der Domäne der Archaeen gesucht. Diese Suche ergab insgesamt drei Treffer für LOX-ähnliche Sequenzen in der Spezies *Methanococcus voltae*. Ob diese Sequenzen allerdings für funktionelle LOXn kodieren, kann auf der Basis der Sequenzdaten nicht mit Sicherheit gesagt werden. Dazu müssten die entsprechenden Enzyme als rekombinante Proteine exprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert werden.

Zsfg.: Obwohl in verschiedenen Bakterienspezies LOX-kodierende Gene nachgewiesen werden konnten und die enzymatischen Eigenschaften ausgewählter bakterieller LOXn charakterisiert worden sind, ist deren Verbreitung in dieser Domäne des irdischen Lebens begrenzt. Die Datenbankrecherchen deuten darauf hin, dass LOXn nur in weniger als 1% aller Bakteriengenome vorkommen. Bei Archaeen ist die Vorkommensrate noch geringer.

3.3 Charakterisierung der *zbfALOX5*

Der Zebrafisch (*D. rerio*) ist ein Modellorganismus für Vertebraten und stellt aufgrund der Eigenschaften seiner Embryonen (Lichtdurchlässigkeit, extrakorporale Entwicklung) ein geeignetes Modell für die Erforschung der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren dar. 2013 wurde das Zebrafischreferenzgenom publiziert und ein Vergleich mit dem humanen Genom zeigte, dass ca. 70 % der humanen Gene mindestens ein orthologes Gen im Genom des Zebrafisches haben (Howe et al., 2013). Unter diesen befindet sich auch eine große Anzahl von Genen, die für die Biosynthese (COX- und

LOX-Isoformen) und die Wirkung (Eikosanoidrezeptoren) von Eikosanoiden verantwortlich sind. Diese Daten deuten darauf hin, dass Eikanoide im Zebrafisch biologisch bedeutsam zu sein scheinen. Trotzdem ist unser Wissen über die Rolle von Eikosanoiden in diesem Modellorganismus noch sehr lückenhaft. Deshalb haben wir zu Beginn unserer Untersuchungen die Frage gestellt, ob das Schlüsselenzym der Leukotrienbiosynthese, die *ALOX5*, beim Zebrafisch exprimiert wird und welche enzymatischen Eigenschaften dieses Enzyms im Vergleich zum humanen Ortholog besitzt. Zu Beginn der Arbeiten wurde mittels der Begriffe „zebrafish AND lipoxygenase“ zunächst die Literatur in MEDLINE über PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) nach bereits beschriebenen Lipoxygenasen des Zebrafischs durchsucht.

Bezeichnung	Datenbankeintrag	Chr.	Orthologie (Protein)
zbfALOX5a / zbfLOX2	ENSDARG00000057273; NP_001290191.1	13	wahrscheinlich ALOX5, höchste Homologien zu humALOX5 (74,5%) und mouALOX5 (73,9%)
zbfALOX5b.1	ENSDARG00000043085; XP_009289657.1	15	wahrscheinlich ALOX5, höchste Homologien zu zbfALOX5b.2 (85,4%), -5b.3 (83,9%) und -5a (21,5%), humALOX5 (19,3%) und mouALOX5 (19,1%)
zbfALOX5b.2	ENSDARG00000043089; NP_001038796.1	15	wahrscheinlich ALOX5, höchste Homologien zu zbfALOX5b.1 (85,4%), -5b.3 (83,9) und -5a (22,8%), bzw. humALOX5 (20,2%) und mouALOX5 (20,2%)
zbfALOX5b.3	ENSDARG00000073781; NP_001018414.1	15	wahrscheinlich ALOX5, höchste Homologien zu zbfALOX5b.1 (83,9%), -5b2 (82,8%) und -5a (20,3%), bzw. hum- und mouALOX5 (19,4%)
zbfLOX1 („zbfALOX12“)	ENSDARG00000069463; NP_955912.1	7	12S-LOX (Jansen et al., 2011), höchste Homologie zu hum- (17,9%), zbf- (17,6%) und mouALOX5 (17,3%)
zbfLOX	ENSDARG00000073781; XP_009293707.1	21	unklar, mglw. Ortholog zu epidermaler LOX, höchste Homologien zu mouALOX12e (8,6%), humALOX15 (8%), -15B (7,5%), mouALOX8 (7,5%) und zbfhd1a (7,3%)
zbfLOX_novel	ENSDARG00000016789; NP_001070814	21	wahrscheinlich 12- oder 15-LOX, höchste Homologien zu humALOX12 (26,5%), humALOX15 (23%) und mouALOX12e (21,8%). Hinweise auf Linolsäure-13S-LOX-Aktivität (?)
zbfhd1a	ENSDARG00000094738; XP_009293408.1	21	unklar, höchste Homologien zu zbfhd1b (15,2%), -ALOX12 (7,6%), -eLOX (7,3%), -ALOX5b.1 (7%), -5b.2 (6,8%), bzw. humALOX12 (6,6%), -15B (6,5%), zbfALOX5b.3 (6,4%)
zbfhd1b	ENSDARG00000074638; XP_001920640.3	8	unklar, höchste Homologien zu zbfhd1a (15,2%), -ALOX5a (8,6%), hum- sowie mouALOX5 (beide 7,6%) und humALOX15 (7,3%)

Tab. 1: Übersicht über Lipoxygenasen des Zebrafischs. In Anlehnung an die Übersicht der Zebrafisch-LOX-Sequenzen aus dem Review von Horn et al. (2015) wurden die Ergebnisse der oben beschriebenen Recherche tabellarisch dargestellt. Es ist jeweils der Datenbankeintrag der Zebrafisch-Genomdatenbank von Ensembl und des NCBI, sowie die Nummer des Chromosoms und die mögliche bzw. als solche erwiesene Orthologie mit entsprechenden prozentualen Homologien zu anderen Isoformen angegeben.

Diese Suche lieferte ein bereits beschriebenes Gen (zbfLOX1), das für eine 12(S)-lipoxygenierende Zebrafisch-Lipoxygenase kodiert (Jansen et al., 2011). Anschließend wurde in der Genomdatenbank ENSEMBL (Cunningham et al., 2015) mit dem Suchbegriff „lipoxygenase“ und den Filtereinstellungen „zebrafish“ für Spezies und „gene“ für Kategorie sowie in der Pubmed Gene-Datenbank (NCBI) mit dem Suchbegriff „danio rerio AND lipoxygenase“ nach möglichen LOXn im Zebrafisch-Genom gesucht. Diese Suche ergab 9 Treffer für genomische Sequenzen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit LOX-Genen entsprechen. Diese Sequenzen wurden mit ihrem jeweils längsten Transkript auf Aminosäureebene mit den humanen Lipoxygenasen und der murinen *Alox5* verglichen. Dafür wurde mittels des Programms MegAlign ein Aminosäurealignment mit allen Sequenzen erstellt, ihre prozentualen Ähnlichkeiten berechnet und eine kladistische Analyse durchgeführt (**Abb. 9**). Die Ergebnisse der Recherchen sind in der obigen Tabelle (**Tab. 1**) zusammengefasst.

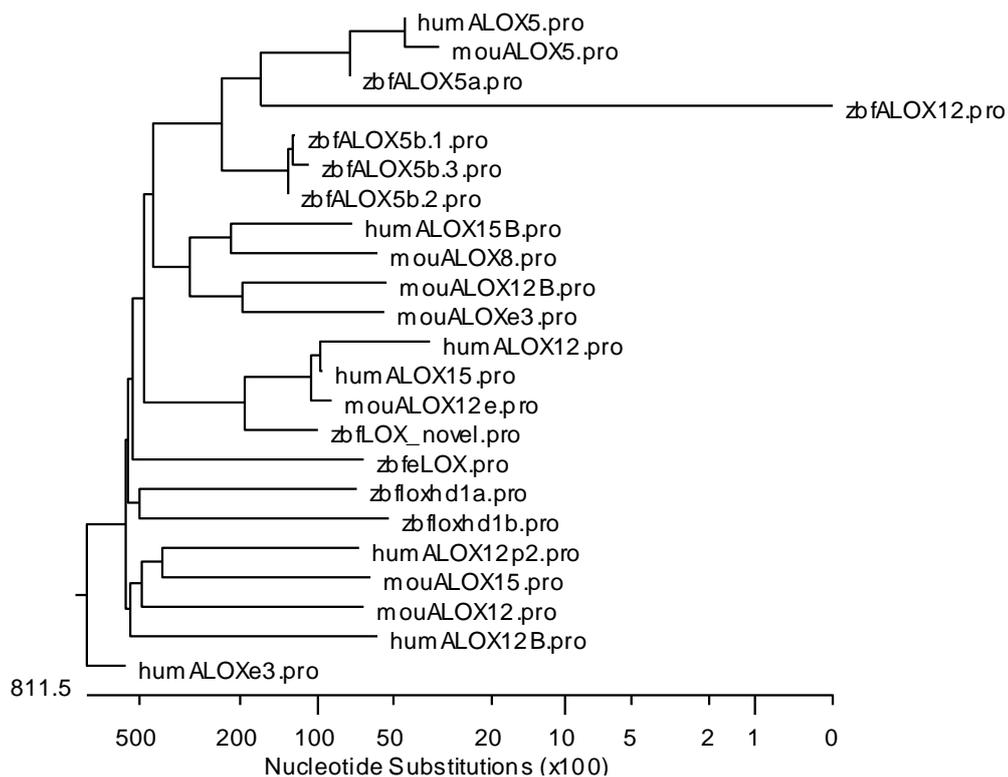


Abb. 9: Gemeinsames Kladogramm der Proteinsequenzen der Zebrafisch-, humanen und murinen LOXn. Für die Erstellung der obigen Abbildung wurden die Aminosäuresequenzen aller LOX-Gene von Zebrafisch, Mensch und Maus mit dem Programm MegAlign abgeglichen und mittels der Berechnung prozentualer Ähnlichkeiten der Sequenzen ein Kladogramm als Verwandtschaftshypothese erstellt.

Die aus den prozentualen Ähnlichkeiten der Enzymsequenzen von Zebrafisch, Mensch und Maus resultierende Verwandtschaftshypothese ist hier als Kladogramm dargestellt (**Abb. 9**). Dieses visualisiert die phylogenetische Ähnlichkeit der untersuchten

Sequenzen und lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Orthologie zu den Enzymen anderer Spezies zu.

Unter allen untersuchten Zebrafisch-LOX-Sequenzen weist das ALOX5a-Gen des Zebrafischs die höchste Sequenzhomologie zu einer menschlichen bzw. murinen LOX-Isoform auf. Die prozentuale Ähnlichkeit zur humanen ALOX5 beträgt 74,5% und zur Maus-Alox5 73,9%. Diese Zahlen deuten darauf hin, dass das ALOX5a-Gen des Zebrafischs das funktionelle Äquivalent der humanen ALOX5 ist und damit für die Leukotrienbiosynthese beim Zebrafisch verantwortlich sein sollte. Aufgrund dieser Schlussfolgerung wurde die LOX-Isoform, die durch das ALOX5a-Gen kodiert wird (NM_001303262.1/NP_001290191.1), für die Experimente zur Charakterisierung der Zebrafisch-ALOX5 ausgewählt.

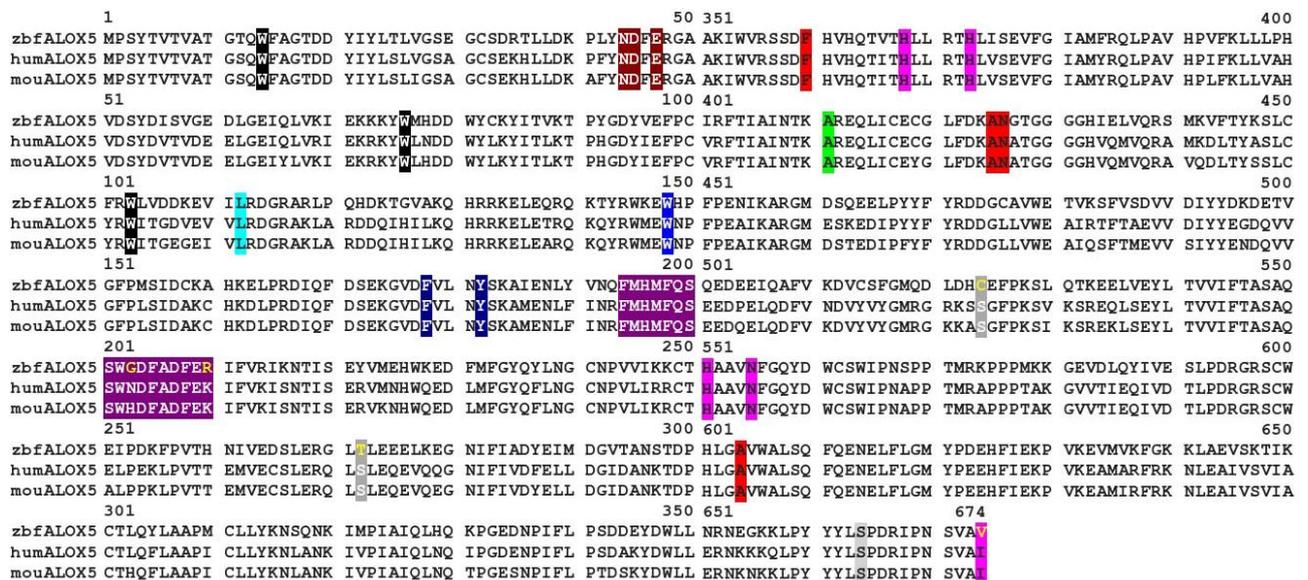


Abb. 10: Aminosäurealignment der zbf-, hum- und mouALOX5. In der oben stehenden Abbildung ist ein multiples AS-Alignment der ALOX5 von Zebrafisch, Mensch und Maus dargestellt. Bekannte für die Enzymfunktion von 5-LOXn relevante Sequenzbereiche sind folgendermaßen farbig hinterlegt: Membranbindungsdomäne (Schwarz), Ca²⁺-Bindungsdomäne (Braun), Übergang von N-terminaler in C-terminale Domäne (Domänentransition; Türkis), W am Eingang der Substratbindungstasche (Blau), FY-Korke, der den Boden der Substratbindungstasche begrenzt (Dunkelblau), ATP-Bindungssequenz (Lila), potentielle Phosphorylierungsstellen (Grau), Triadendeterminanten (BG-I, SL und BG-II) der Positionsspezifität (Rot), Eisenliganden (Magenta) und Coffa-Determinante der Enantioselektivität (Grün). AS-Unterschiede der zbfALOX5-Sequenz an funktionsrelevanten AS-Positionen wurden in gelber Schrift hervorgehoben. Die Nummerierung der AS ist aufgrund der Darstellung des initialen Methionins um eine Position verschoben.

Ein wesentliches Kriterium für die Charakterisierung von LOXn ist deren Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure. Obwohl diese Enzymeigenschaft für eine Kategorisierung von LOXn nicht wirklich geeignet ist, ist die Reaktionsspezifität trotzdem von funktionellem Interesse, da die Leukotrienbiosynthese ein 5-lipoxygenierendes

Enzym erfordert. Obwohl es aufgrund der verfügbaren Sequenzinformationen möglich ist, Vorhersagen hinsichtlich der zu erwartenden Reaktionsspezifität des Enzyms zu treffen, muss diese Eigenschaft des Zebrafischenzym experimentell bestimmt werden. Um die mögliche Reaktionsspezifität der zu untersuchenden *zbfALOX5* vorherzusagen, wurde ein multipler Aminosäureabgleich dieser Isoform mit dem humanen und dem murinen orthologen Enzym durchgeführt. Hierbei wurde das Augenmerk zunächst auf die Triadendeterminanten Borngräber I (BG-I), Sloane (SL) und Borngräber II (BG-II) gerichtet, welche zumindest für die Positionsspezifität von Säugetier-*ALOX5*-Orthologen (Schwarz et al., 2001, Hofheinz et al., 2013) wichtig sind.

Wie im Alignment zu erkennen ist, sind die Triadendeterminanten Phe359 (Borngräber I), Ala424+Asn425 (Sloane) und Ala603 (Borngräber II), die in der Vergangenheit für die *humALOX5* und *mouALOX5* als positionsdeterminierend identifiziert worden sind (Schwarz et al., 2001, Hofheinz et al., 2013), in der Sequenz der *zbfALOX5* absolut konserviert. Dies spricht für eine wahrscheinliche 5-lipoxygenierende Aktivität der *zbfALOX5*. Ebenso ist die Coffa-Determinante der Enantioselektivität, Ala410, konserviert, was auf eine S-Lipoxygenierung schließen lässt. Weiterhin wurde der Konservierungsgrad anderer für die Enzymfunktionalität relevanter Aminosäuren untersucht und im Alignment farbig hervorgehoben (**Abb. 10**). Dazu gehören u.a. die mit der Membranbindung der *ALOX5* assoziierten Trp-Reste, die mit der Calcium-Bindung assoziierten Aminosäuren, der Übergang der N-terminalen β -Faltblattdomäne zur C-terminalen katalytischen Untereinheit, sowie die am Eingang und am Boden der Substratbindungstasche sitzenden AS (W am Eingang und FY-Korke am Ende). Alle diese Strukturelemente sind bei der *zbfALOX5* konserviert. Es gibt allerdings auch einige strukturelle Unterschiede an funktionsrelevanten Positionen. Die für die Enzymfunktion essenziellen Eisenliganden der *zbfALOX5* sind zu 80% mit denen von Mensch und Maus identisch. Die C-terminale AS der *humALOX5* und der *mouALOX5* ist jeweils ein Ile und fungiert als fünfter proteinogener Eisenligand. Bei der *zbfALOX5* befindet sich am C-Terminus ein Val, was ebenfalls als Eisenligand fungieren sollte. Da für die Eisenligandierung die C-terminale Carboxylgruppe und nicht ein Seitenkettenatom verantwortlich ist, sollte dieser Austausch des Ile zum Val keine funktionellen Konsequenzen haben. Trotzdem kann eine Beeinträchtigung der katalytischen Funktion des Enzyms in Abwesenheit funktioneller experimenteller Daten durch diese Veränderung nicht völlig ausgeschlossen werden. Zwei weitere Aminosäureaustausche sind in einem Bereich lokalisiert, der als ATP-Bindungsmotiv für andere *ALOX5*-

Isoformen postuliert wurde (Falgueyret et al., 1995). Inwiefern sich dies auf die enzymatische Funktion auswirkt, ist unklar und muss im Experiment erforscht werden. Außerdem konnten weitere Unterschiede an zwei (Ser271 und Ser523) der drei (Ser271, Ser523, Ser663) potentiellen Phosphorylierungsstellen des humanen Enzyms (Markoutsa et al., 2014) nachgewiesen werden. An diesen Stellen befinden sich in der *zbfALOX5*-Sequenz ein Thr und ein Cys, welche beide, wie das Ser in der *humALOX5* und der *murALOX5*, ungeladene AS darstellen. Allerdings führt der Ser523Cys-Austausch dazu, dass diese Aminosäure in der *zbfALOX5* nicht mehr als Phosphorylierungstarget fungieren kann, da Cys keine OH-Gruppe trägt. Der Ser271Thr Austausch wäre hinsichtlich einer möglichen Phosphorylierung unbedenklich. Dies schränkt die Möglichkeit einer potentiellen Proteinphosphorylierung als regulatorischen Prozess für die *zbfALOX5* durch Ausschluss der Position 523 auf zwei Positionen ein (siehe 3.3.3).

Zsfg.: Das ALOX5a-Gen des Zebrafischgenoms kodiert mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein ALOX5-Ortholog. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus dem hohen Grad der Aminosäuresequenzhomologie und aus dem Konservierungsgrad funktionell wichtiger Aminosäuren. Im Unterschied zur *humALOX5* und zur *mouALOX5* ist Ser663 des Zebrafischenzym kein Target für eine Proteinphosphorylierung.

3.3.1 Expression der *zbfALOX5* in pro- und eukaryontischen Expressionssystemen

Zur biochemischen Charakterisierung der *zbfALOX5* wurde das Enzym zunächst als N-terminales Multi-His-tag-Fusionsprotein in einem bakteriellen Überexpressionssystem (*E. coli*) rekombinant exprimiert und anschließend mittels Cobalt-Sepharose-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Je 5-10 µl der Elutionsfraktionen wurden für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot verwendet. Die *zbfALOX5* konnte bei ca. 75 kDa mittels eines Anti-His-HRP-Antikörpers spezifisch detektiert werden. Diese Daten belegen eine erfolgreiche Expression des Enzyms. Anschließend erfolgte ein Aktivitätsassay (siehe 2.2.9) zur Quantifizierung des Produktmusters. Dafür wurde das Enzym mit dem Substrat AA für 10 min inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels unterschiedlicher HPLC-Verfahren analysiert. Für die Verifikation der Experimente

erfolgten anschließend die Expressionen in einem eukaryontischen Überexpressionssystem.

3.3.1.1 Reaktionsspezifität der bakteriell exprimierten *zbfALOX5*

Zur Bestimmung der Reaktionsspezifität der klonierten *zbfALOX5* wurde das Enzym mit AA für 15 min inkubiert. Danach wurden die Reaktionsprodukte reduziert, extrahiert und sequentiell unter Verwendung verschiedener HPLC Systeme (RP-HPLC, SP-HPLC, CP-HPLC) analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der folgenden Abbildung (**Abb. 11**) zusammengefasst.

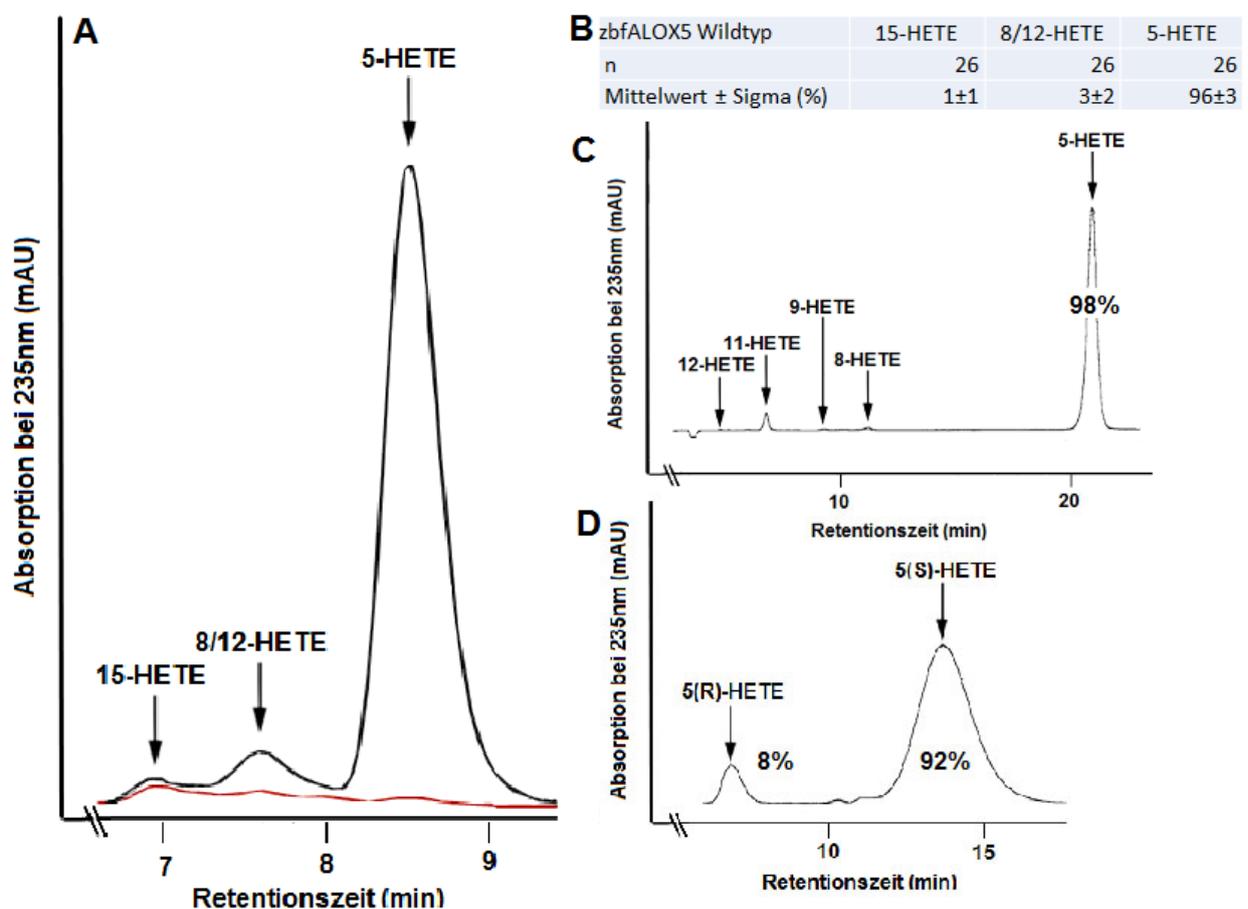


Abb. 11: Die Reaktionsspezifität der *zbfALOX5*. Links in der Abbildung dargestellt (**A**) ist ein repräsentatives RP-HPLC-Beispielchromatogramm der *zbfALOX5* Wildtyp-Reaktionsprodukte (schwarze Kurve) mit der entsprechenden Negativkontrolle (kein Enzym, rote Kurve) aus dem 15minütigen Aktivitätsassay mit AA. Rechts daneben tabellarisch dargestellt (**B**) ist die deskriptive Statistik der RP-HPLC (jeweils mit Mittelwert ± Standardabweichung, letzteres hier und im Folgenden abgekürzt mit „Sigma“) aus insgesamt 26 Versuchen. Die hier verwendeten Enzyme entstammen stets bakterieller rekombinanter Expression. Deweiteren wurde der 5-HETE-Peak aus der RP-HPLC aufgefangen und zur Strukturbestätigung mittels SP-HPLC (**C**) weiter analysiert. Der aufgereinigte 5-HETE-Peak wurde mittels CP-HPLC (**D**) auf seine Enantiomerenverteilung untersucht. Die Retentionszeiten authentischer HETE-Standards sind durch Pfeile über den Kurven angegeben.

Zunächst wurden die Reaktionsprodukte mittels RP-HPLC in ihren 15-, 8/12- sowie 5-HETE-Anteil aufgetrennt (**Abb. 11A**). Daraus geht hervor, dass die rekombinante *zbfALOX5* eine fast vollständige *ALOX5*-Aktivität aufweist. AA wird zu 96% zu 5-H(p)ETE umgesetzt. Daneben ist zu einem kleinen Anteil von 3% ein 8/12-H(p)ETE-Peak sowie zu 1% 15-H(p)ETE zu detektieren (**Abb. 11A**). Diese Analysen wurden für mehrere Expressionsansätze durchgeführt und die Statistik der prozentualen Produktzusammensetzung ist tabellarisch wiedergegeben (**Abb. 11B**). Zur weiteren Analyse wurde der 5-HETE Peak eines repräsentativen RP-HPLC Laufes präpariert und mittels SP-HPLC analysiert. Dabei konnte die chemische Identität des Hauptproduktes 5-H(p)ETE in einem unabhängigen HPLC System bestätigt werden (**Abb. 11C**). Um die Enantiomerenzusammensetzung des gebildeten 5-H(p)ETE zu quantifizieren, wurde eine weitere Analyse der 5-HETE-Fraktion aus der SP-HPLC mittels CP-HPLC durchgeführt (**Abb. 11D**). Die hier analysierte 5-HETE-Fraktion zeigt mit einem Anteil von 92% des S-Enantiomers und 8% des R-Enantiomers einen überwiegend chiralen Charakter. Die dominante S-Lipoxygenierung konnte vorhergesagt werden, da sich an der Position der Coffa-Determinante bei diesem Enzym kein Gly sondern ein etwas größeres Ala befindet. Außerdem beweist der chirale Charakter des dominanten Reaktionsproduktes, dass das Enzym die Oxygenierungsreaktion in allen seinen Elementarreaktionen vollständig kontrolliert. Nichtenzymatisch entstandene Oxidationprodukte würden eine eher racemische (50:50) Enantiomerenverteilung aufweisen.

3.3.1.2 Reaktionsspezifität der eukaryontisch exprimierten *zbfALOX5*

Um zu überprüfen, ob die Reaktionsspezifität der *zbfALOX5* von der Art des rekombinanten Expressionssystems abhängt, wurde für eine weitere Versuchsreihe die *zbfALOX5* in HEK 293-Zellen rekombinant exprimiert. Dabei wurde das Lysat von $2-4 \times 10^5$ Zellen für den Aktivitätsassay als Enzymquelle verwendet. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zur bakteriellen Expression bzgl. der Positionsspezifität. Der hier gemessene Anteil der 5-Lipoxygenierung betrug $97 \pm 3\%$. Weiterhin konnten $3 \pm 2\%$ 8/12-H(p)ETE und keine 15-H(p)ETE gemessen werden (**Abb. 12**).

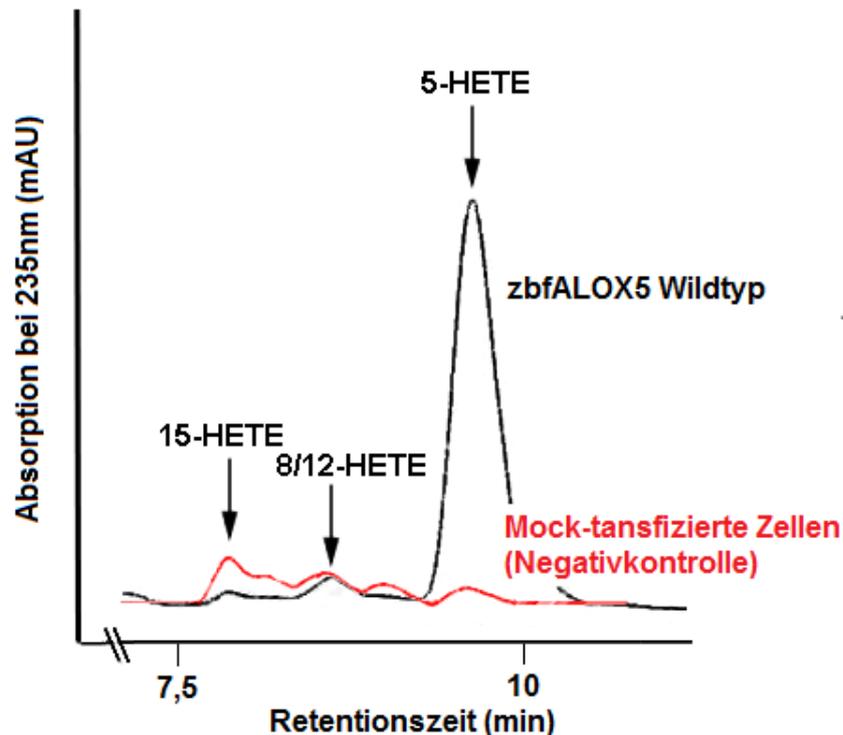


Abb. 12: Beispielchromatogramm der Reaktionsprodukte der rekombinanten *zbfALOX5* aus eukaryontischer Expression: In der oben stehenden Abbildung ist ein repräsentatives Chromatogramm des *zbfALOX5*-Produktmusters (schwarze Kurve) aus eukaryontischer Expression mittels HEK 293-Zellen dargestellt. Die rote Kurve entspricht der Negativkontrolle (NK) aus derselben Versuchsreihe. Hierfür wurden mock-transfizierte Zellen (Transfektion mit einem Leerplasmid) zum Aktivitätsassay verwendet. Die Retentionszeiten authentischer HETE-Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Der höhere 15-HETE-Peak der NK lässt sich dadurch erklären, dass aktives Enzym (hier *zbfALOX5*) nicht nur AA als Substrat verwenden kann, sondern zum Teil auch 15-HETE-Autoxidationsprodukte umsetzt, die folglich nicht mehr als solche nachweisbar sind.

Zsfg.: Die *zbfALOX5* kann in bakteriellen und eukaryontischen Zellen erfolgreich exprimiert werden und zeigt im Experiment für beide Methoden eine dominierende 5-Lipoxygenaseaktivität (96 bzw. 97%) mit ausgeprägter Stereospezifität für das 5(S)-H(p)ETE-Enantiomer (92%).

3.3.2 Versuche zur Anwendbarkeit der Volumenhypothese auf die *zbfALOX5*

Die Volumenhypothese der Reaktionsspezifität von *ALOX5*-Orthologen basiert auf der Beobachtung, dass die Substratbindungstasche der *ALOX5*, verglichen mit dem aktiven Zentrum der *ALOX15*, ein größeres Volumen aufweist (Gillmor et al., 1997). Wenngleich die damals vorliegenden Strukturdaten dieses Konzept zu bestätigen schienen, gab es alternative Interpretationsmöglichkeiten (Prigge et al., 1998). Obwohl die Kristallstruktur der *humALOX5* kürzlich aufgeklärt wurde (Gilbert et al., 2011), kann bisher nicht wirklich entschieden werden, ob die Reaktionsspezifität der *ALOX5* der

Volumenhypothese folgt, oder ob andere Faktoren wichtiger sind. Ortsgerichtete Mutageneseuntersuchungen an den *ALOX5*-Orthologen des Menschen (Schwarz et al., 2001) und der Maus (Hofheinz et al., 2013), bei denen die Triadendeterminanten durch größere Aminosäuren ersetzt wurden, wandelten die 5-lipoxygenierenden *ALOX5*-Orthologe in dominant 15-lipoxygenierende Enzyme um. Bei diesen *ALOX5*-Orthologen repräsentieren die Aminosäureregionen um Phe359 (Borngräber I), um Ala424+Asn425 (Sloane) und um Ala603 (Borngräber II) die Triadendeterminanten. Obwohl die mechanistischen Grundlagen für die beobachteten Veränderungen der Reaktionsspezifität noch nicht geklärt werden konnten, scheint die Einführung großer Aminosäuren an den Triadenpositionen die Reaktionsspezifität von *ALOX5*-Orthologen zunächst in Richtung 8-Lipoxygenierung und letztlich in Richtung 15-Lipoxygenierung zu verändern. Um die Anwendbarkeit dieses Konzeptes auf den Zebrafisch zu untersuchen, wurden ausgewählte Positionsdeterminanten der *zbfALOX5* mittels ortsgerechter Mutagenese durch unterschiedlich große Aminosäuren ersetzt und die Enzyme als Einfach-, Zweifach-, Dreifach- und Vierfachmutanten im pro- und eukaryontischen Expressionssystem exprimiert. Als Positivkontrolle diente dabei das Wildtypenzym. Die prokaryontischen Expressionen erfolgten in ein- bis vierfacher Wiederholung mit anschließender Proteinaufreinigung der Zelllysatüberstände. Die Analytik erfolgte mit allen Elutionsfraktionen der Co-Agarose-Affinitätschromatographie. Die Analysen der Reaktionsprodukte erfolgten mittels RP-, SP- und CP-HPLC.

3.3.2.1 Sloane-Mutanten

Wie in dem Aminosäurealignment der *zbfALOX5* (**Abb. 10**) dargestellt, sind die durch Sloane et. al. beschriebenen Triadendeterminanten Ala424 und Asn425 (Sloane et al., 1991) in der Sequenz der *zbfALOX5* im Vergleich zum humanen Enzym unverändert konserviert. Diese Aminosäuren weisen ein van-der-Waals-Volumen von 67 \AA^3 für Alanin (Ala, A) bzw. 96 \AA^3 für Asparagin (Asn, N) auf und wurden zunächst per Einzelmutationen durch verschiedene größere Aminosäuren ersetzt. Dadurch sollte das Volumen der Substratbindungstasche verringert werden, was entsprechend der Volumenhypothese eine Erhöhung des relativen Anteils an 8- und 15-Lipoxygenierung nach sich ziehen sollte. Dafür wurde zunächst A424 (Ala, A; 67 \AA^3) per ortsgerechter Mutagenese durch ein großes Phenylalanin (Phe, F; 135 \AA^3) substituiert und die Mutante A424F rekombinant exprimiert. Anschließend wurde N425 (Asn; 96 \AA^3) einmal durch ein Isoleucin (Ile, I; 124

Å³) und einmal durch ein Phe (F; 135 Å³) ersetzt und die Einfachmutanten N425M und N425F ebenfalls rekombinant exprimiert. Anschließend wurde auch eine Doppelmutante, A424I+N425M, konstruiert und rekombinant exprimiert. Die Produktspektren wurden jeweils zuerst mittels RP-HPLC analysiert. Bei relativ hohen 8/12-HETE-Anteilen, die in der RP-HPLC nicht ausreichend differenziert werden können, wurden zusätzliche SP-HPLC-Analysen nötig. Weiterhin wurden die dominierenden Reaktionsprodukte für jede Mutante mittels CP-HPLC auf die Enantiomerenverteilung hin untersucht.

3.3.2.1.1 Einfachmutante A424F

Das Produktmuster der Einfachmutante A424F (A: 67 Å³ vs. F: 135 Å³) ist mit einem Beispielchromatogramm sowie deskriptiver und vergleichender Statistik in der unten stehenden Abbildung dargestellt (**Abb.13**).

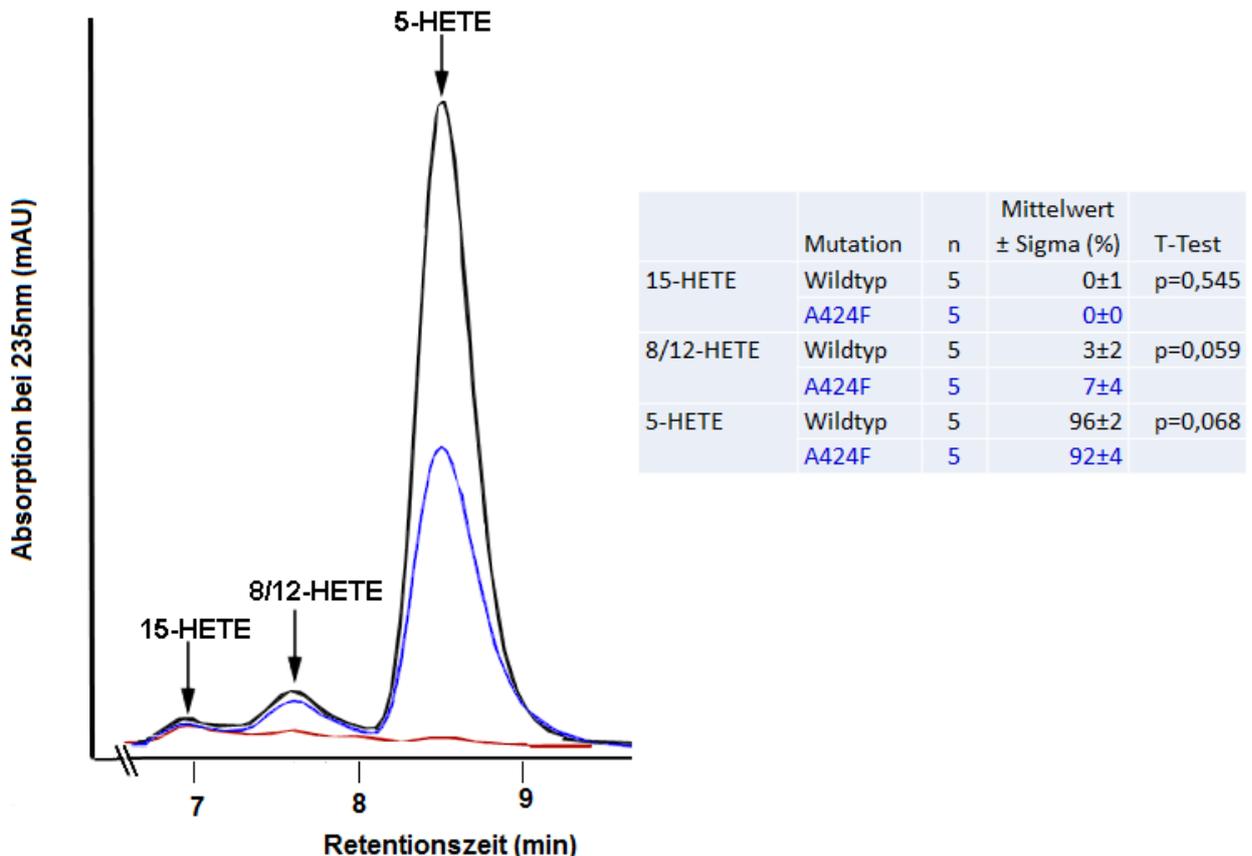


Abb. 13: Produktmuster der *zbfALOX5* Sloane-Mutante A424F. Links in der Abbildung ist ein repräsentatives RP-HPLC-Beispielchromatogramm der Reaktionsprodukte der *zbfALOX5* A424F-Mutante (Blau) im Vergleich zur Positivkontrolle (*zbfALOX5*-Wildtyp, Schwarz) und Negativkontrolle (denaturierte *ALOX5* statt Probe im Aktivitätsassay verwendet, Rot) dargestellt. In einem vorausgehenden Lauf wurden durch authentische Standards die Retentionszeiten der HETEs ermittelt und mit Pfeilen über den Kurven angegeben. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Flächen unter den entsprechenden Peaks der Mutante und des Wildtyps integriert und durch Subtraktion der Integrale aus der Analyse der Negativkontrolle korrigiert und mittels deskriptiver und vergleichender (T-Tests) statistischer Methoden analysiert (siehe tabellarische Darstellung rechts in der Abbildung).

5-H(p)ETE ist mit $92\pm 4\%$ das dominierende Arachidonsäureoxygenierungsprodukt der A424F-Mutante. Verglichen mit dem Wildtypenzym ist der 5-HETE-Anteil am Muster der Gesamtprodukte 4% niedriger, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant ist. Des Weiteren kann ein kleiner Anteil an 8/12-HETE gemessen werden, der im Mittel bei 7% lag. Dieser ist ebenfalls nicht signifikant höher als beim Wildtypenzym. Eine weitere Untersuchung der 8/12-HETE-Fraktion mittels SP-HPLC zeigte, dass dieser Peak zu 89% aus 8-HETE und nur zu 11% aus 12-HETE besteht. Eine 15-HETE-Produktion konnte wie beim Wildtyp nicht nachgewiesen werden. Die geringen Mengen an 15-HETE, die sich im Chromatogramm abzeichnen, waren auch in der Negativkontrolle nachweisbar (rote Kurve). Dies deutet darauf hin, dass diese geringen Mengen an 15-HETE als Autoxidationsprodukte bereits in der Substratlösung vorhanden waren. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese Mutation keine signifikanten Auswirkungen auf die Positionsspezifität der *zbfALOX5* hatte.

Da die Fläche des 5-HETE-Peaks des Wildtypenzym mehr als doppelt so groß ist wie die der Mutante, kann geschlossen werden, dass die spezifische katalytische Aktivität der A424F-Mutante nur etwa halb so groß ist wie die des Wildtypenzym. Für diese Schlussfolgerung wurde berücksichtigt, dass für die Aktivitätsassays vergleichbare Mengen rekombinanten Enzym eingesetzt wurden.

3.3.2.1.2 Einfachmutante N425M

Die Analyse des Produktmusters der Einfachmutante N425M (N: 96 \AA^3 vs. M: 124 \AA^3) belegt, dass 5-H(p)ETE nicht mehr das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung ist. Dieses Produkt trägt nur noch zu $38\pm 2\%$ zur Gesamtproduktbildung bei und dieser Anteil ist signifikant niedriger als der 5-HETE-Anteil am Muster der Wildtyp-Reaktionsprodukte. Dafür repräsentiert der 8/12-HETE-Peak mit $58\pm 3\%$ das dominierende Produkt. Eine weitere Analyse dieser Fraktion mittels SP-HPLC zeigt eine Zusammensetzung aus 58% 8-HETE und 42% 12-HETE (**Abb. 17**). In der RP-HPLC konnte mit $4\pm 3\%$ auch eine signifikant größere Menge an 15-HETE detektiert werden. Insgesamt bleibt der Anteil der 15-HETEs an der Produktbildung aber gering. Ein Beispielchromatogramm der RP-HPLC mit der entsprechenden Statistik dieser Mutante ist im Folgenden dargestellt (**Abb. 14**). Da die Fläche des 5-HETE-Peaks für das Wildtypenzym deutlich größer ist als die Summe der Flächen des 5-HETE- und des 8/12-

HETE-Peaks, kann geschlussfolgert werden, dass die Enzymmutante eine deutlich reduzierte spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym aufweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bereits durch die einfache Mutation der Sloane-Determinante N425M das Produktspektrum signifikant verändern lässt. Die ursprünglich überwiegende 5-Lipoxygenaseaktivität wurde in eine dominierende 8-Lipoxygenaseaktivität umgewandelt. Daneben ist auch ein kleiner Anteil der 15-HETE-Produktion zu erkennen.

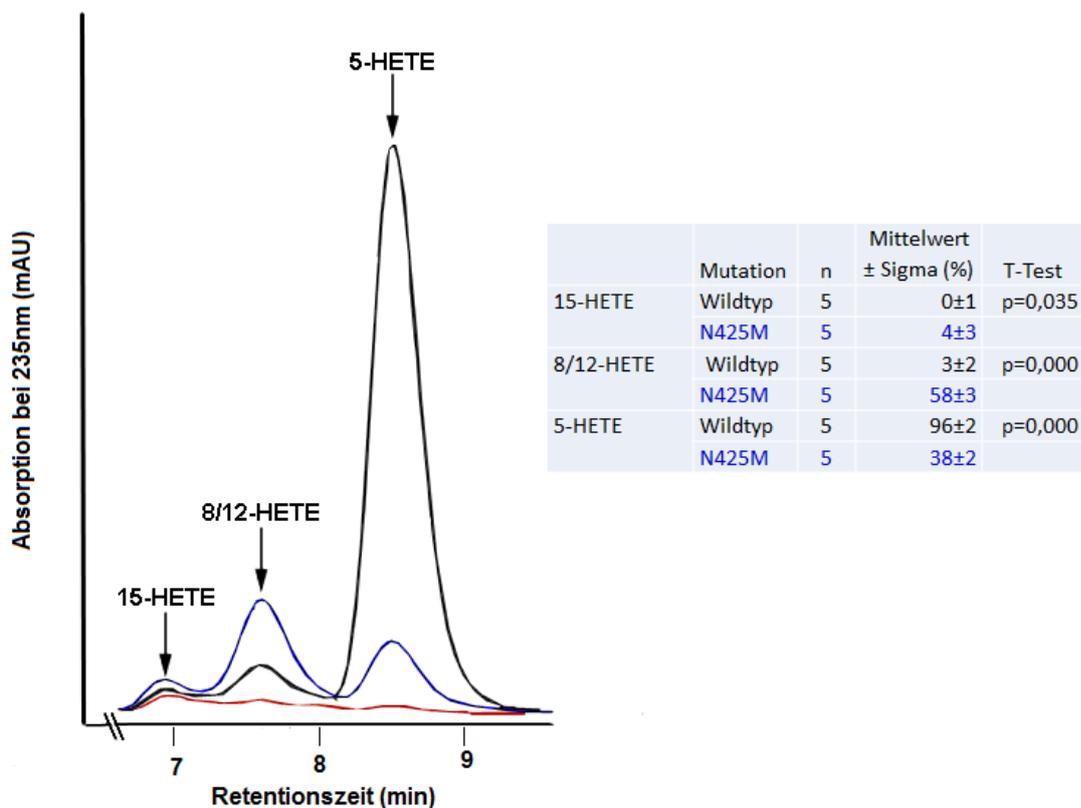


Abb. 14: Produktpattern der *zbfALOX5* Sloane-Mutante N425M. Abgebildet sind links partielle RP-HPLC-Chromatogramme der Einfachmutante N425M (Blau), des *zbfALOX5*-Wildtyps (Schwarz) und der Negativkontrolle (Rot). Die Retentionszeiten authentischer Produktstandards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Rechts in der Abbildung befindet sich eine tabellarische Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichungen („Sigma“) sowie P-Werte von vergleichenden T-Tests der HETE-Anteile von Mutante und Wildtyp-LOX.

3.3.2.1.3 Einfachmutante N425F

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Einführung einer noch größeren Aminosäure bei N424 eine weitergehende Veränderung in der Reaktionsspezifität des Enzyms induziert. Deshalb wurde an dieser Stelle ein Phenylalanin eingeführt. Dadurch wurde im Vergleich zur N425M (N: 96 Å³ vs. M: 124 Å³) ein formaler Raumverlust am aktiven Zentrum des Enzyms von 11Å³ induziert (M: 124 Å³ vs. F: 135 Å³). Das

Produktmuster der N425F-Mutante zeigt in der RP-HPLC mit im Mittelwert $27\pm 13\%$ einen niedrigeren Anteil an 5-HETE im Vergleich mit dem Wildtypenzym und der N425M-Mutante. Weiterhin ist der Anteil des 8/12-HETE-Peaks mit $41\pm 14\%$ höher als beim Wildtypenzym, jedoch niedriger als bei der N425M-Mutante. Besonders bemerkenswert ist aber, dass die 15-HETE-Produktion mit 32% weit über der 15-HETE-Produktion des Wildtyps (0%) und der N425M-Mutante (4%) liegt (**Abb. 15**). Statistisch gesehen ist der Unterschied in der 15-HETE-Bildung aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant.

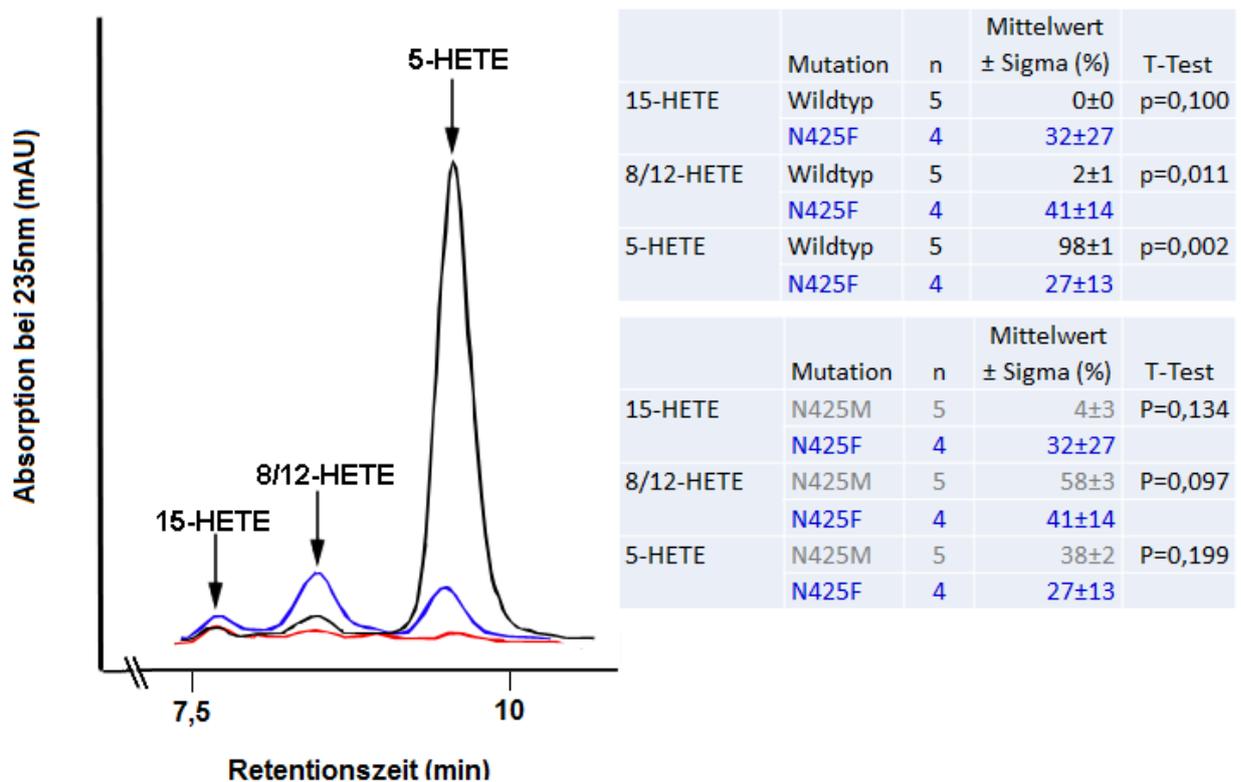


Abb. 15: Produktspektrum der *zbfALOX5*-Triadenmutante N425F. Dargestellt sind links partielle RP-HPLC-Chromatogramme der Sloane-Einfachmutante N425F (Blau), des Wildtyps (Schwarz) und der Negativkontrolle (Rot). Die Retentionszeiten authentischer Standards wurden in einem Vorlauf ermittelt und sind mit Pfeilen über den Kurven angegeben. Rechts im Bild ist die deskriptive und vergleichende Statistik dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp (oben) und zur Einfachmutante N425M (unten, Grau) dargestellt.

Da die Fläche des 5-HETE Peaks für das Wildtypenzym deutlich größer ist als die Summe der Flächen des 5-HETE-Peaks, des 8/12-HETE-Peaks und des 15-HETE-Peaks zusammen, kann geschlussfolgert werden, dass die Enzymmutante eine reduzierte spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym aufweist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Positionsspezifität der N425F-Mutante sich im Sinne der Volumenhypothese verändert hat. Die relativen Anteile der 5- und 8/12-HETE-Bildung sind niedriger, der 15-HETE-Anteil höher. Nach wie vor bildet

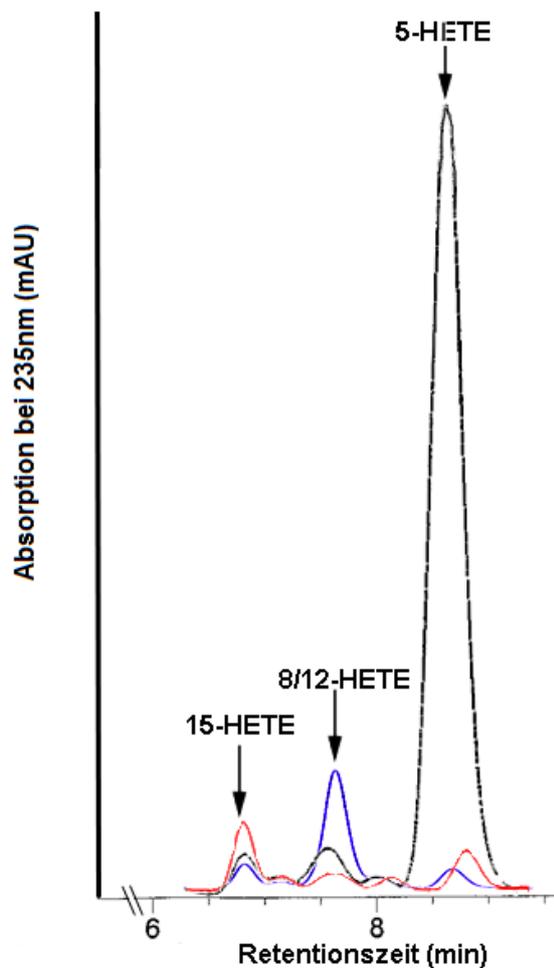
allerdings 8/12-HETE das dominierende Produkt. Im Vergleich zur N425M-Mutante hat sich die Produktspezifität nicht signifikant verändert.

3.3.2.1.4 Zweifachmutante A424I+N425M

Um die Effekte einer stärkeren Volumenabnahme der Substratbindungstasche auf die Positionsspezifität zu untersuchen, wurden neben den Einfachmutanten auch Doppelmutanten konstruiert, bei denen zwei Triadendeterminanten gleichzeitig durch größere Aminosäuren ersetzt wurden. Die substituierten Aminosäuren der hier exprimierten Doppelmutante A424I (A: 67 Å³ vs. I: 124 Å³) + N425M (N: 96 Å³ vs. M: 124 Å³) führen formal betrachtet zu einer Volumenabnahme der Substratbindungstasche von insgesamt 85 Å³.

Die Analyse dieser Mutante zeigt in der RP-HPLC mit 16% nur noch eine geringe 5-Lipoxygenierung. Mit 65±24% bildet der 8/12-HETE-Peak die dominierende Produktfraktion (**Abb. 16**). Dieser Peak wurde mittels SP-HPLC in seine weiteren Bestandteile aufgetrennt und scheint mit 75% hauptsächlich aus 8-HETE und nur zu 10% aus 12-HETE zu bestehen (**Abb. 17**). Mit 19% 15-HETE im Produktspektrum ist zudem eine signifikante Zunahme der 15-Lipoxygenierung im Vergleich zum Wildtyp und den getesteten Einfachmutanten nachzuweisen. Da die Fläche des 5-HETE-Peaks für das Wildtypenzym größer ist als die Summe der Flächen des 5-HETE-, 8/12-HETE- und 15-HETE Peaks, kann geschlussfolgert werden, dass die Enzymmutante eine reduzierte spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtypenzym aufweist.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die weitere Volumenzunahme (verglichen mit dem Wildtypenzym) auf insgesamt 85 Å³ zu einer höheren 8-Lipoxygenierung geführt hat. Diese ist mit 65% unter den bisherigen Mutanten am höchsten. Auch die 15-HETE-Fraktion hat im Vergleich zum Wildtyp und der N425M-Mutante signifikant zugenommen, was für die Anwendbarkeit der Volumenhypothese spricht.



	Mutation	n	Mittelwert ± Sigma (%)	T-Test
15-HETE	Wildtyp	5	0±0	p=0,020
	A424I+N425M	6	19±14	
8/12-HETE	Wildtyp	5	2±1	p=0,001
	A424I+N425M	6	65±24	
5-HETE	Wildtyp	5	98±1	p=0,000
	A424I+N425M	6	16±10	

	Mutation	n	Mittelwert ± Sigma (%)	T-Test
15-HETE	N425F	4	32±27	p=0,420
	A424I+N425M	6	19±14	
8/12-HETE	N425F	4	41±14	P=0,084
	A424I+N425M	6	65±24	
5-HETE	N425F	4	27±13	p=0,220
	A424I+N425M	6	16±10	

	Mutation	n	Mittelwert ± Sigma (%)	T-Test
15-HETE	N425M	5	4±3	p=0,049
	A424I+N425M	6	19±14	
8/12-HETE	N425M	5	58±3	p=0,508
	A424I+N425M	6	65±24	
5-HETE	N425M	5	38±2	p=0,003
	A424I+N425M	6	16±10	

Abb. 16: Produktspektrum der A424I+N425M-Doppelmutante der *zbfALOX5*. Auf der linken Seite sind jeweils repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme des *zbfALOX5*-Wildtyps (Schwarz), der Triaden-Doppelmutante A424I+N4245M (Blau) und denaturierter *zbfALOX5* als Negativkontrolle (Rot) abgebildet. Retentionszeiten der HETE-Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Rechts im Bild ist die deskriptive und vergleichende Statistik dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp (oben) und zu den Einfachmutanten N425M und N425F (Grau) darunter dargestellt.

3.3.2.1.5 Normalphasen-HPLC interessanter Sloane-Mutanten

In der unten stehenden Abbildung (**Abb. 17**) sind partielle SP-HPLC-Chromatogramme interessanter 8/12-HETE-produzierender Sloane-Mutanten vergleichend dargestellt. Durch dieses HPLC-Verfahren wird die weitere Differenzierung der 8/12-HETE-Fraktion ermöglicht. In der durch die Mutationen zunehmenden 8/12-HETE-Fraktion ist stets 8-HETE, für die Doppelmutante A424I+N425M mit 74% am deutlichsten ausgeprägt, das dominierende Produkt.

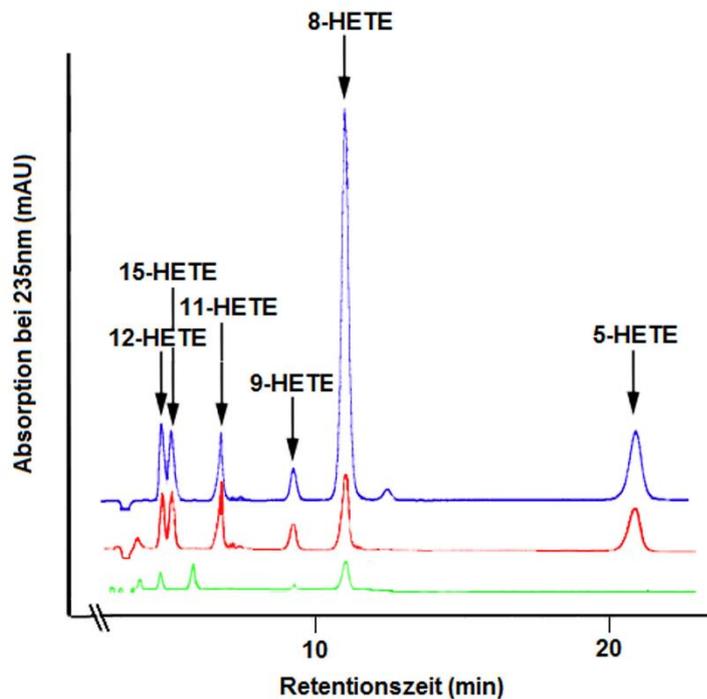


Abb. 17: Untersuchung des 8/12-HETE Peaks unterschiedlicher Sloane-Mutanten der *zbfALOX5*. In der links stehenden Abbildung sind die SP-HPLC-Chromatogramme von Mutanten der *zbfALOX5*-Sloane-Determinanten A424I+N425M (Blau), N425M (Rot), N425F (Grün) im Vergleich dargestellt. Diese Analyse diente vor allem dazu, zwischen 8- und 12-HETE zu differenzieren, die in der RP-HPLC nicht sicher von einander getrennt werden konnten. Die Retentionszeiten unterschiedlicher HETE-Isomere wurden mittels authentischer Standards zu Beginn der Analysen bestimmt und sind mit Pfeilen über den Kurven markiert.

3.3.2.1.6 Enantioselektivität dominant 8-lipoxygenierender *zbfALOX5*-Mutanten

In der unten stehenden Abbildung (**Abb. 18**) sind partielle CP-HPLC-Chromatogramme der isolierten 8-HETE-Peaks der beiden dominant 8-HETE-produzierenden Mutanten N425M und A424I+N425M dargestellt.

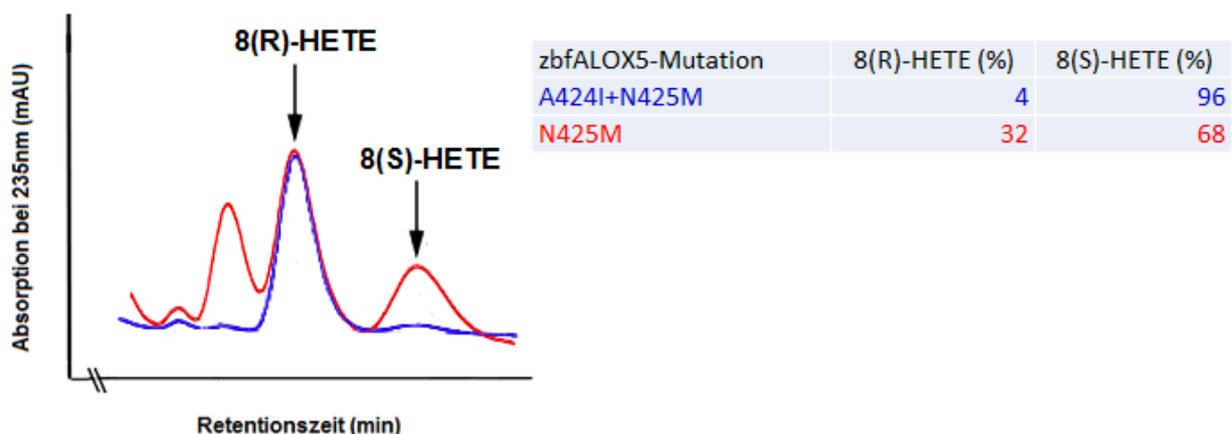


Abb. 18: Chiralphasen-HPLC der 8-HETE, die von Triadenmutanten der *zbfALOX5* produziert wurde. Links in der oben stehenden Abbildung sind partielle CP-HPLC-Chromatogramme der isolierten 8-HETE-Fractionen der beiden dominant 8-H(p)ETE-produzierenden Sloane-Mutanten A424I+N425M (Blau) und N425M (Rot) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Standards wurden in einem Referenz-Lauf zuvor ermittelt und sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Der nichtbeschriftete rote Peak mit der kürzesten Retentionszeit ist durch ein anderes konjugiertes Dien, vermutlich nicht erfolgreich methylierte 8-HETE, bedingt. In der Abbildung rechts sind die relativen Anteile der beiden Enantiomere zusammengefasst.

Dafür wurden die 8-HETE-Peaks aus der SP-HPLC aufgefangen und die Carboxylgruppe durch Zugabe etherischen Diazomethans methyliert. Die Methylierung war notwendig, da sich die Enantiomeren (R vs. S) der freien Säuren von 8-HETE unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen nicht sicher voneinander trennen ließen. Aus den Analysen geht hervor, dass durch beide Enzymmutanten dominant 8(S)-H(p)ETE gebildet wurde. Die Doppelmutante setzt AA mit 96% stereospezifisch zu 8(S)-H(p)ETE um, während nur 4% 8(R)-H(p)ETE nachweisbar war. Für die Einfachmutante lag 8-HETE zu 68% als S-Enantiomer vor. Da 8(R)-HETE immerhin zu 32% gebildet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die 8-H(p)ETE-Synthese nicht vollständig Enzym-kontrolliert abgelaufen ist. Die Sauerstoffinsertion enthält hier offenbar einen signifikanten nicht-enzymatischen Anteil. Diese Schlussfolgerung steht im Einklang mit der relativ geringen katalytischen Effizienz (geringe spezifische Aktivität) dieser Einfachmutante (**Abb. 14**).

Die Enantiomerenanalytik des 5-HETE-Anteils am Produktmuster der dominant 8-lipoxygenierenden Sloane Mutanten ergab (**Tab. 2**), dass die hohe Stereospezifität der 5-H(p)ETE Bildung des Wildtypenzym bei den beiden Mutanten erhalten geblieben ist. 5-HETE wird von allen getesteten *zbfALOX5*-Varianten überwiegend als S-Enantiomer synthetisiert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die 5-H(p)ETE Bildung in allen Elementarreaktionen (Wasserstoffabstraktion, Radikalverschiebung, Sauerstoffinsertion) vollständig Enzym-kontrolliert abgelaufen ist.

<i>zbfALOX5</i> -Mutation	5(R)-HETE (%)	5(S)-HETE (%)
Wildtyp	8	92
A424I+N425M	10	90
N425M	12	88

Tab. 2: Enantiomerenzusammensetzung der 5-HETEs, die durch ausgewählte Sloane-Mutanten synthetisiert wurden. In der oben stehenden Tabelle ist die Enantiomerenverteilung mittels CP-HPLC-untersuchter isolierter 5-HETE-Peaks der beiden Sloane-Mutanten A424I+N425M und N425M im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

3.3.2.2 Kombinierte Mutationen der Sloane- und Borngräber-Determinanten

Mit einfachen und kombinierten Mutationen der beiden Sloane-Determinanten konnte die Positionsspezifität der 5-lipoxygenierenden *zbfALOX5* in überwiegend 8-lipoxygenierende Enzymvarianten umgewandelt werden. Dabei ergab sich manchmal auch eine geringgradige Zunahme der 15-Lipoxygenierung. Um zu überprüfen, ob

kombinierte Mutationen verschiedener Triadendeterminanten zu einer deutlicheren Erhöhung der 15-Lipoxygenierungsaktivität führen, wurden ausgewählte Sloane-Mutanten mit Mutationen der anderen beiden Triadendeterminanten (Borngräber-I und -II) kombiniert.

3.3.2.2.1 Zweifachmutante F359W+N425M

Die N425M Sloane-Mutante der *zbfALOX5* (**Abb. 14**) veränderte die Reaktionsspezifität der *zbfALOX5* zu einer dominant 8-lipoxygenierenden Enzymvariante, wobei geringe Mengen an 15-H(p)ETE gebildet wurden. Um diesen 15-H(p)ETE-Anteil zu erhöhen, wurde entsprechend der Volumenhypothese an der Borngräber-I Determinante der N425M-Mutante eine Aminosäure mit großer Seitenkette eingeführt (F: 135 Å³ vs. W: 163 Å³). Diese Manipulation führte leider zu einer inaktiven Enzymvariante, sodass keine Reaktionsprodukte analysiert werden konnten. Da mit allen exprimierten Mutanten SDS-PAGEs und spezifische AK-basierte LOX-Nachweise mittels Western Blot erfolgt sind, konnte die erfolgreiche Expression nachgewiesen werden. Die Intensität der Immunfluoreszenz der E2-Fraktion, in der sich die Hauptmenge des Enzym-Eluats nach der Affinitätschromatographie befindet, betrug 80% im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (nicht gezeigt). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die F359W+N425M-Doppelmutante als katalytisch inaktives Protein exprimiert wird. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Einführung des großen Trp an der Position Phe359 zu strukturellen Veränderungen führt, die das Enzym katalytisch inaktiv machen. Die genauen Ursachen dieser katalytischen Inaktivität wurden nicht näher untersucht.

3.3.2.2.2 Dreifachmutante F359W+A424I+N425M

Trotz der katalytischen Inaktivität der F359W-N425M-Mutante wurde diese Enzymvariante dazu genutzt, die Dreifachmutante F359W+A424I+N425M herzustellen und hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität zu testen. Dieser Strategie lagen folgende Überlegungen zugrunde: Die katalytische Inaktivität der F359W+N425M Doppelmutante könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die große Seitenkette des eingeführten Trp in der Raumstruktur in einer Weise orientiert, welche die native Faltung der Polypeptidkette behindert. Dadurch könnte es zu Faltungsproblemen kommen, die sich auf die katalytische Aktivität auswirken. Die Einführung eines Ile bei Ala424 könnte eine

Umorientierung des eingeführten W359-Restes bewirken, sodass eine native Proteinfaltung wieder möglich wird.

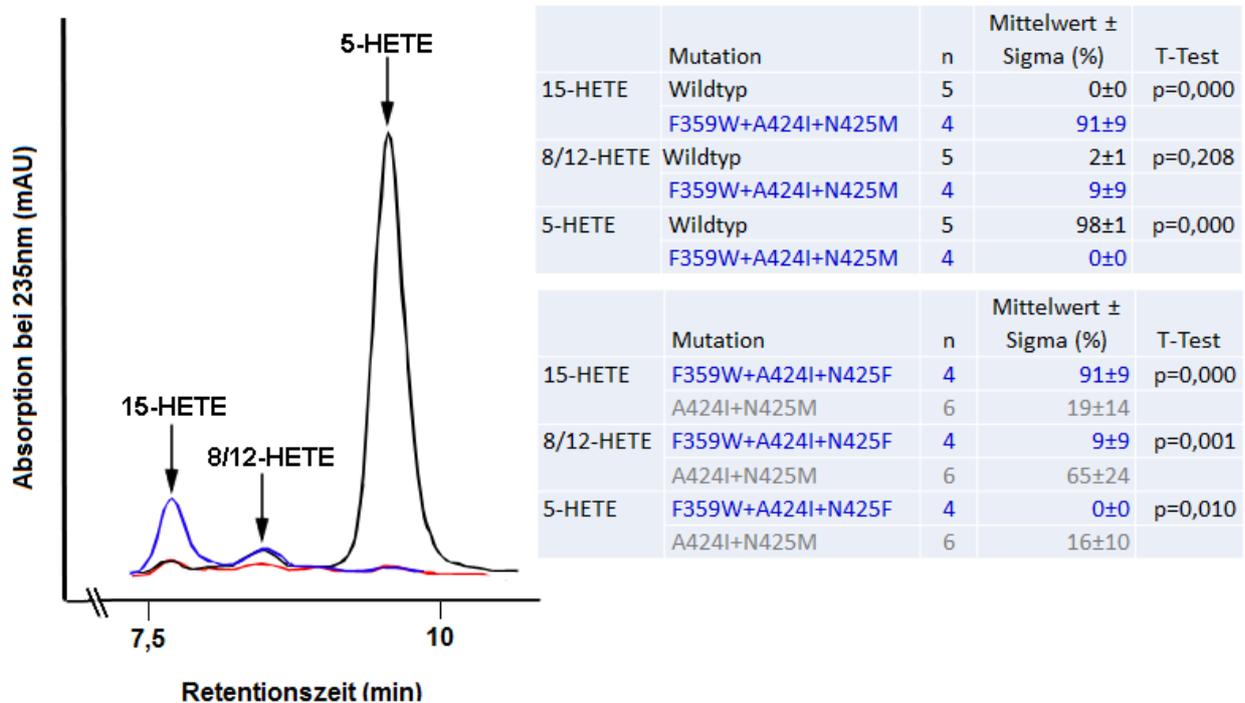


Abb. 19 Produktmuster der *zbfALOX5*-Dreifachmutante **F359W+A424I+N425M**. In der obigen Abbildung sind die partiellen Chromatogramme der Dreifachmutante (Blau), des Wildtyps (Schwarz) und der Negativkontrolle (kein Enzym, Rot) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Rechts in der Abbildung befindet sich die tabellarische Darstellung der relativen HETE-Anteile dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp (oben), darunter auch beispielhaft vergleichend zur dominierend 8-HETE-produzierenden Mutante A424I+N425M (Grau).

Im Rahmen unserer Experimente konnten wir feststellen, dass die zuvor als funktionslos erwiesene Zweifachmutante F359W+N425M in Kombination mit der Mutation A424I als funktionelle Dreifachmutante exprimiert werden konnte. Obwohl das Expressionsniveau der Dreifachmutante verglichen mit dem des Wildtyp-Enzyms deutlich geringer war [das Immunfluoreszenzsignal im Western-Blot (hier nicht gezeigt) belegte, dass die LOX-Proteinexpression nur 28% der Expression des Wildtypenzym entsprach], zeigten die durchgeführten Aktivitätsassays reproduzierbar eine gut messbare enzymatische Aktivität. Die Analytik des Produktmusters ergab, dass die Dreifachmutante kein 5-H(p)ETE mehr produzierte. Der Anteil des 8/12-H(p)ETE Peaks betrug nur 9%. Dafür konnte eine deutliche 15-H(p)ETE-Bildung nachgewiesen werden (**Abb. 19**). Der 15-H(p)ETE-Anteil am Gesamtproduktmuster beträgt 91% mit einer Standardabweichung von $\pm 9\%$. Dieses Ergebnis ist im Vergleich zum Wildtypenzym (WT) und zu den drei dominierend 8-HETE-produzierenden Triadenmutanten hochgradig

signifikant. In der obigen Abbildung ist exemplarisch die Statistik der Doppelmutante A424I+N425M zum Vergleich dargestellt. Die Abweichungen der relativen Anteile der Reaktionsprodukte der Dreifachmutante A424I+N425M+F359W waren im Vergleich zu den Produktfraktionen der anderen beiden dominierend 8-HETE-produzierenden Triadenmutanten (N425M und N425F) ebenfalls für alle drei Peaks der RP-HPLC signifikant. Die vergleichenden Statistiken sind der Übersichtlichkeit halber auf den Wildtyp und die Doppelmutante beschränkt dargestellt.

Ein Vergleich der Peakflächen der Produkte, die durch das WT-Enzym gebildet wurden, und der Peakflächen der Dreifachmutante zeigt dabei an, dass das mutierte Enzym nur etwa 20 % der spezifischen Aktivität des WT-Enzyms aufweist. Bei dieser Berechnung wurden die unterschiedlichen Expressionshöhen der rekombinanten Proteine berücksichtigt.

3.3.2.2.3 Vierfachmutante F359W+A424I+N425M+A603I

Da Experimente an der murinen *ALOX5* gezeigt hatten (Hofheinz et al., 2013), dass der 15-HETE-Anteil einer Dreifachmutation durch einen Ala603Ile Austausch noch weiter verstärkt werden konnte, wurde auch für die *zbfALOX5* die entsprechende Vierfachmutante (F359W+A424I+N425M+A603I) hergestellt. Diese Vierfachmutante zeigt ebenfalls eine überwiegende 15-Lipoxygenaseaktivität. Für dieses Enzym betrug der 15-H(p)ETE-Anteil im Produktmuster $64 \pm 12\%$. Die 8/12-H(p)ETE-Fraktion trug im Mittel zu 29% zum Produktmuster bei und zu 8% wurde 5-H(p)ETE produziert (**Abb. 20**). Ein möglichst repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm ist in der unten stehenden Abbildung einsehbar. Ein Vergleich der Peakflächen der Produkte, die durch das WT-Enzym gebildet wurden, und der Peakflächen der Vierfachmutante zeigt dabei an, dass das mutierte Enzym nur etwa 20 % der spezifischen Aktivität des WT-Enzyms aufweist. Bei dieser Berechnung wurden die unterschiedlichen Expressionshöhen der rekombinanten Proteine berücksichtigt.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass die Vierfachmutante zwar signifikant weniger 15-Lipoxygenasespezifität ausweist als die Dreifachmutante, jedoch ebenfalls 15-HETE das dominierende Produkt darstellt. Die HETE-Anteile im Produktspektrum sind im Vergleich zum Wildtyp-Enzym alle signifikant im Sinne der Volumenhypothese verändert und stützen diese nach wie vor. Es scheint neben der Volumina der

Seitenketten von Positionsdeterminanten zusätzliche, z.B. sterische, Faktoren zu geben, die ebenfalls die Positionsspezifität beeinflussen.

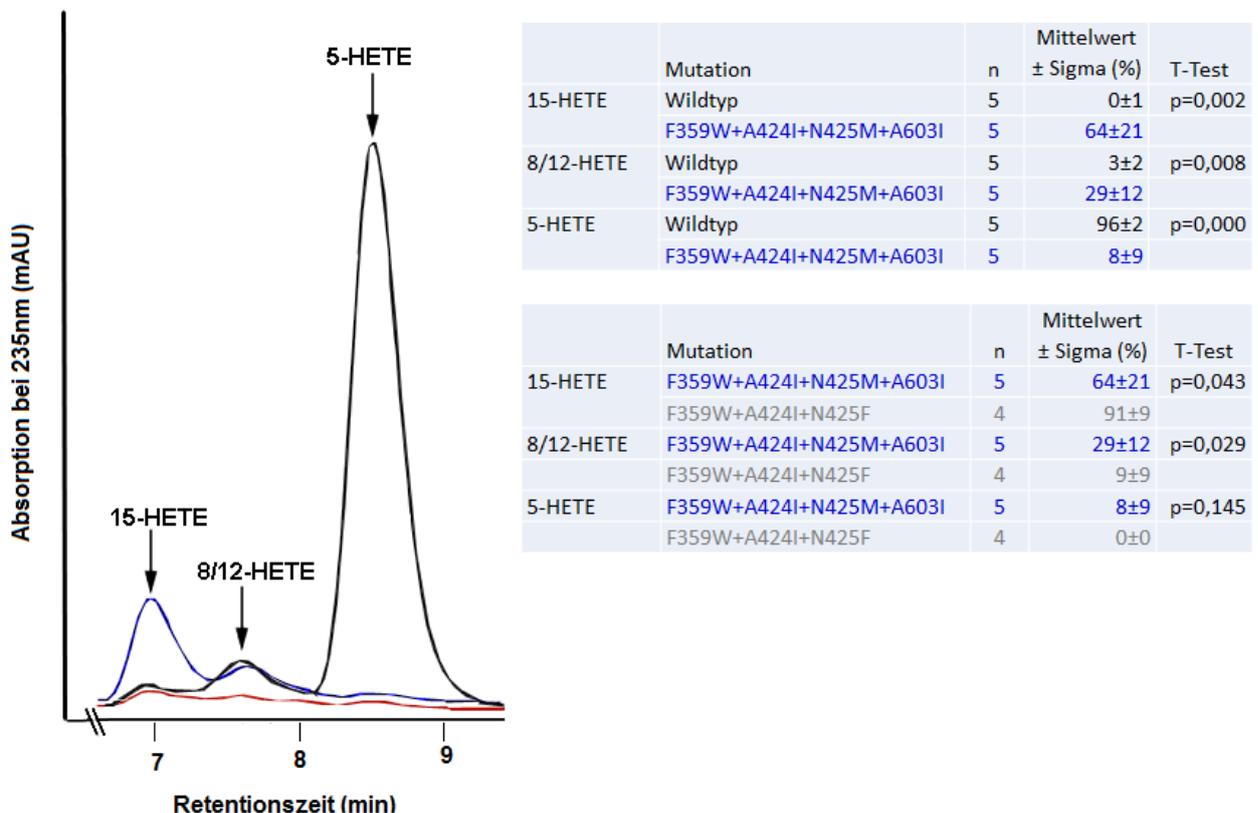


Abb. 20: Produktmuster der *zbfALOX5*-Vierfachmutante F359W+A424I+N425M+A603I. In der obigen Abbildung sind partielle RP-HPLC-Chromatogramme der Vierfachmutanten (Blau), des Wildtyps (Schwarz) und der Negativkontrolle (Rot) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Standards wurden in einem vorherigen Lauf bestimmt und sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Rechts in der Abbildung sind die relativen Anteile der Reaktionsprodukte im Vergleich zum Wildtyp (oben) und darunter zur Dreifachmutanten (Grau) dargestellt.

3.3.2.3 Enantioselektivität der 15-lipoxygenierenden *zbfALOX5*-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die 15-H(p)ETE-Bildung durch die *zbfALOX5*-Mutanten vollständig enzymkontrolliert verläuft, wurde dieses Produkt isoliert und mittels CP-HPLC auf seine Enantiomerenzusammensetzung untersucht. Für die Analysen zur 15-HETE-Chiralität bedarf es keiner Methylierung der freien Hydroxyfettsäuren. Aus der folgenden Abbildung (**Abb. 21**) geht hervor, dass die dominant 15-lipoxygenierende Dreifachmutante F359W+A424I+N425M zu 81% 15(S)-H(p)ETE produziert. Das entsprechende 15(R)-Enantiomer wurde in nur geringen Mengen gebildet. Diese Daten belegen, dass die 15-H(p)ETE Bildung durch die Triadendreifachmutante überwiegend enzymkontrolliert abläuft. Für die anderen getesteten 15-HETE-produzierenden

Enzymvarianten konnte ebenfalls eine Bevorzugung der 15(S)-H(p)ETE-Produktion nachgewiesen werden [68% für die Sloane-Einfachmutante N425F (Grün), 59% für die Sloane-Doppelmutante A424I+N4225M (Blau) und 59% für die Sloane-Einfachmutante N425M (Rot)]. Bei diesen Mutanten trug jedoch das entsprechende 15(R)-Enantiomer bis zu einem Drittel zur gesamten 15-H(p)ETE-Bildung bei. Aus diesem Ergebnis muss geschlussfolgert werden, dass die 15-H(p)ETE-Bildung bei den Mutanten, die 15-H(p)ETE als Nebenprodukt synthetisieren, nur teilweise enzymkontrolliert abläuft. Interessanterweise korreliert die Zunahme des Anteils der 15-H(p)ETE-Bildung mit der Zunahme der Stereospezifität. Dies bedeutet, dass Mutanten mit einem geringen Anteil an 15-H(p)ETE-Bildung überwiegend racemische 15-HETE produzieren, während Enzymmutanten mit hohem 15-H(p)ETE-Anteil bevorzugt 15(S)-HETE bilden. Leider konnte aus Mangel an verfügbarem Enzym das Enantiomerenverhältnis von 15-H(p)ETE, das durch die Vierfachmutante gebildet wurde, nicht quantifiziert werden.

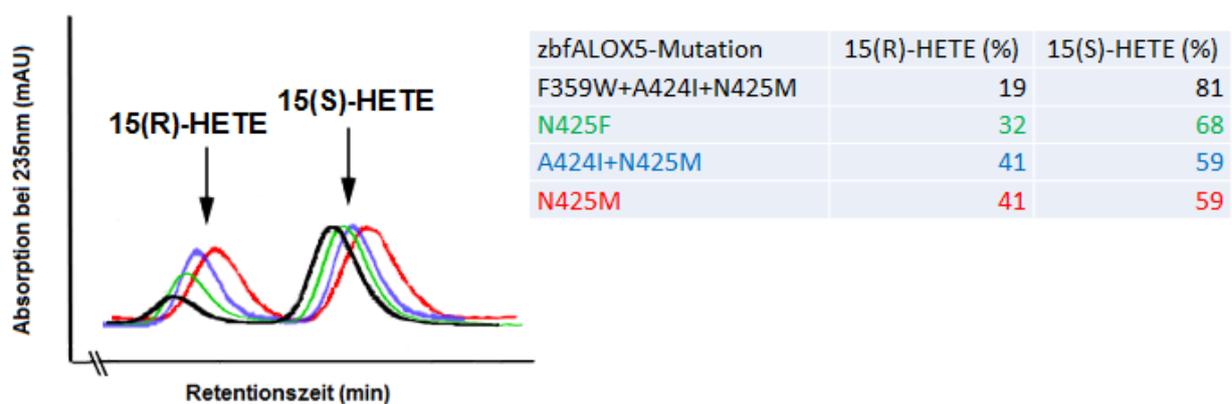


Abb. 21: Chiralphasen-HPLC der 15-HETE, die von zbfALOX5-Triadenmutanten synthetisiert wurde. In der Abbildung sind partielle CP-HPLC-Chromatogramme der hauptsächlich 15-oxygenierenden Dreifachmutante (Schwarz), verschiedener Sloane-Einfachmutanten N425F (Grün) und N425M (Rot), und der Doppelmutante A424I+N425M (Blau) dargestellt. Für die Untersuchung der 15-HETE-Chiralität wurden die 15-HETE-Peaks aus der RP-HPLC präpariert und mittels CP-HPLC in ihre R- und S-Isomere aufgetrennt. Der S-Peak wurde in dem obigen Chromatogramm für alle Mutanten gleich skaliert, um eine sinnvolle Darstellung der relativen S-/R-Anteile zu erreichen. Die Retentionszeiten authentischer Standards sind als Pfeile über den Kurven angegeben.

3.3.2.4 Übersicht über das Produktmuster der zbfALOX5-Triadenmutanten

Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit sind in Tabelle 3 die Produktmuster aller untersuchten zbfALOX5-Triadenmutanten tabellarisch zusammengefasst. Für diese Darstellung wurden die relativen Anteile der 3 Hauptpeaks aus den RP-HPLC-Analysen quantifiziert. Für die überwiegend 8/12-HETE-produzierenden Mutanten (N425M und A424I+N425M) ist bereits gezeigt worden, dass es sich bei dem 8/12-HETE-Peak

überwiegend um 8(S)-HETE handelt (siehe 3.3.2.1.5 und 3.3.2.1.6). Bei den überwiegend 15-oxygenierenden Mutanten wird eher das S-Enantiomer der 15-HETE gebildet (siehe 3.3.2.3).

zbfALOX5-Mutation	15-HETE (%)	8/12-HETE (%)	5-HETE (%)
Wildtyp	1±1	3±2	96±3
A424F	0±0	7±4	92±4
N425M	4±3	58±3	38±2
N425F	32±27	41±14	27±13
A424I+N425M	19±14	65±24	16±10
F359W+A424I+N425M	91±9	9±9	0±0
F359W+A424I+N425M+A603I	61±21	29±12	8±9

Tab. 3: Übersicht über die Reaktionsspezifität von zbfALOX5-Triadenmutanten. In der obigen Tabelle sind die im Detail bereits vorgestellten Triadenmutanten der *zbfALOX5* zusammenfassend aufgeführt. Das jeweilige Hauptprodukt ist durch fette Schrift hervorgehoben. Für die Einfachmutante N425M und die Zweifachmutante A424I+N425M ist bereits gezeigt worden, dass es sich in der 8/12-HETE-Fraktion überwiegend um 8(S)-HETE handelt (siehe 3.3.2.1.5 und 3.3.2.1.6).

Zsfg.: Die Positionsspezifität der *zbfALOX5* lässt sich durch multiple Mutationen der Triadendeterminanten von einer spezifisch 5(S)-lipoxygenierenden ALOX, über eine dominierend 8(S)-lipoxygenierende Form zu einer spezifisch 15(S)-oxygenierenden ALOX umwandeln. Die Ergebnisse bestätigen die Befunde, die für das humane und murine Enzym bereits publiziert wurden, an einer evolutionär entfernten *ALOX5*. Damit scheint das Prinzip, das dieser Eigenschaft zugrunde liegt, evolutionär konserviert zu sein.

3.3.3 Phosphorylierungsmimetische Mutationen

Wie in Kapitel 1.3.3 (Regulation von Lipoxygenasen) bereits erwähnt, enthält die *humALOX5* drei potentielle Phosphorylierungsstellen (Rådmark et al., 2015). Für die phosphorylierungsmimetische Mutation Ser663Asp der humanen *ALOX5* wurde in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt, dass die Mutation eine vollständige Umkehrung der Positionsspezifität des Enzyms von einer 5- zu einer 15-lipoxygenierenden Isoform induziert (Gilbert et al., 2012). Für die humane und die murine *ALOX5* konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden (Adel et al., 2014). Da der Zebrafisch mit hoher

Wahrscheinlichkeit über einen funktionellen Leukotriensignalweg verfügt (Horn et al., 2015), sollten die regulatorischen Mechanismen leukotriensynthetisierender Enzyme evolutionär konserviert sein.

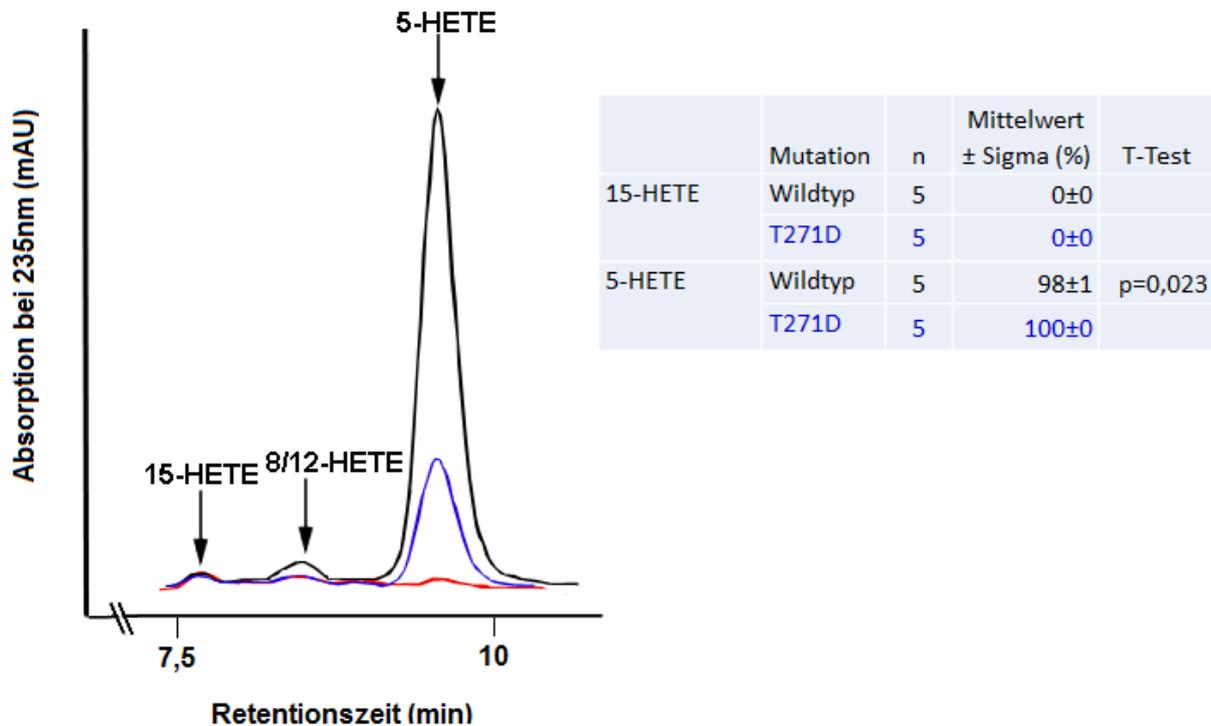


Abb. 22: Produktmuster der phosphorylierungsmimetischen Mutante T271D. In der obigen Abbildung sind jeweils repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der Produktmuster von *zbfALOX5*-Wildtyp (Schwarz), Negativkontrolle (denaturierter Wildtyp, Rot) und der Pseudophosphorylierungsmutante T271D (Blau, Thr271Asp) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Produktstandards wurden ebenfalls analysiert und sind mit Pfeilen über den Kurven gekennzeichnet. Rechts in der Abbildung ist die deskriptive und vergleichende Statistik tabellarisch dargestellt.

Um die Auswirkungen einer etwaigen Phosphorylierung auf die Produktspezifität der *zbfALOX5* zu untersuchen, wurde zunächst ein multiples Aminosäurealignment mit der *hum-* und *mouALOX5* erstellt, das Aufschluss über ein mögliches Vorhandensein dieser Phosphorylierungsstellen in der Primärstruktur der *zbfALOX5* gibt (siehe 3.3, Abb. 10). Aus diesem Alignment geht hervor, dass nur die Position Ser663 der drei Phosphorylierungsstellen (Ser271, Ser523 und Ser663) streng konserviert zu sein scheint. An der Stelle Ser271 befindet sich ein Threonin (T, Thr). Dieses enthält allerdings ebenfalls eine Hydroxylgruppe in der Seitenkette und könnte damit als potentielle Phosphorylierungsstelle fungieren. An der Position Ser523 ist in der *zbfALOX5* ein Cystein (C, Cys) lokalisiert, das mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht phosphoryliert werden kann. In der Sequenz der *zbfALOX5* scheinen also zwei (Thr271 und Ser663) der drei Phosphorylierungsstellen des humanen Enzyms funktionell konserviert zu sein. An diesen beiden Aminosäuren wurde durch ortsgerichtete Mutagenese eine

Phosphorylierung simuliert. Dabei wurde die Zielaminosäure durch ein Aspartat (Asp, D) ersetzt, dessen strukturelle Auswirkungen auf das Protein einer Phosphorylierung von Serin ähnlich sind (Huang and Erikson, 1994). Schließlich erfolgte die Expression dieser Mutante, mit jeweils simultaner Expression des Wildtypenzym als Positivkontrolle, in BL21(DE3)pLysS E. coli-Zellen mit anschließender Aufreinigung per Affinitätschromatographie mittels Cobalt-Sepharose. Das Niveau der LOX-Expressionen wurde im Western Blot quantifiziert und Aktivitätsassays mit allen fünf Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Charakterisierung der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte erfolgte mittels RP-HPLC (**Abb. 22 und 23**). Die relativen Anteile der Flächeneinheiten unter den jeweiligen HETE-Peaks wurden für die Statistik durch Subtraktion der jeweiligen Negativkontrolle korrigiert.

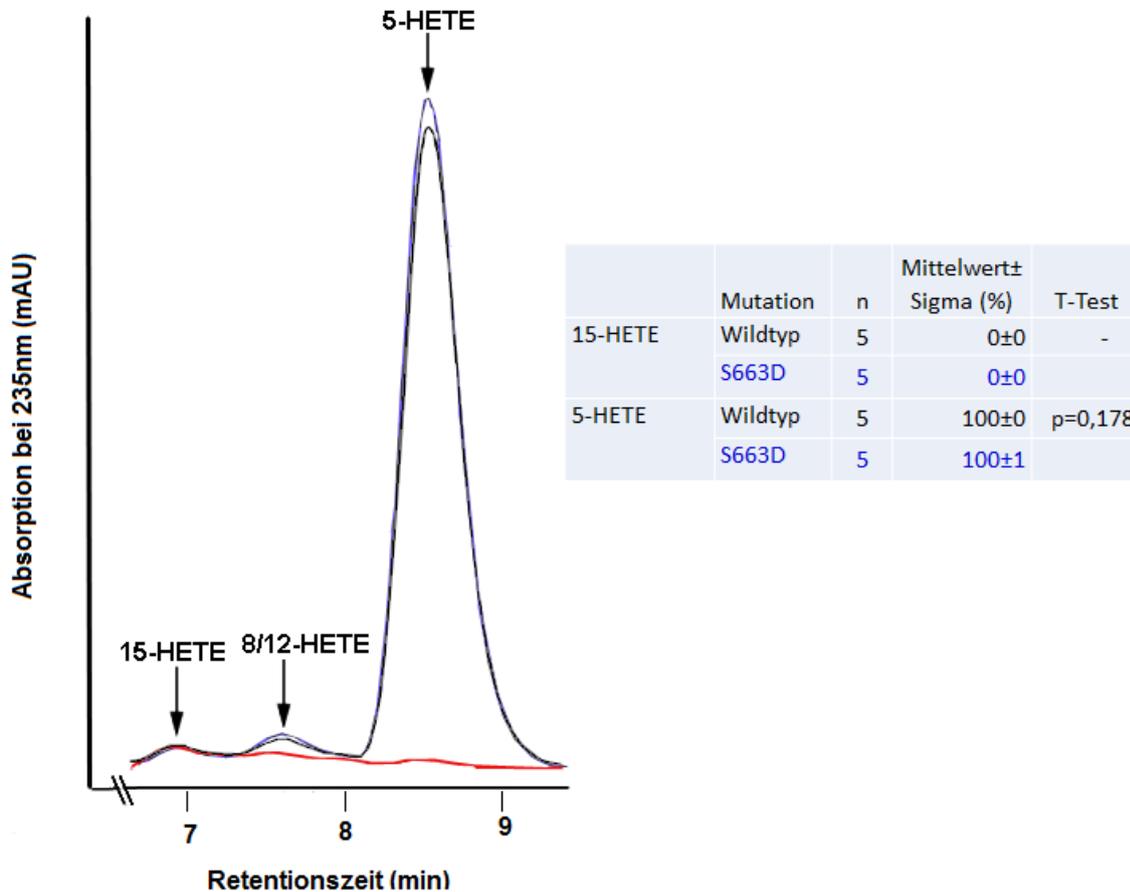


Abb. 23: Produktmuster der Phosphorylierungsmutante S663D. In der obigen Abbildung sind jeweils repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der Produktspektren von *zbfALOX5*-Wildtyp (Schwarz), Negativkontrolle (denaturierter Wildtyp, Rot) und der Pseudophosphorylierungsmutante S663D (Blau, Ser663Asp) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Produktstandards wurden ebenfalls analysiert und sind mit Pfeilen über den Kurven gekennzeichnet. Rechts in der Abbildung ist die deskriptive und vergleichende Statistik tabellarisch dargestellt.

Für alle exprimierten Zebrafisch-Enzyme war 5-H(p)ETE das dominante Reaktionsprodukt. Bei den Untersuchungen der Phosphorylierungsmutante Thr271Asp konnte ein relativer Anteil von $100\pm 0\%$ 5-H(p)ETE für die Phosphorylierungsmutante gemessen werden. Dieser liegt geringfügig, jedoch statistisch signifikant, höher als die durch den Wildtyp entstandene 5-H(p)ETE-Fraktion von $98\pm 1\%$ ($p < 0,05$). Die Bildung von 15-HETE konnte nicht nachgewiesen werden. Für die Phosphorylierungsmutante Ser663Asp konnte, ebenso wie für die Thr271Asp-Mutante, keine 15-H(p)ETE-Produktion nachgewiesen werden. In diesem Experiment ergab sich für das Wildtypenzym und die Ser663Asp-Mutante eine 100%ige 5-HETE Bildung.

Die Bildung einer größeren Menge 15-H(p)ETE oder gar Inversion der Produktspezifität von 15- zu 5-Lipoxygenierung durch Phosphorylierung kann für die *zbfALOX5* auf der Grundlage dieser Experimente nicht postuliert werden. Für beide phosphorylierungsmimetischen Mutanten beträgt der relative 15-H(p)ETE-Anteil $< 1\%$ und der 5-H(p)ETE-Anteil $> 99\%$. In Anbetracht der deutlich geringeren Fläche des 5-H(p)ETE-Peaks im Chromatogramm könnte man bei gleichem Expressionsniveau des Enzymproteins auf eine geringere spezifische Aktivität der Enzymmutanten schließen. Detaillierte Untersuchungen zur spezifischen Aktivität dieser Mutanten durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe bestätigen eine geringere Aktivität der Phosphorylierungsmutante Thr271Asp. Demnach beträgt die $\mu\text{g HETE/mg Gesamtprotein-Ratio}$ für den *zbfALOX5*-Wildtyp $1,31\pm 0,21$ und die *zbfALOX5* Thr271Asp-Mutante nur $0,54\pm 0,05$ (Adel et al., 2014). Bei der Interpretation der spezifischen Aktivitäten sollte berücksichtigt werden, dass die molaren Turnover-Raten der verschiedenen Mutanten nicht exakt bestimmt worden sind. Dies würde eine komplette Aufreinigung der rekombinanten Mutanten und detaillierte kinetische Messungen voraussetzen, die hier nicht durchgeführt wurden.

Zsfg.: Von den drei bekannten Phosphorylierungsstellen der humanen *ALOX5* sind zwei (Ser271 und Ser663) in der Sequenz der *zbfALOX5* funktionell konserviert. Phosphorylierungsmimetische Mutanten (Thr271Asp und Ser663Asp) der *zbfALOX5* weisen keine wesentlichen Veränderungen in Ihrem Produktmuster auf. 5-H(p)ETE ist bei allen getesteten Enzymvarianten das Hauptprodukt und die Bildung von 15-H(p)ETE ist nicht nachweisbar.

3.3.4 Expressionsprofile Leukotrien-relevanter Enzyme in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs

Untersuchungen des Phänotyps *zbfLOX1*-defizienter Zebrafische haben gezeigt, dass die Inaktivierung des entsprechenden Gens zu einer Beeinträchtigung der frühen Embryonalentwicklung führt. Zebrafisch-Embryonen, in denen die Expression des entsprechenden Gens mittels Morpholino-Oligonukleotiden unterdrückt wurde, zeigten Fehlbildungen im Bereich des Kopfs und der Schwanzflosse mit einer gestörten Somitenorganisation und Ödemen des Perikards und des Dottersacks im Bereich der Nieren- und Darmanlage. Diese Befunde lassen eine Rolle dieser LOX-Isoform während der Embryonalentwicklung und bei der Organogenese vermuten. Daraus ergibt sich die Frage, ob und in welchem Umfang die verschiedenen Lipoxygenasen während der Embryonalentwicklung des Zebrafischs exprimiert werden, denn bisher gibt es keine detaillierten Expressionsprofile für Eikosanoid-relevante Genprodukte in diesem Modellorganismus. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde aus Zebrafischembryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Embryonalentwicklung RNA isoliert und in den RNA-Extrakten die Konzentrationen verschiedener LOX-mRNAs mittels quantitativer RT-PCR quantifiziert. Um eine exakte Quantifizierung zu erreichen, wurden den RNA-Präparationen externe Quantifizierungsstandards für die jeweiligen Genprodukte (Amplikons) und für den internen Standard zugesetzt. Diese Untersuchungen erfolgten jeweils 24h, 48h, 72h und 5d nach der Fertilisation. Als interner Standard wurde die mRNA des Elongationsfaktors 1-alpha (EF1a) quantifiziert. Die mRNA-Level der untersuchten Zebrafischlipoxygenasen ALOX5, ALOX12, ALOX15B und ALOXE3 sind in der unten stehenden Abbildung (**Abb. 24**), jeweils in Relation zur Kopien-Anzahl des Housekeeping-Gens EF1a angegeben.

Für alle untersuchten Enzyme kann festgestellt werden, dass ihre maximalen Expressionslevel, bezogen auf den Untersuchungszeitraum der ersten fünf Tage ihrer Embryonalentwicklung, an Tag eins oder zwei erreicht werden. Die mRNA-Level der *zbfALOX5* liegen nach 24h bei 7.198 Kopien pro 10^4 EF1a-Kopien und zeigen nach weiteren 24h einen steilen Abfall auf 1.845 Kopien. Dieser Wert schwankt in den darauffolgenden Tagen nicht mehr maßgeblich und liegt zum Zeitpunkt 72h bei 957 Kopien und nach 5d bei 593 Kopien pro 10^4 EF1a-Kopien. Die *zbfALOX12*-Expression zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, auf ca. doppeltem Expressionsniveau. Nach 24h kann eine mRNA-Kopien-Anzahl von 14.473, nach 48h von 6.594, nach 72h von 2.327

und nach 5d von 881 pro 10^4 EF1a-Kopien gemessen werden. Für die ALOX15B ist die Expressionskinetik zwar ähnlich und zeigt nach 24h mit 339 mRNA-Kopien den relativ höchsten Wert mit einem darauffolgenden Abfall auf 137 Kopien nach 48h, 89 Kopien nach 72h und 32 Kopien nach 5d pro 10^4 EF1a-Kopien. Das absolute Expressionsniveau für die ALOX15B ist jedoch deutlich niedriger als das der anderen LOX-Isoformen. Das Expressionslevel der zbfALOXE3 kann 24h nach der Befruchtung auf 11.706 Kopien pro 10^4 EF1a-Kopien beziffert werden und steigt auf 15.253 Kopien nach 48h an. Damit liegt die höchste Expressionsrate dieser LOX nicht bei 24h, sondern wird erst zum Messzeitpunkt 48h erreicht. Anschließend kann eine steile Abnahme der Expression auf zunächst 5.133 Kopien nach 72h 934 Kopien pro 10^4 EF1a-Kopien nach 5d nachgewiesen werden.

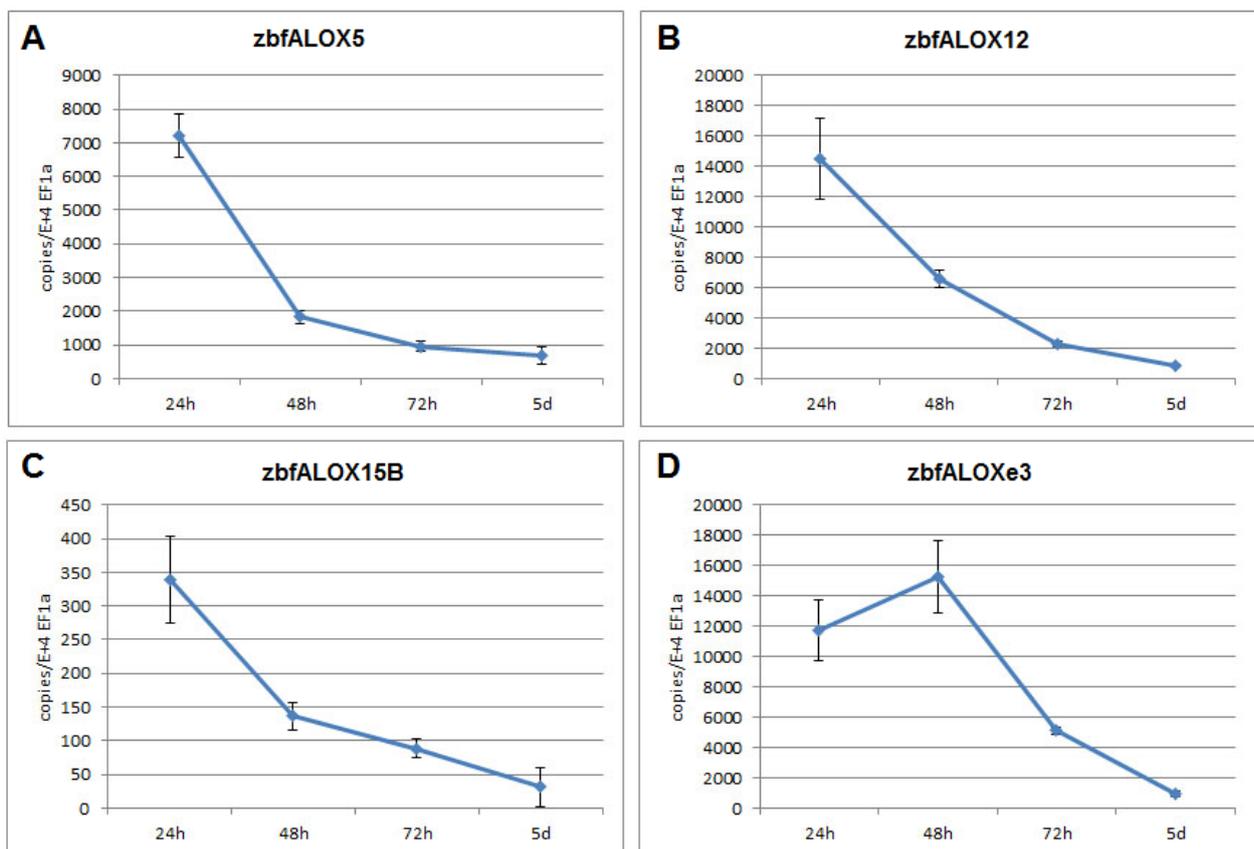


Abb. 24: Expressionsprofile von LOX-Isoformen in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs. In der obigen Abbildung sind jeweils die mRNA-Level der zbfALOX5 (A), der zbfALOX12 (B), der zbfALOX15B (C) und der zbfALOXE3 (D) als Anzahl der Kopien pro 10^4 Kopien des Homekeeping-Gens EF1a dargestellt.

3.4 Charakterisierung der 15-Lipoxygenase höherer Primaten

Die orthologen Enzyme der humanen *ALOX15* in anderen Säugetierspezies weisen eine variable Positionsspezifität auf. So verfügen Mäuse (Sun and Funk, 1996), Ratten (Watanabe and Haeggström, 1993) und niedere Primaten (Vogel et al., 2010) über 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoformen, während höhere Primaten (Johannesson et al., 2010, Vogel et al., 2010) und der Mensch (Sloane et al., 1990) offensichtlich 15-lipoxygenierende Enzyme exprimieren. Zum Zeitpunkt des Beginns meiner experimentellen Arbeiten war ungeklärt, ob es sich bei der Variabilität der Reaktionsspezifität um zufällige Veränderungen dieser Eigenschaft der *ALOX15*-Orthologe handelt, oder ob sich dahinter ein evolutionäres Konzept verbirgt. Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst in Anlehnung an den in der Einleitung aufgezeigten Primatenstammbaum (siehe 1.5.4.3.1, Abb. 5) die *ALOX15*-Isoformen ausgewählter Primatenspezies (Schimpansen, Gibbons, Paviane) kloniert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Die Klonierung und Charakterisierung der *ALOX15* des Pavians (*Papio anubis*) wurde von Frau Maria Pekarova im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. Im Rahmen meiner Dissertation wurden die *ALOX15*-Orthologe des Schimpansen (*Pan troglodytes*) und des Gibbons (*Nomascus leucogenys*) charakterisiert. Auf die experimentelle Charakterisierung der Bonobo-*ALOX15* konnte verzichtet werden, da es keine Unterschiede in der Primärstruktur zur *ALOX15* des *Pan troglodytes* gab. Die *ALOX15* des Gibbons ist von besonderem Interesse, da dieser die mögliche Übergangsspezies zwischen niederen Primaten mit 12-lipoxygenierenden und höheren Primaten mit 15-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen darstellen könnte. Im Anschluss an die Charakterisierung der *ALOX15*-Orthologe wurden Mutageneseuntersuchungen durchgeführt, um die mechanistische Grundlage der *ALOX15*-Spezifitätsveränderung während der Primatenevolution zu erklären und die Gültigkeit des Triadenkonzepts für die neu klonierten *ALOX15*-Orthologe zu überprüfen (siehe 3.4.5).

3.4.1 Phylogenetische Aspekte der *ALOX15*-Produktspezifität

Auf der Grundlage des Triadenkonzepts der Positionsspezifität (Ivanov et al., 2010) kann die Reaktionsspezifität von *ALOX15*-Orthologen auf der Basis ihrer Aminosäuresequenz vorausgesagt werden. Dabei spielen vor allem die Seitenketten der Triadendeterminanten eine Rolle. In Tabelle 4 sind die Triadendeterminanten der Gibbon-

und Schimpansen-*ALOX15* gemeinsam mit denen anderer Säugetierspezies zusammengestellt (Tab. 4).

Spezies	BG-I	SL	BG-II	Σ (Å ³)	Hauptprodukt (vorhergesagt)	Hauptprodukt (experimentell)
Maus (<i>Mus musculus</i>)	DLQ	KVMS	NVV	458	12-H(p)ETE	12-H(p)ETE
Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	DLQ	KAMS	NVV	420	12-H(p)ETE	12-H(p)ETE
Rind (<i>Bos taurus</i>)	DFQ	QVVS	SIT	469	12-H(p)ETE	12-H(p)ETE
Pavian (<i>Papio anubis</i>)	DFQ	QVVS	SMT	469	12-H(p)ETE	12-H(p)ETE
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	DFQ	QVVS	SIT	469	12-H(p)ETE	12-H(p)ETE
Gibbon (<i>Nomascus leucogenys</i>)	DFQ	QITS	SIV	476	?	s.u.
Orangutan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	15-H(p)ETE
Orangutan (<i>Pongo abelii</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	15-H(p)ETE
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	DFG	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	n.d.
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	s.u.
Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	s.u.
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	15-H(p)ETE
Mensch (<i>H. neanderthalensis</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	s.u.
Mensch (<i>Homo denisovan</i>)	DFQ	QIMS	SIT	507	15-H(p)ETE	s.u.

Tab. 4: Triadendeterminanten der *ALOX15* ausgewählter Säugetierspezies. In der Tabelle sind die Triadendeterminanten für Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Rind (*Bos taurus*) als niedere Säuger sowie für die Primaten Pavian (*Papio anubis*), Rhesusaffe (*Macaca mulatta*), Gibbon (*Nomascus leucogenys*), Orangutans (*Pongo pygmaeus* und *abelii*), Gorilla (*Gorilla gorilla*), Schimpanse (*Pan troglodytes*), Bonobo (*Pan paniscus*), Mensch (*Homo sapiens*) und für die Frühmenschen (*H. neanderthalensis* und *H. denisovan*) zusammengefasst. Zusätzlich ist das kumulative van-der-Waals-Volumen der Seitenketten der Triadendeterminanten [Σ (Å³)] und das entsprechend der Triadenhypothese zu erwartende Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung dargestellt. n.d.: Experimentell noch nicht definiert. s.u.: Experimentelle Ergebnisse im Ergebnisteil (siehe 3.4.4) einzusehen. Die Tabelle wurde modifiziert nach (Horn et al., 2015).

Entsprechend des Triadenkonzepts befinden sich an den Stellen der Triadendeterminanten bei Spezies mit der 12-oxygenierenden Variante der *ALOX15* wie Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Rind (*Bos taurus*) und Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) vergleichsweise kleine Aminosäuren wie Valin (V; 105 Å³) oder Threonin (T; 93 Å³). So findet man bei diesen Enzymen mindestens eine kleine Aminosäure an einer der Sloane-Determinanten oder mehrere kleine Aminosäuren an der Sloane- und an der Borngräber II-Determinante. Die höheren Primaten mit 15-oxygenierenden Isoformen der *ALOX15* enthalten konsequent ein großes Phenylalanin (F; 135 Å³) an der Position der Borngräber I-Determinante, zwei mittelgroße AS [Isoleucin (I; 124 Å³) und Methionin (M; 124 Å³)] an der Sloane-Determinante und je ein Isoleucin

(I; 124 Å³) und Threonin (T; 93 Å³) an der Borngräber II-Determinante. Aufgrund der identischen Positionsdeterminanten des Schimpansen (*Pan troglodytes*) und des Bonobos (*Pan paniscus*) wird im Folgenden der Einfachheit halber nur noch vom Schimpansen gesprochen, allerdings treffen alle Ergebnisse folglich auch auf den Bonobo zu.

Bedient man sich unter Vernachlässigung der biochemischen Dynamik einfachster mathematischer Mittel und addiert die van-der-Waals-Volumina dieser Determinanten, kann man das Volumen der AS-Seitenketten abschätzen und somit den theoretischen Raumbedarf quantifizieren, der das Volumen der Substratbindungstasche beeinflussen sollte. Für die Spezies mit einer 12-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoform kommt man für die Maus-LOX auf ein Gesamtvolumen von 458 Å³, für die Ratten-LOX auf 420 Å³ und für das Volumen der Triadendeterminanten von Rind, Pavian- und Rhesusaffen-LOXn auf je 469 Å³. Für den Gibbon erhält man einen Wert von 476 Å³ und für die höheren Primaten Orang-Utan, Gorilla, Schimpanse, Bonobo, sowie die Früh- und modernen Menschen erhält man je einen Wert von 507 Å³. Aus diesen Daten kann man formal schlussfolgern, dass 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe eine größere Substratbindungstasche aufweisen (geringerer Raumverlust), während 15-lipoxygenierende Enzyme eine kleinere Substratbindungstasche besitzen sollten. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass es sich hierbei um formale Rechenmodelle handelt, die bisher noch nicht durch experimentelle Strukturdaten belegt worden sind.

Zsfg.: Aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der *ALOX15*-Orthologe verschiedener Säugetierspezies kann geschlussfolgert werden, dass die Reaktionsspezifität der *ALOX15* sich während der Säugetierevolution von einer spezifischen 12-Lipoxygenierung zu einer 15-Lipoxygenierung verändert hat. Diese Veränderung könnte auf Punktmutationen der Spezifitätsdeterminanten zurückzuführen sein.

3.4.2 Sequenzhomologie der *hum*-, *pan*- und *gibALOX15*

Zu Beginn der Experimente wurden die *ALOX15*-cDNAs von Gibbon und Schimpanse vergleichend mit der menschlichen Isoform hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie untersucht. Dazu wurden mittels der Software Clustal Omega und Lasergene MegAlign von DNA Star multiple Alignments auf DNA- sowie auf

Aminosäureebene durchgeführt. Die Sequenz der ALOX15 des Gibbons (*Nomascus leucogenys*) entstammt der Datenbank Pubmed/MEDLINE (XM_003277854.1), ebenso die Sequenz der humanen Isoform (NM_001140.3). Die ALOX15 des Schimpansen *Pan Troglodytes* entstammt eigener mRNA-Isolation durch Mitarbeiter der AG Prof. Kühn und anschließender Sequenzierung der korrespondierenden cDNA durch Eurofins MWG Operon.

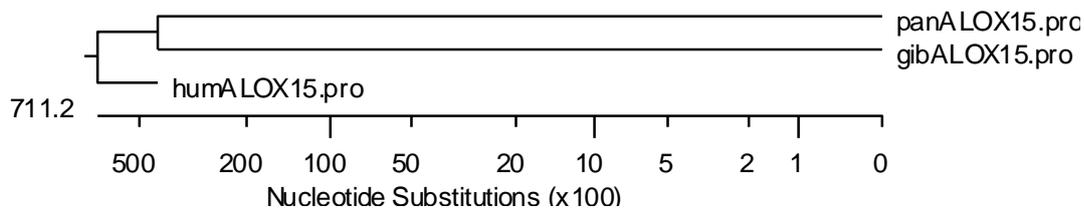


Abb. 25: Phenogramm der ALOX15-Isoformen von Gibbon, Schimpanse und Mensch. Auf der Grundlage der Aminosäure-Sequenzhomologie ist in der Abbildung die Verwandtschaftshypothese von Schimpanse und Mensch als Phenogramm dargestellt.

Die unten stehende Tabelle illustriert den Grad der Sequenzhomologie der ALOX15-Isoformen von Schimpanse und Gibbon im Verhältnis zur menschlichen Isoform in Prozent (**Tab. 5**).

Enzym	Sequenzhomologie in %		
	cDNA	Protein	Anzahl der AS Unterschiede
humALO15	100	100	0
panALO15	99,5	99,5	3
gibALO15	96,2	96,8	21

Tab. 5: Sequenzhomologiegrad der ALOX15-Isoformen von Gibbon, Schimpanse und Mensch. Die Konservierung der Sequenzen auf cDNA-Ebene sowie auf Aminosäurelevel ist jeweils in Relation zur humanen Isoform in Prozent angegeben. Spalte drei kennzeichnet die Anzahl der Aminosäure-Mutationen, verglichen mit der humanen ALOX15.

Von Bedeutung sind insbesondere die Unterschiede auf Aminosäureebene, da stille Mutationen, welche in DNA-Vergleichen berücksichtigt werden, aufgrund der Translation zu gleichen Aminosäuren keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben. Allerdings ist die Gesamtheit der Sequenzhomologie nicht von großer Bedeutung für die Positionsspezifität, da Lipoxygenasen mit hoher evolutionärer Verwandtschaft (hohe Sequenzhomologie) durchaus unterschiedliche Produktmuster synthetisieren können (Ivanov et al., 2010). Um funktionelle Unterschiede der Säugetier-ALOX15-Orthologe zu ermitteln, bedarf es daher einer gezielten Analyse jener Aminosäuren, die am

katalytischen Zentrum der Enzyme lokalisiert sind und damit die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen direkt beeinflussen können.

3.4.3 Vorhersage der Positionsspezifität von *pan*- und *gib*ALOX15

Da das Triadenkonzept für die *ALOX15*-Isoformen von Säugetieren eine vorhersagende Bedeutung hat, kann man aus der chemischen Struktur der Triadendeterminanten die Reaktionsspezifität noch nicht isolierter *ALOX15*-Isoformen vorhersagen. Durch den Vergleich der Sequenzdeterminanten (**Abb. 26**) für die Positionsspezifität der beiden noch nicht charakterisierten *ALOX15*-Orthologe des Gibbons und des Schimpansen erhält man folgende Hinweise:

	351				400
h. sapiens	DFQLHELQSH	LLRGHLMAEV	IVVATMRCLP	SIHPIFKLII	PHLRYTLEIN
n. leucogenys	DFQLHELQSH	LLRGHLMAEV	IVVATMRCLP	SIHPIFKLII	PHLRYTLEIN
pan troglodytes	DFQLHELQSH	LLRGHLMAEV	IVVATMRCLP	SIHPIFKLII	PHLRYTLEIN
	401				450
h. sapiens	VRARTGLVSD	MGIFDQIMST	GGGGHVQLLK	QAGAFLTYSS	FCPPDDLADR
n. leucogenys	VRARTGLVSD	MGIFDQITST	GGGGHVQLLK	QAGAFLTYSS	FCPPDDLADR
pan troglodytes	VRARTGLVSG	MGIFDQIMST	GGGGHVQLLK	RAGAFLTYSS	FCPPDDLADR
	451				500
h. sapiens	GLLGVKSSFY	AQDALRLWEI	IYRYVEGIVS	LHYKTDVAVK	DDPELQTWCR
n. leucogenys	GLLGVESSFY	AQDALRLWEI	IYRYVEGIVS	LHYKTDVAVK	DDPELQSWCR
pan troglodytes	GLLGVKSSFY	AQDALRLWEI	ICRYVEGIVS	LHYKTDVAVK	DDPELQTWCR
	501				550
h. sapiens	EITEIGLQGA	QDRGFPVSLQ	ARDQVCHFVT	MCIFTCTGQH	ASVELGQLDW
n. leucogenys	DITEIGLQGA	QDRGFPVSLQ	SRDQVCRFVT	MCIFTCTGQH	ASVELGQLDW
pan troglodytes	EITEIGLQGA	QDRGFPVSLQ	ARDQVCHFVT	MCIFTCTGQH	ASVELGQLDW
	551				600
h. sapiens	YSWVPNAPCT	MRLPPPTTKD	ATLETVMATL	PNFHQASLQM	SITWQLGRRQ
n. leucogenys	YSWVPNAPCT	MRLPPPTTKD	ATLETVMATL	PNFHQASLQM	SIVWQLGRRQ
pan troglodytes	YSWVPNAPCT	MRLPPPTTKD	ATLETVMATL	PNFHQASLQM	SITWQLGRRQ

Abb. 26: Partielles *ALOX15*-Aminosäurealignment von Mensch, Gibbon und Schimpanse. In den Sequenzen sind in Rot die Triaden-Determinanten dargestellt. In Lila erkennbar sind 4 der 5 proteinogenen Eisenliganden. Dunkelgrün markiert ist die sogenannte Coffa-Determinante, welche die Stereospezifität der Reaktion definiert (Coffa and Brash, 2004). In Gelb markiert sind Aminosäureunterschiede im Vergleich zur humanen *ALOX15* AS-Sequenz. Die hier alternative Nummerierung der AS erfolgte ohne Einbeziehung des initialen Methionins, daher die Verschiebung um eine Position.

Der Schimpanse (*Pan Troglodytes*) scheint aufgrund menschenidentischer Triaden-Determinanten Phe353, Ile418, Met419 und Ile593 eine 15-lipoxygenierende Isoform der *ALOX15* zu exprimieren. Aufgrund der Tatsache, dass es sich beim Schimpansen um den nächsten lebenden Verwandten des Menschen handelt (Shoshani et al., 1996), wäre eine solche Reaktionsspezifität nicht verwunderlich.

Der Gibbon (*N. Leucogenys*) hingegen als evolutionär ferner Verwandter des Menschen weist bei der Sloane-Determinante Met419 einen Aminosäureaustausch Met419Thr auf. Das relativ große Methionin mit einem van-der-Waals-Volumen von 124 Å³ ist hier durch ein deutlich kleineres Threonin (van-der-Waals-Volumen: 93 Å³) substituiert. Durch diese einzelne Mutation könnte man unter Anbetracht der kleineren Seitenkettengröße des Threonins annehmen, die Substratbindungstasche würde größer. Entsprechend des Triadenkonzepts würde dies eine vermehrte 12-Lipoxygenierung nach sich ziehen. Hinzu kommt allerdings eine zweite Mutation in direkter Nachbarschaft zur Borngräber II-Determinante Ile593. Dort ist ein Threonin mit einem van-der-Waals-Volumen von 93 Å³ durch ein geringfügig größeres Valin (van-der-Waals-Volumen der Seitenkette: 105 Å³) ersetzt (Thr594Val). Dies bedeutete formal eine geringfügige Verkleinerung der Substratbindungstasche und damit eine partielle Aufhebung des vergrößernden Effekts des Met419Thr-Austausches. Würde man die Volumenänderungen durch die beiden Mutationen verrechnen, käme man auf einen Nettoraumgewinn von $31 \text{ Å}^3 - 12 \text{ Å}^3 = 19 \text{ Å}^3$ im aktiven Zentrum. Diese Überlegungen lassen eine mögliche Zunahme der 12-Lipoxygenierung in der Positionsspezifität der Gibbon-15-LOX im Vergleich zur menschlichen Isoform vermuten.

Die funktionelle Bedeutung dieser Modellrechnungen ist jedoch limitiert. Die alleinige Betrachtung der Volumina von einzelnen Aminosäureresten bedeutet nicht, dass die diskutierten Größenveränderungen im Protein auch wirklich auftreten. Dies hängt in erster Linie von der Orientierung der Seitenketten im Protein ab, die sich aus den Volumendaten nicht ableiten lässt. Diese Orientierung wird vor allem durch die Wechselwirkungen zwischen den betroffenen Aminosäuren und anderen Bestandteilen der Polypeptidkette bestimmt, die sich in der unmittelbaren räumlichen Umgebung befinden. Beispielsweise wurde bei der Mutation Thr594Val eine polare Hydroxylgruppe durch eine hydrophobe Methylgruppe ersetzt. Dies könnte sich auf die Orientierung der Seitenkette auswirken, da Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken zu anderen Aminosäuren in der Umgebung ausbilden können, was die räumliche Orientierung des AS-Restes verändern sollte. Methylgruppen könnten andererseits durch stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Resten eine veränderte Orientierung induzieren. Es können sich also viele Faktoren auf die Positions- und Stereospezifität der

Lipoxygenase auswirken, die man nicht so einfach vorhersagen kann. Daher bedarf es unbedingt der experimentellen Untersuchung der Enzymeigenschaften.

Zsfg.: Anhand der Aminosäuresequenz lässt sich für die *ALOX15* des Schimpansen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine 15-Lipoxygenierung vorhersagen. Für den Gibbon kann aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuren an den Positionsdeterminanten mit einem theoretischen Raumgewinn der Substratbindungstasche von ca. 19 Å³ eine Zunahme der 12-Lipoxygenierung im Vergleich zur menschlichen Isoform vorhergesagt werden.

3.4.4 Biochemische Charakterisierung der *ALOX15*-Orthologe

Zur biochemischen Charakterisierung der *ALOX15*-Orthologe von Gibbon und Schimpanse wurden diese als Multi-His-Tag-Fusionsproteine in *E. coli* rekombinant exprimiert und der Zellysatsüberstand als Enzymquelle für die Experimente genutzt.

3.4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zunächst erfolgte nach der Bradford-Methode die Proteingehaltbestimmung der Zellysatsüberstände. Von diesen wurde jeweils eine Menge von 40 µg für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot verwendet.

Die unten stehende Abbildung (**Abb. 27 A**) zeigt die mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran nach erfolgter SDS-PAGE und Blotvorgang. Von links nach rechts sind eine Proteinleiter als Maßstab für die molekulare Masse, ein Aliquot *aufgereinigter ALOX15* des Kaninchens als Referenz und jeweils 40 µl des Lysatsüberstands der rekombinant exprimierten *ALOX15*-Orthologe von Mensch (*humALOX15*), Gibbon (*gibALOX15*) und Schimpanse (*panALOX15*), aufgetragen. Durch die unspezifische Ponceau-Färbung ist das heterogene Muster aller vorhandenen Proteine in den Lysatsüberständen gut erkennbar. Durch den Vergleich mit der Referenz-*ALOX15* lässt sich eine *ALOX15*-enthaltende Proteinbande von 75 kDa identifizieren, wobei unklar bleibt, ob diese Bande nur auf die *ALOX15* zurückzuführen ist, oder auch andere Proteine enthält. Für den selektiven Nachweis der *ALOX15*-Expression bedarf es der Immundetektion mittels eines spezifischen Antikörpers. Abb. 27B zeigt den Western Blot derselben Nitrozellulose-Membran nach Blockierung mit Magermilch und

einstündiger Inkubation mit einem Anti-His-HRP mit anschließender Chemilumineszenzdetektion. Dadurch kann das His-tag *ALOX15*-Fusionsprotein spezifisch detektiert werden. Da die Intensität der Bande proportional der Enzymmenge ist, kann unter Zuhilfenahme der Referenzbande der *ALOX15*-Gehalt in den Lysatüberständen quantifiziert werden.

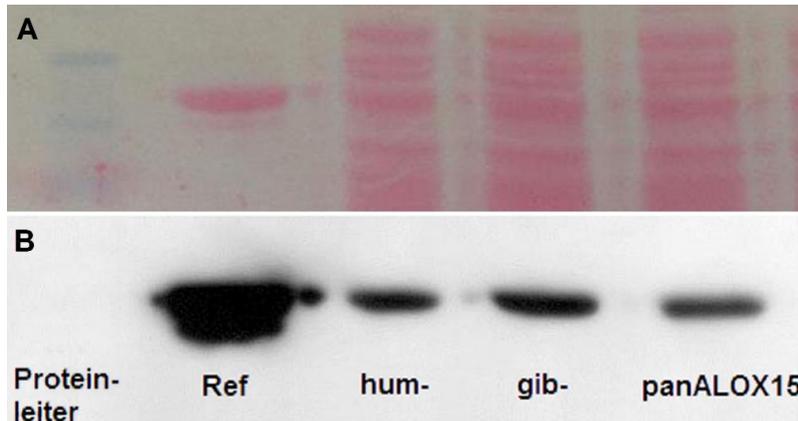


Abb. 27: SDS-PAGE und Western Blot der *hum-*, *gib-* und *panALOX15*. **A:** Temporäre Färbung aller Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S. **B** Im Western Blot sind durch den Anti-His-HRP-AK die LOXn in der 75 kDa-Bande spezifisch detektiert worden und können quantifiziert werden. v.l.n.r. zu sehen sind die Referenz-*ALOX15* des Kaninchens, sowie *hum-*, *gib-* und *panALOX15*.

3.4.4.2 HPLC-Analytik der *ALOX15*-Produkte höherer Primaten

Zur Ermittlung des Produktmusters der einzelnen Enzyme wurden die Lysatüberstände der rekombinant exprimierten Primaten-LOXn im Aktivitätsassay unter definierten Bedingungen mit Arachidonsäure inkubiert. Die Oxygenierungsprodukte wurden mittels RP-HPLC in die verschiedenen Positionsisomere aufgetrennt und quantifiziert. Die Retentionszeiten der unterschiedlichen HETE-Isomere wurden jeweils mittels vorausgehender Analyse eines definierten Standardgemischs bestimmt. Die statistischen Werte ergeben sich aus je vier voneinander unabhängigen Expressionsansätzen, wobei die humane *ALOX15* jeweils als Positivkontrolle mitexprimiert wurde. Pro Expressionsansatz wurden zwei HPLC-Läufe durchgeführt. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen sind in der unten stehenden Abbildung (**Abb. 28**) zusammengefasst.

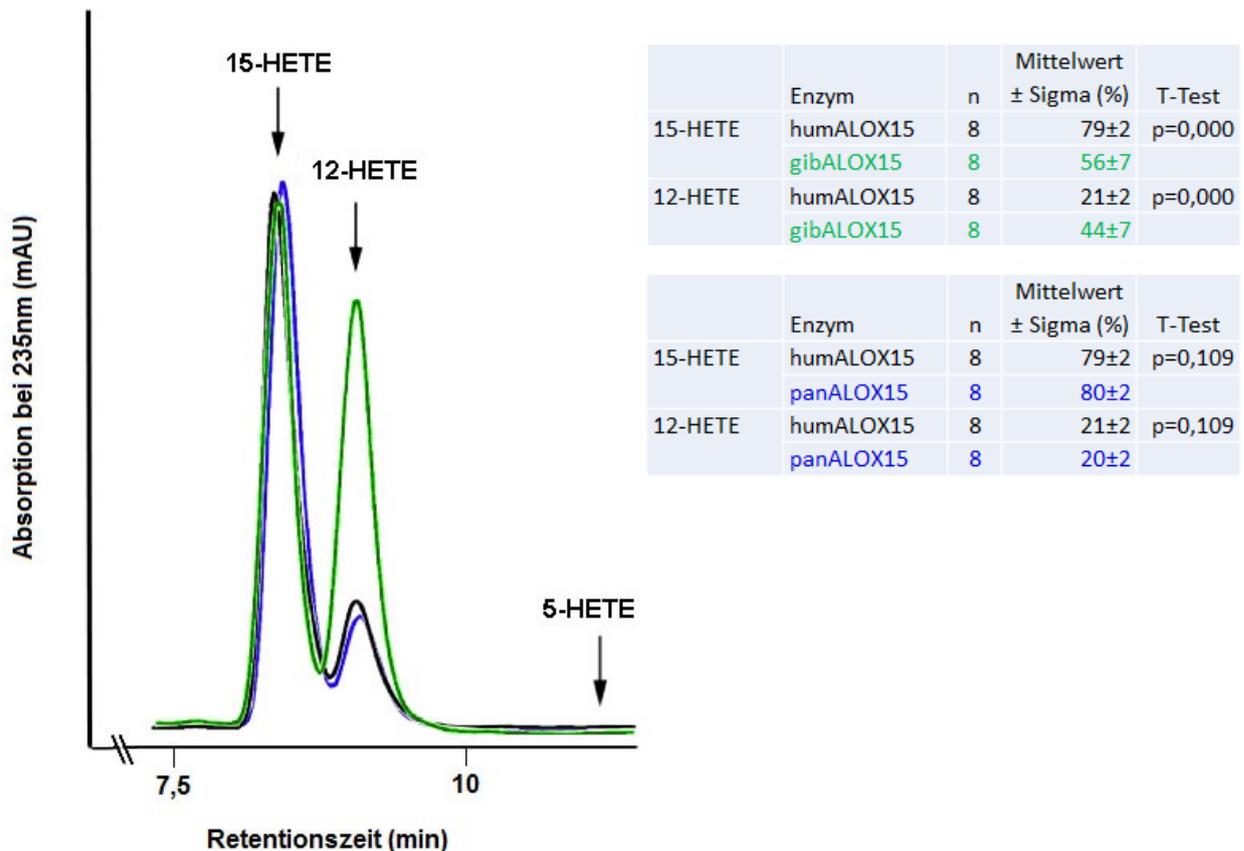


Abb. 28: Partielle Chromatogramme der RP-HPLC-Analysen der *hum*-, *gib*- und *panAlox15*-Reaktionsprodukte. Links in der Abbildung sind repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der *ALOX15*-Isoformen von Mensch (Schwarz), Gibbon (Grün) und Schimpanse (Blau) dargestellt. Die Retentionszeiten authentischer Standards sind durch die Pfeile über den Kurven angegeben. Es erfolgten vier voneinander unabhängige Expressionen mit je zwei Produktanalysen pro Ansatz (n=8). Die deskriptive und vergleichende Statistik der relativen Anteile von 15- und 12-HETE sind rechts in der Abbildung in Prozent angegeben.

Für die *ALOX15*-Reaktionsprodukte des Schimpansen *Pan Troglodytes* (*panAlox15*) kann in der RP-HPLC ein 15-HETE-Anteil von 80,3% und ein 8/12-HETE-Anteil von 19,7% gemessen werden. Die *panAlox15* ist demnach wie die menschliche Isoform überwiegend 15-lipoxygenierend. Die *ALOX15* des Menschen *Homo Sapiens* (*humAlox15*) zeigt im Produktspektrum einen 15-HETE-Anteil von 78,7% und einen 8/12-HETE-Anteil 21,3%, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Positionsspezifität zwischen diesen beiden *ALOX*-Orthologen bestehen. Die *ALOX15* des Gibbons *Nomascus Leucogenys* (*gibAlox15*) setzt die Arachidonsäure hingegen zu 56,1% zu 15-HETE und zu 43,9% zu 8/12-HETE um. Es erfolgte ein zweiseitiger T-Test für zwei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz (heteroskedatisch), welcher signifikante Unterschiede, sowohl hinsichtlich der 12-, als auch der 15-Oxygenierung des Gibbons im Vergleich zum Menschen bzw. zum Schimpansen zeigte. Während diese

dominierend 15-HETE produzieren, zeigt der Gibbon eine nahezu ähnliche Verteilung von 15-HETE und 8/12-HETE im Produktmuster. Es sei darauf hingewiesen, dass unter unseren analytischen Bedingungen in der RP-HPLC 12- und 8-HETE nicht vollständig voneinander getrennt werden können. Zusätzliche SP-HPLC-Analysen haben jedoch ergeben, dass der Anteil an 8-HETE sehr gering war, sodass der gesamte RP-HPLC-Peak auf 12-HETE zurückzuführen ist (**Abb. 29**). Auf eine separate Quantifizierung der 8-HETE Bildung wurde deshalb verzichtet.

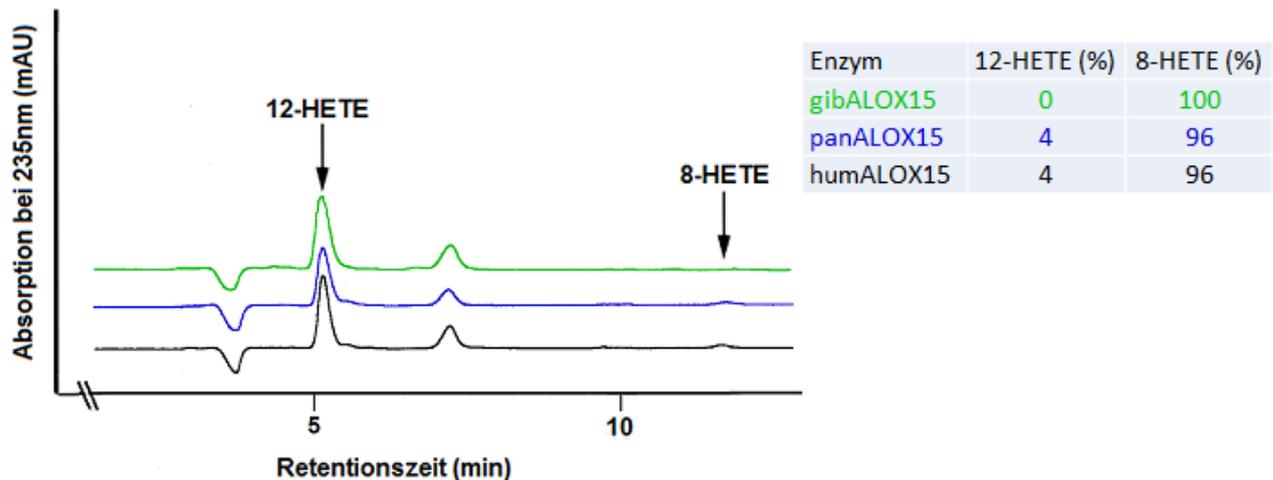


Abb. 29.: Partielle SP-HPLC-Chromatogramme des 8/12-HETE-Peaks der RP-HPLC unterschiedlicher Primaten. In der obenstehenden Abbildung sind partielle SP-HPLC-Chromatogramme des präparierten 8/12-HETE-Peaks von Mensch (Schwarz), Schimpanse (Blau) und Gibbon (Grün) dargestellt. Diese wurden zuvor aus der RP-HPLC aufgefangen, das Lösungsmittel vaporisiert und die Probe für das SP-HPLC-Verfahren in entsprechendes Laufmittel aufgenommen. Die Retentionszeiten authentischer Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Bei dem nicht beschrifteten Peak nach einer Retentionszeit von ca. sieben Minuten handelt es sich nicht um ein konjugiertes Dien. Ein entsprechender Peak wurde auch gefunden, wenn eine entsprechende Lösungsmittelmenge der RP-HPLC verdampft und analysiert wurde.

Zur Ermittlung der Chiralität von *ALOX15*-Produkten wurden die 12- und 15-HETE-Peaks nach einem Reinigungsschritt über SP-HPLC mittels CP-HPLC analysiert. Die Untersuchung der 15-HETE-Peaks ergab eine S/R-Verteilung von 93:7 für den Menschen und 91:9 für den Schimpansen. Die Chiralität der 12-HETE-Produkte ergab für alle untersuchten Proben zu 100% die Bildung des S-Enantiomers. Die Enantioselektivität ist ein wesentliches Indiz für die enzymatische Herkunft der Reaktionsprodukte und belegt, dass die gesamte Reaktion in allen ihren Teilschritten (Wasserstoffabstraktion, Radikalverschiebung, Sauerstoffinsertion und Radikalreduktion) streng enzymkontrolliert abläuft. Repräsentative Chromatogramme sind im Folgenden (**Abb. 30**) dargestellt.

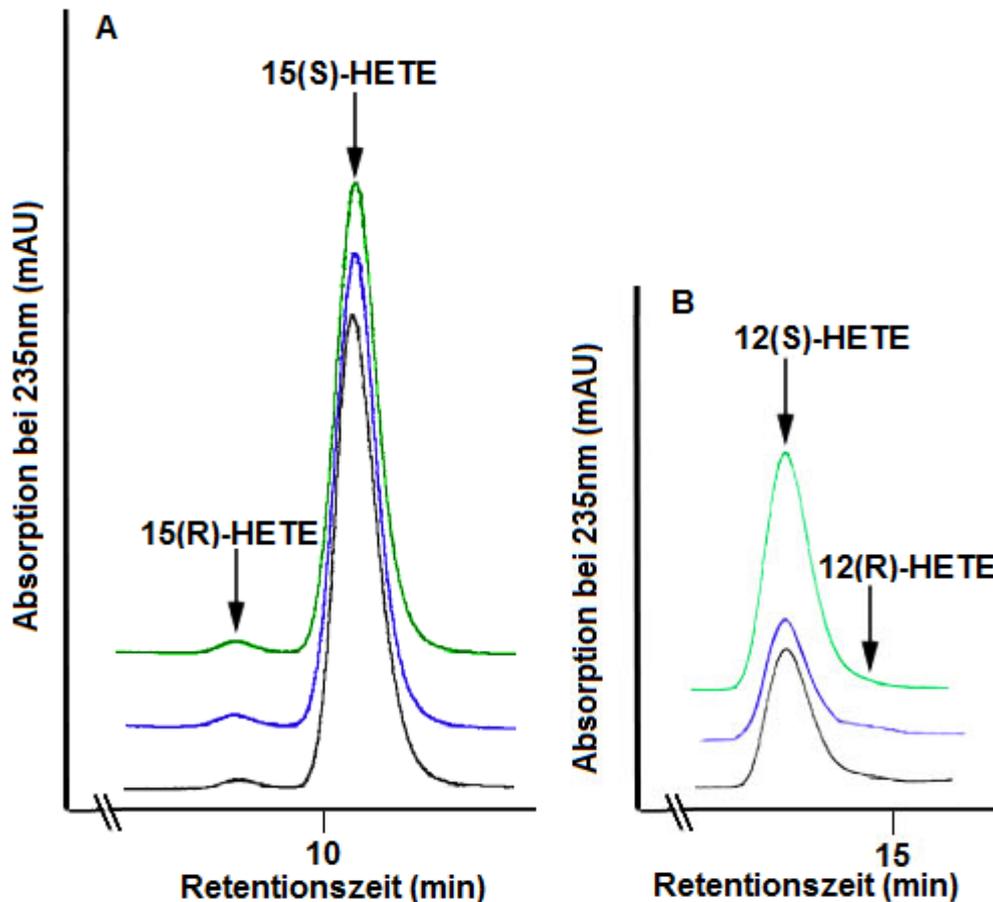


Abb. 30: Chiralität der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte von *hum*-, *pan*- und *gibALOX15*. In der obigen Abbildung sind partielle CP-HPLC-Chromatogramme der 15-HETE-Produkte (**A**) und der methylierten 12-HETE Produkte (**B**) der *hum*- (Schwarz), *pan*- (Blau) und *gibALOX15* (Grün) dargestellt. (**A**) Die aufgefangenen 15-HETE-Peaks aus der RP-HPLC wurden mittels SP-HPLC aufgereinigt. Die Enantiomerenzusammensetzung von 15-HETE konnte anschließend mittels CP-HPLC ohne weitere Methylierung an einer Chiralcel-OD Säule untersucht werden. Die Retentionszeiten der Enantiomere wurden in einem vorherigen Lauf mit methylierten 15(R)- und 15(S)-HETE-Standards ermittelt und sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Auf eine tabellarische Darstellung der relativen R- und S-Anteile wurde verzichtet, da kaum nachweisbare Mengen an 15(R)-HETE ermittelt wurden. (**B**) Die aufgefangenen 8/12-HETE-Peaks aus der RP-HPLC wurden mittels SP-HPLC in 8- und 12-HETE separiert und der 12-HETE-Peak für die Untersuchung der Chiralität methyliert. Aus dem Methylierungsansatz wurde das methylierte 12-HETE durch RP-HPLC extrahiert und anschließend mittels CP-HPLC an einer Charalcel-OB Säule auf seine Enantiomerenverteilung hin untersucht.

Zsfg.: Die *ALOX15*-Sequenzen des Schimpansen und des Gibbons lassen sich rekombinant exprimieren und sind katalytisch aktiv. Während der Schimpanse wie der Mensch eine rein 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoform exprimiert, oxygeniert die *ALOX15* des Gibbons Arachidonsäure mit einer ausgeprägt dualen Positionsspezifität. Damit bildet dieses Enzym eine Übergangsform von 12-lipoxygenierenden zu 15-lipoxygenierenden *ALOX15*-Orthologen und stellt einen Umschlagpunkt in der *ALOX15*-Evolution der Säugetiere dar.

3.4.5 Mechanistische Grundlage der Evolution der ALOX15-Spezifität

Um die molekulare Basis für die Veränderung der Reaktionsspezifität der *gibALOX15* von einer für höhere Primaten typischen 15-lipoxygenierenden ALOX15 zu einer gleichermaßen 15- wie 12-lipoxygenierenden Enzyms zu ermitteln, wurden die unterschiedlichen AS an den Positionen der Triadendeterminanten der *gibALOX15* einzeln in die an diesen Stellen beim menschlichen Enzym vorkommenden AS mutiert. Die dabei entstehenden *gibALOX15*-Varianten wurden anschließend exprimiert und hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität charakterisiert.

Eine erneute Betrachtung des AS-Alignments der ALOX15-Isoformen untersuchter Primaten (siehe 3.4.3, Abb. 26) zeigt, dass sich die AS-Unterschiede (im besagten Alignment gelb hinterlegt) zwischen Gibbon und Mensch in unmittelbarer Nähe der Positionsdeterminanten auf zwei Mutationen beschränken. Eine betrifft mit Met419Thr die Sloane-Determinante und die zweite bildet mit Thr593Val die angrenzende Aminosäure zur Borngräber-II-Determinante. Beide Aminosäureveränderungen wurden zunächst getrennt voneinander durchgeführt. Diese Mutationsstrategie führte zu einer partiellen Gibbonisierung der *humALOX15*. Repräsentative Chromatogramme der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte dieser Einzelmutationen sind in der folgenden Abbildung dargestellt (**Abb. 31**).

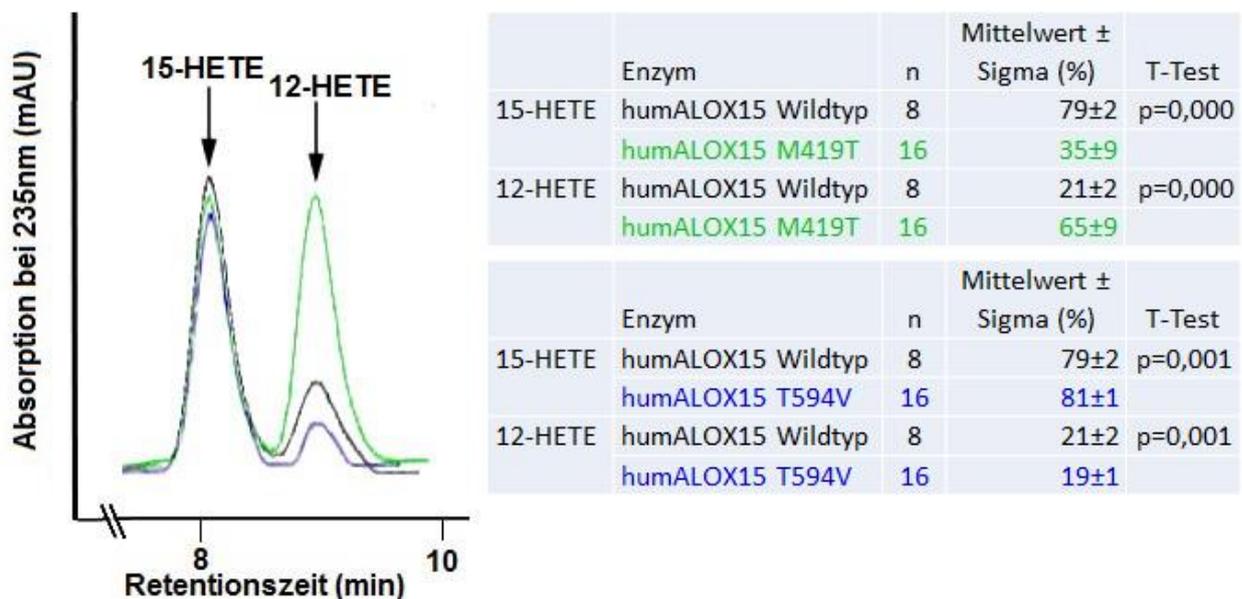


Abb. 31: Produktmuster der partiellen Gibbonisierungsmutanten der *humALOX15*. Oben dargestellt sind repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der *humALOX15* (Schwarz) und der partiellen Gibbonisierungsmutanten M419T (Grün) und T594V (Blau). Diese Mutationen simulieren die beiden Punktmutationen der Gibbon-Triadendeterminanten und wurden einzeln in die *humALOX15* eingeführt. Die Retentionszeiten authentischer Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Rechts sind die deskriptiven und vergleichenden Statistiken der relativen Anteile von 15- und 12-HETE am Produktmuster zusammengestellt.

Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, führt die einzelne Mutation Met419Thr zu einer signifikanten Änderung der *humALOX15*-Reaktionsspezifität in Richtung 12-Lipoxygenierung. Mit einem 12-HETE-Anteil von 65±9% am Produktspektrum zeigt das Enzym nun eine dominierende 12-Lipoxygenaseaktivität. Hiermit kann die Punktmutation Met419Thr an der Sloane-Determinante bereits als ursächlich für die hohe 12-Lipoxygenaseaktivität der *gibALOX15* angesehen werden. Dieses Erkenntnis steht in Einklang mit dem Triadenkonzept, da Modellberechnungen eine daraus resultierende Volumenzunahme der Substratbindungstasche um 31 Å³ ergeben.

Für die Mutation Thr594Val konnte keine Veränderung der *ALOX15*-Spezifität in Richtung 12-Lipoxygenierung nachgewiesen werden. Stattdessen konnte die Vorhersage einer entgegengesetzten Wirkung bestätigt werden. Mit einem 15-HETE-Anteil von 81±1% und einem 12-HETE-Anteil von 19±1% konnte eine geringfügige, statistisch aber signifikante Zunahme der 15-Lipoxygenaseaktivität gemessen werden. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Triadenkonzept, wobei der Einfluss dieser AS auf die Positionsspezifität von *ALOX15*-Orthologen eher begrenzt zu sein scheint.

Zsfg.: Die Punktmutation Met419Thr an der Sloane-Determinante der *humALOX15* verändert dessen Positionsspezifität zu einem dominierend 12-lipoxygenierenden Enzym. Dieser Aminosäureaustausch kann damit als ursächlich für den hohen 12-H(p)ETE-Anteil im Produktmuster der *gibALOX15* angesehen werden.

3.4.6 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts

Um abschließend die Anwendbarkeit der Triadenhypothese auf die *ALOX15*-Isoformen der hier untersuchten Primaten-*ALOX15*-Orthologe (*pan*- und *gibALOX15*) zu überprüfen, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese die Sloane-Determinante Ile418 der *pan*- und *gibALOX15* in unterschiedlich große Aminosäuren mutiert und die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Positionsspezifität des Enzyms ermittelt. Es erfolgten jeweils vier voneinander unabhängige bakterielle Expressionen mit simultaner Expression des entsprechenden Wildtypenzym als Positivkontrolle und jeweils vier Aktivitätsassays pro Expression (n=16). Die Analytik der Reaktionsprodukte erfolgte mit RP-HPLC.

3.4.6.1 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts für die *panALOX15*

Zur Testung des Triadenkonzepts für die *panALOX15* wurde das relativ große Isoleucin an der Sloane-Determinante Ile419 (I, 124 Å³) durch ein relativ kleines Alanin (A, 67 Å³) ersetzt und das Enzym rekombinant exprimiert. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in der folgenden Abbildung (**Abb. 32**) dargestellt und zeigt die erwarteten signifikanten Änderungen der relativen Anteile von 12- und 15-HETE am Produktspektrum. Die zuvor dominierend 15-lipoxygenierende *ALOX15* zeigt mit der einzelnen Mutation Ile418Ala nun eine 100%ige 12-HETE-Bildung. Ähnliche Resultate wurden zuvor für die Kaninchen-*ALOX15* beschrieben (Borngräber et al., 1996).

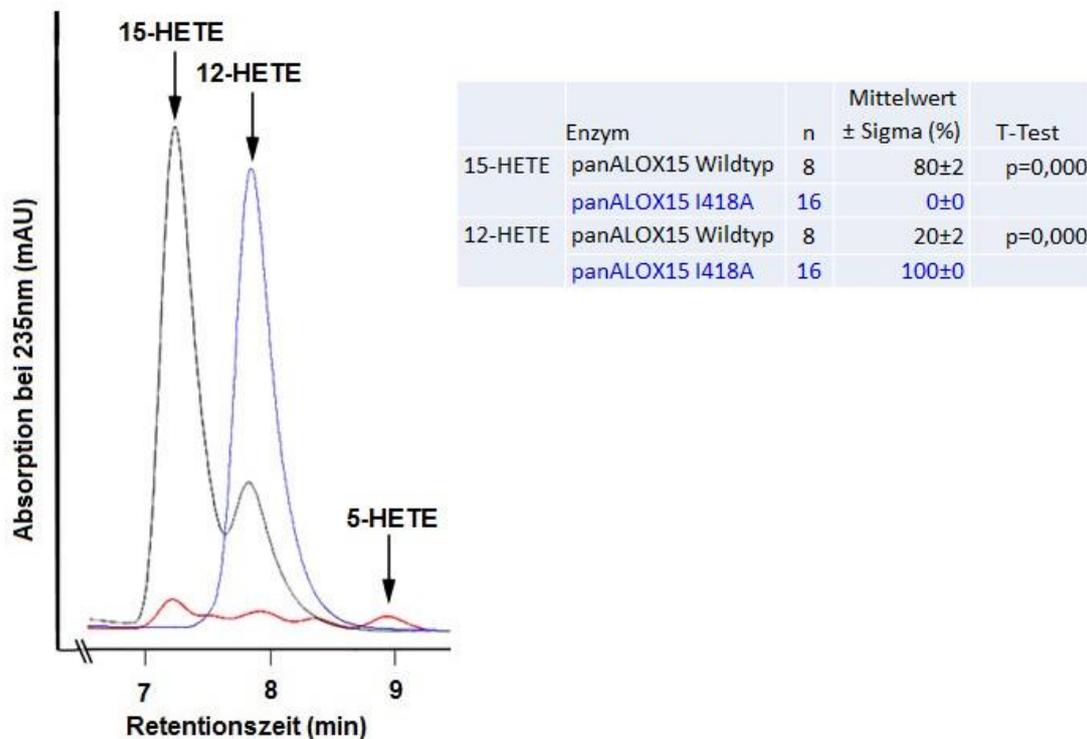


Abb. 32: Positionsspezifität der *panALOX15*-Triadenmutante I418A. Um die Applikabilität des Triadenkonzepts auf die *panALOX15* zu untersuchen, wurde die Sloane-Determinante I418 des rein 15-lipoxygenierenden *panALOX15*-Wildtyps durch die deutlich kleinere AS Ala (A) ersetzt und rekombinant exprimiert. In der obigen Abbildung sind repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme des *panALOX15*-Wildtyps (Schwarz) und der Mutante I418A (Blau) im Vergleich zur Negativkontrolle (Rot) dargestellt. Die Retentionszeiten zuvor analysierter HETE-Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Die deskriptiven und vergleichenden Statistiken sind rechts tabellarisch abgebildet.

Zsfg.: Das Triadenkonzept ist auf die *panALOX15* anwendbar. Durch die Einführung einer kleinen Aminosäure an der Sloane-Determinante Ile418 (I418A) lässt sich die dominierend 15-lipoxygenierende *ALOX15* des Schimpansen in eine rein 12-lipoxygenierende *ALOX15* umwandeln.

3.4.6.2 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts für die *gibALOX15*

Die Testung der Anwendbarkeit des Triadenkonzepts auf die *gibALOX15* erfolgte in zweierlei Richtung. Zum einen wurde die Sloane-Determinante I418 (I, 124 Å³) mit der Mutation I418A zu einer kleinen Aminosäure Alanin (A, 67 Å³) mutiert, um eine dominierende 12-Lipoxygenaseaktivität zu erreichen. Zum anderen wurde mit der Mutation Ile417Phe ein großes Phenylalanin (F, 135 Å³) eingeführt, um die Enzymspezifität in Richtung einer dominierenden 15-Lipoxygenierung zu verändern. Die Produktspektren beider Mutationen sind in der gezeigten Abbildung (**Abb. 33**) zusammengefasst und zeigen beide die vorhergesagten Effekte.

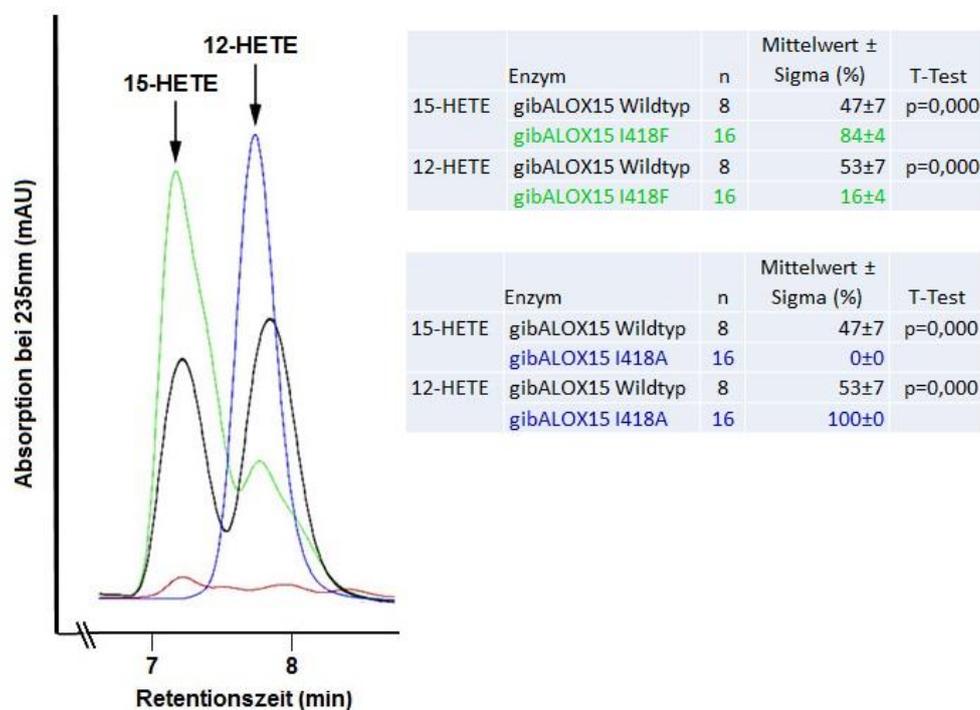


Abb. 33: Reaktionsspezifität von *gibALOX15*-Triadenmutanten. Um die Applikabilität des Triadenkonzepts auf die *gibALOX15* zu untersuchen, wurde die Sloane-Determinante I418 des zu ähnlichen Anteilen 15- und 12-oxygenierenden *gibALOX15*-Wildtyps einmal durch die deutlich kleinere AS Ala (A) und einmal durch die deutlich größere AS Phe (F) ersetzt und rekombinant exprimiert. In der obigen Abbildung sind repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der Wildtyp-*gibALOX15* (Schwarz) und der Mutante I418F (Grün) und I418A (Blau) dargestellt. Die Retentionszeiten zuvor analysierter HETE-Standards sind mit Pfeilen über den Kurven markiert. Die deskriptive und vergleichende Statistike ist rechts tabellarisch abgebildet.

Der Ile418Ala-Austausch verändert die *gibALOX15*, die als Wildtypenzym eine duale Positionsspezifität besitzt, zu einem 100%ig 12-lipoxygenierenden Enzym. Der Austausch derselben Positionsdeterminante durch das große Phenylalanin hingegen verändert die Produktspezifität in ein mit 84% dominierend 15-lipoxygenierendes Enzym.

Diese Ergebnisse sind hochsignifikant und entsprechen vollständig den Vorhersagen, die aufgrund des Triadenkonzepts gemacht worden sind.

Zsfg.: Das Triadenkonzept ist auf die *gibALOX15* anwendbar. Die Einführung einer kleinen Aminosäure bei Ile418 (I418A) wandelt das Enzym, das als Wildtypform eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität aufweist, in ein 12-lipoxygenierendes Enzym um. Im Gegensatz dazu führt die Einführung einer großen Aminosäure an dieser Position zu einer dominant 15-lipoxygenierenden Enzymspezies.

3.5 Untersuchungen der Membranbindung

LOXn sind in der Lage, an Biomembranen zu binden. Für die *ALOX15* und die *ALOX5* führt deren Membranbindung zu einer Aktivierung der Enzyme. Die genauen molekularen Mechanismen für den Aktivierungsprozess sind bislang noch unklar. Für die *ALOX15* wurde vermutet, dass die Membranbindung aufgrund der strukturellen Flexibilität des Enzyms zu subtilen Strukturveränderungen führt, die als Ursache für die erhöhte Oxygenaseaktivität diskutiert werden können (Di Venere et al., 2013). Nach dieser Hypothese wurden als Konsequenz der Enzym-Membran-Wechselwirkung sowohl Veränderungen in der Enzymstruktur, als auch lokale Modifikationen der Membranzusammensetzung diskutiert. Im Rahmen der oben zitierten Arbeit wurden die Membranbindungseigenschaften der Kaninchen-*ALOX15* (*rabALOX15*) unter der Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen des Suizidsubstrates ETYA getestet. Dieser irreversible Hemmstoff bindet am aktiven Zentrum des Enzyms und wird zunächst durch das Enzym oxygeniert. Dabei entsteht ein reaktives Azetylenhydroperoxid, welches kovalent an das Enzym bindet und damit die Bindung von Fettsäuresubstraten verhindert. Diese kovalente Enzymmodifizierung führt einerseits zum Aktivitätsverlust, andererseits aber auch zur Veränderung der Enzymstruktur (Abnahme der Strukturflexibilität), was die Membranbindungsfähigkeit beeinflussen sollte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die gereinigte *rabALOX15* i) ohne ETYA, ii) mit ETYA im molaren Überschuss von 1:10 und iii) mit ETYA im molaren Überschuss von 1:50 inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für weitere fünf Minuten mit einer Membranpräparation (Bruchstücke von Rinderherzmitochondrien) inkubiert, um eine Membranbindung zu induzieren. Zum Nachweis der Membranbindungsfähigkeit der nativen (ohne ETYA) und der inaktivierten (mit ETYA) *rabALOX15* wurden die Membranvesikel abzentrifugiert und die *rabALOX15*

im Membranpellet (gebundener Anteil) und im Überstand (ungebundener Anteil) mittels Western Blot nachgewiesen.

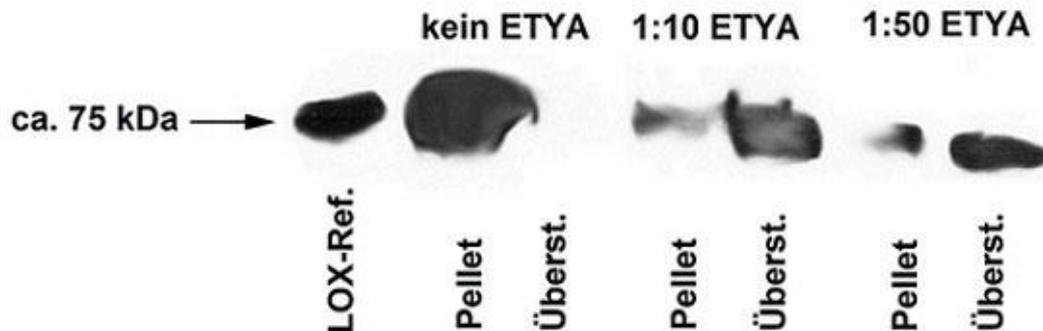


Abb. 34: Membranbindung der *rabALOX15* unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des LOX-Hemmstoffs ETYA. Native *rabALOX15* (kein ETYA) und inaktiviertes Enzym (nach Behandlung mit ETYA bei 1:10 bzw. 1:50 molarem Überschuss) wurden mit Rinderherzmitochondrien inkubiert. Anschließend wurden die Membranen durch ein Saccharosekissen abzentrifugiert und der *ALOX15*-Gehalt im Membranpellet und im Überstand mittels Western Blot quantifiziert.

Im oben abgebildeten Western Blot (**Abb. 34**) wurde ganz links die *ALOX15*-Referenz und dann jeweils Pellet- und Überstand-Probe der unterschiedlich behandelten LOXn aufgetragen. Für die Kontroll-Probe, die nur mit Ethanol (Lösungsmittel des ETYA) behandelt wurde, ist die gesamte LOX im Membranpellet nachweisbar. Das Enzym konnte also vollständig an die Membranen binden. Für die Enzyme, die zuvor mit dem Hemmstoff inkubiert worden sind, kann für beide Hemmstoffkonzentrationen nur noch weniger als 25% der *ALOX15* im Membranpellet detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Inaktivierung der LOX durch ETYA die Membranbindung maßgeblich beeinträchtigt. Für die Probe, die mit einer geringeren konzentrierten Hemmstofflösung behandelt wurde (10-facher molarer Überschuss an ETYA), konnten 79% im Überstand gefunden werden. Bei 50-fach molarem Überschuss an ETYA in der Inkubationslösung wurden 76% der *ALOX15* im Überstand detektiert. Diese Daten deuten darauf hin, dass ein 10-facher molarer Überschuss an ETYA für die Hemmung der Membranbindung ausreichend ist und dass eine vollständige Hemmung auch bei exzessiv hohen Hemmstoffkonzentrationen nicht erreicht werden kann.

3.6 Leukotriensignalwege ausgestorbener Verwandte des modernen Menschen

Um die Funktionalität des Leukotriensignalwegs bei ausgestorbenen Verwandten des Menschen zu überprüfen, wurden die Genome des *H. neanderthalensis*

(Neandertaler) und *H. denisovan* (Denisovan-Mensch) auf das Vorkommen und die strukturelle Intaktheit von Leukotrien-relevanten Genen untersucht. Dabei haben wir uns vor allem auf Leukotrien-synthetisierende Enzyme (LOXn, LTA₄-Hydrolase, LTC₄ Synthase) und LT-Rezeptoren (Cys-LTR1, Cys-LTR2, BLTR1, BLTR2) konzentriert. Die entsprechenden Gene wurden aus den relevanten Datenbanken herausgesucht, die cDNAs extrahiert und die entsprechenden Proteine hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz mit den entsprechenden Proteinen des modernen Menschen (*H. sapiens*) verglichen.

3.6.1 Leukotriensignalwege des *H. neanderthalensis*

Das erste, noch unvollständige, nukleäre Genom des *H. neanderthalensis* wurde im Jahre 2010 veröffentlicht (Green et al., 2010). Als wir die cDNA-Sequenzen der LOX-Isoformen des Neandertalergenoms mit denen des *H. sapiens* verglichen, mussten wir feststellen, dass nur 60-70% der Aminosäurereste im Neandertalergenom spezifiziert waren (Chaitidis et al., 2013). Die Ergebnisse dieser frühen Forschungen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit als vorläufiges Neandertalergenom bezeichnet werden, werden im Folgenden nur kurz thesenhaft zusammengefasst, da sie nach der Veröffentlichung der hochqualitativen Genomsequenz zwei Jahre später (Prüfer et al., 2014) im Rahmen der Arbeiten um die Denisovan-LOXn (Adel et al., 2015) aktualisiert worden sind:

1. Es konnten zu allen sechs funktionellen humanen LOX-Genen sowie zum *ALOXE12* Pseudogen (*ALOX12P2*) orthologe Sequenzen im Neandertaler-Genom identifiziert werden.

2. Auf der AS-Ebene weisen die spezifizierten Sequenzen einen Homologiegrad von 95-99% mit den orthologen *H. sapiens*-Proteinen auf.

3. Aminosäurealignments ergaben, dass bei den meisten LOX-Isoformen funktionell wichtige Aminosäuren (Eisenliganden, Positions determinanten, Phosphorylierungsstellen, Calcium- und ATP-Bindungsstellen, Membranbindungs determinanten) konserviert waren (Chaitidis et al., 2013).

4. Auftretende Punktmutationen, die sich auf die Aminosäuresequenz auswirkten, wurden in dieser Arbeit nach der Qualität der jeweiligen Sequenzierungsgrundlage in drei Gruppen (sichere Aminosäureunterschiede, unsichere Aminosäureunterschiede, unbestätigte Aminosäureunterschiede) eingeteilt. In der Gruppe der sicheren Aminosäureunterschiede, welche in mindestens zwei Sequenzierungsfragmenten übereinstimmend gefunden wurden, konnte eine Mutation in

der Sequenz der *neaALOX15*, zwei in der *neaALOX12* und eine Mutation in der *neaALOXE3* festgestellt werden. Für die *neaALOX12* und die *neaALOXE3* handelte es sich dabei um Nonsense-Mutationen in exonischen Bereichen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette führen sollten. Diese Proteintrunkation hätte mit großer Sicherheit einen vollständigen Funktionsverlust der Enzyme zur Folge (Chaitidis et al., 2013). Zusammenfassend muss aber gesagt werden, dass detaillierte Schlussfolgerungen zur Funktionalität der LOX-Isoformen auf der Grundlage der bis dahin verfügbaren Sequenzen (1,3-faches Genomcoverage) mit einem hohen Risiko behaftet sind und deshalb nicht überbewertet werden dürfen.

Die erneute Untersuchung des Neandertaler-Genoms auf der Basis der Veröffentlichung einer genomischen Sequenz höherer Qualität [*genome coverage*-Koeffizient von 40 (Prüfer et al., 2014)] lässt fundiertere Schlussfolgerungen aus den existierenden AS-Unterschieden zu. Diese Unterschiede sind gemeinsam mit den AS-Unterschieden des Denisovan-Menschen in Tabelle 6 zusammengefasst (**Tab. 6**).

Beim Vergleich der *neaALOX15* mit dem *H. sapiens*-Ortholog konnten zwei AS-Unterschiede, Val239Met und Arg562Trp, identifiziert werden. Neben dem *H. sapiens*-Referenzgenom wurden zu Vergleichszwecken auch die Ergebnisse des humanen *1000 Genomes Project* berücksichtigt, um beim *H. sapiens* vorkommende SNPs mit in die Diskussion einfließen zu lassen. Ein Val239Met-Austausch konnte im Rahmen dieses Projektes als ein in der *humALOX15* vorkommender SNP identifiziert werden (Adel et al., 2015). Arg562Trp konnte in der ersten Neandertaler-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden, obwohl die Position Arg562 sequenziert worden war. Dies könnte auf interindividuelle Unterschiede unter den Neandertaler-Individuen zurückzuführen sein. Funktionell relevante AS der *neaALOX15* sind nicht von Mutationen betroffen. Für die *neaALOX15B* und die *neaALOX12* konnte jeweils eine AS-Differenz an Positionen ausgemacht werden, die in der ersten Neandertaler-Sequenzierung nicht spezifiziert werden konnten. Der AS-Unterschied Gly650Asp in der *neaALOX15B* sollte aufgrund der Lokalisation erfahrungsgemäß keine funktionellen Auswirkungen auf die Enzymfunktion haben. Die AS-Differenz Arg430His in der Sequenz der *neaALOX12* konnte im Rahmen des *1000 Genomes Projects* als ein SNP identifiziert werden. Die beiden zuvor identifizierten Nonsense-Mutationen in der *neaALOX12*-Sequenz auf der Grundlage der ersten Neandertaler-Sequenzierung konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Dabei könnte es sich um Sequenzierungsartefakte oder chemische Modifikationen der Basen

in den ursprünglich sequenzierten Neandertaler-Fossilien gehandelt haben. Für die *neaALOX12B* konnten keine Unterschiede zur humanen Isoform beobachtet werden.

Bezeichnung	Gen	Unterschiede zwischen <i>H. sapiens</i> und <i>H. neanderthalensis</i>	Unterschiede zwischen <i>H. sapiens</i> und <i>Denisova hominin</i>
12/15-lipoxygenase	ALOX15	Val239Met [#] (SNP ID: rs980466), Arg562Trp [*]	Tyr158Cys, Val239Met (SNP ID: rs980466), Ser244Thr (SNP ID: rs201672823)
15-Lipoxygenase-2	ALOX15B	Gly650Asp [#]	Gln656Arg (SNP ID: rs479147)
Plättchen-Typ 12-Lipoxygenase	ALOX12	Arg430His [#] (SNP ID: rs11571342)	Gln261Arg (SNP ID: rs1126667)
12R-Lipoxygenase	ALOX12B	keine	keine
5-Lipoxygenase	ALOX5	His226Gln [*]	keine
Epidermale Lipoxygenase-3	ALOXE3	Ala674Thr [*]	Ala359Pro
5-Lipoxygenase aktivierendes Protein	ALOX5AP	keine	keine
Leukotrien A ₄ -Hydrolase	LTA4H	Lys219Arg	keine
Leukotrien C ₄ -Synthase	LTC4S	keine	keine
Cysteinylleukotrien-Rezeptor 1	CysLTR1	Gln164Lys	keine
Cysteinylleukotrien-Rezeptor 2	CysLTR2	Leu278Ile (SNP ID: rs138722135)	keine
Leukotrien B ₄ -Rezeptor 1	BLT1	keine	keine
Leukotrien B ₄ -Rezeptor 2	BLT2	keine	keine
Cyclooxygenase-1	COX-1	keine (10 unbekannte AS)	Trp8Arg (SNP ID: rs12369139)
Cyclooxygenase-2	COX-2	Arg228His (SNP ID: 3218622)	keine

Tab. 6: Aminosäureunterschiede in Leukotrien-relevanten Proteinsequenzen von *H. sapiens*, *H. neanderthalensis* und *H. denisovan*. Bei AS-Unterschieden, die anhand des humanen *1000 Genomes Projects* als SNP beim Menschen identifiziert wurden, ist die jeweilige SNP ID in Klammern angegeben. AS-Unterschiede des Neanderthalers, die zuvor auf der Grundlage der ersten Genomsequenzierung schlechterer Qualität noch nicht erfasst worden waren, sind mit einem * gekennzeichnet, und solche, deren Positionen zuvor nicht spezifiziert werden konnten mit einem #. Die Tabelle wurde modifiziert nach (Adel et al., 2015).

Für die *neaALOX5* und die *neaALOXE3* konnte jeweils ein Unterschied in der AS-Sequenz gefunden werden. Diese wurden in der ersten Neandertaler-Sequenzierung trotz der erfolgreichen Sequenzierung dieser Positionen nicht erfasst. Da diese Mutationen, His226Gln in der *neaALOX5*- und Ala674Thr in der *neaALOXE3*-Sequenz, keine funktionell relevanten AS (Eisenliganden, Determinanten für die Positions- und Stereospezifität, ATP-, Ca²⁺- und Membranbindungsdomänen) betreffen, kann man von einer unveränderten Enzymfunktion der Neandertaler-Orthologe ausgehen.

Darüber hinaus wurden neben den LOX-Genen auch Neandertaler-Gensequenzen anderer Proteine, die in den Leukotrien-Signalweg involviert sind, untersucht. Für das 5-Lipoxygenase aktivierende Protein (*neaALOX5AP*), die Leukotrien C₄-Synthase (*neaLTC4S*) und die beiden Leukotrien-Rezeptoren *neaBLT1* und *neaBLT2* konnten keine Unterschiede zu den humanen Proteinsequenzen identifiziert werden. In den Sequenzen der Leukotrien A₄-Hydrolase (*neaLTA4H*) und des Cysteinylleukotrien-Rezeptors 2 (*neaCysLTR2*) konnten jeweils einzelne AS-Unterschiede detektiert werden. Über die funktionellen Konsequenzen der in der *neaLTA4H*-Sequenz gefundenen AS-Differenz, Lys219Arg, liegen keine Daten vor. Da Lys und Arg jeweils positive Ladungen tragen, hat dieser Austausch eher konservativen Charakter. Der AS-Unterschied in der *neaCysLTR2*-Sequenz, Leu278Ile, konnte aufgrund der Daten des *1000 Genomes Projects* als ein beim Menschen vorkommender SNP identifiziert werden.

In der Sequenz des Cysteinylleukotrien-Rezeptors 1 (*neaCysLTR1*) können zwei AS-Unterschiede, Gln164Lys und Cys173Stop, im Vergleich zur humanen Isoform gefunden werden, von denen letzterer eine Nonsense-Mutation darstellt. Dies würde bereits nach 173 der 352 Aminosäuren zu einem vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette führen und hätte mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Funktionsverlust des kodierten Rezeptors zur Folge. Eine nähere Betrachtung der Sequenzdaten gibt Aufschluss darüber, welche Evidenzen es für diesen AS-Unterschied gibt. Anscheinend gibt es zwei unterschiedliche Sequenzvarianten für diesen Genloкус in der hochqualitativen Genomsequenz des *H. neanderthalensis*. In 7 von 18 Sequenzfragmenten ist das Kodon TGC sequenziert worden, welches auch in der humanen Isoform an dieser Position für ein Cys kodiert. In 11 von 18 Sequenzen ist an dieser Position allerdings das Kodon TGA sequenziert worden, welches für ein Stoppsignal kodiert (Adel et al., 2015). Eine Erklärung für die zwiespaltigen Sequenzdaten könnte ein allelspezifischer Polymorphismus sein, bei dem ein Allel bei diesem Individuum in mutierter Form, das andere als nicht-mutierte Sequenz vorliegt. Im Falle einer dominanten Vererbung des

nicht mutierten Allels hätte dies bestenfalls eine nur geringe phänotypische Veränderung des Leukotriensignalwegs zur Folge (Adel et al., 2015).

Abschließend wurden auch die Cyclooxygenase-Sequenzen des *H. neanderthalensis* nach Veränderungen untersucht. In der Sequenz der Cyclooxygenase-1 (*neaCOX1*) sind keine Unterschiede nachweisbar. Allerdings konnten die N-terminalen Aminosäuren nicht identifiziert werden, sodass Veränderungen an diesen Positionen nicht ausgeschlossen werden können. Die Cyclooxygenase-2-Sequenz des Neandertalers (*neaCOX2*) enthält eine AS-Veränderung, Arg228His. Die gleiche Veränderung konnte im Rahmen des *1000 Genomes Projects* als SNP ausgemacht werden und kommt mit einer Allelfrequenz von 0,1% vor.

3.6.2 Leukotriensignalwege des *H. denisovans*

Das qualitativ hochwertige Genom des Denisovan-Menschen wurde ebenfalls auf das Vorkommen von Lipoxygenasen und anderen Leukotrien-relevanten Proteinen untersucht. Es konnten orthologe Sequenzen zu allen funktionellen humanen LOXn sowie den anderen in Tabelle 6 aufgelisteten Proteinen gefunden werden. Diese wurden mit den Sequenzen der humanen Orthologe abgeglichen, um mögliche AS-Unterschiede zu erfassen und mögliche funktionelle Konsequenzen zu diskutieren.

Für die *ALOX15* des Denisovans (*denALOX15*) konnten drei AS-Unterschiede, Tyr158Cys, Val239Met und Ser244Thr, nachgewiesen werden (**Abb. 35**). Die Seitenketten der veränderten AS unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Polaritätseigenschaften nur wenig von denen, die in der *humALOX15* an dieser Stelle lokalisiert sind. Tyr und Cys tragen beide polare Gruppen, Val und Met sind beide überwiegend unpolar und Ser und Thr tragen beide eine OH-Gruppe. Allerdings unterscheiden sich die spezifizierten Reste hinsichtlich der Volumina ihrer Seitenketten. Die Unterschiede an den Positionen 239 und 244 haben mit +19 Å³ und +20 Å³ nur relativ geringe Veränderungen der van-der-Waals-Volumina zur Folge. Die Veränderung von Tyr zu Cys weist allerdings eine deutliche Volumenveränderung um 55 Å³ auf. Die Mutation Ser244Thr wurde nicht experimentell untersucht, allerdings kann man, da sich alle AS-Unterschiede der *denALOX15* nicht an kritischen Positionen für die Enzymfunktionalität befinden, vermuten, dass sich keine der beobachteten Veränderungen auf die Enzymaktivität auswirken sollte. Val239Met und Ser244Thr konnten anhand der Sequenzen des *1000 Genomes Projects* als SNPs in der *ALOX15* des *H. sapiens* identifiziert werden (Adel et al., 2015).

ausgegangen werden. Ein Strukturmodell des Enzyms auf der Basis der R -Struktur der *rabALOX15* deutet aber darauf hin, dass Ala395 nicht in der alpha-helikalen Region lokalisiert zu sein scheint (Adel et al., 2015).

	1				50	451					500
humALOXe3	MPRGAFRPCL	PALYFAFLTC	PTPEQRMSGT	QAPDIHLGEP	ARGTGCVRGK	ERGNIFLADY	WILAEAPTHC	LNGRQQYVAA	PLCLLWLSPO	GALVPLAIQL	
denALOXe3	MPRGAFRPCL	PALYFAFLTC	PTPEQRMSGT	QAPDIHLGEP	ARGTGCVRGK	ERGNIFLADY	WILAEAPTHC	LNGRQQYVAA	PLCLLWLSPO	GALVPLAIQL	
	51				100	501				550	
humALOXe3	QTSIRVQDCG	RREEARAASR	ELRREKAQEH	PRESWAHPQP	YPAPQPLALR	SQTPGPDSP	FLPTDSEWDW	LLAKTWVRNS	E ^{LVHENNT}	FLCT ^{LLCEA}	
denALOXe3	QTSIRVQDCG	RREEARAASR	ELRREKAQEH	PRESWAHPQP	YPAPQPLALR	SQTPGPDSP	FLPTDSEWDW	LLAKTWVRNS	E ^{LVHENNT}	FLCT ^{LLCEA}	
	101				150	551				600	
humALOXe3	PETQPCPACR	SSPPGRLLLR	PALPGHPFLL	PIMAVYRLCV	TTGPLYRAGT	FAMATLRQLP	LCHPIYKLLL	PHTRYTLQVN	T ^{IARATLLNP}	EGLVDQ ^{VSI}	
denALOXe3	PETQPCPACR	SSPPGRLLLR	PALPGHPFLL	PIMAVYRLCV	TTGPLYRAGT	FAMATLRQLP	LCHPIYKLLL	PHTRYTLQVN	T ^{IARATLLNP}	EGLVDQ ^{VSI}	
	151				200	601				650	
humALOXe3	LDNISVTLVG	TCGESPKQRL	DRMGRDFAPG	SVQKYKVRCT	AELGELLLLR	GRQGLIYMS	TGLAHFTYTN	FCLPDSLRR	GVLAIPNYHY	RDDGLKIWAA	
denALOXe3	LDNISVTLVG	TCGESPKQRL	DRMGRDFAPG	SVQKYKVRCT	AELGELLLLR	GRQGLIYMS	TGLAHFTYTN	FCLPDSLRR	GVLAIPNYHY	RDDGLKIWAA	
	201				250	651				700	
humALOXe3	VHKERYAFFR	KDSWYCSRIC	VTEPDGVS	FPCYQWIEGY	CTVE ^{LRPGTA}	IESFVSEIVG	YYYPSDASVQ	QDSELQAWTG	EIFAQAFLLGR	ESSGFPSRLC	
denALOXe3	VHKERYAFFR	KDSWYCSRIC	VTEPDGVS	FPCYQWIEGY	CTVE ^{LRPGTA}	IESFVSEIVG	YYYPSDASVQ	QDSELQAWTG	EIFAQAFLLGR	ESSGFPSRLC	
	251				300	701				750	
humALOXe3	RTICQDSLPL	LLDHRTRREL	ARQECYRWKI	YAPGFPCMVD	VNSFQEMESD	TPGEMVKFLT	AIIFNCSAQH	AAV ^{SGQHDF}	GAWMPNAPSS	MRQPPQPTKG	
denALOXe3	RTICQDSLPL	LLDHRTRREL	ARQECYRWKI	YAPGFPCMVD	VNSFQEMESD	TPGEMVKFLT	AIIFNCSAQH	AAV ^{SGQHDF}	GAWMPNAPSS	MRQPPQPTKG	
	301				350	751				800	
humALOXe3	KKFALTKTTT	CVDQGDSSGN	RYLPGFPMKI	DIPSLMYMEP	NVRYSATKTI	TTTLKTYLDT	LPEVNI SCNN	LL ^{FWLVSQE}	PKDQRPLGTY	PDEHFTEEAP	
denALOXe3	KKFALTKTTT	CVDQGDSSGN	RYLPGFPMKI	DIPSLMYMEP	NVRYSATKTI	TTTLKTYLDT	LPEVNI SCNN	LL ^{FWLVSQE}	PKDQRPLGTY	PDEHFTEEAP	
	351				400	801				843	
humALOXe3	SLLFNAI ^{PAS}	LGMKLRGLLD	RKGSWKLLDD	MQNIWFCHKT	FTTKYVTEHW	RRSIAAFQSR	LAQISRDIQE	RNQGALALPYT	YLDPPLIENS	VS ^I	
denALOXe3	SLLFNAI ^{PPS}	LGMKLRGLLD	RKGSWKLLDD	MQNIWFCHKT	FTTKYVTEHW	RRSIAAFQSR	LAQISRDIQE	RNQGALALPYT	YLDPPLIENS	VS ^I	
	401				450					843	
humALOXe3	CEDHFFGYQY	LNGVNPVMLH	CISLPSKLP	VTNDMVAPLL	GQDTC ^{LQTEL}						
denALOXe3	CEDHFFGYQY	LNGVNPVMLH	CISLPSKLP	VTNDMVAPLL	GQDTC ^{LQTEL}						

Abb. 38: Aminosäurealignment der *hum*- und *denALOXE3*. Der AS-Unterschied Ala359Pro (A359P) ist gelb hinterlegt. Mit anderen Farben wurden die funktionell relevanten AS, welche beim *H. denisovan* unverändert konserviert sind, folgendermaßen gekennzeichnet: Dom nentransitionsstelle (Türkis), Triadendeterminanten (BG-I, Sloane und BG-II) der Positionsspezifität (Rot), Eisenliganden (Magenta) und Coffa-Determinante der Enantioselektivität (Grün).

Darüber hinaus wurde nach Cyclooxygenasesequenzen im Genom des *H. denisovan* gesucht. Dabei konnten orthologe Sequenzen zu beiden *H. sapiens*-Isoformen (*COX-1*, *COX-2*) gefunden werden. Für die *denCOX1* konnte ein nicht konservativer AS-Austausch einer apolaren gegen eine basische AS, Trp8Arg, nachgewiesen werden. Ob dies Auswirkungen auf den COX/LOX-Signalweg hat, kann man allein auf der Grundlage der Punktmutation nicht sagen. Allerdings scheint diese Veränderung ein bei modernen Menschen vorkommender SNP zu sein (Adel et al., 2015).

Zsfg.: Sequenzvergleiche Leukotriensignalweg-relevanter Enzyme neandertalisierter und denisovanisierter humaner LOXn deuten darauf hin, dass diese Frühmenschen bereits über ein funktionelles Leukotriensignaling verfügt haben. Ebenso scheinen sie funktionelle *COX-1* und *COX-2*-Isoformen besessen zu haben, was für eine intakte Prostaglandinsynthese spricht.

4 Diskussion

4.1 Bakterielle Lipoxygenasen

LOX-ähnliche Sequenzen wurden in allen drei Domänen des irdischen Lebens nachgewiesen (Horn et al., 2015). Bisher sind aber noch keine funktionellen Enzyme bei Archaeen identifiziert worden. Hingegen gibt es mehrere Arbeiten zur Charakterisierung bakterieller Lipoxygenasen. Eine systematische Recherche nach bakteriellen Lipoxygenasen (Kap. 3.1.) hat gezeigt, dass in den bisher sequenzierten bakteriellen Spezies weniger als 1% LOX-ähnliche Sequenzen im Genom tragen. Demnach scheinen LOXn für die meisten bakteriellen Spezies verzichtbar zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass LOXn in der Domäne der Bakterien keine überlebenswichtige Funktion ausüben und erst später im Laufe der Evolution eingeführt wurden. Dennoch enthalten einige bakteriellen Spezies echte LOX-Gene und Sequenzvergleiche bisher charakterisierter pro- und eukaryontischer LOXn deuten darauf hin, dass die LOX-Gene der Spezies *P. aeruginosa*, *N. punctiforme* und *S. cellulorum* nicht durch kontinuierliche Evolution, sondern durch horizontalen Gentransfer ins Genom der Zielorganismen eingeführt wurden (Porta and Rocha-Sosa, 2001). Das hypothetische Ur-LOX-Gen scheint also erst auf der Ebene der Eukaryonten entstanden zu sein und anschließend sporadisch in die Domäne der Bakterien eingefügt worden zu sein. Es bleibt allerdings die Frage offen, warum nur bei diesen Spezies der horizontale Gentransfer produktiv war und warum nur diese bakteriellen Spezies einen evolutionären Vorteil durch die Expression echter LOXn haben. Es bleibt weiterhin offen, welcher Mechanismus dem zu vermutenden evolutionären Vorteil zugrunde liegt (Horn et al., 2015).

Welche biologischen Funktionen LOXn in der Domäne der Bakterien erfüllen, ist nach wie vor ungeklärt. Die Tatsache, dass der humanpathogene, opportunistische Erreger *Pseudomonas aeruginosa* die genetische Information für mehrere LOX-Isoformen trägt, könnte auf eine funktionelle Bedeutung der LOXn für pathogene Eigenschaften dieser Bakterien hindeuten. Zwar kann die Pathogenität von Bakterien nicht generell LOXn zugeschrieben werden, da für die meisten humanpathogenen Keime keine LOX-Sequenzen nachgewiesen werden können. Es besteht allerdings durchaus die Möglichkeit für eine pathogene Bedeutung der LOX durch die Beeinflussung der Immunantwort oder der Entzündungsprozesse des Wirts im Rahmen bakterieller Infektionen (Hansen et al., 2013, Vance et al., 2004). Außerdem erscheint eine

bakterieneigene, physiologische Funktion der LOX, zumindest für die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, als wenig wahrscheinlich, da diese selbst gar keine PUFAs enthält, die normalerweise die Hauptsubstrate von LOXn darstellen (Horn et al., 2015). Eine andere Hypothese bezieht sich auf die Ähnlichkeit der LOX-Sequenzen von *Pseudomonas aeruginosa* und *Nostoc punctiforme* zu denen Stickstoffmetabolisierender Bakterien und zieht eine mögliche Funktion der LOX im Stickstoffstoffwechsel in Betracht (Koeduka et al., 2007). Für die Klasse der Photosynthese-betreibenden *Cyanobacteriae* wurde eine völlig andere biologische Funktion der LOX postuliert (Koeduka et al., 2007). Entsprechend dieser Hypothese sollten LOXn eine Rolle beim Ab- bzw. Umbau von Chloroplasten spielen. Diese Idee ist von evolutionärem Interesse, da Cyanobakterien einerseits durch ihre Fähigkeit zur Photosynthese zur Anreicherung von Sauerstoff in der Erdatmosphäre im Kambrium beitragen. Andererseits entsprechen die Chloroplasten der Endosymbiontentheorie zufolge den Mitochondrien höherer Organismen (Cavalier-Smith, 2000). Demnach könnten LOXn bei der Entwicklung des sauerstoffbasierten oxidativen Energiemetabolismus beteiligt gewesen sein, was heute als entscheidender Faktor für die kambriale Artenexplosion angesehen wird (Horn et al., 2015, Seilacher, 1997). Die experimentellen Beweise für diese Hypothese sind derzeit aber noch wenig überzeugend.

Die Zuordnung von LOX-Isoformen niederer Organismen zu entsprechenden Säugetierisoformen ist aufgrund ihrer strukturellen (Sequenzhomologie) und funktionellen (Reaktionsspezifität) Eigenschaften nur selten zweifelsfrei möglich. Zum einen bevorzugen bakterielle LOXn Linolsäure als Substrat und können ähnlich wie verschiedene pflanzliche LOXn Arachidonsäure nur begrenzt oxygenieren. Die LOX des Phylum *Nostoc sp.* setzt z.B. Linolsäure hauptsächlich zu 9(R)-HpODE um (Andreou et al., 2008). Die Reaktionsspezifität mit AA wurde nicht bestimmt. Die Linolsäure-13(S)-oxygenierende LOX-Isoformen von *Nostoc punctiforme* (Koeduka et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (Lu et al., 2013) und *Anabaena sp.*, weisen substratabhängig unterschiedliche Positionsspezifitäten auf (Wang et al., 2014b). Aus diesem Grunde kann aus der Tatsache, dass einige bakterielle LOXn 13(S)-HODE als Hauptprodukt der Linolsäureoxygenierung bilden, nicht abgeleitet werden, dass Arachidonsäure durch diese Enzyme notwendigerweise zu 15(S)-HETE umgewandelt wird. Eine substratabhängige Positionsspezifität wurde auch für die LOX aus grünen Erbsen beschrieben. Dieses Enzym, welches Linolsäure zu 13- und 9-H(p)ODE oxygeniert,

wandelt Arachidonsäure in ein sehr komplexes Muster verschiedener Oxygenierungsprodukten um (Kühn et al., 1991).

In niederen Organismen kommen LOXn vereinzelt auch als Fusionsproteine vor, deren Domänen unterschiedliche katalytische Aktivitäten aufweisen. Dies konnte für das Cyanobakterium *Acaryochloris marina* nachgewiesen werden, bei dem die C-terminale Domäne als LOX und N-terminale Domäne als Katalase fungiert (Gao et al., 2010).

Von den verschiedenen bakteriellen LOX-Isoformen gibt es bisher eine Kristallstruktur für die LOX von *P. aeruginosa*. Diese ist im Unterschied zu allen anderen bisher kristallisierten LOX-Isoformen nicht aus einer N-terminalen Membranbindungsdomäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne aufgebaut, sondern besteht nur aus einer katalytischen Domäne. Die Funktion der Membranbindungsdomäne könnte eine N-terminale Lid-Struktur übernehmen (Horn et al., 2015, Garreta et al., 2013), die möglicherweise den Eingang zum aktiven Zentrum blockieren könnte und damit ähnlich wie die N-terminale Domäne der Säugetier-LOX regulatorische Bedeutung haben könnte.

In weniger als 1 % aller bisher sequenzierten Bakteriengenome kommen LOX-ähnliche Sequenzen vor. Bei den meisten dieser Sequenzen ist jedoch noch unklar, ob diese wirklich für funktionelle Enzyme kodieren und ob und unter welchen Bedingungen sie in vivo exprimiert werden. Ob eine LOX-Sequenz für ein funktionelles Enzym kodiert, kann u.a. durch die rekombinante Expression des entsprechenden Proteins mit anschließenden Aktivitätsassays überprüft werden. Entsprechende experimentelle Daten sind für bakterielle LOXn nur vereinzelt vorhanden. Leider gibt es für LOXn kein spezifisches Sequenzmerkmal, das LOX-Sequenzen eindeutig von denen anderer Proteine abgrenzt. Ein potentiell geeignetes Strukturmerkmal, das wir in unserer Suchstrategie nach funktionellen LOX-Sequenzen eingebaut haben, sind die Metallliganden. Alle bisher charakterisierten LOXn enthalten ein Redox-aktives Metallion (Eisen oder Mangan), das mit einem Wertigkeitswechsel am katalytischen Zyklus beteiligt ist (**Abb. 1**). Bei den LOX-Proteinen gibt es in der Primärstruktur zwei Sequenzmotive, die für 4 der 5 proteinogenen Metallliganden kodieren. Bei den eisenhaltigen LOXn enthalten diese beiden Motive zwei konservierte His mit einem Abstand von 4 Aminosäuren (His-X₁-X₂-X₃-X₄-His, Cluster 1) und ein His bzw. ein His/Asn/Ser im Abstand von 3 Aminosäuren (His-Y₁-Y₂-Y₃-His/Asn/Ser, Cluster 2). Für die meisten charakterisierten LOX-Isoformen beträgt der Abstand zwischen den beiden Ligandenclustern 180-200 Aminosäuren. Als fünfter proteinogener Eisenligand fungiert

die C-terminale Aminosäure, die häufig durch ein Ile repräsentiert wird. Mutageneseuntersuchungen zeigten, dass ein Ile-Ala Austausch an der *rabALOX15* nicht zu einem Aktivitätsverlust führt (Kühn et al., nicht publizierte Daten), sodass ein C-terminales Ile nicht als geeignetes Filterkriterium für LOXn angesehen werden kann. Obwohl durch die Einführung solcher Filterkriterien die Verlässlichkeit der strukturbasierten Suchstrategien verbessert wurde, ist die alleinige Suche nach LOXn auf der Grundlage genomischer Sequenz mit der Möglichkeit behaftet, sowohl falsch positive, als auch Auslassung durch falsch negative Ergebnisse, zu erzielen. Weiterhin wurden unsere Suchstrategien dadurch erschwert, dass ein intensiver horizontaler Gentransfer von LOX-Genen nachgewiesen wurde, sodass die Vorhersage phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse auf der Basis linearer Vererbungsschemata nur eingeschränkt möglich ist. Dieser Gentransfer und die Modifizierung von LOX-Sequenzen innerhalb einer Spezies nach dem Transfer macht es nahezu unmöglich, den Zeitpunkt abzuschätzen, zu dem LOXn erstmals in der Evolution lebender Organismen aufgetreten sind und welche Umstände zu deren Einführung geführt haben.

4.2 Eikosanoidstoffwechsel beim Zebrafisch

Der Zebrafisch stellt einen häufig genutzten Modellorganismus für niedere Vertebraten dar und hat sich aufgrund verschiedener Eigenschaften (extrakorporale Entwicklung, Durchsichtigkeit der Embryonen) für die Untersuchung der Organogenese bei Vertebraten als nützlich erwiesen. Daher ist es von Interesse, ob dieser Organismus Lipoxygenasen und andere Eikosanoid-relevanten Enzyme enthält, die auf einen funktionellen Leukotrien-Signalweg in dieser Spezies hindeuten. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde zunächst das in der Ensembl-Datenbank zugängliche Zebrafisch-Genom (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index) nach Sequenzen durchforstet, die für Enzyme und Rezeptoren der Leukotrienbiosynthese kodieren. Wie in den Ergebnissen ersichtlich ist, konnten mehrere potentielle LOX-Gene gefunden werden, wobei eine dieser Sequenzen für ein Protein kodiert, das zu 75% mit der Sequenz der humanen *ALOX5* übereinstimmt. Die rekombinante Expression dieses Enzyms konnte dessen *ALOX5*-Aktivität bestätigen (siehe 3.3). Weiterhin bewies unsere Suchstrategie die Existenz anderer Enzyme der Leukotrienbiosynthese im Zebrafischgenom, darunter die Zebrafischorthologe der Leukotrien C₄-Synthase (*zbfLTC4S*) und der Leukotrien A₄-Hydrolase (*zbfLTA4H*). Obwohl derzeit noch keine funktionellen Daten zu den Zebrafischorthologen dieser Enzyme vorliegen, sind durch deren Existenz die

prinzipiellen Voraussetzungen für die Synthese von Leukotrienen beim Zebrafisch gegeben. Im zweiten Schritt unserer Untersuchungen wurde im Zebrafischgenom nach Leukotrienrezeptorgenen gesucht, da diese für eine funktionierende Leukotrienesignalkaskade essenziell sind. Dabei konnten die Zebrafischorthologe der Cysteinylleukotrien-Rezeptoren 1 und 2 (*zbfCysLTR1* und *zbfCysLTR2*) gefunden werden. Auch die Suche nach Leukotrien B₄-Rezeptor-ähnlichen Sequenzen (*BLT1/2*) ergab zwei Treffer auf Chromosom 7, die als Leukotrien B₄-Rezeptoren des Zebrafischs ausgewiesen sind. Zusätzlich konnten mehrere weitere Leukotrien B₄-Rezeptor-ähnliche Sequenzen auf drei anderen Chromosomen identifiziert werden (Chromosomen 2, 5 und 25). Das genomische Repertoire für ein funktionelles Leukotriensignaling wäre beim Zebrafisch entsprechend unserer Recherchen gegeben. Es bleibt allerdings offen, ob und unter welchen Bedingungen die vorhandenen genomischen Sequenzen exprimiert werden. Außerdem bleibt unklar, ob die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beim Zebrafisch in analoger Art und Weise ablaufen wie bei höher entwickelten Organismen, und ob die ligandeninduzierten Signalkaskaden ähnlich verlaufen. Unterschiede könnten sich hinsichtlich der Rezeptoraffinitäten, der Ligandenspezifität und der intrazellulären Signalwandlungsmechanismen ergeben.

Der Zebrafisch ist ein Vertreter der Knochenfische, die sich parallel, aber unabhängig von den Knorpelfischen, entwickelt haben. Als Modellorganismus für Knorpelfische wurde das Genom des Elefantenhais (*Callorhinchus milii*) sequenziert und 2014 publiziert. Das Genom enthält mehrere potentielle LOX Sequenzen und zwei davon scheinen für funktionelle ALOX5-Isoformen zu kodieren (Horn et al., 2015). Weiterhin enthält das Genom ein orthologes Gen für den *BLT1*-Rezeptor und jeweils ein Gen für den *cysLTR1*- und den *cysLTR2*-Rezeptor, was auf ein funktionelles Leukotriensignaling bei Knorpelfischen hindeutet. Diese Beobachtung ist von funktionellem Interesse, da frühere Daten postuliert haben, dass Knorpelfische kein funktionelles Leukotriensignaling aufweisen (Morgan et al., 2005). Sollte sich diese Hypothese bewahrheiten, könnte die Leukotriensignalkaskade während der Evolution auf der Stufe der Knochenfische eingeführt worden sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten die Enzyme und Rezeptoren des Leukotriensignalwegs in beiden Wirbeltierklassen genauer untersucht werden. Zusätzlich sollten dazu *in vivo*-Untersuchungen zur Wirksamkeit von Leukotriensynthesehemmstoffen und Leukotrienrezeptorantagonisten in verschiedenen Entzündungsmodellen bei Knochen- und Knorpelfischen durchgeführt werden. Damit könnte überprüft werden, ob Leukotriene für die Entzündungsreaktion bei diesen

Wirbeltierarten bedeutsam sind. Da weder Knorpel noch Knochenfische Lungen aufweisen, erübrigt sich die Testung von Antileukotrienpharmaka in Asthmodellen dieser Tierarten.

4.2.1 Expressionsprofile Leukotrien-relevanter Enzyme

Makroskopische Analysen des Phänotyps *zbfLOX1*-defizienter Zebrafischembryonen haben gezeigt, dass das Fehlen dieser 12(S)-lipoxygenierenden Enzymspezies zu einer Beeinträchtigung der frühen Embryonalentwicklung der Tiere führt. Zebrafischembryonen, bei denen die Expression dieser LOX mittels Morpholino-Oligonukleotiden gehemmt worden war, zeigten bereits nach dem ersten Tag Fehlbildungen im Bereich des Kopfs und der Schwanzflosse (Haas et al., 2011). Außerdem war die Entwicklung des Gehirns und der Augen beeinträchtigt. Zudem zeigten sich Ödeme im Bereich des Perikards, der Nieren- und der Darmanlage. Sollten diese Befunde spezifische Konsequenzen des Expressionsknockdowns sein, würden sie voraussetzen, dass die entsprechende Lipoxygenase während der frühen Embryogenese exprimiert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden jeweils 24h, 48h, 72h und 5d alte Zebrafischembryonen homogenisiert und die mRNA-Konzentrationen verschiedener Eikosanoid-relevanter Proteine (ALOX5, ALOX12, ALOX15B, ALOXE3, hier wäre eine andere Bezeichnung wünschenswert) mittels quantitativer RT-PCR unter Verwendung externer Amplifikationsstandards (Amplikons) quantifiziert. Aus den Expressionsprofilen geht hervor, dass alle vier getesteten LOXn bereits am ersten (ALOX5, ALOX12 und ALOX15B) bzw. zweiten Tag (ALOXE3) nach der Befruchtung auf hohem Niveau exprimiert werden. Die Expressionsraten der *zbfALOX12* und *zbfALOXE3* liegen mit 14.473 und 15.523 Kopien auf einem so hohen Niveau, dass bei entsprechender Translation eine biologische Wirksamkeit der exprimierten Proteine in Betracht gezogen werden sollte. Das Expressionsprofil der *zbfALOX12* während der frühen Embryonalentwicklung steht im Einklang mit den Beobachtungen von embryonalen Fehlbildungen *zbfALOX1*-defizienter Zebrafische, die bereits einen Tag nach der Befruchtung eintreten (Haas et al., 2011). Der Expressionshochpunkt der *zbfALOX2* liegt mit 7.198 Kopien ebenfalls auf einem relativ hohen Niveau. Leider können durch die Bestimmung der mRNA-Profile keine Informationen darüber gewonnen werden, welche Funktion die entsprechenden Enzyme erfüllen. Es bleibt also unklar, ob die in relativ hohen Konzentrationen vorhandenen mRNA-Spiegel auch translationsaktiv sind.

Außerdem muss die Höhe der Proteinexpression nicht unbedingt mit einem biologischen Effekt korrelieren, da andere Faktoren, wie beispielsweise das Vorhandensein entsprechender Substrate, begrenzend sein können.

4.2.2 Die genomische Vielfalt der Zebrafisch-Lipoxygenasen

Das Zebrafischgenom enthält neun LOX-Gene, die auf fünf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (siehe 3.3, Tab. 1: Übersicht über die Lipoxygenasen des Zebrafischs). Mit Ausnahme der in dieser Arbeit charakterisierten *zbfALOX5a* (oder *zbfLOX2*) auf Chr. 13 (NP_001290191.1), welche einen Homologiegrad von 74,5% zur humanen ALOX5 aufweist, zeigt keine der anderen Zebrafisch-LOXn eine vergleichbar hohe Homologie zu einem humanen Enzym. Näher charakterisiert wurde bisher lediglich die als *zbfALOX1* bezeichnete Sequenz auf Chr. 7 (NP_955912.1). Aufgrund der Arbeit, die den extremen Phänotyp *zbfLOX1*-defizienter Zebrafisch-Embryonen beschreibt (Haas et al., 2011), wurde zunächst der Verdacht geäußert, es handle sich bei diesem Enzym um das Zebrafisch-Ortholog einer epidermalen humanen LOX-Isoform. *Alox12b*- und *Aloxe3-Knock-out*-Mäuse fallen ebenfalls durch einen drastischen Phänotyp auf (Epp et al., 2007, Krieg et al., 2013). Dieser ist jedoch auf eine Beeinträchtigung der epidermalen Wasserbarriere zurückzuführen und führt in unterschiedlicher Ausprägung zur Austrocknung der LOX-defizienten Tiere kurz nach der Geburt. Bei Zebrafischembryonen fielen jedoch eher neurologische Fehlbildungen auf. Die enzymatische Charakterisierung der *zbfLOX1* klassifizierte dieses Enzym als 12(S)-Lipoxygenase, während die *Alox12b* bei der Maus 12(R)-lipoxygenierend wirkt (Jansen et al., 2011). Auf der Ebene der Aminosäuresequenz weist die *zbfLOX1* mit 17,9% Sequenzidentität den höchsten Homologiegrad zur humanen ALOX5 auf. Diese Daten belegen, dass sich die *zbfLOX1* funktionell und entwicklungsbiologisch nicht mit Sicherheit einer der humanen ALOX-Isoformen zuordnen lässt. Dafür spricht auch, dass die für die meisten höheren Säuger identifizierten Struktur determinanten für die *zbfLOX1* nicht zu gelten scheinen. So folgt die *zbfLOX1* weder dem Triadenkonzept, das die Positionsspezifität von 12- und 15-lipoxygenierenden Isoformen determiniert, noch folgt die Enantioselektivität des Enzyms der Coffa-Hypothese (Horn et al., 2015, Jansen et al., 2011).

Die in dieser Arbeit als *zbfALOX5* (auch *zbfLOX2*) bezeichnete Sequenz, deren Gen auf Chr. 13 liegt (NP_001290191.1), weist mit 74,5% Sequenzidentität als einzige

Zebrafisch-LOX eine vergleichsweise hohe Homologie zu einem humanen LOX-Ortholog auf. Der Zebrafisch enthält jedoch weitere drei cDNA-Sequenzen mit einem Homologie-Grad von 19,3%, 19,4% und 20,2% zur menschlichen *ALOX5* (XP_009289657.1, NP_001038796.1, NP_001018414.1). Diese Verhältnisse könnten darauf hindeuten, dass der Zebrafisch mehrere *ALOX5*-ähnliche Sequenzen enthält, von denen aber nur eine (die in dieser Arbeit charakterisierte und als *zbfALOX5(a)* oder *zbfLOX2* bezeichnete Sequenz) funktionell der humanen *ALOX5* entsprechen sollte. Die anderen drei Sequenzen, welche hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie der *zbfALOX5a* am nächsten sind (Homologien von 20,3%, 21,5% und 22,8%), sollten andere funktionelle Eigenschaften aufweisen. Da die entsprechenden Enzyme bislang jedoch nicht charakterisiert worden sind, lassen sich diese Schlussfolgerungen derzeit experimentell nicht beweisen.

4.2.3 Anwendbarkeit des Triadenkonzepts auf die Zebrafisch-*ALOX5*

Anhand der *ALOX5*-Orthologe des Menschen und der Maus ist in der Vergangenheit gezeigt worden, dass Mutationen der Triadenmutanten (Borngräber I, Sloane und Borngräber II) zu großen Aminosäuren die Umwandlung des 5-lipoxygenierenden Enzyms in eine 15-lipoxygenierende LOX bewirken. Ob die Anwendung dieses Konzepts auch auf die *ALOX5*-Orthologe weniger weit entwickelter Spezies anwendbar ist, wurde anhand der *zbfLOX2* getestet (siehe 3.3.2). Der Austausch der *zbfLOX2*-Triadendeterminanten [Borngräber I (Phe359), Sloane (Ala424 und Asn425) und Borngräber II (Ala603)] durch große Aminosäuren bewirkte ebenfalls eine Umwandlung der rein 5-lipoxygenierenden *zbfLOX2* in ein überwiegend 15-lipoxygenierendes Enzym. Dabei scheint formal gesehen ein linearer Zusammenhang zwischen der Volumenzunahme mutierter Aminosäuren und dem Anteil der 15-Lipoxygenierung zu bestehen.

Das Prinzip einer Umwandlungsmöglichkeit von 5-lipoxygenierenden *ALOX5*-Orthologen in 15-lipoxygenierende Enzymspezies trifft entsprechend der hier erhaltenen Mutagenesedaten nicht nur für höhere Vertebraten wie Maus und Mensch zu, sondern kann bereits für das Zebrafischenzym nachgewiesen werden. Warum die Umwandlungsmöglichkeit auftritt und weshalb sie während der Evolution konserviert wurde, bleibt weiterhin unklar.

4.2.4 Phosphorylierungsmimetische Mutanten der *zbfALOX5*

Wenn der Zebrafisch ein funktionelles Leukotriensignaling hat, dann sollten auch die Regulationsmechanismen der Schlüsselenzyme einen vergleichsweise hohen Konservierungsgrad aufweisen. Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass zwei von drei Phosphorylierungsstellen, die für die humane *ALOX5* identifiziert wurden, in der Sequenz der *zbfALOX5* konserviert sind (siehe 3.3). Obwohl die *humALOX5* durch Proteinphosphorylierung prinzipiell an drei verschiedenen Stellen reguliert werden kann, trifft dies für das Zebrafischenzym nicht mehr in vollem Umfang zu. Bei dieser Vertebratenspezies ist die Proteinphosphorylierung nur an zwei Stellen (Ser271 und Thr663) möglich. An der Position 663 ist beim Zebrafisch ein Thr statt eines Ser (beim Menschen) lokalisiert. Beide Aminosäuren sind aber aufgrund ihrer OH-Gruppe phosphorylierungsfähig, wobei möglicherweise unterschiedliche Proteinkinasen erforderlich sein sollten.

Ser663 scheint bei der humanen *ALOX5* nicht ausschließlich für die Regulation der Enzymaktivität bedeutsam zu sein. Eine Arbeit beschreibt, dass offensichtlich bei der humanen *ALOX5* die Reaktionsspezifität durch Phosphorylierung von Ser663 verändert werden könnte. Die Erstellung phosphorylierungsmimetischer Mutanten hat scheinbar eine Umwandlung der Positionsspezifität der 5-lipoxygenierenden *humALOX5* in ein 15-lipoxygenierendes Enzym zur Folge (Gilbert et al., 2012). Für die *mouALOX5* und die *humALOX5* sind in anderen Laboren identische phosphorylierungsmimetische Mutanten hergestellt worden, ohne dass dabei eine Veränderung der Reaktionsspezifität festgestellt werden konnte (Adel et al., 2014). In dieser Arbeit sind für die *zbfALOX5* ebenfalls phosphorylierungsmimetische Mutanten erstellt worden, für die keine Veränderungen in der Positionsspezifität festgestellt werden konnten (siehe 3.3.3). Aufgrund der kontroversen Datenlage lässt sich derzeit nicht sicher entscheiden, ob die Phosphorylierung von Ser663 bei der *humALOX5* zu einer Veränderung der Reaktionsspezifität führt. Der biologische Hintergrund einer potentiellen Veränderung der Reaktionsspezifität der *humALOX5* durch Ser663-Phosphorylierung ist schwer nachvollziehbar. Würde das Enzym bei Zellaktivierung phosphoryliert, verlöre es seine Fähigkeit zur Leukotrienbiosynthese. Damit könnten diese proinflammatorischen Mediatoren nicht mehr synthetisiert werden, was die proinflammatorische Rolle des Enzyms insgesamt in Frage stellen würde.

4.3 ALOX15-Orthologe während der Primatenentwicklung

Es gibt zwei prinzipielle Typen der ALOX15-Orthologe, die 12-lipoxygenierenden und die 15-lipoxygenierenden Formen. Der Vergleich von ALOX15-Sequenzen unterschiedlicher Spezies deutete bereits vor Beginn meiner Arbeiten darauf hin, dass niedrigere Säuger, wie Maus, Ratte und Schwein 12-lipoxygenierende ALOX15-Isoformen exprimieren, während höhere Säuger wie der Mensch 15-lipoxygenierende Enzyme aufweisen (siehe 3.4.1, Tab. 3). Eine Ausnahme von dieser Regel bildet die Kaninchen-ALOX15, welche sowohl als 15-lipoxygenierendes Enzym in Retikulozyten, als auch als 12-lipoxygenierendes Enzym in Monozyten exprimiert wird (Berger et al., 1998, Bryant et al., 1982). Diese funktionellen Unterschiede der *rabALOX15* basieren auf unterschiedlichen cDNA-Sequenzen für die beiden ALOX15 Isoformen. Beide cDNAs gehen aus einem ALOX15-Gen des Kaninchens hervor, wobei der zellspezifische Umkodierungsmechanismus noch völlig ungeklärt ist.

Von den ALOX15-Isoformen höherer Säugertiere waren bei Beginn meiner Arbeiten nur die orthologen Enzyme des Menschen und des Orang-Utans charakterisiert, sodass nicht klar war, ob prinzipiell alle höheren Säugetiere die 15-lipoxygenierende Version der ALOX15-Isoform enthalten und die niederen Säuger die 12-lipoxygenierende Variante. Außerdem war unklar, ob es eine Übergangsform zwischen 12- und 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen gibt und wenn ja, auf welcher Entwicklungsstufe diese hypothetische Übergangsform anzutreffen ist.

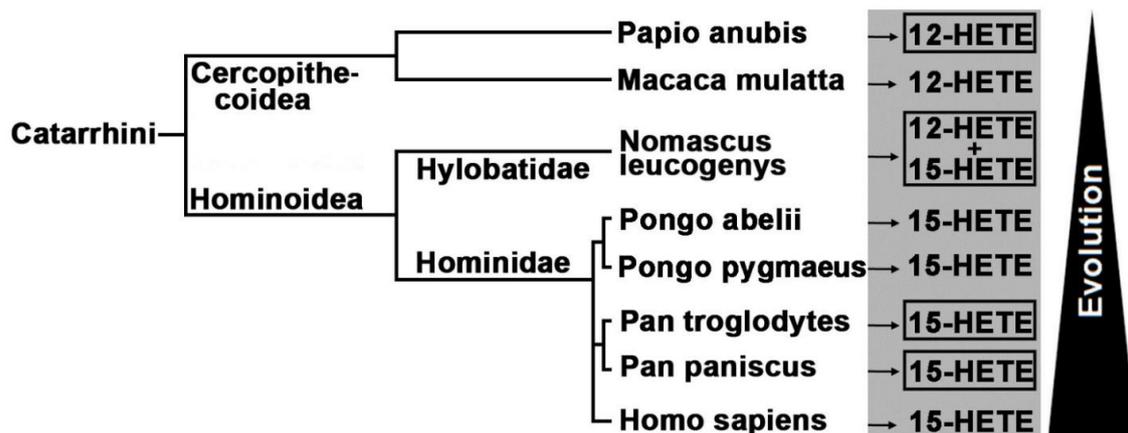


Abb. 39: Vereinfachte phylogenetische Systematik der Primaten und ALOX15-Produktspezifität. In der Abbildung sind links die Verwandtschaftsverhältnisse der Primaten und rechts daneben grau hinterlegt die zugehörigen ALOX15-Produktspezifitäten dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit neu erworbenen Daten zur Reaktionsspezifität neu klonierter ALOX15-Orthologe sind mit einem schwarzen Rahmen kenntlich gemacht. Die lateinischen Namen der Spezies sind im Folgenden erläutert. *Catarrhini*: Altweltaffen oder Schmalnasenaffen; *Cercopithecoidea*: Meerkatzenverwandte; *Hominoidea*: Menschenartige; *Hominidae*: Menschenaffen; *Papio anubis*: Pavian; *Macaca mulatta*: Makake/Rhesusaffe; *Nomascus leucogenys*: Gibbon; *Pongo abelii* und *Pongo pygmaeus*: Orang-Utans; *Pan troglodytes* und *Pan paniscus*: Schimpansen; *Homo sapiens*: Mensch.

Zur Verifikation dieses Konzepts mussten die *ALOX15*-Orthologe verschiedener Spezies (Pavian, Gibbon, Schimpansen) kloniert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert werden. In der obigen Abbildung ist ein vereinfachtes Schema des Primatenstammbaums dargestellt, welches bereits in der Einleitung den derzeitigen Wissensstand über die Reaktionsspezifitäten der *ALOX15*-Orthologe unterschiedlicher Primaten zusammenfasst. Dieses Schema wurde hier mit den in meiner Arbeit erzielten Resultaten ergänzt (**Abb. 39**). Mit einem grauen Hintergrund sind auf der rechten Seite des Stammbaums die jeweiligen Produktspezifitäten der *ALOX15*-Isoformen zusammengefasst. Die nicht umrandeten Produkte stellen den Wissensstand zur Reaktionsspezifität der *ALOX15*-Isoformen dar, der zu Beginn meiner Arbeiten vorlag. Die mit einem schwarzen Rahmen kenntlich gemachten Hauptprodukte entsprechen den hier neu ermittelten Produktspezifitäten. Die *ALOX15* des Pavians (*Papio anubis*) stellt eine rein 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoform dar, wie es aufgrund der kleinen Triadendeterminanten und der evolutionären Positionierung des Pavians als der niederste der untersuchten Primaten auch zu erwarten war. Von besonderem Interesse ist die *ALOX15* des Gibbons (*Nomascus leucogenys*), da sie phylogenetisch zwischen dem 12-oxygenierenden Makakenenzym (*Macaca mulatta*) und dem 15-oxygenierenden Orang-Utan-Enzym (*Pongo abelii* und *Pongo pygmaeus*) angesiedelt ist. Durch theoretische Modellberechnungen des Raumgewinns, der sich aus den Mutationen an den Triadendeterminanten Met419 (Met419Thr/M419T) und Thr594 (Thr594Val/T594V) ergab, konnte die Positionsspezifität der *gibALOX15* aufgrund der gegensätzlichen räumlichen Tendenzen (Verkleinerung des Raumbedarfs bei M419 bei gleichzeitiger Vergrößerung des Raumbedarfs durch Thr594) nicht sicher vorhergesagt werden. Obwohl der formale kumulative Nettoraumverlust von 19 Å³ einer Vergrößerung des Volumens der Substratbindungstasche entsprach, konnte eine Zunahme des 12-H(p)ETE-Anteils im Muster der Oxygenierungsprodukte verglichen mit dem humanen Enzym nicht sicher vorausgesagt werden. Unsere Experimente konnten hingegen eine deutliche Zunahme der 12-HETE-Bildung nachweisen. Die *gibALOX15* besitzt eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität und produziert fast gleiche Mengen an 12- und 15-H(p)ETE. Somit scheint die *ALOX15* des Gibbons eine Zwischenform zwischen 12- und 15-oxygenierenden Enzymen darzustellen. Auch das hier erstmals experimentell charakterisierte *ALOX15*-Ortholog des Schimpansen (*Pan troglodytes*) zeigt die vorhergesagte Produktspezifität für 15(S)-H(p)ETE. Dies erschien aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen sowie menschenidentischer Triadendeterminanten

plausibel und sollte aufgrund der Sequenzidentität auch für die *ALOX15* des Bonobos (*Pan paniscus*) gelten.

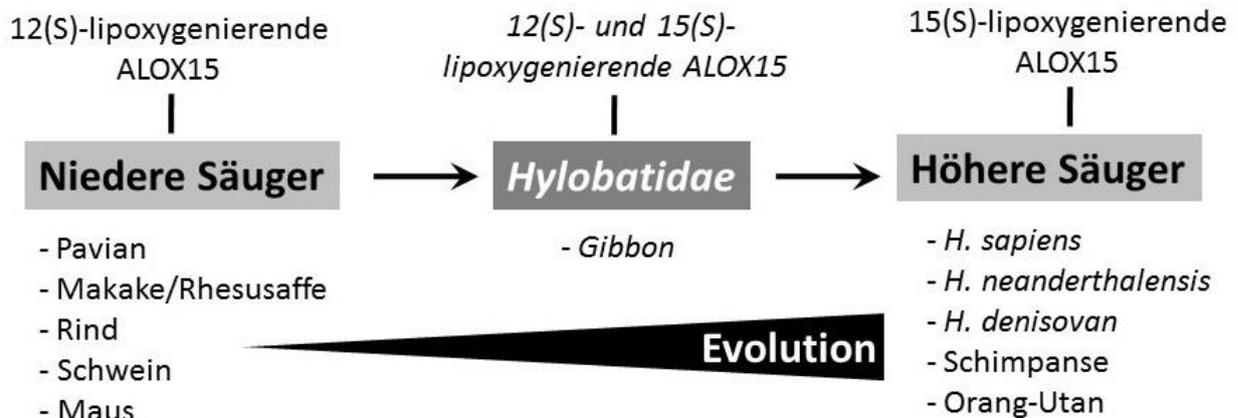


Abb. 40: Beziehung von *ALOX15*-Spezifität und phylogenetischer Stellung. In der obigen Abbildung sind schematisch die bekannten *ALOX15*-Spezifitäten unterschiedlicher Säuger unter Berücksichtigung ihrer evolutionären Positionierung dargestellt.

Diese Ergebnisse stützen die postulierte Beziehung von LOX-Spezifität und phylogenetischer Stellung der Primatenspezies (Johannesson et al., 2010). Die Hypothese der evolutionär bedingten Veränderung der *ALOX15*-Positionsspezifität konnte durch Sequenzanalysen und die experimentelle Charakterisierung der Reaktionsspezifitäten unterschiedlicher Primaten-15-LOXn abgeleitet werden (**Abb. 40**). Es sei allerdings erwähnt, dass der Vollständigkeit halber noch die *ALOX15* des Gorillas, der evolutionär zwischen den Orang-Utans und Schimpansen einzuordnen ist, zur Verifikation des Konzepts von Interesse wäre. Leider ist das *ALOX15*-Gen des Gorillas nicht vollständig im Gorilla-Genom abgebildet, sodass die rekombinante Expression des Enzyms im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Die Triadendeterminanten sind jedoch in der Sequenz der Gorilla-*ALOX15* die gleichen wie bei Mensch und Schimpanse, was für ein 15-lipoxygenierendes *ALOX15*-Ortholog spricht. Damit würde sich auch die *gorALOX15* in das hier entwickelte evolutionäre Konzept einordnen.

4.3.2 Der biologische Sinn und evolutionäre Triebkraft der Spezifitätsänderung

Die Evolution biologischer Systeme beruht auf spontan auftretenden Veränderungen des Erbguts und natürlicher Selektion der am besten angepassten Individuen. Als „Survival of the fittest“ bezeichnete Charles Darwin als Begründer der Evolutionstheorie diesen Vorgang und erklärt damit die Entstehung der Arten. Dieses Prinzip der natürlichen Selektion ist auch auf die Evolution von Enzymen anwendbar.

Den bisherigen Untersuchungen zufolge scheinen niedrigere Säugetiere 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoformen und höhere Säugetiere 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoformen zu exprimieren. Die 15-Lipoxygenierung sollte entsprechend der Evolutionstheorie den Individuen mit 15-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen gegenüber denen mit 12-lipoxygenierenden Enzymen einen Vorteil erbracht haben, wobei unklar bleibt, worin dieser Vorteil eigentlich besteht. Sollte sich die biologische Funktion der *ALOX15*-Enzyme über die Wirkung ihrer primären Reaktionsprodukte 12- bzw. 15-H(p)ETE oder aus daraus abgeleiteten Mediatoren definieren, könnte die Umstellung der *ALOX15*-Reaktionsspezifität von einer 12- auf eine 15-Lipoxygenierung als Optimierung eines biologischen Prozesses angesehen werden, wenn 15-HETE diesen biologischen Effekt besser vermittelt als 12-HETE. Die meisten Säugetiere und niederen Primaten (Makaken) produzieren als Produkt der *ALOX15*-Reaktion nur wenig 15-H(p)ETE und wären damit nicht optimal an die Biosynthese solcher Mediatoren angepasst. Höhere Primaten (Menschenaffen, Mensch) hingegen bilden 15-H(p)ETE als Hauptprodukt der *ALOX15*-Reaktion und könnten damit ihre Funktion besser erfüllen. Worin aber könnte die biologische Rolle von 15-H(p)ETE bestehen? In der Literatur sind in verschiedenen Entzündungsmodellen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte von 15-H(p)ETE beschrieben (Kühn, 1996). Es gibt aber bisher kein einheitliches Konzept zur biologischen Rolle von 15(S)-HETE und der Mechanismus für die beschriebenen Wirkungen ist völlig unklar.

4.3.2.1 12-HETE- vs. 15-HETE-Rezeptor (mögliche Koevolution mit *ALOX15*)

Für das Schwein, das ein 12-lipoxygenierendes *ALOX15*-Ortholog exprimiert, konnte ein G-Protein gekoppelter Zelloberflächenrezeptor (GPR31) für 12-HETE nachgewiesen werden, der für die Bioaktivität von 12-HETE als Signaltransduktionsmolekül bedeutsam zu sein scheint (Guo et al., 2011). Sollte 15(S)-HETE ebenfalls ein Ligand von GPR31 sein und sollte dieser Rezeptor für die biologische Aktivität der primären *ALOX15*-Produkte Bedeutung besitzen, müsste eine Koevolution der Reaktionsspezifität von *ALOX15* und der Ligandenspezifität von GPR31 nachweisbar sein. Eine solche Koevolution würde bedeuten, dass bei niederen Primaten (Pavian, Rhesusaffen), die eine 12-lipoxygenierende *ALOX15* exprimieren, GPR31 bevorzugt 12(S)-HETE binden sollte. Im Gegensatz dazu sollte bei höheren Primaten, die 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe enthalten, die Affinität für 15(S)-HETE höher sein.

Leider liegen bisher noch keine experimentellen Daten zur Ligandenspezifität von GPR31 bei höheren Säugetieren einschließlich von Primaten vor, sodass eine mögliche Koevolution nicht nachvollzogen werden kann. Deshalb sollte in weiterführenden Untersuchungen erforscht werden, ob es eine Koevolution der Ligandenspezifität von GPR31 und der Reaktionsspezifität der *ALOX15* gibt. Dazu müssten die GPR31-Orthologe ausgewählter Primaten (Makaken, Rhesusaffen Gibbons, Schimpansen und Menschen) kloniert, exprimiert und hinsichtlich ihrer Ligandenspezifitäten charakterisiert werden.

4.3.2.2 Die evolutionäre Optimierung der Lipoxinsynthese

Lipoxine (Romano et al., 2015) sind antiinflammatorische Mediatoren, welche die Pathogenese der Entzündungsreaktion regulieren. Dabei wird vor allem die inflammatorische Resolution (Heilungsphase der Entzündung) beeinflusst. Es gibt prinzipiell mehrere Wege der Lipoxinbiosynthese (Romano et al., 2015), die alle eine Oxygenierung der Arachidonsäure am C₅ (5-Lipoxygenierung) und am C₁₅ (15-Lipoxygenierung) enthalten: Vier mögliche Szenarien seien hier kurz beschrieben: i) An mucosalen Oberflächen kann die Lipoxinbiosynthese auf transzellulärem Wege durch 15-Lipoxygenierung (*ALOX15*) von Arachidonsäure durch epitheliale Zellen und anschließende 5-Lipoxygenierung durch neutrophile Granulozyten erfolgen. ii) LTA₄, das durch LTA₄-Synthaseaktivität der *ALOX5* in Entzündungszellen gebildet wird, kann durch Hydrolyse zu 5(S),6(R)-DiHETE umgewandelt werden. Dieses Intermediat kann anschließend durch 15-Lipoxygenierung zum LxA₄ [5(S),6(R),15(S)-TriHETE] umgesetzt werden, wobei sowohl die *ALOX15*, als auch die *ALOX12* (Kieran et al., 2004) eine 15-Lipoxygenierung des 5(S),6(R)-DiHETE katalysieren kann. Damit wären neben der *ALOX5* prinzipiell auch die *ALOX15*, die *ALOX15B* und die *ALOX12* an der Lipoxinbiosynthese beteiligt. Bei diesem Szenario der Lipoxinbiosynthese entstammt die *ALOX15* ebenfalls den neutrophilen Granulozyten. iii) Ein dritter möglicher Weg der Lipoxinbiosynthese benötigt die 15-Lipoxygenaseaktivität der aspirinbehandelten COX-2 (Serhan, 2005). Behandelt man dieses Enzym mit therapeutischen Dosen von Acetylsalicylsäure (Aspirin), kommt es zu einer Hemmung der COX-Aktivität durch Acetylierung des Enzyms bei gleichzeitiger Induktion einer 15(R)-Lipoxygenaseaktivität. Diese katalytische Aktivität der COX-2 kann 15-lipoxygenierende ALOX-Isoformen (*ALOX15B*, *ALOX12*) in der Biosynthese der Lipoxine ersetzen. Die Effektivität der

Lipoxinsynthese ist jedoch höher, wenn die 15-Lipoxygenierung durch die *ALOX15* katalysiert wird, da dieses Enzym evolutionär für die 15-Lipoxygenierung optimiert wurde. iv) Ein vierter Weg der Biosynthese von Lipoxin B₄ besteht darin, dass die *ALOX15* direkt und ohne Mithilfe eines anderen Enzyms 15-HETE-Methylester durch Doppeloxygenierung an C5 und C14 zu 5,14,15-TriHETE (LxB₄-Isomer) umsetzt. Dieser Syntheseweg wurde für rekonstituierte *in vitro* Synthese beschrieben (Serhan, 2005, Kühn et al., 1987, Kühn et al., 1986), es bleibt aber unklar, ob dieser Mechanismus auch *in vivo* von Bedeutung ist.

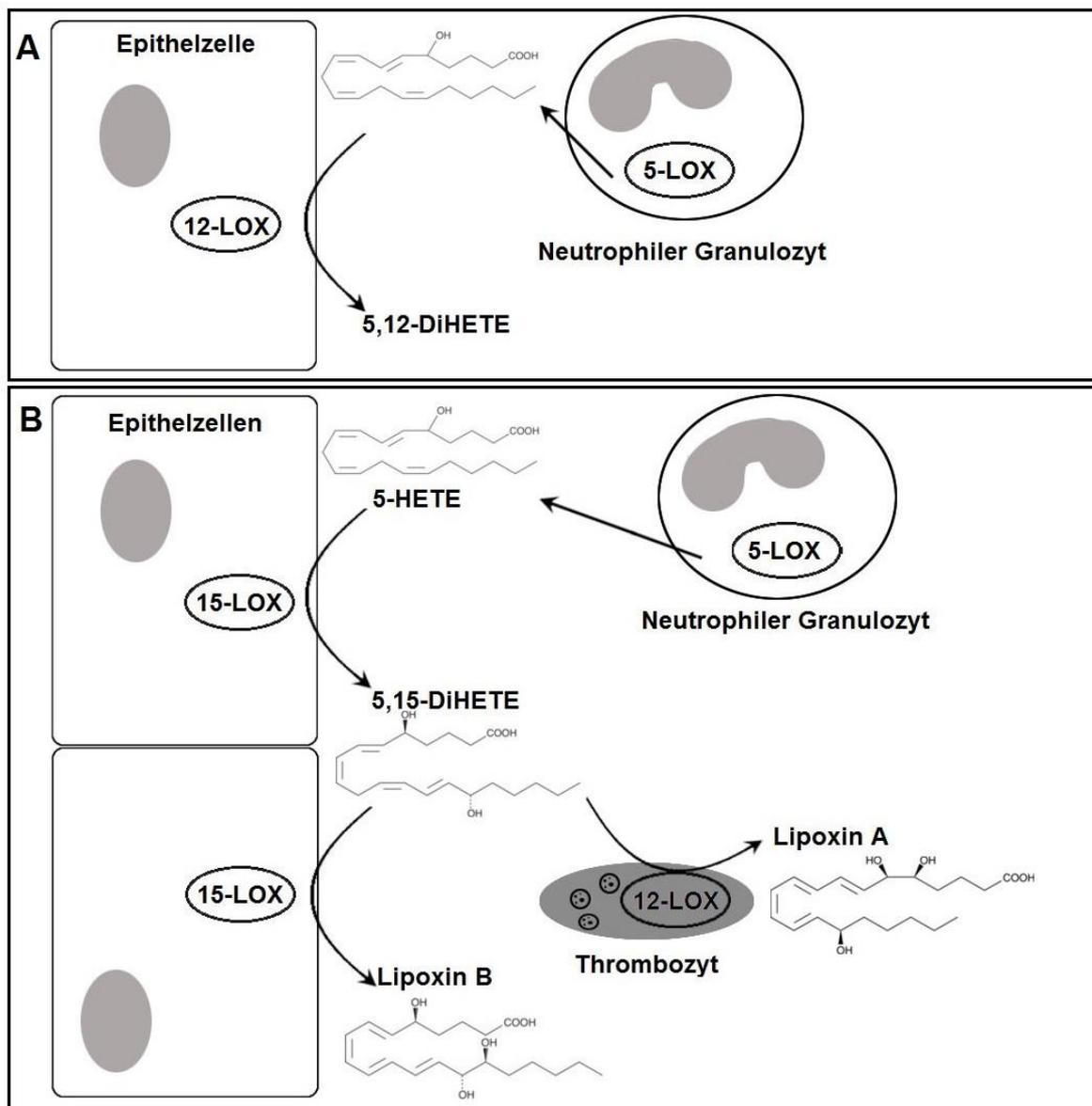


Abb. 41: Lipoxinsynthese unter den Bedingungen 12-lipoxygenierender und 15-lipoxygenierender *ALOX15*-Isoformen. In der obigen Abbildung ist der Lipoxinsyntheseweg beispielhaft ausgehend vom Zwischenmetabolit 5-HETE dargestellt. In **A** unter den Umständen eines 12-LOX-Schritts, zum Beispiel durch die 12-lipoxygenierende *ALOX15* niederer Säuger und in **B** unter den Umständen eines folgenden 15-LOX-Schritts, wie es mit einer 15-lipoxygenierenden *ALOX15* höherer Säuger der Fall wäre.

Wenn die *ALOX15* allerdings, wie bei niederen Säugern und Primaten, ein 12-lipoxygenierendes Enzym darstellt, sollte die 15-Lipoxygenierung schlechter ablaufen. In der obigen Abbildung sind beispielhaft mögliche Unterschiede beim transzellulären Lipoxinsyntheseweg an mucosalen Oberflächen unter Beteiligung 12-lipoxygenierender und 15-lipoxygenierender *ALOX15*-Enzyme im Vergleich dargestellt (**Abb. 41**). Eine 12-Oxygenierung von 5-HETE würde entsprechend dieses Mechanismus initial zur Bildung von 5,12-DiHETEs führen. Dieses Substrat kann durch weitere Oxygenierung nicht mehr in Lipoxine umgewandelt werden, da es keine bisallylständigen Methylgruppen mehr enthält. Die 15-Lipoxygenierung von 5-HETE hingegen führte zur Bildung von 5,15-DiHETE. Dieses Substrat kann durch weitere Oxygenierung durch ein 12-lipoxygenierendes Enzym (*ALOX12* oder *ALOX15*) zu Lipoxin A (5,6,15-TriHETE) oder zu Lipoxin B (5,14,15-TriHETE) oxygeniert werden (**Abb. 41**), wobei im Prinzip beide oben genannten Enzyme zu beiden Lipoxinformen führen können.

Ein *in vitro*-Vergleich der Lipoxinsynthaseaktivität der *rabALOX15* mit dessen 12-lipoxygenierender Ile418Ala-Mutante zeigte, dass ausgehend von 5(S)-HETE als Substrat für die Lipoxinbiosynthese das 15-lipoxygenierende Wildtypenzym eine um 35% höhere Lipoxinsynthaseaktivität aufweist als die 12-lipoxygenierende Mutante (Adel et al., 2016). Noch drastischer waren die Unterschiede, wenn 5(S),6(R)-DiHETE als Substrat für die Lipoxinsynthese eingesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen war für die Enzymmutante keine signifikante Lipoxinbildung nachweisbar, während das Wildtypenzym große Mengen an Lipoxin A-Isomeren produzierte (Adel et al., 2016). Wenn die Lipoxinsynthese der niederen Primaten durch die Expression einer 12-lipoxygenierenden *ALOX15* folglich schlechter abläuft, sollte die inflammatorische Resolution schlechter reguliert werden. Durch die evolutionäre Veränderung der *ALOX15* Aktivität von 12- nach 15-Lipoxygenierung würde die Entzündungshelung verbessert werden, was als evolutionärer Vorteil angesehen werden kann.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten folgende weiterführenden Versuche durchgeführt werden: i) *In vitro* Strategien: Hierbei sollten 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Enzyme niederer Primaten und 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Enzyme höherer Primaten exprimiert und gereinigt werden, um sie anschließend jeweils in einem Reaktionsansatz mit vorgelegten Substraten (5-HETE, 5,6-DiHETE) zu inkubieren. Die gebildeten Produkte (Lipoxin A- und Lipoxin B-Isomere) könnten dann mittels HPLC quantifiziert werden. Den Erwartungen gemäß müsste die 15-lipoxygenierende *ALOX15* höherer Primaten zu einer erhöhten Bildung von Lipoxinen in der Lage sein. ii) *In vivo*-Strategie:

Ein geeignetes Tiermodell für die *in vivo*-Untersuchung dieser Hypothese wären Versuchsmäuse, deren 12-lipoxygenierende *ALOX15* durch ein *Knock-in*-Verfahren in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt wurde (*ALOX15*-humanisierte Maus). Diese humanisierten Mäuse und entsprechende Kontrolltiere mit ihren 12-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen könnten anschließend in verschiedenen Inflammationsmodellen, z.B. einer chemisch oder bakteriell induzierten Glomerulonephritis, hinsichtlich der Krankheitsintensität, der Krankheitsdauer und Regenerationsfähigkeit untersucht werden.

4.3.2.3 Die evolutionäre Optimierung der Membranoxygenierung

ALOX15-Orthologe sind in der Lage, PUFAs zu oxygenieren, auch wenn diese in veresterter Form in Biomembranen vorkommen (Schewe et al., 1975, Kuhn et al., 1990, Kühn et al., 1987). Durch die Oxygenierung der Membranlipide spielt die *ALOX15* beim reifungsabhängigen Mitochondrienabbau während der Erythropoiese eine Rolle (Schewe et al., 1986, van Leyen, 1998). Membranen tierischer Zellen enthalten neben gesättigten Fettsäuren vor allem die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure und Arachidonsäure, wobei Linolsäure in den meisten Zellen in höheren Konzentrationen vorkommt (Casu et al., 1968). Arachidonsäure ist ein gutes Substrat sowohl für 12- als auch für 15-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe, da sowohl C₁₀ (n-11) als auch C₁₃ (n-8) der Fettsäurekette als bisallylische Methylengruppen vorliegen und dadurch eine Wasserstoffabstraktion von diesen Kohlenstoffatomen möglich ist. Linolsäure besitzt aber nur eine n-8 doppelallylständige Methylengruppe, sodass 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe diese Fettsäure weniger gut oxygenieren können. Die 15-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen des Kaninchens und des Menschen bevorzugen unter den freien PUFAs Linolsäure als Oxygenierungssubstrate während die 12-lipoxygenierenden Orthologe der Maus und des Schweins Linolsäure mit geringerer Effektivität umsetzen. Überträgt man diese Enzymeigenschaften auf Biomembranen in denen sowohl Linol- als auch Arachidonsäure enthalten sind, kann geschlossen werden, dass bestimmte Biomembranen wegen ihres hohen Linolsäuregehaltes von 15-lipoxygenierenden *ALOX15*-Isoformen gut oxygeniert werden können. Dagegen sollten solche Membranen ein schlechteres Substrat für 12-lipoxygenierende *ALOX15*-Isoformen darstellen. Ein direkter Vergleich der Membranoxygenaseaktivität der 15-lipoxygenierenden *humALOX15* mit seiner 12-lipoxygenierenden I418A-Mutante ergab, dass die 15-

lipoxygenierende Wildtypvariante verglichen mit der I418A-Mutante mehr als eine doppelt so hohe Membranoxygenaseaktivität aufwies, wenn die Enzymmenge auf eine vergleichbare Arachidonsäureoxygenaseaktivität normiert wurde (Adel et al., 2016). Diese Daten deuten darauf hin, dass die evolutionäre Umstellung der Reaktionsspezifität der *ALOX15*-Orthologe möglicherweise darauf abzielt, die Membranoxygenaseaktivität der Enzyme zu verbessern. Damit sollte die biologische Rolle der Enzyme beim Organellabbau evolutionär effektiviert worden sein.

4.4 Volumenhypothese

Entsprechend des Triadenmodells spielt das Volumen der Substratbindungstasche eine wesentliche Rolle für die Reaktionsspezifität von *ALOX15*- und *ALOX5*-Isoformen. Im Rahmen dieser Dissertation habe ich experimentell die Anwendbarkeit des Triadenkonzepts auf die *zbfALOX5*- und die *ALOX15*-Orthologe des Schimpansen und des Gibbons überprüft, welche ursprünglich als Erklärung für die variable Positionsspezifität der *ALOX15*-Orthologe von Mensch, Kaninchen und Maus entwickelt worden war (Ivanov et al., 2010, Borngräber et al., 1999). Bei diesen Versuchen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese die Positionsdeterminanten BG-I, SL und BG-II durch unterschiedlich große Aminosäuren ersetzt und die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Reaktionsspezifität der Enzyme untersucht. Dabei konnte rein phänomenologisch ein positiver Zusammenhang zwischen dem Volumen der eingeführten Aminosäureseitenketten und dem Anteil der 15-H(p)ETE-Produktion durch die Enzymmutanten festgestellt werden. Um diesen Zusammenhang statistisch abzusichern und seine Stärke zu quantifizieren, erfolgten quantitative Korrelationsuntersuchungen. Dabei wurde der 15-H(p)ETE-Anteil (in %) am Produktmuster in Abhängigkeit von den summierten van-der-Waals-Volumina der Triadendeterminanten (BG-I, SL und BG-II) in Kubik-Ångström (Å^3) aller in dieser Arbeit experimentell charakterisierten Enzymvarianten zusammengetragen (**Abb. 42**). Durch die Verteilung der Messpunkte kann bereits phänomenologisch ein monoton ansteigender Zusammenhang festgestellt werden. Um die Stärke des Zusammenhangs zu ermitteln, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman-Rho mittels SPSS berechnet. Die parametrische Korrelationsanalyse nach Pearson, welche neben der Monotonie auch eine Linearität der untersuchten Messgrößen voraussetzt, ergibt einen Korrelationskoeffizienten von 0,805, der sich mit $p < 0,01$ signifikant von 0

unterscheidet (zweiseitig getestet). Durch die parametrische Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho (Rangkorrelation), welche auch bei nicht linearen, monotonen Zusammenhängen angewandt werden kann, lässt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,748 berechnen, welcher ebenfalls signifikant von 0 (=keine Korrelation) abweicht ($p < 0,01$, zweiseitiger Test).

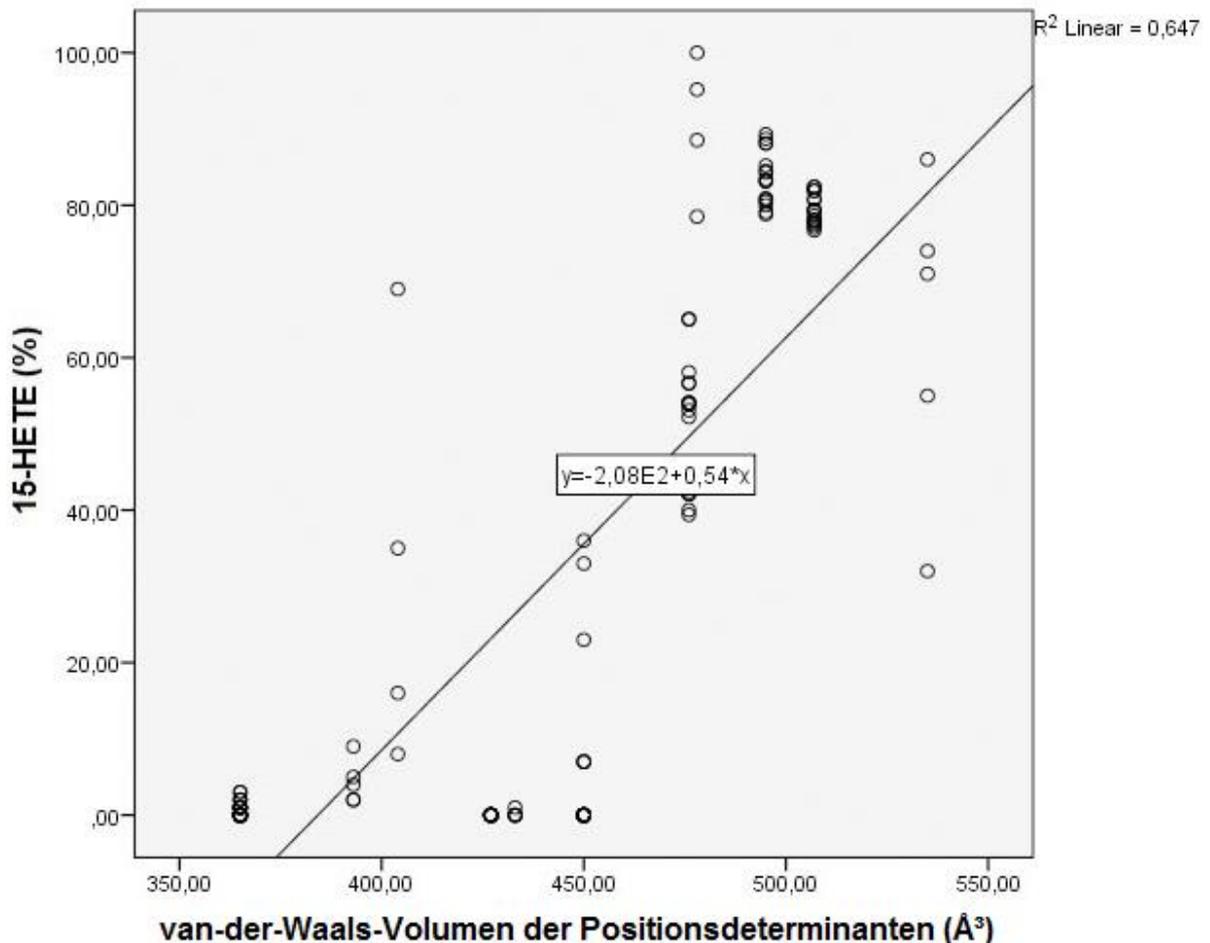


Abb. 42: Korrelation der 15-HETE-Produktion und der van-der-Waals-Volumina von Positionsdeterminanten. In der obigen Abbildung ist ein Scatterplot mit eingetragener Regressionsgeraden dargestellt. Es sind jeweils auf der Ordinate die 15-HETE-Anteile in Prozent (%) und auf der Abszisse die Gesamt-van-der-Waals-Volumina (Beschriftung der x-Achse) der Triadendeterminanten (BG-I, Sloane und BG-II) in Kubik- Ångström (Å³) der folgenden in dieser Arbeit experimentell charakterisierten Enzyme eingetragen:

1. 365 Å³ (zbfALOX5 Wildtyp, Phosphorylierungsmutanten T271D und S663D),
2. 393 Å³ (zbfALOX5 N425M),
3. 404 Å³ (zbfALOX5 N425F),
4. 427 Å³ (gibALOX15 I418A),
5. 433 Å³ (zbfALOX5 A424F),
6. 450 Å³ (zbfALOX5 A424I+N425M, panALOX15 I418A),
7. 476 Å³ (gibALOX15 Wildtyp),
8. 478 Å³ (zbfALOX5 F359W+A424I+N425M),
9. 495 Å³ (gibALOX15 I418F),
10. 507 Å³ (humALOX15 Wildtyp, panALOX15 Wildtyp),
11. 535 Å³ (zbfALOX5 Wildtyp)

Diese Berechnungen bestätigen den positiven Zusammenhang der 15-H(p)ETE-Anteile am Produktspektrum und der van-der-Waals-Volumina der spezifitätsdeterminierenden Aminosäuren an den Positionen BG-I, SL und BG-II. Die Tatsache, dass der Spearman-Rho-Koeffizient kleiner ist als der Pearson-Koeffizient kann dadurch erklärt werden, dass hier ein linearer Zusammenhang vorliegt. Demnach würde ein parametrisches Verfahren zur Korrelationsanalyse (Pearson) auch das tendentiell teststärkere Verfahren darstellen. Nachdem zumindest eine annähernde Linearität angenommen werden kann, wurde schließlich eine Regressionsgerade mittels SPSS berechnet, welche den Zusammenhang grafisch zusammenfasst (**Abb. 42**). Das Bestimmtheitsmaß R^2 dient der Einschätzung der Verlässlichkeit oder Güte der Regressionsgeraden für dieses Modell und ist mit dem Wert 0,647 als gut einzuschätzen. Demnach sind nur ca. 35% der Varianz der 15-HETE-Produktion durch andere nicht im Regressionsmodell berücksichtigte Einflüsse verursacht.

Durch diese Berechnungen kann auf mathematischem Wege eine signifikante statistische Korrelation zwischen der 15-H(p)ETE-Produktion und den Volumina der positionsdeterminierenden AS bestätigt werden. Allerdings können aus den signifikanten Korrelationen und berechneten Kurven keine Schlussfolgerungen auf eine Kausalität dieser Größen gezogen werden. Streng genommen besagen die positiven Korrelationskoeffizienten nur, dass ein kausaler Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann.

4.5 Membranbindungsstudien

4.5.1 Unterschiede im Mechanismus der Membranbindung (ALOX15, ALOX5)

Die Membranbindung ist eine nachgewiesene Eigenschaft der Lipoxygenasen (Walther et al., 2011). Die Mechanismen, welche die Membranbindung ermöglichen, sind jedoch unterschiedlich. Bei *ALOX5*-Orthologen wird z.B. Calcium an hochaffine Bindungsstellen des Enzyms gebunden. Deshalb sind für die *ALOX5* bereits Calcium-Konzentrationen im submikromolaren Bereich wirksam. Bei der *ALOX15* sind die hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen am Enzym nicht konserviert und es sind millimolare Konzentrationen an Calcium notwendig, um eine effektive Membranbindung zu erreichen. Für die *ALOX15* haben Mutageneseuntersuchungen gezeigt, dass Trunktionsmutanten, bei denen die N-terminale PLAT-Domäne mittels gentechnischer Verfahren deletiert wurde, noch zur Membranbindung fähig sind, dass dieser Prozess

aber deutlich schlechter abläuft (Walther et al., 2011). Für die Membranbindung von LOXn sind oberflächenexponierte hydrophobe AS von Bedeutung, deren Seitenketten mit der Lipiddoppelschicht interagieren können und damit das Enzym in der Membran verankern. Es bleibt aber nach wie vor unklar, ob die Membranbindung von LOXn ein diffusionskontrollierter Prozess ist oder ob es sich um einen gerichteten Transport des Enzyms an die Membran handelt.

4.5.2 Biologische Rolle der Membranbindung

Für die *ALOX15* gibt es zweierlei Konsequenzen für die Membranbindung. Erstens geht sie einher mit der Aktivierung des Enzyms: Die Fettsäureoxygenaseaktivität wird bei der Membranbindung der *ALOX15* um den Faktor zehn hochreguliert. Zweitens ist die Membranbindung für die direkte Oxygenierung von Membranphospholipiden notwendig.

4.5.3 Strukturveränderungen bei Membranbindung

Die Bindung von LOXn an Biomembranen induziert in den Enzymen Strukturveränderungen, wobei nach wie vor unklar ist, wie diese Strukturveränderungen im Detail aussehen (Di Venere et al., 2013). Um diese molekularen Prozesse besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Membranbindungsassays mit der *rabALOX15* durchgeführt, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffs ETYA behandelt worden ist. Dieser bindet am aktiven Zentrum des Enzyms und führt zu einer irreversiblen Inaktivierung der LOX (Kühn et al., 1984). Die durch ETYA inaktivierte *ALOX15* zeigte eine zu mehr als zwei Dritteln reduzierte Fähigkeit zur Membranbindung. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass für eine effektive Membranbindung das Enzym in einer katalytisch aktiven Struktur vorhanden sein muss. Unklar bleibt jedoch, in welchem Ausmaß die Inaktivierung durch ETYA die Enzymstruktur verändert. Obwohl sich entsprechend des derzeit bekannten Inaktivierungsmechanismus von LOXn durch ETYA nur lokale Strukturveränderungen am aktiven Zentrum des Enzyms ergeben würden, kann eine Modifizierung der Enzymoberfläche nicht wirklich ausgeschlossen werden. Solche Oberflächenveränderungen sollten die Membranbindung beeinflussen.

4.6 Untersuchungen der Leukotriensignalwege von Hominiden

4.6.1 Leukotriensignalwege des *H. neanderthalensis*

Die Untersuchung der Leukotrien-relevanten Gene im Genom des *H. neanderthalensis* hat aufgezeigt, dass es subtile strukturelle Unterschiede im Vergleich mit den entsprechenden Genen des *H. sapiens* gibt. Aufgrund der Tatsache, dass es bisher ein qualitativ hochwertiges Genom nur von einem Individuum der humanen Subspezies *H. neanderthalensis* gibt, kann nicht entschieden werden, ob diese gefundenen Aminosäureunterschiede auf zufällige Punktmutationen bei diesem Individuum zurückzuführen sind oder ob sie in den Genomen aller Neandertaler-Individuen vorkommen. Trotz der subtilen Strukturunterschiede kann man aus den Sequenzdaten schlussfolgern, dass Neandertalermenschen prinzipiell zur Leukotrienbiosynthese fähig waren. Die dafür nötigen Enzyme und die entsprechenden Leukotrienrezeptoren haben sich im Verlaufe der letzten 300.000 Jahre praktisch nicht verändert.

Für den Cysteinylleukotrien-Rezeptor 1 (*neaCysLTR1*) ergab die Auswertung der in den Datenbanken gespeicherten Sequenzdaten einen Hinweis darauf, dass dieser Rezeptor aufgrund einer Nonsense-Mutation im Leserahmen der entsprechenden cDNA als trunkeiertes Protein exprimiert wurde. Ein detaillierter Sequenzvergleich aller verfügbaren Sequenzbruchstücke, die diesen Sequenzbereich abdecken, zeigte, dass an dieser Stelle zwei unterschiedliche Sequenzen nachweisbar waren. In 7 der 18 verfügbaren Sequenzen für diesen Bereich wurde das Kodon TGC identifiziert, welches auch beim humanen Ortholog an dieser Position für ein Cys kodiert. In 11 der 18 Sequenzen wurde bei der Sequenzierung an dieser Position allerdings das Kodon TGA gefunden, das als Stoppkodon fungiert (Adel et al., 2015). Dies würde zu einem vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette, bereits nach 173 der 352 Aminosäuren, führen und hätte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einen Funktionsverlust des Rezeptors zur Folge. Eine Erklärung für die kontroversen Sequenzdaten könnte ein allelspezifischer Polymorphismus bei diesem *H. neanderthalensis*-Individuum sein. Dabei befinden sich im mütterlichen und väterlichen Allel unterschiedliche Sequenzen. Dies hätte im Falle einer rezessiven Vererbung des von dieser Veränderung betroffenen *cysLTR1*-Allels keine phänotypische Veränderung der Leukotrien-Signalwege dieses Neandertalerindividuum zufolge (Adel et al., 2015). Bisher ist aber nicht bekannt, welches der beiden Allele dominant vererbt wird oder ob es sich bei diesem Genlokus um

eine kodominanten Vererbung handelt. Deshalb können die funktionellen Konsequenzen dieser Sequenzbesonderheit für dieses *H. neandethalensis*-Individuum nicht abgeschätzt werden.

4.6.2 Leukotriensignalwege des *H. denisovans*

Durch die Sequenzvergleiche leukotrienrelevanter Proteine des *H. denisovans* und des *H. sapiens* wurden im Ergebnissteil einige Aminosäureunterschiede identifiziert, die sich aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf die Funktionalität der entsprechenden Proteine auswirken sollten. Bei diesen Diskussionen wurden jedoch ausschließlich Aminosäuren berücksichtigt, die an für die Funktionalität der Proteine kritischen Positionen lagen: Eisenliganden, Phosphorylierungsstellen, Determinanten der Positions- und Stereospezifität, ATP-, Ca^{2+} - und Membranbindungsstellen. Außer Betracht gelassen wurde bei diesen Diskussionen aber die Möglichkeit, dass veränderte Eigenschaften von anderen Aminosäuren die Orientierung von Seitenketten funktionsrelevanter Reste im gefalteten Protein verändern könnten und somit indirekt funktionsrelevante Strukturveränderungen hervorrufen würden. Solche indirekten strukturellen Veränderungen können zwar auf der Basis der vorhandenen Strukturdaten modelliert werden (siehe unten), ihre funktionellen Konsequenzen sind aber nicht mit Sicherheit vorherzusagen.

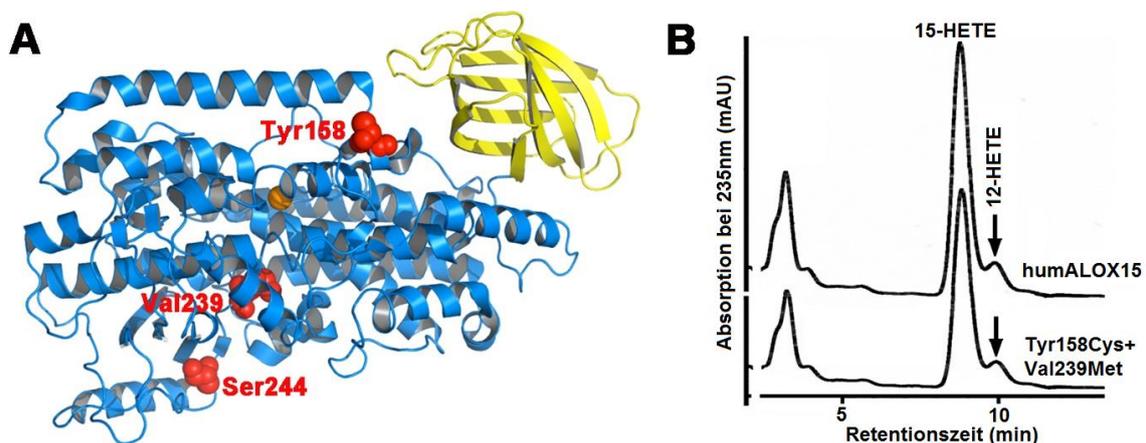


Abb. 43: Vergleich der *hum*- und *den*ALOX15. A: Lokalisation der *den*ALOX15-AS-Unterschiede in der 3D-Struktur der *hum*ALOX15. **B:** Positionsspezifität der *hum*ALOX15-Doppelmutante Tyr158Cys+Val239Met im Vergleich zum *hum*ALOX15-Wildtyp. Die Abb. wurde modifiziert nach (Adel et al., 2015). Diese Experimente wurden von T. Horn durchgeführt.

In der obigen Abbildung (**Abb. 43A**) ist zur Linken die 3D-Struktur der *hum*ALOX15 dargestellt, in der die Lokalisation der AS-Unterschiede des *H. denisovans* eingetragen

wurden. Daraus geht hervor, dass es sich bei den beiden *denALOX15*-Mutationen Tyr158Cys und Ser244Thr um oberflächenexponierte AS handelt. Beim Val239Met-Austausch ist eine interne AS betroffen, die jedoch keinen direkten Kontakt zum aktiven Zentrum hat (Adel et al., 2015). Um die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Enzymaktivität beurteilen zu können, wurden die beiden oberflächenexponierten AS-Veränderungen als denisovanisierte *humALOX15*-Doppelmutante (Tyr158Cys + Val239Met) exprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften mit dem humanen Wildtypenzym verglichen. Dabei wurde das Produktmuster mittels RP-HPLC analysiert und ein repräsentatives Chromatogramm ist ebenfalls in der obigen Abbildung dargestellt (**Abb. 43B**). Aus der experimentellen Analyse des Produktspektrums geht hervor, dass die beiden oberflächenexponierten AS-Veränderungen der *denALOX15* keine Veränderungen der Positionsspezifität des Enzyms bewirken. Die denisovanisierende Doppelmutante der *humALOX15* weist, ebenso wie das Wildtypenzym, eine dominante 15-Lipoxygenaseaktivität auf (Adel et al., 2015). Die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzymvarianten unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander, was aus der vergleichbaren Menge an produzierten LOX-Produkten (vergleichbare Peakhöhen) hervorgeht. Diese Ergebnisse bestätigen die vermutlich unveränderte Funktionalität der *denALOX15*.

Ähnliche Untersuchungen erfolgten mit den 3D-Strukturen der anderen LOX-Isoformen, welche beim Denisovan von Veränderungen betroffen waren. In der unteren Abbildung (**Abb. 44**) ist die Lokalisation der *denALOX15B*-Mutation in der Struktur der *humALOX15B* dargestellt.

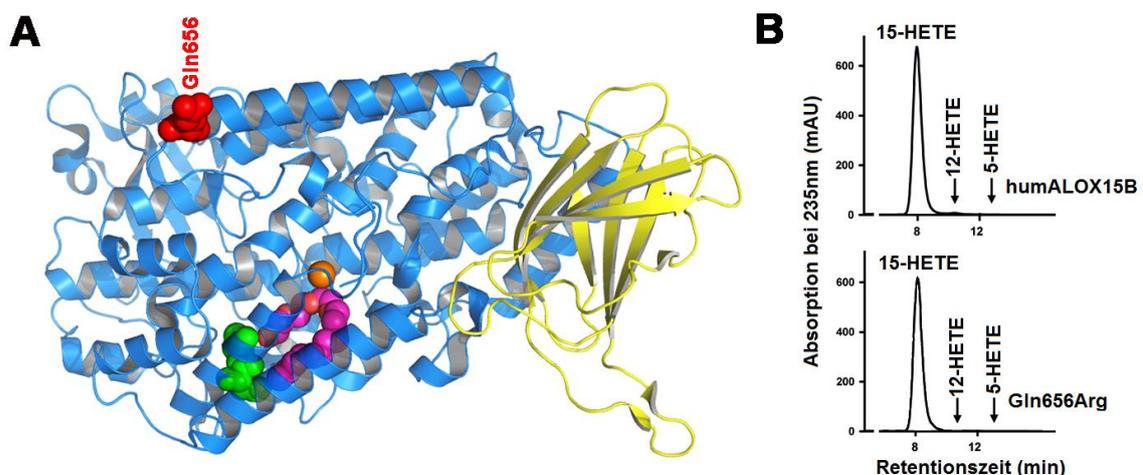


Abb. 44: Vergleich der *hum*- und *denALOX15B*. **A:** Lokalisation der *denALOX15B*-AS-Veränderung in der 3D-Struktur der *humALOX15B*. **B:** Positionsspezifität der *humALOX15B*-Mutante Gln656Arg im Vergleich zum *humALOX15B*-Wildtyp. Die Abb. wurde modifiziert nach (Adel et al., 2015). Diese Experimente wurden von T. Horn (Koautor) durchgeführt.

Diese ist in der Nähe des C-Terminus in der katalytischen Domäne lokalisiert und könnte die Enzymfunktion indirekt beeinträchtigen. Rekombinante Expressionen der denisovanierten *humALOX15B*, die diesen Aminosäureaustausch enthalten, zeigen allerdings eine unveränderte Enzymaktivität mit fast ausschließlicher 15-Lipoxygenierung von AA (Adel et al., 2015). Diese Daten deuten darauf hin, dass die *denALOX15B* als funktionell intaktes Protein exprimiert wird.

Auch der einzige AS-Unterschied in der *ALOX12*-Sequenz des *H. denisovans* befindet sich in der katalytischen Domäne des Enzyms und die nähere Betrachtung der Lokalisation dieser Mutation in der 3D-Struktur des humanen Orthologs belegt dessen Lokalisation an der Enzymoberfläche (**Abb. 45**). Die rekombinante Expression der denisovanierten *humALOX12* zeigte, dass die Veränderung keine wesentlichen Auswirkungen auf die Enzymfunktion hat. Die Mutante Gln261Arg ist katalytisch aktiv und zeigt im Aktivitätsassay mit AA als Substrat eine fast ausschließliche 12-Lipoxygenaseaktivität (Adel et al., 2015). Daraus kann man auf eine vermutlich unveränderte Funktionalität der *denALOX12* schließen.

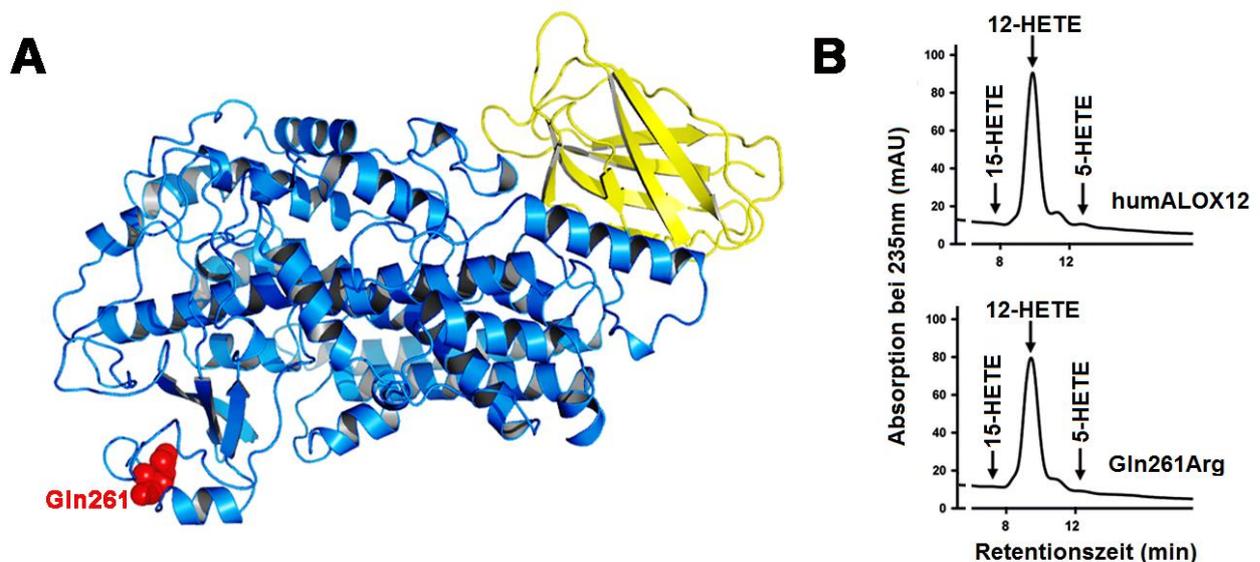


Abb. 45: Vergleich der *hum*- und *denALOX12*. **A:** Lokalisation der *denALOX12*-AS-Veränderung in der 3D-Struktur der *humALOX12*. **B:** Positionsspezifität der *humALOX12*-Mutante Gln261Arg im Vergleich zum *humALOX12*-Wildtyp. Die Abb. wurde modifiziert nach (Adel et al., 2015). Diese Experimente wurden von T. Horn (Koautor) durchgeführt.

Für die *denALOXE3* wurde beim Vergleich mit der orthologen Sequenz des *H. sapiens* ein Ala359Pro Austausch gefunden. Aufgrund der helixbrechenden Funktion von Prolinresten wurde bereits im Ergebnisteil diskutiert, dass ein solcher Austausch funktionelle Konsequenzen haben könnte, falls sich diese Aminosäure in einer Helix befindet. Leider gibt es derzeit keine Kristallstruktur für *ALOXE3*-Orthologe, sodass nicht

geprüft werden konnte, ob dieser Aminosäurerest beim Wildtypenzym Bestandteil einer Helix ist. Deshalb wurde auf der Basis der Aminosäuresequenz der *denALOXE3* und den Strukturdaten der *rabALOX15* ein Strukturmodell der *denALOXE3* konstruiert (**Abb. 46**).

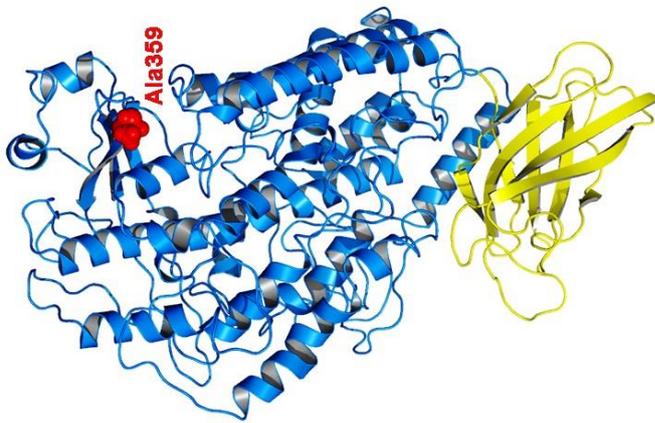


Abb. 46: Lokalisation der *denALOXE3*-Mutation Ala359Pro in der 3D-Struktur der *humALOXE3*. In der links stehenden Abbildung der dreidimensionalen *humALOXE3*-Struktur wurde die Position Ala359, welche in der *denALOXE3* durch den Helixbrecher Pro ersetzt ist, hervorgehoben. Die Lokalisation ist eher peripher und nicht Bestandteil einer Alpha-Helix des Proteins, sodass die helixbrechende Funktion vernachlässigt werden kann. Die Modellierungsexperimente wurden von Kumar Reddy aus der Arbeitsgruppe von Prof. P. Redanna (Universität Hyderabad, Koautor) durchgeführt.

Diese Modellberechnungen deuten darauf hin, dass Ala359 kein Bestandteil des aktiven Zentrums des Enzyms ist und auch nicht in einer Helix lokalisiert zu sein scheint. Demnach kann die potentiell helixbrechende Funktion des identifizierten Aminosäureaustausches mit großer Sicherheit vernachlässigt werden (Adel et al., 2015).

5 Literaturverzeichnis

- ABEL, S., RIEDEL, S. & GELDERBLOM, W. C. 2014. Dietary PUFA and cancer. *Proc Nutr Soc*, 73, 361-7.
- ACOSTA, I. F., LAPARRA, H., ROMERO, S. P., SCHMELZ, E., HAMBERG, M., MOTTINGER, J. P., MORENO, M. A. & DELLAPORTA, S. L. 2009. tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science*, 323, 262-5.
- ADEL, S., HOFHEINZ, K., HEYDECK, D., KUHN, H. & HÄFNER, A. K. 2014. Phosphorylation mimicking mutations of ALOX5 orthologs of different vertebrates do not alter reaction specificities of the enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 1460-1466.
- ADEL, S., KAKULARAM, K. R., HORN, T., REDDANNA, P., KUHN, H. & HEYDECK, D. 2015. Leukotriene signaling in the extinct human subspecies *Homo denisovan* and *Homo neanderthalensis*. Structural and functional comparison with *Homo sapiens*. *Arch Biochem Biophys*, 565, 17-24.
- ADEL, S., KARST, F., GONZÁLEZ-LAFONT, À., PEKÁROVÁ, M., SAURA, P., MASGRAU, L., LLUCH, J. M., STEHLING, S., HORN, T., KUHN, H. & HEYDECK, D. 2016. Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4266-75.
- AHARONY, D., REDKAR-BROWN, D. G., HUBBS, S. J. & STEIN, R. L. 1987. Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Prostaglandins*, 33, 85-100.
- AHARONY, D. & STEIN, R. L. 1986. Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*, 261, 11512-9.
- ALEEM, A. M., JANKUN, J., DIGNAM, J. D., WALTHER, M., KÜHN, H., SVERGUN, D. I. & SKRZYPCZAK-JANKUN, E. 2008. Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure. *J Mol Biol*, 376, 193-209.
- AMLANI, S., NADARAJAH, T. & MCIVOR, R. A. 2011. Montelukast for the treatment of asthma in the adult population. *Expert Opin Pharmacother*, 12, 2119-28.
- ANDREOU, A. & FEUSSNER, I. 2009. Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70, 1504-10.
- ANDREOU, A. Z., VANKO, M., BEZAKOVA, L. & FEUSSNER, I. 2008. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. *Phytochemistry*, 69, 1832-7.
- BALCAREK, J. M., THEISEN, T. W., COOK, M. N., VARRICHIO, A., HWANG, S. M., STROHSACKER, M. W. & CROOKE, S. T. 1988. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*, 263, 13937-41.
- BARRAL, S., FERNÁNDEZ-CADENAS, I., BIS, J. C., MONTANER, J., IKRAM, A. M., LAUNER, L. J., FORNAGE, M., SCHMIDT, H., BRICKMAN, A. M., SESHADRI, S. & MAYEUX, R. 2012. No association of ALOX5AP polymorphisms with risk of MRI-defined brain infarcts. *Neurobiol Aging*, 33, 629.e1-3.
- BASAVARAJAPPA, D., WAN, M., LUKIC, A., STEINHILBER, D., SAMUELSSON, B. & RÅDMARK, O. 2014. Roles of coactosin-like protein (CLP) and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in cellular leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 11371-6.

- BAZAN, N. G. 2009. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S400-5.
- BAZAN, N. G., EADY, T. N., KHOUTOROVA, L., ATKINS, K. D., HONG, S., LU, Y., ZHANG, C., JUN, B., OBENAU, A., FREDMAN, G., ZHU, M., WINKLER, J. W., PETASIS, N. A., SERHAN, C. N. & BELAYEV, L. 2012. Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. *Exp Neurol*, 236, 122-30.
- BELKNER, J., WIESNER, R., KÜHN, H. & LANKIN, V. Z. 1991. The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett*, 279, 110-4.
- BERGER, M., SCHWARZ, K., THIELE, H., REIMANN, I., HUTH, A., BORNGRÄBER, S., KÜHN, H. & THIELE, B. J. 1998. Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J Mol Biol*, 278, 935-48.
- BEVAN, S., DICHGANS, M., WIECHMANN, H. E., GSCHWENDTNER, A., MEITINGER, T. & MARKUS, H. S. 2008. Genetic variation in members of the leukotriene biosynthesis pathway confer an increased risk of ischemic stroke: a replication study in two independent populations. *Stroke*, 39, 1109-14.
- BHATIA, B., MALDONADO, C. J., TANG, S., CHANDRA, D., KLEIN, R. D., CHOPRA, D., SHAPPELL, S. B., YANG, P., NEWMAN, R. A. & TANG, D. G. 2003. Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *J Biol Chem*, 278, 25091-100.
- BHATTACHARYA, S., MATHEW, G., JAYNE, D. G., PELENGARIS, S. & KHAN, M. 2009. 15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review. *Tumour Biol*, 30, 185-99.
- BISHAYEE, K. & KHUDA-BUKHSH, A. R. 2013. 5-lipoxygenase antagonist therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45, 709-19.
- BLEICH, D., CHEN, S., ZIPSER, B., SUN, D., FUNK, C. D. & NADLER, J. L. 1999. Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J Clin Invest*, 103, 1431-6.
- BORNGRÄBER, S., BROWNER, M., GILLMOR, S., GERTH, C., ANTON, M., FLETTERICK, R. & KÜHN, H. 1999. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem*, 274, 37345-50.
- BORNGRÄBER, S., KUBAN, R. J., ANTON, M. & KÜHN, H. 1996. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol*, 264, 1145-53.
- BOYINGTON, J. C., GAFFNEY, B. J. & AMZEL, L. M. 1993. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260, 1482-6.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRASH, A. R. 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem*, 274, 23679-82.
- BRASH, A. R., HUGHES, M. A., HAWKINS, D. J., BOEGLIN, W. E., SONG, W. C. & MEIJER, L. 1991. Allene oxide and aldehyde biosynthesis in starfish oocytes. *J Biol Chem*, 266, 22926-31.
- BRASH, A. R., YU, Z., BOEGLIN, W. E. & SCHNEIDER, C. 2007. The hepoxilin connection in the epidermis. *FEBS J*, 274, 3494-502.

- BRENNAN, E. P., NOLAN, K. A., BÖRGESON, E., GOUGH, O. S., MCEVOY, C. M., DOCHERTY, N. G., HIGGINS, D. F., MURPHY, M., SADLIER, D. M., ALI-SHAH, S. T., GUIRY, P. J., SAVAGE, D. A., MAXWELL, A. P., MARTIN, F., GODSON, C. & CONSORTIUM, G. 2013. Lipoxins attenuate renal fibrosis by inducing let-7c and suppressing TGF β R1. *J Am Soc Nephrol*, 24, 627-37.
- BRODHUN, F., CRISTOBAL-SARRAMIAN, A., ZABEL, S., NEWIE, J., HAMBERG, M. & FEUSSNER, I. 2013. An iron 13S-lipoxygenase with an α -linolenic acid specific hydroperoxidase activity from *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*, 8, e64919.
- BRYANT, R. W., BAILEY, J. M., SCHEWE, T. & RAPOPORT, S. M. 1982. Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *J Biol Chem*, 257, 6050-5.
- BUNDESÄRZTEKAMMER, BUNDESVEREINIGUNG, K. & FACHGESELLSCHAFTEN, A. D. W. M. 2009, zuletzt geändert: August 2013. *Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma, Kurzfassung* [Online]. Available: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-002k_S3_Asthma_2013-09.pdf [Accessed 20.09.2014].
- BUSQUETS, M., CARPENA, X., FITA, I., FUSTÉ, C., GARRETA, A. & MANRESA, Á. 2011. Crystallization of the lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, evolution and phylogenetic study of the subfamilies of the lipoxygenases. Transworld Research Network (Trivandrum, India).
- BÖRGESON, E., DOCHERTY, N. G., MURPHY, M., RODGERS, K., RYAN, A., O'SULLIVAN, T. P., GUIRY, P. J., GOLDSCHMEDING, R., HIGGINS, D. F. & GODSON, C. 2011. Lipoxin A₄ and benzo-lipoxin A₄ attenuate experimental renal fibrosis. *FASEB J*, 25, 2967-79.
- CAO, R. Y., ADAMS, M. A., HABENICHT, A. J. & FUNK, C. D. 2007. Angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm occurs independently of the 5-lipoxygenase pathway in apolipoprotein E-deficient mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 84, 34-42.
- CASU, A., PALA, V., MONACELLI, R., FERRO, M. & NANNI, G. 1968. Structure of membranes. I. Lipid composition of the erythrocyte membrane. *Ital J Biochem*, 17, 77-89.
- CAVALIER-SMITH, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73, 203-66.
- CAVALIER-SMITH, T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci*, 5, 174-82.
- CELENK, F., BAYRAMOGLU, I., YILMAZ, A., MENEVSE, A. & BAYAZIT, Y. 2013. Expression of cyclooxygenase-2, 12-lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase in head and neck squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg*, 24, 1114-7.
- CHAITIDIS, P., ADEL, S., ANTON, M., HEYDECK, D., KUHN, H. & HORN, T. 2013. Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms. *J Lipid Res*, 54, 1397-409.
- CHAKRABARTI, S. K., COLE, B. K., WEN, Y., KELLER, S. R. & NADLER, J. L. 2009. 12/15-lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 1657-63.
- CHAWENGSUB, Y., GAUTHIER, K. M. & CAMPBELL, W. B. 2009. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H495-507.

- CHEN, X. S., SHELLER, J. R., JOHNSON, E. N. & FUNK, C. D. 1994. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*, 372, 179-82.
- CHO, K., JANG, S., HUON, T., PARK, S. & HAN, O. 2007. Biochemical characterization of the dual positional specific maize lipoxygenase and the dependence of lagging and initial burst phenomenon on pH, substrate, and detergent during pre-steady state kinetics. *J Biochem Mol Biol*, 40, 100-6.
- CHOI, J., CHON, J. K., KIM, S. & SHIN, W. 2008. Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins*, 70, 1023-32.
- CIMEN, I., ASTARCI, E. & BANERJEE, S. 2011. 15-lipoxygenase-1 exerts its tumor suppressive role by inhibiting nuclear factor-kappa B via activation of PPAR gamma. *J Cell Biochem*, 112, 2490-501.
- COBANOĞLU, B., TOSKALA, E., URAL, A. & CINGI, C. 2013. Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13, 203-8.
- COCKBAIN, A. J., VOLPATO, M., RACE, A. D., MUNARINI, A., FAZIO, C., BELLUZZI, A., LOADMAN, P. M., TOOGOOD, G. J. & HULL, M. A. 2014. Anticolorectal cancer activity of the omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. *Gut*.
- COFFA, G. & BRASH, A. R. 2004. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15579-84.
- COFFA, G. & HILL, E. M. 2000. Discovery of an 11 (R)- and 12(S)-lipoxygenase activity in ovaries of the mussel *Mytilus edulis*. *Lipids*, 35, 1195-204.
- COLE, B. K., LIEB, D. C., DOBRIAN, A. D. & NADLER, J. L. 2013. 12- and 15-lipoxygenases in adipose tissue inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 104-105, 84-92.
- CUNNINGHAM, F., AMODE, M. R., BARRELL, D., BEAL, K., BILLIS, K., BRENT, S., CARVALHO-SILVA, D., CLAPHAM, P., COATES, G., FITZGERALD, S., GIL, L., GIRÓN, C. G., GORDON, L., HOURLIER, T., HUNT, S. E., JANACEK, S. H., JOHNSON, N., JUETTEMANN, T., KÄHÄRI, A. K., KEENAN, S., MARTIN, F. J., MAUREL, T., MCLAREN, W., MURPHY, D. N., NAG, R., OVERDUIN, B., PARKER, A., PATRICIO, M., PERRY, E., PIGNATELLI, M., RIAT, H. S., SHEPPARD, D., TAYLOR, K., THORMANN, A., VULLO, A., WILDER, S. P., ZADISSA, A., AKEN, B. L., BIRNEY, E., HARROW, J., KINSELLA, R., MUFFATO, M., RUFFIER, M., SEARLE, S. M., SPUDICH, G., TREVANION, S. J., YATES, A., ZERBINO, D. R. & FLICEK, P. 2015. *Ensembl* [Online]. Available: http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index [Accessed lately 03.03.2015].
- CYRUS, T., PRATICÒ, D., ZHAO, L., WITZTUM, J. L., RADER, D. J., ROKACH, J., FITZGERALD, G. A. & FUNK, C. D. 2001. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*, 103, 2277-82.
- CYRUS, T., WITZTUM, J. L., RADER, D. J., TANGIRALA, R., FAZIO, S., LINTON, M. F. & FUNK, C. D. 1999. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest*, 103, 1597-604.
- DAHLÉN, S. E., BJÖRK, J., HEDQVIST, P., ARFORS, K. E., HAMMARSTRÖM, S., LINDGREN, J. A. & SAMUELSSON, B. 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with

- relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 3887-91.
- DAHLÉN, S. E., HEDQVIST, P., HAMMARSTRÖM, S. & SAMUELSSON, B. 1980. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*, 288, 484-6.
- DAINESE, E., SABATUCCI, A., VAN ZADELHOFF, G., ANGELUCCI, C. B., VACHETTE, P., VELDINK, G. A., AGRÒ, A. F. & MACCARRONE, M. 2005. Structural stability of soybean lipoxygenase-1 in solution as probed by small angle X-ray scattering. *J Mol Biol*, 349, 143-52.
- DAURKIN, I., ERUSLANOV, E., STOFFS, T., PERRIN, G. Q., ALGOOD, C., GILBERT, S. M., ROSSER, C. J., SU, L. M., VIEWEG, J. & KUSMARTSEV, S. 2011. Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Res*, 71, 6400-9.
- DE MARZO, N., SLOANE, D. L., DICHARRY, S., HIGHLAND, E. & SIGAL, E. 1992. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am J Physiol*, 263, 1 p preceding L1.
- DECOSTANZO, A. J., VOLOSHYNA, I., ROSEN, Z. B., FEINMARK, S. J. & SIEGELBAUM, S. A. 2010. 12-Lipoxygenase regulates hippocampal long-term potentiation by modulating L-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci*, 30, 1822-31.
- DELONG, E. F. 1998. Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 649-54.
- DI VENERE, A., NICOLAI, E., IVANOV, I., DAINESE, E., ADEL, S., ANGELUCCI, B. C., KUHN, H., MACCARRONE, M. & MEI, G. 2013. Probing conformational changes in lipoxygenases upon membrane binding: Fine-tuning by the active site inhibitor ETYA. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 1-10.
- DIXON, R. A., DIEHL, R. E., OPAS, E., RANDS, E., VICKERS, P. J., EVANS, J. F., GILLARD, J. W. & MILLER, D. K. 1990. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, 343, 282-4.
- DOBRIAN, A. D., LIEB, D. C., COLE, B. K., TAYLOR-FISHWICK, D. A., CHAKRABARTI, S. K. & NADLER, J. L. 2011. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res*, 50, 115-31.
- DOMINGUES-MONTANARI, S., FERNÁNDEZ-CADENAS, I., DEL RIO-ESPINOLA, A., CORBETO, N., KRUG, T., MANSO, H., GOUVEIA, L., SOBRAL, J., MENDIORIZ, M., FERNÁNDEZ-MORALES, J., ALVAREZ-SABIN, J., RIBÓ, M., RUBIERA, M., OBACH, V., MARTÍ-FÀBREGAS, J., FREIJO, M., SERENA, J., FERRO, J. M., VICENTE, A. M., OLIVEIRA, S. A. & MONTANER, J. 2010. Association of a genetic variant in the ALOX5AP with higher risk of ischemic stroke: a case-control, meta-analysis and functional study. *Cerebrovasc Dis*, 29, 528-37.
- DUBOIS, R. N. 2003. Leukotriene A4 signaling, inflammation, and cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1028-9.
- EADEN, J. A., ABRAMS, K. R. & MAYBERRY, J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48, 526-35.
- ECKL, K. M., DE JUANES, S., KURTENBACH, J., NÄTEBUS, M., LUGASSY, J., OJI, V., TRAUPE, H., PREIL, M. L., MARTÍNEZ, F., SMOLLE, J., HAREL, A., KRIEG, P., SPRECHER, E. & HENNIES, H. C. 2009. Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. *J Invest Dermatol*, 129, 1421-8.

- EEK, P., JÄRVING, R., JÄRVING, I., GILBERT, N. C., NEWCOMER, M. E. & SAMEL, N. 2012. Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem*, 287, 22377-86.
- EINZIG, S., NOREN, G. R., STALEY, N. A., WHITE, J. G. & RAO, G. H. 1985. Arachidonic acid metabolism in thrombocytes and vascular tissues of turkeys. *Prostaglandins*, 30, 999-1017.
- EMERSON, M. R. & LEVINE, S. M. 2004. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Res*, 1021, 140-5.
- EPP, N., FÜRSTENBERGER, G., MÜLLER, K., DE JUANES, S., LEITGES, M., HAUSSER, I., THIEME, F., LIEBISCH, G., SCHMITZ, G. & KRIEG, P. 2007. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol*, 177, 173-82.
- FALGUEYRET, J. P., DENIS, D., MACDONALD, D., HUTCHINSON, J. H. & RIENDEAU, D. 1995. Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling and enzyme immobilization. *Biochemistry*, 34, 13603-11.
- FARONATO, M., MUZZONIGRO, G., MILANESE, G., MENNA, C., BONFIGLI, A. R., CATALANO, A. & PROCOPIO, A. 2007. Increased expression of 5-lipoxygenase is common in clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol*, 22, 1109-18.
- FEINMARK, S. J., BEGUM, R., TSVETKOV, E., GOUSSAKOV, I., FUNK, C. D., SIEGELBAUM, S. A. & BOLSHAKOV, V. Y. 2003. 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. *J Neurosci*, 23, 11427-35.
- FEUSSNER, I., KÜHN, H. & WASTERNAACK, C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci*, 6, 268-73.
- FEUSSNER, I. & WASTERNAACK, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275-97.
- FLYNN, M. A., QIAO, M., GARCIA, C., DALLAS, M. & BONEWALD, L. F. 1999. Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B₄. *Calcif Tissue Int*, 64, 154-9.
- FORMAN, H. J., URSINI, F. & MAIORINO, M. 2014. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 73, 2-9.
- FUNK, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-5.
- FUNK, C. D., CHEN, X. S., JOHNSON, E. N. & ZHAO, L. 2002. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 303-12.
- GAO, B., BOEGLIN, W. E. & BRASH, A. R. 2010. Omega-3 fatty acids are oxygenated at the n-7 carbon by the lipoxygenase domain of a fusion protein in the cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 58-63.
- GAO, X., PORTER, A. T. & HONN, K. V. 1997. Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, 407, 41-53.
- GARDNER, H. W. 1989. Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1001, 274-81.
- GARRETA, A., VAL-MORAES, S. P., GARCÍA-FERNÁNDEZ, Q., BUSQUETS, M., JUAN, C., OLIVER, A., ORTIZ, A., GAFFNEY, B. J., FITA, I., MANRESA, À. & CARPENA, X. 2013. Structure and interaction with phospholipids of a prokaryotic lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FASEB J*, 27, 4811-21.

- GARSCHA, U., JERNERÉN, F., CHUNG, D., KELLER, N. P., HAMBERG, M. & OLIW, E. H. 2007. Identification of dioxygenases required for *Aspergillus* development. Studies of products, stereochemistry, and the reaction mechanism. *J Biol Chem*, 282, 34707-18.
- GEORGE, J., AFEK, A., SHAISH, A., LEVKOVITZ, H., BLOOM, N., CYRUS, T., ZHAO, L., FUNK, C. D., SIGAL, E. & HARATS, D. 2001. 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*, 104, 1646-50.
- GERTOW, K., NOBILI, E., FOLKERSEN, L., NEWMAN, J. W., PEDERSEN, T. L., EKSTRAND, J., SWEDENBORG, J., KÜHN, H., WHEELOCK, C. E., HANSSON, G. K., HEDIN, U., HAEGGSTRÖM, J. Z. & GABRIELSEN, A. 2011. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis*, 215, 411-6.
- GERWICK, W. H. 1994. Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins. *Biochim Biophys Acta*, 1211, 243-55.
- GERWICK, W. H., ROBERTS, M. A., VULPANOVICI, A. & BALLANTINE, D. L. 1999. Biogenesis and biological function of marine algal oxylipins. *Adv Exp Med Biol*, 447, 211-8.
- GIBBONS, A. 2014a. Human evolution. Neandertals and moderns made imperfect mates. *Science*, 343, 471-2.
- GIBBONS, A. 2014b. Human evolution. Oldest *Homo sapiens* genome pinpoints Neandertal input. *Science*, 343, 1417.
- GILBERT, N. C., BARTLETT, S. G., WAIGHT, M. T., NEAU, D. B., BOEGLIN, W. E., BRASH, A. R. & NEWCOMER, M. E. 2011. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science*, 331, 217-9.
- GILBERT, N. C., RUI, Z., NEAU, D. B., WAIGHT, M. T., BARTLETT, S. G., BOEGLIN, W. E., BRASH, A. R. & NEWCOMER, M. E. 2012. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB J*, 26, 3222-9.
- GILLMOR, S. A., VILLASEÑOR, A., FLETTERICK, R., SIGAL, E. & BROWNER, M. F. 1997. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol*, 4, 1003-9.
- GOHARA, A., ELTAKI, N., SABRY, D., MURTAGH, D., JANKUN, J., SELMAN, S. H. & SKRZYPCZAK-JANKUN, E. 2012. Human 5-, 12- and 15-lipoxygenase-1 coexist in kidney but show opposite trends and their balance changes in cancer. *Oncol Rep*, 28, 1275-82.
- GREBNER, W., STINGL, N. E., OENEL, A., MUELLER, M. J. & BERGER, S. 2013. Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 161, 2159-70.
- GREEN, R. E., KRAUSE, J., BRIGGS, A. W., MARICIC, T., STENZEL, U., KIRCHER, M., PATTERSON, N., LI, H., ZHAI, W., FRITZ, M. H., HANSEN, N. F., DURAND, E. Y., MALASPINAS, A. S., JENSEN, J. D., MARQUES-BONET, T., ALKAN, C., PRÜFER, K., MEYER, M., BURBANO, H. A., GOOD, J. M., SCHULTZ, R., AXIMU-PETRI, A., BUTTHOF, A., HÖBER, B., HÖFFNER, B., SIEGEMUND, M., WEIHMANN, A., NUSBAUM, C., LANDER, E. S., RUSS, C., NOVOD, N., AFFOURTIT, J., EGHOLM, M., VERNA, C., RUDAN, P., BRAJKOVIC, D., KUCAN, Z., GUSIC, I., DORONICHEV, V. B., GOLOVANOVA, L. V., LALUEZA-FOX, C., DE LA RASILLA, M., FORTEA, J., ROSAS, A., SCHMITZ, R. W., JOHNSON, P. L., EICHLER, E. E., FALUSH, D., BIRNEY, E., MULLIKIN, J. C.,

- SLATKIN, M., NIELSEN, R., KELSO, J., LACHMANN, M., REICH, D. & PÄÄBO, S. 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328, 710-22.
- GREENBERG-LEVY, S. H., BUDOWSKI, P. & GROSSMAN, S. 1992. Lipoxygenase activity in the brain regions of young chicks: isolation and some properties. *Int J Biochem*, 24, 1607-14.
- GROSSMAN, S., BERGMAN, M. & SKLAN, D. 1988. Lipoxygenase in chicken muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 1268-1270.
- GUO, Y., ZHANG, W., GIROUX, C., CAI, Y., EKAMBARAM, P., DILLY, A. K., HSU, A., ZHOU, S., MADDIPATI, K. R., LIU, J., JOSHI, S., TUCKER, S. C., LEE, M. J. & HONN, K. V. 2011. Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem*, 286, 33832-40.
- GUPTA, R. S. 1998. Life's third domain (Archaea): an established fact or an endangered paradigm? *Theor Popul Biol*, 54, 91-104.
- HAAS, U., RASCHPERGER, E., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B., TRYGGVASON, K. & HAEGGSTRÖM, J. Z. 2011. Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 20479-84.
- HADA, T., HAGIYA, H., SUZUKI, H., ARAKAWA, T., NAKAMURA, M., MATSUDA, S., YOSHIMOTO, T., YAMAMOTO, S., AZEKAWA, T. & MORITA, Y. 1994. Arachidonate 12-lipoxygenase of rat pineal glands: catalytic properties and primary structure deduced from its cDNA. *Biochim Biophys Acta*, 1211, 221-8.
- HAEGGSTRÖM, J. Z. & FUNK, C. D. 2011. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*, 111, 5866-98.
- HALLENBORG, P., JØRGENSEN, C., PETERSEN, R. K., FEDDERSEN, S., ARAUJO, P., MARKT, P., LANGER, T., FURSTENBERGER, G., KRIEG, P., KOPPEN, A., KALKHOVEN, E., MADSEN, L. & KRISTIANSEN, K. 2010. Epidermis-type lipoxygenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *Mol Cell Biol*, 30, 4077-91.
- HAMBERG, M. 1986. Isolation and structures of lipoxygenase products from *Saprolegnia parasitica*. *Biochem Biophys Acta*, 876, 688-692.
- HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B. 1967. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J Biol Chem*, 242, 5329-35.
- HAMBERG, M., SU, C. & OLIW, E. 1998. Manganese lipoxygenase. Discovery of a bis-allylic hydroperoxide as product and intermediate in a lipoxygenase reaction. *J Biol Chem*, 273, 13080-8.
- HAMMEL, M. 2012. Validation of macromolecular flexibility in solution by small-angle X-ray scattering (SAXS). *Eur Biophys J*, 41, 789-99.
- HAMMEL, M., WALTHER, M., PRASSL, R. & KUHN, H. 2004. Structural flexibility of the N-terminal beta-barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle X-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding. *J Mol Biol*, 343, 917-29.
- HAMPSON, A. J., ROWLEY, A. F., BARROW, S. E. & STEADMAN, R. 1992. Biosynthesis of eicosanoids by blood cells of the crab, *Carcinus maenas*. *Biochim Biophys Acta*, 1124, 143-50.
- HANSEN, J., GARRETA, A., BENINCASA, M., FUSTÉ, M. C., BUSQUETS, M. & MANRESA, A. 2013. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 4737-47.

- HAWKINS, D. J. & BRASH, A. R. 1987. Eggs of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, contain a prominent (11R) and (12R) lipoxygenase activity. *J Biol Chem*, 262, 7629-34.
- HAYASHI, T., NISHIYAMA, K. & SHIRAHAMA, T. 2006. Inhibition of 5-lipoxygenase pathway suppresses the growth of bladder cancer cells. *Int J Urol*, 13, 1086-91.
- HAYNES, R. L. & VAN LEYEN, K. 2013. 12/15-lipoxygenase expression is increased in oligodendrocytes and microglia of periventricular leukomalacia. *Dev Neurosci*, 35, 140-54.
- HEADLAND, S. E. & NORLING, L. V. 2015. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*.
- HELGADOTTIR, A., MANOLESCU, A., THORLEIFSSON, G., GRETARSDOTTIR, S., JONSDOTTIR, H., THORSTEINSDOTTIR, U., SAMANI, N. J., GUDMUNDSSON, G., GRANT, S. F., THORGEIRSSON, G., SVEINBJORNSDOTTIR, S., VALDIMARSSON, E. M., MATTHIASSEN, S. E., JOHANNSSON, H., GUDMUNDSDOTTIR, O., GURNEY, M. E., SAINZ, J., THORHALLSDOTTIR, M., ANDRESDOTTIR, M., FRIGGE, M. L., TOPOL, E. J., KONG, A., GUDNASON, V., HAKONARSON, H., GULCHER, J. R. & STEFANSSON, K. 2004. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet*, 36, 233-9.
- HERSHKOVITZ, I., MARDER, O., AYALON, A., BAR-MATTHEWS, M., YASUR, G., BOARETTO, E., CARACUTA, V., ALEX, B., FRUMKIN, A., GODER-GOLDBERGER, M., GUNZ, P., HOLLOWAY, R. L., LATIMER, B., LAVI, R., MATTHEWS, A., SLON, V., MAYER, D. B., BERNA, F., BAR-OZ, G., YESHURUN, R., MAY, H., HANS, M. G., WEBER, G. W. & BARZILAI, O. 2015. Levantine cranium from Manot Cave (Israel) foreshadows the first European modern humans. *Nature*.
- HIRATA, K., KATAYAMA, K., NAKAJIMA, A., TAKADA, K., KAMISAKI, Y. & WADA, K. 2012. Role of leukotriene B₄ receptor signaling in human preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 429, 197-203.
- HOFHEINZ, K., KAKULARAM, K. R., ADEL, S., ANTON, M., POLYMARASETTY, A., REDDANNA, P., KUHN, H. & HORN, T. 2013. Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. *Arch Biochem Biophys*, 530, 40-7.
- HORN, T., ADEL, S., SCHUMANN, R., SUR, S., KAKULARAM, K. R., POLAMARASETTY, A., REDANNA, P., KUHN, H. & HEYDECK, D. 2015. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*, 57, 13-39.
- HOROWITZ BROWN, S., ZARNOWSKI, R., SHARPEE, W. C. & KELLER, N. P. 2008. Morphological transitions governed by density dependence and lipoxygenase activity in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5674-85.
- HOWE, K., CLARK, M. D., TORROJA, C. F., TORRANCE, J., BERTHELOT, C., MUFFATO, M., COLLINS, J. E., HUMPHRAY, S., MCLAREN, K., MATTHEWS, L., MCLAREN, S., SEALY, I., CACCAMO, M., CHURCHER, C., SCOTT, C., BARRETT, J. C., KOCH, R., RAUCH, G. J., WHITE, S., CHOW, W., KILIAN, B., QUINTAIS, L. T., GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A., ZHOU, Y., GU, Y., YEN, J., VOGEL, J. H., EYRE, T., REDMOND, S., BANERJEE, R., CHI, J., FU, B., LANGLEY, E., MAGUIRE, S. F., LAIRD, G. K., LLOYD, D., KENYON, E., DONALDSON, S., SEHRA, H., ALMEIDA-KING, J., LOVELAND, J., TREVANION, S., JONES, M., QUAIL, M., WILLEY, D., HUNT, A., BURTON, J., SIMS, S., MCLAY, K., PLUMB, B., DAVIS, J., CLEE, C., OLIVER, K., CLARK,

- R., RIDDLE, C., ELLIOT, D., ELIOTT, D., THREADGOLD, G., HARDEN, G., WARE, D., BEGUM, S., MORTIMORE, B., MORTIMER, B., KERRY, G., HEATH, P., PHILLIMORE, B., TRACEY, A., CORBY, N., DUNN, M., JOHNSON, C., WOOD, J., CLARK, S., PELAN, S., GRIFFITHS, G., SMITH, M., GLITHERO, R., HOWDEN, P., BARKER, N., LLOYD, C., STEVENS, C., HARLEY, J., HOLT, K., PANAGIOTIDIS, G., LOVELL, J., BEASLEY, H., HENDERSON, C., GORDON, D., AUGER, K., WRIGHT, D., COLLINS, J., RAISEN, C., DYER, L., LEUNG, K., ROBERTSON, L., AMBRIDGE, K., LEONGAMORNLETT, D., MCGUIRE, S., GILDERTHORP, R., GRIFFITHS, C., MANTHRAVADI, D., et al. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 498-503.
- HUANG, W. & ERIKSON, R. L. 1994. Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8960-3.
- HUI, Y., YANG, G., GALCZENSKI, H., FIGUEROA, D. J., AUSTIN, C. P., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. & FUNK, C. D. 2001. The murine cysteinyl leukotriene 2 (CysLT2) receptor. cDNA and genomic cloning, alternative splicing, and in vitro characterization. *J Biol Chem*, 276, 47489-95.
- HULTÉN, L. M., OLSON, F. J., ABERG, H., CARLSSON, J., KARLSTRÖM, L., BORÉN, J., FAGERBERG, B. & WIKLUND, O. 2010. 15-Lipoxygenase-2 is expressed in macrophages in human carotid plaques and regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Clin Invest*, 40, 11-7.
- HUO, Y., ZHAO, L., HYMAN, M. C., SHASHKIN, P., HARRY, B. L., BURCIN, T., FORLOW, S. B., STARK, M. A., SMITH, D. F., CLARKE, S., SRINIVASAN, S., HEDRICK, C. C., PRATICÒ, D., WITZTUM, J. L., NADLER, J. L., FUNK, C. D. & LEY, K. 2004. Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 110, 2024-31.
- HÄFNER, A. K., CERNESCU, M., HOFMANN, B., ERMISCH, M., HÖRNIG, M., METZNER, J., SCHNEIDER, G., BRUTSCHY, B. & STEINHILBER, D. 2011. Dimerization of human 5-lipoxygenase. *Biol Chem*, 392, 1097-111.
- HÄRTEL, B., LUDWIG, P., SCHEWE, T. & RAPOPORT, S. M. 1982. Self-inactivation by 13-hydroperoxylinoleic acid and lipohydroperoxidase activity of the reticulocyte lipoxygenase. *Eur J Biochem*, 126, 353-7.
- HÖRNSTEN, L., SU, C., OSBOURN, A. E., GAROSI, P., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C. & OLIW, E. H. 1999. Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. *J Biol Chem*, 274, 28219-24.
- ICHIKAWA, S., KOLLER, D. L., JOHNSON, M. L., LAI, D., XUEI, X., EDENBERG, H. J., KLEIN, R. F., ORWOLL, E. S., HUI, S. L., FOROUD, T. M., PEACOCK, M. & ECONS, M. J. 2006. Human ALOX12, but not ALOX15, is associated with BMD in white men and women. *J Bone Miner Res*, 21, 556-64.
- IHARA, A., WADA, K., YONEDA, M., FUJISAWA, N., TAKAHASHI, H. & NAKAJIMA, A. 2007. Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J Pharmacol Sci*, 103, 24-32.
- IVANOV, I., HEYDECK, D., HOFHEINZ, K., ROFFEIS, J., O'DONNELL, V. B., KUHN, H. & WALTHER, M. 2010. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys*, 503, 161-74.
- IVANOV, I., SHANG, W., TOLEDO, L., MASGRAU, L., SVERGUN, D. I., STEHLING, S., GÓMEZ, H., DI VENERE, A., MEI, G., LLUCH, J. M., SKRZYPCZAK-JANKUN, E., GONZÁLEZ-LAFONT, A. & KÜHN, H. 2012. Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes? *Proteins*, 80, 703-12.

- IYER, A., FAIRLIE, D. P., PRINS, J. B., HAMMOCK, B. D. & BROWN, L. 2010. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat Rev Endocrinol*, 6, 71-82.
- JANAKIRAM, N. B. & RAO, C. V. 2014. The role of inflammation in colon cancer. *Adv Exp Med Biol*, 816, 25-52.
- JANANI, C. & RANJITHA KUMARI, B. D. 2015. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr*, 9, 46-50.
- JANSEN, C., HOFHEINZ, K., VOGEL, R., ROFFEIS, J., ANTON, M., REDDANNA, P., KUHN, H. & WALTHER, M. 2011. Stereocontrol of Arachidonic Acid Oxygenation by Vertebrate Lipoxygenases: NEWLY CLONED ZEBRAFISH LIPOXYGENASE 1 DOES NOT FOLLOW THE ALA-VERSUS-GLY CONCEPT. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 37804-37812.
- JESS, T., SIMONSEN, J., JØRGENSEN, K. T., PEDERSEN, B. V., NIELSEN, N. M. & FRISCH, M. 2012. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*, 143, 375-81.e1; quiz e13-4.
- JIN, G., ARAI, K., MURATA, Y., WANG, S., STINS, M. F., LO, E. H. & VAN LEYEN, K. 2008. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke*, 39, 2538-43.
- JISAKA, M., KIM, R. B., BOEGLIN, W. E. & BRASH, A. R. 2000. Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem*, 275, 1287-93.
- JOHANNESSON, M., BACKMAN, L., CLAESSION, H. E. & FORSELL, P. K. 2010. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82, 121-9.
- JOHNSON, E. N., BRASS, L. F. & FUNK, C. D. 1998. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3100-5.
- JOHNSON, E. N., NANNEY, L. B., VIRMANI, J., LAWSON, J. A. & FUNK, C. D. 1999. Basal transepidermal water loss is increased in platelet-type 12-lipoxygenase deficient mice. *J Invest Dermatol*, 112, 861-5.
- KANG, L. T. & VANDERHOEK, J. Y. 1998. Mono (S) hydroxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin. *J Lipid Res*, 39, 1476-82.
- KAUR, G., JALAGADUGULA, G., MAO, G. & RAO, A. K. 2010. RUNX1/core binding factor A2 regulates platelet 12-lipoxygenase gene (ALOX12): studies in human RUNX1 haplodeficiency. *Blood*, 115, 3128-35.
- KAUSHAL, R., PAL, P., ALWELL, K., HAVERBUSCH, M., FLAHERTY, M., MOOMAW, C., SEKAR, P., KISSELA, B., KLEINDORFER, D., CHAKRABORTY, R., BRODERICK, J., DEKA, R. & WOO, D. 2007. Association of ALOX5AP with ischemic stroke: a population-based case-control study. *Hum Genet*, 121, 601-7.
- KELAVKAR, U. P., NIXON, J. B., COHEN, C., DILLEHAY, D., ELING, T. E. & BADR, K. F. 2001. Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 22, 1765-73.
- KHANNA, S., ROY, S., SLIVKA, A., CRAFT, T. K., CHAKI, S., RINK, C., NOTESTINE, M. A., DEVRIES, A. C., PARINANDI, N. L. & SEN, C. K. 2005. Neuroprotective properties of the natural vitamin E alpha-tocotrienol. *Stroke*, 36, 2258-64.
- KIERAN, N. E., MADERNA, P. & GODSON, C. 2004. Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. *Kidney Int*, 65, 1145-54.

- KIM, G. H., RYAN, J. J. & ARCHER, S. L. 2013. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*, 18, 1920-36.
- KITAGAWA, K., MATSUMOTO, M. & HORI, M. 2004. Cerebral ischemia in 5-lipoxygenase knockout mice. *Brain Res*, 1004, 198-202.
- KNAPP, M. J. & KLINMAN, J. P. 2003. Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, 42, 11466-75.
- KOBE, M. J., NEAU, D. B., MITCHELL, C. E., BARTLETT, S. G. & NEWCOMER, M. E. 2014. The structure of human 15-lipoxygenase-2 with a substrate mimic. *J Biol Chem*, 289, 8562-9.
- KOEDUKA, T., KAJIWARA, T. & MATSUI, K. 2007. Cloning of lipoxygenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, 54, 315-9.
- KOLJAK, R., BOUTAUD, O., SHIEH, B. H., SAMEL, N. & BRASH, A. R. 1997. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science*, 277, 1994-6.
- KONG, H., LANDHERR, L. L., FROHLICH, M. W., LEEBENS-MACK, J., MA, H. & DEPAMPHILIS, C. W. 2007. Patterns of gene duplication in the plant SKP1 gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. *Plant J*, 50, 873-85.
- KOSTULAS, K., GRETARSDOTTIR, S., KOSTULAS, V., MANOLESCU, A., HELGADOTTIR, A., THORLEIFSSON, G., GUDMUNDSSON, L. J., THORSTEINSDOTTIR, U., GULCHER, J. R., STEFANSSON, K. & HILLERT, J. 2007. PDE4D and ALOX5AP genetic variants and risk for Ischemic Cerebrovascular Disease in Sweden. *J Neurol Sci*, 263, 113-7.
- KRAUSE, J., ORLANDO, L., SERRE, D., VIOLA, B., PRÜFER, K., RICHARDS, M. P., HUBLIN, J. J., HÄNNI, C., DEREVIANKO, A. P. & PÄÄBO, S. 2007. Neanderthals in central Asia and Siberia. *Nature*, 449, 902-4.
- KRAUSE, M., UKKONEN, K., HAATAJA, T., RUOTTINEN, M., GLUMOFF, T., NEUBAUER, A., NEUBAUER, P. & VASALA, A. 2010. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microb Cell Fact*, 9, 11.
- KRIEG, P., ROSENBERGER, S., DE JUANES, S., LATZKO, S., HOU, J., DICK, A., KLOZ, U., VAN DER HOEVEN, F., HAUSSER, I., ESPOSITO, I., RAUH, M. & SCHNEIDER, H. 2013. Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J Invest Dermatol*, 133, 172-80.
- KRISKA, T., CEPURA, C., MAGIER, D., SIANGJONG, L., GAUTHIER, K. M. & CAMPBELL, W. B. 2012. Mice lacking macrophage 12/15-lipoxygenase are resistant to experimental hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H2428-38.
- KRZYZANKOVA, M., CHOVANOVA, S., CHLAPEK, P., RADSETOULAL, M., NERADIL, J., ZITTERBART, K., STERBA, J. & VESELSKA, R. 2014. LOX/COX inhibitors enhance the antineoplastic effects of all-trans retinoic acid in osteosarcoma cell lines. *Tumour Biol*.
- KRÖNKE, G., KATZENBEISSER, J., UDERHARDT, S., ZAISS, M. M., SCHOLTYSEK, C., SCHABBAUER, G., ZARBOCK, A., KOENDERS, M. I., AXMANN, R., ZWERINA, J., BAENCKLER, H. W., VAN DEN BERG, W., VOLL, R. E., KÜHN, H., JOOSTEN, L. A. & SCHETT, G. 2009a. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*, 183, 3383-9.

- KRÖNKE, G., UDERHARDT, S., KATZENBEISSER, J. & SCHETT, G. 2009b. The 12/15-lipoxygenase pathway promotes osteoclast development and differentiation. *Autoimmunity*, 42, 383-5.
- KUHN, H., BANTHIYA, S. & VAN LEYEN, K. 2014. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta*, submitted.
- KUHN, H., BANTHIYA, S. & VAN LEYEN, K. 2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 308-330.
- KUHN, H., BELKNER, J., WIESNER, R. & BRASH, A. R. 1990. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem*, 265, 18351-61.
- KUHN, H., CHAITIDIS, P., ROFFEIS, J. & WALTHER, M. 2007. Arachidonic Acid metabolites in the cardiovascular system: the role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis with particular emphasis on vascular remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50, 609-20.
- KÜHN, H. 1996. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog Lipid Res*, 35, 203-26.
- KÜHN, H., BARNETT, J., GRUNBERGER, D., BAECKER, P., CHOW, J., NGUYEN, B., BURSZTYN-PETTEGREW, H., CHAN, H. & SIGAL, E. 1993. Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 1169, 80-9.
- KÜHN, H., HOLZHÜTTER, H. G., SCHEWE, T., HIEBSCH, C. & RAPOPORT, S. M. 1984. The mechanism of inactivation of lipoxygenases by acetylenic fatty acids. *Eur J Biochem*, 139, 577-83.
- KÜHN, H., RÖMISCH, I. & BELKNER, J. 2005. The role of lipoxygenase-isoforms in atherogenesis. *Mol Nutr Food Res*, 49, 1014-29.
- KÜHN, H., SPRECHER, H. & BRASH, A. R. 1990. On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme. *J Biol Chem*, 265, 16300-5.
- KÜHN, H., WIESNER, R., ALDER, L., FITZSIMMONS, B. J., ROKACH, J. & BRASH, A. R. 1987. Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase via sequential oxygenation of the substrate. *Eur J Biochem*, 169, 593-601.
- KÜHN, H., WIESNER, R., ALDER, L., SCHEWE, T. & STENDER, H. 1986. Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett*, 208, 248-52.
- KÜHN, H., WIESNER, R., RATHMANN, J. & SCHEWE, T. 1991. Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids*, 4, 9-14.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEAF, A. 2008. Historical overview of n-3 fatty acids and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*, 87, 1978S-80S.
- LEBEAU, A., ESCLAIRE, F., ROSTÈNE, W. & PÉLAPRAT, D. 2001. Baicalein protects cortical neurons from beta-amyloid (25-35) induced toxicity. *Neuroreport*, 12, 2199-202.
- LEBEAU, A., TERRO, F., ROSTENE, W. & PELAPRAT, D. 2004. Blockade of 12-lipoxygenase expression protects cortical neurons from apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Cell Death Differ*, 11, 875-84.
- LEONARD, M. O., HANNAN, K., BURNE, M. J., LAPPIN, D. W., DORAN, P., COLEMAN, P., STENSON, C., TAYLOR, C. T., DANIELS, F., GODSON, C., PETASIS, N. A., RABB, H. & BRADY, H. R. 2002. 15-Epi-16-(para-

- fluorophenoxy)-lipoxin A(4)-methyl ester, a synthetic analogue of 15-epi-lipoxin A(4), is protective in experimental ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 13, 1657-62.
- LI, D.-C., LUI, Z.-W. & LU, J. 2001. Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol Res*, 105, 190-194.
- LI, Y. C., WANG, D. X., LI, C. S., YE, Z. P., WU, Z. M. & CHEN, J. H. 2013. [Association of 5-lipoxygenase expression and clinicopathological factors in colorectal carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 16, 895-7.
- LIU, M. & YOKOMIZO, T. 2015. The role of leukotrienes in allergic diseases. *Allergol Int*, 64, 17-26.
- LIU, X. H., CONNOLLY, J. M. & ROSE, D. P. 1996. The 12-lipoxygenase gene-transfected MCF-7 human breast cancer cell line exhibits estrogen-independent, but estrogen and omega-6 fatty acid-stimulated proliferation in vitro, and enhanced growth in athymic nude mice. *Cancer Lett*, 109, 223-30.
- LOHSE, K. & FRANTZ, L. A. 2014. Neandertal admixture in Eurasia confirmed by maximum-likelihood analysis of three genomes. *Genetics*, 196, 1241-51.
- LOVEGROVE, C., AHMED, K., CHALLACOMBE, B., KHAN, M. S., POPERT, R. & DASGUPTA, P. 2015. Systematic review of prostate cancer risk and association with consumption of fish and fish-oils: analysis of 495,321 participants. *Int J Clin Pract*, 69, 87-105.
- LOY, J. 1997. Charles Darwin as primatologist: a literature guide. *Am J Primatol*, 42, 53-60.
- LU, X., ZHANG, J., LIU, S., ZHANG, D., XU, Z., WU, J., LI, J., DU, G. & CHEN, J. 2013. Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 5793-800.
- LUDWIG, P., HOLZHÜTTER, H. G., COLOSIMO, A., SILVESTRINI, M. C., SCHEWE, T. & RAPOPORT, S. M. 1987. A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur J Biochem*, 168, 325-37.
- LUKIW, W. J., CUI, J. G., MARCHESELLI, V. L., BODKER, M., BOTKJAER, A., GOTLINGER, K., SERHAN, C. N. & BAZAN, N. G. 2005. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 115, 2774-83.
- LÖHELAID, H., JÄRVING, R., VALMSEN, K., VARVAS, K., KREEN, M., JÄRVING, I. & SAMEL, N. 2008. Identification of a functional allene oxide synthase-lipoxygenase fusion protein in the soft coral *Gersemia fruticosa* suggests the generality of this pathway in octocorals. *Biochim Biophys Acta*, 1780, 315-21.
- MADSEN, L., PETERSEN, R. K., SØRENSEN, M. B., JØRGENSEN, C., HALLENBORG, P., PRIDAL, L., FLECKNER, J., AMRI, E. Z., KRIEG, P., FURSTENBERGER, G., BERGE, R. K. & KRISTIANSEN, K. 2003. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J*, 375, 539-49.
- MAGI, S., TAKEMOTO, Y., KOBAYASHI, H., KASAMATSU, M., AKITA, T., TANAKA, A., TAKANO, K., TASHIRO, E., IGARASHI, Y. & IMOTO, M. 2014. 5-Lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1 regulate epidermal growth factor-induced cell migration through Tiam1 upregulation and Rac1 activation. *Cancer Sci*, 105, 290-6.

- MANCINI, A. D. & DI BATTISTA, J. A. 2011. The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammotaxis. *Inflamm Res*, 60, 1083-92.
- MANGINO, M. J., BROUNTS, L., HARMS, B. & HEISE, C. 2006. Lipoxin biosynthesis in inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 79, 84-92.
- MARKOUTSA, S., SÜRÜN, D., KARAS, M., HOFMANN, B., STEINHILBER, D. & SORG, B. L. 2014. Analysis of 5-lipoxygenase phosphorylation on molecular level by MALDI-MS. *FEBS J*, 281, 1931-47.
- MARTIN, V., SAWYER, N., STOCCO, R., UNETT, D., LERNER, M. R., ABRAMOVITZ, M. & FUNK, C. D. 2001. Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors. *Biochem Pharmacol*, 62, 1193-200.
- MATSUSE, H. & KOHNO, S. 2014. Leukotriene receptor antagonists pranlukast and montelukast for treating asthma. *Expert Opin Pharmacother*, 15, 353-63.
- MATSUYAMA, M. & YOSHIMURA, R. 2008. The target of arachidonic acid pathway is a new anticancer strategy for human prostate cancer. *Biologics*, 2, 725-32.
- MCDUFFIE, M., MAYBEE, N. A., KELLER, S. R., STEVENS, B. K., GARMEY, J. C., MORRIS, M. A., KROPF, E., RIVAL, C., MA, K., CARTER, J. D., TERSEY, S. A., NUNEMAKER, C. S. & NADLER, J. L. 2008. Nonobese diabetic (NOD) mice congenic for a targeted deletion of 12/15-lipoxygenase are protected from autoimmune diabetes. *Diabetes*, 57, 199-208.
- MEI, G., DI VENERE, A., NICOLAI, E., ANGELUCCI, C. B., IVANOV, I., SABATUCCI, A., DAINESE, E., KUHN, H. & MACCARRONE, M. 2008. Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability. *Biochemistry*, 47, 9234-42.
- MELSTROM, L. G., BENTREM, D. J., SALABAT, M. R., KENNEDY, T. J., DING, X. Z., STROUCH, M., RAO, S. M., WITT, R. C., TERNENT, C. A., TALAMONTI, M. S., BELL, R. H. & ADRIAN, T. A. 2008. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res*, 14, 6525-30.
- MENG, Z., CAO, R., YANG, Z., LIU, T., WANG, Y. & WANG, X. 2013. Inhibitor of 5-lipoxygenase, zileuton, suppresses prostate cancer metastasis by upregulating E-cadherin and paxillin. *Urology*, 82, 1452.e7-14.
- MENGER, B., VOGT, P. M., ALLMELING, C., RADTKE, C., KUHBIER, J. W. & REIMERS, K. 2011. AmbLOXe--an epidermal lipoxygenase of the Mexican axolotl in the context of amphibian regeneration and its impact on human wound closure in vitro. *Ann Surg*, 253, 410-8.
- MERCHED, A. J., KO, K., GOTLINGER, K. H., SERHAN, C. N. & CHAN, L. 2008. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J*, 22, 3595-606.
- MICHALIK, L., DESVERGNE, B. & WAHLI, W. 2004. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, 4, 61-70.
- MIKULE, K., GATLIN, J. C., DE LA HOUSSAYE, B. A. & PFENNINGER, K. H. 2002. Growth cone collapse induced by semaphorin 3A requires 12/15-lipoxygenase. *J Neurosci*, 22, 4932-41.
- MINOR, W., STECZKO, J., STEC, B., OTWINOWSKI, Z., BOLIN, J. T., WALTER, R. & AXELROD, B. 1996. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, 35, 10687-701.

- MOIN, S. T., HOFER, T. S., SATTAR, R. & UL-HAQ, Z. 2011. Molecular dynamics simulation of mammalian 15S-lipoxygenase with AMBER force field. *Eur Biophys J*, 40, 715-26.
- MORGAN, E. L., MASKREY, B. H. & ROWLEY, A. F. 2005. At what stage in metazoan evolution did leukotriene generation first appear?--key insights from cartilaginous fish. *Dev Comp Immunol*, 29, 53-9.
- MUNGER, K. A., MONTERO, A., FUKUNAGA, M., UDA, S., YURA, T., IMAI, E., KANEDA, Y., VALDIVIELSO, J. M. & BADR, K. F. 1999. Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13375-80.
- NCBI. *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> [Accessed].
- NGUYEN, G. C. & BRESSLER, B. 2012. A tale of two cohorts: are we overestimating the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease? *Gastroenterology*, 143, 288-90.
- NGUYEN-HIEU, T., KHELAIPIA, S., ABOUDHARAM, G. & DRANCOURT, M. 2013. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. *APMIS*, 121, 467-77.
- NIE, D., HILLMAN, G. G., GEDDES, T., TANG, K., PIERSON, C., GRIGNON, D. J. & HONN, K. V. 1998. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*, 58, 4047-51.
- NISHIYAMA, M., OKAMOTO, H., WATANABE, T., HORI, T., HADA, T., UEDA, N., YAMAMOTO, S., TSUKAMOTO, H., WATANABE, K. & KIRINO, T. 1992. Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in canine brain tissues. *J Neurochem*, 58, 1395-400.
- NORMANDIN, M., GAGNÉ, J., BERNARD, J., ELIE, R., MICELI, D., BAUDRY, M. & MASSICOTTE, G. 1996. Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Res*, 730, 40-6.
- NOWAK, J., WEYLANDT, K. H., HABEL, P., WANG, J., DIGNASS, A., GLICKMAN, J. N. & KANG, J. X. 2007. Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*, 28, 1991-5.
- OCHS, M. J., SORG, B. L., PUFAHL, L., GREZ, M., SUESS, B. & STEINHILBER, D. 2012. Post-transcriptional regulation of 5-lipoxygenase mRNA expression via alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS One*, 7, e31363.
- OLDHAM, M. L., BRASH, A. R. & NEWCOMER, M. E. 2005. The structure of coral allene oxide synthase reveals a catalase adapted for metabolism of a fatty acid hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 297-302.
- ORTIZ, M. E., BÜHLER, M. I. & ZELARAYÁN, L. I. 2013. Involvement of PLA2, COX and LOX in *Rhinella arenarum* oocyte maturation. *Zygote*, 1-6.
- OSKOLKOVA, O. V., AFONYUSHKIN, T., PREINERSTORFER, B., BICKER, W., VON SCHLIEFFEN, E., HAINZL, E., DEMYANETS, S., SCHABBAUER, G., LINDNER, W., TSELEPIS, A. D., WOJTA, J., BINDER, B. R. & BOCHKOV, V. N. 2010. Oxidized phospholipids are more potent antagonists of lipopolysaccharide than inducers of inflammation. *J Immunol*, 185, 7706-12.
- PACE-ASCIAK, C. R. 2009. The hepoxilins and some analogues: a review of their biology. *Br J Pharmacol*, 158, 972-81.
- PALMBLAD, J., MALMSTEN, C. L., UDÉN, A. M., RÅDMARK, O., ENGSTEDT, L. & SAMUELSSON, B. 1981. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*, 58, 658-61.

- PEATFIELD, A. C., PIPER, P. J. & RICHARDSON, P. S. 1982. The effect of leukotriene C4 on mucin release into the cat trachea in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*, 77, 391-3.
- PEKCEC, A., YIGITKANLI, K., JUNG, J. E., PALLAST, S., XING, C., ANTIPENKO, A., MINCHENKO, M., NIKOLOV, D. B., HOLMAN, T. R., LO, E. H. & VAN LEYEN, K. 2013. Following experimental stroke, the recovering brain is vulnerable to lipoxygenase-dependent semaphorin signaling. *FASEB J*, 27, 437-45.
- PETTITT, T. R., ROWLEY, A. F., BARROW, S. E., MALLET, A. I. & SECOMBES, C. J. 1991. Synthesis of lipoxins and other lipoxygenase products by macrophages from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Biol Chem*, 266, 8720-6.
- PFISTER, S. L., SPITZBARTH, N., NITHIPATIKOM, K., EDGEMOND, W. S., FALCK, J. R. & CAMPBELL, W. B. 1998. Identification of the 11,14,15- and 11,12, 15-trihydroxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived relaxing factors of rabbit aorta. *J Biol Chem*, 273, 30879-87.
- PIOMELLI, D., SHAPIRO, E., FEINMARK, S. J. & SCHWARTZ, J. H. 1987. Metabolites of arachidonic acid in the nervous system of *Aplysia*: possible mediators of synaptic modulation. *J Neurosci*, 7, 3675-86.
- POECKEL, D., ZEMSKI BERRY, K. A., MURPHY, R. C. & FUNK, C. D. 2009. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Biol Chem*, 284, 21077-89.
- PORTA, H. & ROCHA-SOSA, M. 2001. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology*, 147, 3199-200.
- PRAKASH, T. R., SWAMY, P. M., SUGUNA, P. & REDDANNA, P. 1990. Characterization and behaviour of 15-lipoxygenase during peanut cotyledonary senescence. *Biochem Biophys Res Commun*, 172, 462-70.
- PRATICÒ, D., ZHUKAREVA, V., YAO, Y., URYU, K., FUNK, C. D., LAWSON, J. A., TROJANOWSKI, J. Q. & LEE, V. M. 2004. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *Am J Pathol*, 164, 1655-62.
- PRIGGE, S. T., GAFFNEY, B. J. & AMZEL, L. M. 1998. Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases. *Nat Struct Biol*, 5, 178-9.
- PRÜFER, K., RACIMO, F., PATTERSON, N., JAY, F., SANKARARAMAN, S., SAWYER, S., HEINZE, A., RENAUD, G., SUDMANT, P. H., DE FILIPPO, C., LI, H., MALLICK, S., DANNEMANN, M., FU, Q., KIRCHER, M., KUHLWILM, M., LACHMANN, M., MEYER, M., ONGYERTH, M., SIEBAUER, M., THEUNERT, C., TANDON, A., MOORJANI, P., PICKRELL, J., MULLIKIN, J. C., VOHR, S. H., GREEN, R. E., HELLMANN, I., JOHNSON, P. L., BLANCHE, H., CANN, H., KITZMAN, J. O., SHENDURE, J., EICHLER, E. E., LEIN, E. S., BAKKEN, T. E., GOLOVANOVA, L. V., DORONICHEV, V. B., SHUNKOV, M. V., DEREVIANKO, A. P., VIOLA, B., SLATKIN, M., REICH, D., KELSO, J. & PÄÄBO, S. 2014. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*, 505, 43-9.
- PUTNAM, N. H., BUTTS, T., FERRIER, D. E., FURLONG, R. F., HELLSTEN, U., KAWASHIMA, T., ROBINSON-RECHAVI, M., SHOGUCHI, E., TERRY, A., YU, J. K., BENITO-GUTIÉRREZ, E. L., DUBCHAK, I., GARCIA-FERNÁNDEZ, J., GIBSON-BROWN, J. J., GRIGORIEV, I. V., HORTON, A. C., DE JONG, P. J., JURKA, J., KAPITONOV, V. V., KOHARA, Y., KUROKI, Y., LINDQUIST, E., LUCAS, S., OSOEGAWA, K., PENNACCHIO, L. A., SALAMOV, A. A., SATOU, Y., SAUKA-SPENGLER, T., SCHMUTZ, J., SHIN-I, T., TOYODA, A.,

- BRONNER-FRASER, M., FUJIYAMA, A., HOLLAND, L. Z., HOLLAND, P. W., SATOH, N. & ROKHSAR, D. S. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453, 1064-71.
- PUUSTINEN, T., SCHEFFER, M. M. & SAMUELSSON, B. 1988. Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 960, 261-7.
- PÉREZ-GILABERT, M., SÁNCHEZ-FELIPE, I. & GARCÍA-CARMONA, F. 2005. Purification and partial characterization of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin) ascocarps. *J Agric Food Chem*, 53, 3666-71.
- RAKONJAC, M., FISCHER, L., PROVOST, P., WERZ, O., STEINHILBER, D., SAMUELSSON, B. & RÅDMARK, O. 2006. Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A₄ production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13150-5.
- RAO, J. S., RAPOPORT, S. I. & KIM, H. W. 2011. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. *Transl Psychiatry*, 1, e31.
- RAPOPORT, S., HÄRTEL, B., SCHEWE, T. & KÜHN, H. 1986. Hydroperoxyfatty acids inactivate the reticulocyte lipoxygenase independently of a hydroperoxidase reaction. *FEBS Lett*, 202, 202-6.
- REICH, D., GREEN, R. E., KIRCHER, M., KRAUSE, J., PATTERSON, N., DURAND, E. Y., VIOLA, B., BRIGGS, A. W., STENZEL, U., JOHNSON, P. L., MARICIC, T., GOOD, J. M., MARQUES-BONET, T., ALKAN, C., FU, Q., MALLICK, S., LI, H., MEYER, M., EICHLER, E. E., STONEKING, M., RICHARDS, M., TALAMO, S., SHUNKOV, M. V., DEREVIANKO, A. P., HUBLIN, J. J., KELSO, J., SLATKIN, M. & PÄÄBO, S. 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468, 1053-60.
- RODRÍGUEZ-PAZOS, L., GINARTE, M., VEGA, A. & TORIBIO, J. 2013. Autosomal recessive congenital ichthyosis. *Actas Dermosifiliogr*, 104, 270-84.
- ROMANO, M. 2010. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal*, 10, 1048-64.
- ROMANO, M., CATALANO, A., NUTINI, M., D'URBANO, E., CRESCENZI, C., CLARIA, J., LIBNER, R., DAVI, G. & PROCOPIO, A. 2001. 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J*, 15, 2326-36.
- ROMANO, M., CIANCI, E., SIMIELE, F. & RECCHIUTI, A. 2015. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. *Eur J Pharmacol*, 760, 49-63.
- ROSSAINT, J., NADLER, J. L., LEY, K. & ZARBOCK, A. 2012. Eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase reduces neutrophil recruitment in mouse models of acute lung injury. *Crit Care*, 16, R166.
- ROSSI, A., PERGOLA, C., KOEBERLE, A., HOFFMANN, M., DEHM, F., BRAMANTI, P., CUZZOCREA, S., WERZ, O. & SAUTEBIN, L. 2010. The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. *Br J Pharmacol*, 161, 555-70.
- RÅDMARK, O., WERZ, O., STEINHILBER, D. & SAMUELSSON, B. 2015. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 331-339.
- SACHS-OLSEN, C., SANAK, M., LANG, A. M., GIELICZ, A., MOWINCKEL, P., LØDRUP CARLSEN, K. C., CARLSEN, K. H. & SZCZEKLIK, A. 2010. Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 126, 859-867.e9.

- SAVARI, S., VINNAKOTA, K., ZHANG, Y. & SJÖLANDER, A. 2014. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20, 968-77.
- SCARPARI, M., PUNELLI, M., SCALA, V., ZACCARIA, M., NOBILI, C., LUDOVICI, M., CAMERA, E., FABBRI, A. A., REVERBERI, M. & FANELLI, C. 2014. Lipids in *Aspergillus flavus*-maize interaction. *Front Microbiol*, 5, 74.
- SCHEWE, T., HALANGK, W., HIEBSCH, C. & RAPOPORT, S. M. 1975. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett*, 60, 149-52.
- SCHEWE, T. & KÜHN, H. 1991. Do 15-lipoxygenases have a common biological role? *Trends Biochem Sci*, 16, 369-73.
- SCHEWE, T., RAPOPORT, S. M. & KÜHN, H. 1986. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 58, 191-272.
- SCHNEIDER, C., PRATT, D. A., PORTER, N. A. & BRASH, A. R. 2007. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol*, 14, 473-88.
- SCHNUR, N., SEUTER, S., KATRYNIOK, C., RÅDMARK, O. & STEINHILBER, D. 2007. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. *Biochim Biophys Acta*, 1771, 1271-82.
- SCHWARZ, K., WALTHER, M., ANTON, M., GERTH, C., FEUSSNER, I. & KUHN, H. 2001. 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*, 276, 773-9.
- SEILACHER, A. 1997. Great revolutions in the history of life. *J Nat Hist Mus Inst Chiba*, 4, 87-91.
- SENGER, T., WICHARD, T., KUNZE, S., GÖBEL, C., LERCHL, J., POHNERT, G. & FEUSSNER, I. 2005. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem*, 280, 7588-96.
- SERHAN, C. N. 2005. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73, 141-62.
- SERHAN, C. N. & PETASIS, N. A. 2011. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*, 111, 5922-43.
- SHAPPELL, S. B., BOEGLIN, W. E., OLSON, S. J., KASPER, S. & BRASH, A. R. 1999. 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 155, 235-45.
- SHEN, J., HERDERICK, E., CORNHILL, J. F., ZSIGMOND, E., KIM, H. S., KÜHN, H., GUEVARA, N. V. & CHAN, L. 1996. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *J Clin Invest*, 98, 2201-8.
- SHEN, J., TIEMAN, D., JONES, J. B., TAYLOR, M. G., SCHMELZ, E., HUFFAKER, A., BIES, D., CHEN, K. & KLEE, H. J. 2014. A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *J Exp Bot*, 65, 419-28.
- SHEN, K. & HERMAN, C. A. 2000. Partial purification and characterization of 12-lipoxygenase in bullfrog erythrocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 127, 563-73.

- SHOSHANI, J., GROVES, C. P., SIMONS, E. L. & GUNNELL, G. F. 1996. Primate phylogeny: morphological vs. molecular results. *Mol Phylogenet Evol*, 5, 102-54.
- SHUREIQI, I., JIANG, W., ZUO, X., WU, Y., STIMMEL, J. B., LEESNITZER, L. M., MORRIS, J. S., FAN, H. Z., FISCHER, S. M. & LIPPMAN, S. M. 2003. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9968-73.
- SINGH, R. K., TANDON, R., DASTIDAR, S. G. & RAY, A. 2013. A review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma. *J Asthma*, 50, 922-31.
- SKRZYPCZAK-JANKUN, E., BORBULEVYCH, O. Y. & JANKUN, J. 2004. Soybean lipoxygenase-3 in complex with 4-nitrocatechol. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 613-5.
- SLOANE, D. L., CRAIK, C. S. & SIGAL, E. 1990. The expression of active human reticulocyte 15-lipoxygenase in bacteria. *Biomed Biochim Acta*, 49, S11-6.
- SLOANE, D. L., LEUNG, R., BARNETT, J., CRAIK, C. S. & SIGAL, E. 1995. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Eng*, 8, 275-82.
- SLOANE, D. L., LEUNG, R., CRAIK, C. S. & SIGAL, E. 1991. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature*, 354, 149-52.
- SU, C. & OLIW, E. H. 1998. Manganese lipoxygenase. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 273, 13072-9.
- SUN, D. & FUNK, C. D. 1996. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 271, 24055-62.
- SUN, D., MCDONNELL, M., CHEN, X. S., LAKKIS, M. M., LI, H., ISAACS, S. N., ELSEA, S. H., PATEL, P. I. & FUNK, C. D. 1998. Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *J Biol Chem*, 273, 33540-7.
- SUZUKI, H., MIYAUCHI, D. & YAMAMOTO, S. 1997. A selective inhibitor of arachidonate 5-lipoxygenase scavenging peroxide activator. *Biochem Pharmacol*, 54, 529-32.
- TANG, D. G., BHATIA, B., TANG, S. & SCHNEIDER-BROUSSARD, R. 2007. 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 82, 135-46.
- TREBUS, F., HEYDECK, D., SCHIMKE, I., GERTH, C. & KÜHN, H. 2002. Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67, 419-28.
- TRESAUGUES, L., MOCHE, M., ARROWSMITH, C., BERGLUND, H., BUSAM, R., COLLINS, R., DAHLGREN, L., EDWARDS, A., FLODIN, S., FLORES, A., GRASLUND, S., HAMMARSTROM, M., HERMAN, M., JOHANSSON, A., JOHANSSON, I., KALLAS, A., KARLBERG, T., KOTENYOVA, T., LEHTIO, L., NILSSON, M., NYMAN, T., OLESEN, K., PERSSON, C., SAGEMARK, J., SCHUELER, H., SVENSSON, L., THORSELL, A., VAN DEN BERG, S., WELIN, M., WEIGELT, J., WIKSTROM, M. & NORDLUND, P. unpublished. Crystal structure of the lipoxygenase domain of human Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type.

- URANO, T., SHIRAKI, M., FUJITA, M., HOSOI, T., ORIMO, H., OUCHI, Y. & INOUE, S. 2005. Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxygenase ALOX15 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, 23, 226-30.
- VAN DYK, M. S., KOCK, J. L. & BOTHA, A. 1994. Hydroxy long-chain fatty acids in fungi. *World J Microbiol Biotechnol*, 10, 495-504.
- VAN LEYEN, K. 1998. Pictures in cell biology. Un-LOXing the door to organelle degradation. *Trends Cell Biol*, 8, 436.
- VAN LEYEN, K. 2013. Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12, 191-9.
- VAN LEYEN, K., KIM, H. Y., LEE, S. R., JIN, G., ARAI, K. & LO, E. H. 2006. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*, 37, 3014-8.
- VAN OS, C. P., RIJKE-SCHILDER, G. P., VAN HALBEEK, H., VERHAGEN, J. & VLIAGENTHART, J. F. 1981. Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps. *Biochim Biophys Acta*, 663, 177-93.
- VANCE, R. E., HONG, S., GRONERT, K., SERHAN, C. N. & MEKALANOS, J. J. 2004. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2135-9.
- VELLOSILLO, T., MARTÍNEZ, M., LÓPEZ, M. A., VICENTE, J., CASCÓN, T., DOLAN, L., HAMBERG, M. & CASTRESANA, C. 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19, 831-46.
- VOGEL, R., JANSEN, C., ROFFEIS, J., REDDANNA, P., FORSELL, P., CLAESSION, H. E., KUHN, H. & WALTHER, M. 2010. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem*, 285, 5369-76.
- WALTHER, M., HOFHEINZ, K., VOGEL, R., ROFFEIS, J. & KÜHN, H. 2011. The N-terminal β -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516, 1-9.
- WALTHER, M., ROFFEIS, J., JANSEN, C., ANTON, M., IVANOV, I. & KUHN, H. 2009. Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms. *Biochim Biophys Acta*, 1791, 827-35.
- WALTHER, M., WIESNER, R. & KUHN, H. 2004. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. *J Biol Chem*, 279, 3717-25.
- WANG, G., LIU, R. & ZHANG, J. 2014a. The arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene SG13S114 polymorphism and ischemic stroke in Chinese population: a meta-analysis. *Gene*, 533, 461-8.
- WANG, X., LU, F., ZHANG, C., LU, Y., BIE, X., REN, D. & LU, Z. 2014b. Peroxidation radical formation and regiospecificity of recombined *Anabaena* sp. lipoxygenase and its effect on modifying wheat proteins. *J Agric Food Chem*, 62, 1713-9.
- WANG, X., LU, F., ZHANG, C., LU, Y., BIE, X., XIE, Y. & LU, Z. 2014c. Effects of recombined *Anabaena* sp. lipoxygenase on the protein component and dough property of wheat flour. *J Agric Food Chem*, 62, 9885-92.
- WASILEWICZ, M. P., KOŁODZIEJ, B., BOJUŁKO, T., KACZMARCZYK, M., SULZYC-BIELICKA, V., BIELICKI, D. & CIEPIELA, K. 2010. Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int J Colorectal Dis*, 25, 1079-85.

- WATANABE, T. & HAEGGSTRÖM, J. Z. 1993. Rat 12-lipoxygenase: mutations of amino acids implicated in the positional specificity of 15- and 12-lipoxygenases. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 1023-9.
- WATANABE, T., MEDINA, J. F., HAEGGSTRÖM, J. Z., RÅDMARK, O. & SAMUELSSON, B. 1993. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur J Biochem*, 212, 605-12.
- WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S. E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M. R., BROWN, D. G., BROWN, S. D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R. D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A. T., CHURCH, D. M., CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F. S., COOK, L. L., COPLEY, R. R., COULSON, A., COURONNE, O., CUFF, J., CURWEN, V., CUTTS, T., DALY, M., DAVID, R., DAVIES, J., DELEHAUNTY, K. D., DERI, J., DERMITZAKIS, E. T., DEWEY, C., DICKENS, N. J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D. M., EDDY, S. R., ELNITSKI, L., EMES, R. D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFELD, A., FEWELL, G. A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W. N., FULTON, L. A., FULTON, R. S., FUREY, T. S., GAGE, D., GIBBS, R. A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N., GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T. A., GREEN, E. D., GREGORY, S., GUIGÓ, R., GUYER, M., HARDISON, R. C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L. W., HINRICH, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D. B., JOHNSON, L. S., JONES, M., JONES, T. A., JOY, A., KAMAL, M., KARLSSON, E. K., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-62.
- WECKSLER, A. T., GARCIA, N. K. & HOLMAN, T. R. 2009a. Substrate specificity effects of lipoxygenase products and inhibitors on soybean lipoxygenase-1. *Bioorg Med Chem*, 17, 6534-9.
- WECKSLER, A. T., JACQUOT, C., VAN DER DONK, W. A. & HOLMAN, T. R. 2009b. Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid. *Biochemistry*, 48, 6259-67.
- WECKSLER, A. T., KENYON, V., DESCHAMPS, J. D. & HOLMAN, T. R. 2008. Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation. *Biochemistry*, 47, 7364-75.
- WEN, Z., LIU, H., LI, M., LI, B., GAO, W., SHAO, Q., FAN, B., ZHAO, F., WANG, Q., XIE, Q., YANG, Y., YU, J. & QU, X. 2014. Increased metabolites of 5-lipoxygenase from hypoxic ovarian cancer cells promote tumor-associated macrophage infiltration. *Oncogene*.
- WENDEL, M. & HELLER, A. R. 2009. Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives. *Anticancer Agents Med Chem*, 9, 457-70.
- WERZ, O., BÜRKERT, E., SAMUELSSON, B., RÅDMARK, O. & STEINHILBER, D. 2002. Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, 99, 1044-52.
- WICHARD, T., GÖBEL, C., FEUSSNER, I. & POHNERT, G. 2004. Unprecedented lipoxygenase/hydroperoxide lyase pathways in the moss *Physcomitrella patens*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 158-61.
- WITTEW, J. & HERSBERGER, M. 2007. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77, 67-77.

- WOESE, C. R., KANDLER, O. & WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4576-9.
- WONG, A., HWANG, S. M., COOK, M. N., HOGABOOM, G. K. & CROOKE, S. T. 1988. Interactions of 5-lipoxygenase with membranes: studies on the association of soluble enzyme with membranes and alterations in enzyme activity. *Biochemistry*, 27, 6763-9.
- WU, D., HUGENHOLTZ, P., MAVROMATIS, K., PUKALL, R., DALIN, E., IVANOVA, N. N., KUNIN, V., GOODWIN, L., WU, M., TINDALL, B. J., HOOPER, S. D., PATI, A., LYKIDIS, A., SPRING, S., ANDERSON, I. J., D'HAESELEER, P., ZEMLA, A., SINGER, M., LAPIDUS, A., NOLAN, M., COPELAND, A., HAN, C., CHEN, F., CHENG, J. F., LUCAS, S., KERFELD, C., LANG, E., GRONOW, S., CHAIN, P., BRUCE, D., RUBIN, E. M., KYRPIDES, N. C., KLENK, H. P. & EISEN, J. A. 2009. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462, 1056-60.
- WUEST, S. J., HORN, T., MARTI-JAUN, J., KÜHN, H. & HERSBERGER, M. 2014. Association of polymorphisms in the ALOX15B gene with coronary artery disease. *Clin Biochem*, 47, 349-55.
- XU, X. C., SHAPPELL, S. B., LIANG, Z., SONG, S., MENTER, D., SUBBARAYAN, V., IYENGAR, S., TANG, D. G. & LIPPMAN, S. M. 2003. Reduced 15S-lipoxygenase-2 expression in esophageal cancer specimens and cells and upregulation in vitro by the cyclooxygenase-2 inhibitor, NS398. *Neoplasia*, 5, 121-7.
- YAO, Y., CLARK, C. M., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. & PRATICÒ, D. 2005. Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 58, 623-6.
- YIGITKANLI, K., PEKCEC, A., KARATAS, H., PALLAST, S., MANDEVILLE, E., JOSHI, N., SMIRNOVA, N., GAZARYAN, I., RATAN, R. R., WITZTUM, J. L., MONTANER, J., HOLMAN, T. R., LO, E. H. & VAN LEYEN, K. 2013. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Ann Neurol*, 73, 129-35.
- YOKOMIZO, T. 2011. Leukotriene B4 receptors: novel roles in immunological regulations. *Adv Enzyme Regul*, 51, 59-64.
- YOO, S., LIM, J. Y. & HWANG, S. W. 2013. Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol*, 11, 664-76.
- YOSHIMOTO, T., SUZUKI, H., YAMAMOTO, S., TAKAI, T., YOKOYAMA, C. & TANABE, T. 1990. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2142-6.
- YOSHINAGA, M., BUCHANAN, F. G. & DUBOIS, R. N. 2004. 15-LOX-1 inhibits p21 (Cip/WAF 1) expression by enhancing MEK-ERK 1/2 signaling in colon carcinoma cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 73, 111-22.
- YUAN, D., ZOU, Q., YU, T., SONG, C., HUANG, S., CHEN, S., REN, Z. & XU, A. 2014. Ancestral genetic complexity of arachidonic acid metabolism in Metazoa. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 1272-84.
- ZARBOCK, A., DISTASI, M. R., SMITH, E., SANDERS, J. M., KRONKE, G., HARRY, B. L., VON VIETINGHOFF, S., BUSCHER, K., NADLER, J. L. & LEY, K. 2009. Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). *J Immunol*, 183, 4715-22.

- ZHANG, B., CHEN, K., BOWEN, J., ALLAN, A., ESPLEY, R., KARUNAIRETNAM, S. & FERGUSON, I. 2006. Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J Exp Bot*, 57, 3825-36.
- ZHANG, C., TAO, T., YING, Q., ZHANG, D., LU, F., BIE, X. & LU, Z. 2012. Extracellular production of lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 in *Bacillus subtilis* and its effect on wheat protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94, 949-58.
- ZHAO, L., MOOS, M. P., GRÄBNER, R., PÉDRONO, F., FAN, J., KAISER, B., JOHN, N., SCHMIDT, S., SPANBROEK, R., LÖTZER, K., HUANG, L., CUI, J., RADER, D. J., EVANS, J. F., HABENICHT, A. J. & FUNK, C. D. 2004. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med*, 10, 966-73.
- ZHAO, L., PRATICÒ, D., RADER, D. J. & FUNK, C. D. 2005. 12/15-Lipoxygenase gene disruption and vitamin E administration diminish atherosclerosis and oxidative stress in apolipoprotein E deficient mice through a final common pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 78, 185-93.
- ZHAO, Y., BHATTACHARJEE, S., JONES, B. M., HILL, J., DUA, P. & LUKIW, W. J. 2014. Regulation of Neurotropic Signaling by the Inducible, NF- κ B-Sensitive miRNA-125b in Alzheimer's Disease (AD) and in Primary Human Neuronal-Glial (HNG) Cells. *Mol Neurobiol*, 50, 97-106.
- ZHENG, Y. & BRASH, A. R. 2010. On the role of molecular oxygen in lipoxygenase activation: comparison and contrast of epidermal lipoxygenase-3 with soybean lipoxygenase-1. *J Biol Chem*, 285, 39876-87.
- ZHU, D. & RAN, Y. 2012. Role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Physiol Sci*, 62, 163-72.

6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen.</i>	17
<i>Abb. 2: Kristallstruktur der ALOX15 des Kaninchens.</i>	19
<i>Abb. 3: Volumenhypothese zur Erklärung der Reaktionsspezifität von 5-, 12- und 15-lipoxygenierenden LOX-Isoformen.</i>	24
<i>Abb. 4: Dreidomänenmodell des irdischen Lebens und Vorkommen von LOXn in den Domänen.</i>	27
<i>Abb. 5: Phylogenetische Systematik der Primaten und bisher bekannte ALOX15-Reaktionsspezifitäten.</i>	35
<i>Abb. 6: Biosynthese der Leukotriene.</i>	41
<i>Abb. 7: Suchstrategie zum Vorkommen von Lipoxygenasen in Bakterien.</i>	73
<i>Abb. 8: Mögliche bakterielle Lipoxygenasen.</i>	76
<i>Abb. 9: Gemeinsames Kladogramm der Proteinsequenzen der Zebrafisch-, humanen und murinen LOXn.</i>	79
<i>Abb. 10: Aminosäurealignment der zbf-, hum- und mouALOX5.</i>	80
<i>Abb. 11: Die Reaktionsspezifität der zbfALOX5.</i>	83
<i>Abb. 12: Beispielchromatogramm der Reaktionsprodukte der rekombinanten zbfALOX5 aus eukaryontischer Expression.</i>	85
<i>Abb. 13: Produktmuster der zbfALOX5 Sloane-Mutante A424F.</i>	87
<i>Abb. 14: Produktmuster der zbfALOX5 Sloane-Mutante N425M.</i>	89
<i>Abb. 15: Produktspektrum der zbfALOX5-Triadenmutante N425F.</i>	90
<i>Abb. 16: Produktspektrum der A424I+N425M-Doppelmutante der zbfALOX5.</i>	92
<i>Abb. 17: Untersuchung des 8/12-HETE Peaks unterschiedlicher Sloane-Mutanten der zbfALOX5.</i>	93
<i>Abb. 18: Chiralphasen-HPLC der 8-HETE, die von Triadenmutanten der zbfALOX5 produziert wurde.</i>	93
<i>Abb. 19 Produktmuster der zbfALOX5-Dreifachmutante F359W+A424I+N425M.</i>	96
<i>Abb. 20: Produktmuster der zbfALOX5-Vierfachmutante F359W+A424I+N425M+A603I.</i>	98
<i>Abb. 21: Chiralphasen-HPLC der 15-HETE, die von zbfALOX5-Triadenmutanten synthetisiert wurde.</i>	99
<i>Abb. 22: Produktmuster der phosphorylierungsmimetischen Mutante T271D.</i>	101
<i>Abb. 23: Produktmuster der Phosphorylierungsmutante S663D.</i>	102

<i>Abb. 24: Expressionsprofile von LOX-Isoformen in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs.</i>	105
<i>Abb. 25: Phenogramm der ALOX15-Isoformen von Gibbon, Schimpanse und Mensch.</i>	109
<i>Abb. 26: Partielles ALOX15-Aminosäurealignment von Mensch, Gibbon und Schimpanse. In den Sequenzen sind in Rot die Triaden-Determinanten dargestellt...</i>	110
<i>Abb. 27: SDS-PAGE und Western Blot der hum-, gib- und panALOX15.....</i>	113
<i>Abb. 28: Partielle Chromatogramme der RP-HPLC-Analysen der hum-, gib- und panALOX15-Reaktionsprodukte.</i>	114
<i>Abb. 29.: Partielle SP-HPLC-Chromatogramme des 8/12-HETE-Peaks der RP-HPLC unterschiedlicher Primaten.</i>	115
<i>Abb. 30: Chiralität der Arachidonsäure oxygenierungsprodukte von hum-, pan- und gibALOX15.</i>	116
<i>Abb. 31: Produktmuster der partiellen Gibbonisierungsmutanten der humALOX15...</i>	117
<i>Abb. 32: Positionsspezifität der panALOX15-Triadenmutante I418A. .</i>	119
<i>Abb. 33: Reaktionsspezifität von gibALOX15-Triadenmutanten.....</i>	120
<i>Abb. 34: Membranbindung der rabALOX15 unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des LOX-Hemmstoffs ETYA.</i>	122
<i>Abb. 35: Aminosäurealignment der hum- und denALOX15.....</i>	128
<i>Abb. 36: Aminosäurealignment der hum- und denALOX15B.....</i>	128
<i>Abb. 37: Aminosäurealignment der hum- und denALOX12.....</i>	129
<i>Abb. 38: Aminosäurealignment der hum- und denALOXE3.</i>	130
<i>Abb. 40: Vereinfachte phylogenetische Systematik der Primaten und ALOX15-Produktspezifität.</i>	140
<i>Abb. 39: Beziehung von ALOX15-Spezifität und phylogenetischer Stellung. .</i>	142
<i>Abb. 41: Lipoxinsynthese unter den Bedingungen 12-lipoxygenierender und 15-lipoxygenierender ALOX15-Isoformen.....</i>	145
<i>Abb. 42: Korrelation der 15-HETE-Produktion und der van-der-Waals-Volumina von Positionsdeterminanten.</i>	149
<i>Abb. 43: Vergleich der hum- und denALOX15.</i>	153
<i>Abb. 44: Vergleich der hum- und denALOX15B.</i>	154
<i>Abb. 45: Vergleich der hum- und denALOX12.</i>	155
<i>Abb. 46: Lokalisation der denALOXe3-Mutation Ala359Pro in der 3D-Struktur der humALOXe3.</i>	156

7 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Übersicht über Lipoxygenasen des Zebrafischs.</i>	<i>78</i>
<i>Tab. 2: Enantiomerenzusammensetzung der 5-HETEs, die durch ausgewählte Sloane-Mutanten synthetisiert wurden.</i>	<i>94</i>
<i>Tab. 3: Übersicht über die Reaktionsspezifität von zbfALOX5-Triadenmutanten.</i>	<i>100</i>
<i>Tab. 4: Triadendeterminanten der ALOX15 ausgewählter Säugetierspezies.</i>	<i>107</i>
<i>Tab. 5: Sequenzhomologiegrad der ALOX15-Isoformen von Gibbon, Schimpanse und Mensch.</i>	<i>109</i>
<i>Tab. 6: Aminosäureunterschiede in Leukotrien-relevanten Proteinsequenzen von H. sapiens, H. neanderthalensis und H. denisovan.....</i>	<i>125</i>

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Susan Adel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mechanistische Aspekte der Evolution von 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 Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Susan Adel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Hofheinz, K., Kakularam, K. R., **Adel, S.**, Anton, M., Polymarasetty, A., Reddanna, P., Kuhn, H. & Horn, T., Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. Arch Biochem Biophys, 530(1), 40-7. (2013)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und die Planung der Experimente wurde in Zusammenarbeit des Erstautors (K. Hofheinz) und H. Kühn vorgenommen. S. Adel nahm an der Konzeption und Planung beratend teil.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente zu den funktionellen Konsequenzen der Mutagenese der Triadendeterminanten wurden vom Erstautor durchgeführt. S. Adel hat dabei experimentelle Teilaufgaben (z.B. HPLC-Analytik) übernommen.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren (u.a. auch S. Adel) Anteil. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 2: Chaitidis, P., **Adel, S.**, Anton, M., Heydeck, D., Kuhn, H. & Horn, T., Lipoxygenase pathways in Homo neanderthalensis: functional comparison with Homo sapiens isoforms. J Lipid Res, 54(5), 1397-409. (2013)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Planung und Konzeption der Datenbanksuche und der Aminosäurevergleich wurde von S. Adel in Zusammenarbeit mit H. Kühn durchgeführt.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Datenbanksuchen wurden zu großen Teilen von P. Chaitidis (Erstautor) erledigt, während die Aminosäurealignments durch S. Adel erstellt wurden. Die möglichen physiologischen Konsequenzen der Aminosäureaustausche wurden von allen beteiligten Kollegen diskutiert.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde von S. Adel in Zusammenarbeit mit H. Kühn durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren Anteil, wobei der redaktionelle Prozess von S. Adel koordiniert wurde. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 3: Di Venere, A., Nicolai, E., Ivanov, I., Dainese, E., **Adel, S.**, Angelucci, B. C., Kuhn, H., Maccarrone, M. & Mei, G., Probing conformational changes in lipoxygenases upon membrane binding: Fine-tuning by the active site inhibitor ETYA. *Biochim Biophys Acta*, 1841(1), 1-10. (2013)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Untersuchungen zur Membranbindung aktiver und ETYA-inaktivierter *ALOX15* wurden von S. Adel in Zusammenarbeit mit H. Kühn geplant und konzeptionell in den Gesamtrahmen der Forschungen eingepasst.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente zur Membranbindung aktiver und ETYA-inaktivierter *ALOX15* wurden von S. Adel selbständig durchgeführt und die erhaltenen Daten von ihr ausgewertet.

c) Schreiben der Publikationen: Das Kapitel Membranbindung wurde von S. Adel im Entwurf erstellt und in die Gesamtpublikation eingefügt. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 4: **Adel, S.**, Hofheinz, K., Heydeck, D., Kuhn, H. & Häfner, A. K., Phosphorylation mimicking mutations of *ALOX5* orthologs of different vertebrates do not alter reaction specificities of the enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1841(10), 1460-1466. (2014)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und die Planung der Experimente wurde in Zusammenarbeit des Erstutors (S. Adel) und H. Kühn vorgenommen. Dazu wurden konzeptionelle Gespräche mit A. Häfner (Universität Frankfurt) geführt.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente zu den funktionellen Konsequenzen phosphorylierungsmimetischer Mutanten der *zbfALOX5* wurden von S. Adel durchgeführt. Die Experimente zur humanen *ALOX5*, die in Frankfurt

durchgeführt wurden, koordinierte H.Kühn.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren Anteil, wobei der redaktionelle Prozess vom Erstautor koordiniert wurde. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 5: Horn, T., **Adel, S.**, Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., Redanna, P., Kuhn, H. & Heydeck, D., Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*, 57, 13-39. (2015)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Publikation: Die Konzeption und Planung dieser Übersichtsarbeit wurde von T. Horn, S. Adel, D. Heydeck und H. Kühn zu gleichen Teilen übernommen.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: S. Adel war federführend für die Kapitel Bakterielle LOXn, Zebrafisch-LOXn und Reaktionsspezifität der *ALOX15* während der Primatenentwicklung verantwortlich. Die Extraktion der genomischen Sequenzen aus den Datenbanken und die Erstellung von LOX-Aminosäurealignments wurde von S. Adel durchgeführt.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs der oben genannten Kapitel wurde von S. Adel durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs und an der Zusammenstellung aller Kapitel hatten alle Koautoren Anteil, wobei der redaktionelle Prozess von S. Adel und T. Horn koordiniert wurde. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 6: **Adel, S.**, Kakularam, K. R., Horn, T., Reddanna, P., Kuhn, H. & Heydeck, D., Leukotriene signaling in the extinct human subspecies *Homo denisovan* and *Homo neanderthalensis*. Structural and functional comparison with *Homo sapiens*. *Arch Biochem Biophys*, 565, 17-24. (2015)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Datenbanksuchen wurden von S. Adel in Zusammenarbeit mit H. Kühn geplant.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Extraktion der genomischen Sequenzen aus den Datenbanken wurde von S. Adel zusammen mit K. Reddy (Universität Hyderabad) durchgeführt. Die Aminosäurealignments wurden von beiden Kollegen gemeinsam erstellt. Die möglichen physiologischen Konsequenzen der Aminosäureaustausche wurden von allen beteiligten Kollegen diskutiert.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren Anteil, wobei der redaktionelle Prozess vom Erstautor koordiniert wurde. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts und an dessen Revision entsprechend der Gutachterkommentare teil.

Publikation 7: Adel, S., González-Lafont, A., Pekárová, M., Saura, P., Masgrau, L., Lluch, J. M., Stehling, S., Horn, T., Kühn, H., Heydeck, D., Evolutionary alteration of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs is aimed at optimizing inflammatory resolution. (submitted)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und die Planung der Experimente wurde in Zusammenarbeit von S. Adel, D. Heydeck und H. Kühn vorgenommen. Dabei war S. Adel die treibende Kraft. Ihr oblag auch die Planung und Kordinierung der Telexperimente.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Der Großteil der Experimente wurde von S. Adel in eigener Regie konzipiert und unter der Anleitung von D. Heydeck selbstständig durchgeführt. Dies betraf auch die Datenauswertung und deren statistische Absicherung.

c) Schreiben der Publikationen: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren (u.a. auch S. Adel) Anteil. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts federführend teil. Den zu erwartenden Revisionsprozess entsprechend der Gutachterkommentare wird S. Adel koordinieren.

Publikation 8: Adel, S., Kühn, H., Heydeck, D., The zebrafish ALOX5 ortholog follows the triade concept and can be converted to a 15-lipoxygenating enzyme by site directed mutagenesis of the triad determinants. (in preparation)

Beitrag im Einzelnen:

a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und die Planung der Experimente wurde in Zusammenarbeit von S. Adel unter Anleitung von H. Kühn vorgenommen. S. Adel oblag auch die Planung und Koordinierung der Telexperimente.

b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Der Großteil der Experimente wurde von S. Adel in eigener Regie konzipiert und unter der Anleitung von D. Heydeck selbstständig durchgeführt. Dies betraf auch die Datenauswertung und deren statistische Absicherung.

c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs hatten alle Koautoren (u.a. auch S. Adel) Anteil. Außerdem nahm S. Adel an der Endredaktion des Gesamtmanuskripts federführend teil. Den zu erwartenden Revisionsprozess entsprechend der Gutachterkommentare wird S. Adel koordinieren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

Adel, S., Karst, F., González-Lafont, A., Pekárová, M., Saura, P., Masgrau, L., Lluch, J. M., Stehling, S., Horn, T., Kühn, H. & Heydeck, D. (2016) Evolutionary alteration of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs is aimed at optimizing the biosynthetic capacity for anti-inflammatory lipoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4266-75.

Adel, S., Heydeck, D., Kuhn H, Ufer C. (2016) The lipoxygenase pathway in zebrafish. Expression and characterization of zebrafish ALOX5 and comparison with its human ortholog. *Biochim Biophys Acta*, 1861(1), 1-11.

Adel, S., Kakularam, K. R., Horn, T., Reddanna, P., Kuhn, H. & Heydeck, D. (2015) Leukotriene signaling in the extinct human subspecies *Homo denisovan* and *Homo neanderthalensis*. Structural and functional comparison with *Homo sapiens*. *Arch Biochem Biophys*, 565, 17-24.

Horn, T., **Adel, S.**, Schumann, R., Sur, S., Kakularam, K. R., Polamarasetty, A., Redanna, P., Kuhn, H. & Heydeck, D. (2015) Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*, 57, 13-39.

Adel, S., Hofheinz, K., Heydeck, D., Kuhn, H. & Häfner, A. K. (2014) Phosphorylation mimicking mutations of ALOX5 orthologs of different vertebrates do not alter reaction specificities of the enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1841(10), 1460-1466.

Di Venere, A., Nicolai, E., Ivanov, I., Dainese, E., **Adel, S.**, Angelucci, B. C., Kuhn, H., Maccarrone, M. & Mei, G. (2014) Probing conformational changes in lipoxygenases upon membrane binding: Fine-tuning by the active site inhibitor ETYA. *Biochim Biophys Acta*, 1841(1), 1-10.

Chaitidis, P., **Adel, S.**, Anton, M., Heydeck, D., Kuhn, H. & Horn, T. (2013) Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms. *J Lipid Res*, 54(5), 1397-409.

Hofheinz, K., Kakularam, K. R., **Adel, S.**, Anton, M., Polymarasetty, A., Reddanna, P., Kuhn, H. & Horn, T. (2013) Conversion of pro-inflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. *Arch Biochem Biophys*, 530(1), 40-7.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn für die freundliche Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas. Außerdem möchte ich mich für die herausragende Betreuung und seine unaufhörliche Unterstützung bedanken. Er war stets offen für Diskussionen, neue Ideen, Fragen und Probleme, was für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit entscheidend war.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die intensiven Einarbeitungen in die Methoden bedanken, insbesondere bei Frau Monika Anton, Frau Dr. Dagmar Heydeck, Frau Sabine Stehling und meinen ehemaligen Mitdoktoranden Frau Dr. Katharina Hofheinz und Herrn Dr. Thomas Horn, die mir insbesondere zu Beginn der Arbeiten viele Dinge gezeigt haben. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Pavlos Chaitidis, der mich an die Arbeit mit Genomdatenbanken herangeführt hat, sowie bei Frau Dr. Astrid Borchert und Herrn Dr. Christoph Ufer, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mir stets mit sachkundigem Rat zur Seite standen. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Koautoren für die freundliche wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Ein herzliches Dankeschön geht außerdem an Frau Sarah Karstedt, Herrn Maximilian Droste und Herrn Peter Schily für das kritische Gegenlesen des Manuskripts.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die stets an meiner Seite stehen. Insbesondere gebührt mein Dank jedoch meinen lieben Eltern, die durch ihre Erziehung und fortwährende Unterstützung die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.