

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur strukturellen Basis der
Reaktionsspezifität von 5-Lipoxygenasen und deren
biologische Bedeutung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Hofheinz

aus Mönchengladbach

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. sc. med. H. Kühn

2. Prof. Dr. D. Steinhilber

3. Priv.-Doz. Dr. M. Hersberger

Datum der Promotion: 14.02.14

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Charakteristika der Lipoxygenasen.....	1
1.1.1 Mechanismus der Lipoxygenasereaktion.....	2
1.1.1.1 Wasserstoffabstraktion.....	2
1.1.1.2 Radikalumlagerung.....	3
1.1.1.3 Sauerstoffinsertion.....	4
1.1.1.4 Radikalreduktion.....	4
1.1.2 5-Lipoxygenase modifizierende Faktoren.....	4
1.1.3 Nomenklatur.....	5
1.1.4 Biologische Funktion tierischer Lipoxygenasen.....	6
1.1.4.1 Der Lipoxygenaseweg im Zusammenhang mit Inflammation und Asthma bronchiale.....	6
1.1.4.2 Kanzerogenese.....	8
1.1.4.3 Atherosklerose.....	9
1.1.4.4 Sonstige Wirkungen.....	10
1.2 Strukturelle Grundlagen der Lipoxygenase-Reaktion.....	11
1.2.1 Kristall- und Primärstruktur.....	11
1.2.2 Die N-terminale Domäne.....	12
1.2.3 Die C-terminale Domäne.....	13
1.2.3.1 Die Substratbindetasche.....	14
1.2.4 Grundlagen der Positionsspezifität.....	16
1.2.5 Grundlagen der Stereospezifität.....	20
1.3 Ziel der Arbeit.....	23
2 Materialien und Methoden	25
2.1 Materialien.....	25
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien.....	25
2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	26
2.1.3 Enzyme und Kits.....	27
2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide.....	27
2.1.5 Bakterienstämme.....	30
2.2 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1 Klonierung der murinen 5-LOX.....	30
2.2.2 Ligation der murinen 5-LOX cDNA in den Vektor pRSET A.....	30
2.2.3 Umklonierung der humanen 5-LOX aus dem pKK in den pRSET A.....	32
2.2.4 Erstellung einzelner Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese.....	32
2.2.5 Expression der rekombinanten Lipoxygenasen.....	32
2.2.6 Aufreinigung der rekombinanten Lipoxygenasen.....	34

2.3 Analytische Methoden.....	34
2.3.1 HPLC basierter LOX Aktivitätsassay.....	34
2.3.2 Produktanalyse.....	35
2.3.2.1 Umkehrphasen-HPLC.....	35
2.3.2.2 Normalphasen-HPLC.....	35
2.3.2.3 Chiralphasen-HPLC.....	35
2.3.2.3.1 Methylierung mit Diazomethan.....	36
2.3.3 Spektrophotometrische Untersuchungen.....	37
2.3.4 Proteinbestimmung.....	37
2.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.3.6 Western Blot.....	37
2.3.7 Quantifizierung der Proteinexpression.....	38
2.4 Untersuchung der Membranbindungseigenschaften von unterschiedlichen LOXn.....	38
2.4.1 Herstellung einer trunktierten Version der murinen 5-LOX.....	38
2.4.2 Membranbindungsassay.....	38
2.5 Statistische Auswertung.....	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Rekombinante Expression und Charakterisierung der Maus-5-Lipoxygenase	40
3.1.1 Expression der rekombinanten Maus-5-Lipoxygenase.....	40
3.1.2 Produktspektrum der rekombinanten murinen 5-LOX.....	41
3.1.3 Kinetische Untersuchung der rekombinanten murinen 5-LOX.....	42
3.2 Versuche zur Volumenhypothese.....	44
3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese und der Einfluss auf die Positionsspezifität	44
3.2.1.1 Einfachmutanten einzelner Positionsdeterminanten.....	45
3.2.1.1.1 Borngräber I Mutante.....	45
3.2.1.1.2 Sloane-Mutante.....	46
3.2.1.1.3 Borngräber II Mutante.....	47
3.2.1.2 Doppelmutanten.....	47
3.2.1.2.1 Borngräber I + Sloane.....	47
3.2.1.2.2 Weitere Doppelmutanten.....	48
3.2.1.3 Dreifachmutanten.....	48
3.2.1.3.1 Borngräber I + Sloane.....	49
3.2.1.3.2 Weitere Dreifachmutanten.....	49
3.2.1.4 Vierfachmutante.....	51
3.2.2 Abhängigkeit der 15-HETE-Produktion von der Volumenverkleinerung der Substratbindetasche.....	51
3.2.3 Bisher unidentifizierte Spezifitätsdeterminanten.....	52
3.2.3.1 A606Q und P569C.....	53
3.3 Phosphorylierungsmutanten.....	54
3.3.1 Mutation an den Phosphorylierungsstellen Serin 271, 523 und 663 der	

murinen 5-LOX.....	54
3.3.2 Mutationen an der stabilen murinen 5-LOX an Serin 663.....	55
3.3.3 Pseudophosphorylierung der humanen 5-LOX.....	56
3.3.3.1 Mutation an den Phosphorylierungsstellen Serin 271, 523 und 663.....	56
3.4 Einfluss von A zu G Mutanten auf die Reaktionsspezifität.....	57
3.4.1 Mutation des Alanin 410 zu einem Glycin.....	58
3.4.2 Kombination der Coffa-Mutante mit ausgewählten Mutanten der Volumenhypothese.....	58
3.5 Trunkationsexperimente.....	60
3.5.1 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Membranbindungseigenschaften des Enzyms	61
3.5.2 Einfluss des N-Terminus auf die katalytische Aktivität	62
4 Diskussion.....	65
4.1 Positionsspezifität von LOXn.....	65
4.1.1 Biologische Bedeutung der Reaktionsspezifität der LOXn.....	66
4.1.2 Anwendbarkeit der Volumenhypothese auf 5-LOXn.....	67
4.1.3 Orientierungshypothese.....	70
4.1.4 Vereinbarkeit der Stereochemie mit den Theorien zur Positionsspezifität....	72
4.1.4.1 Nomenklatur der Lipoxygenasesubstrate und -produkte.....	75
4.2 Stereoselektivität von LOXn.....	77
4.3 Die Rolle der N-terminalen Domäne.....	79
4.4 Entwicklung eines Klassifizierungssystems, welches die Volumenhypothese sowie die phylogenetischen Beziehungen berücksichtigt.	81
5 Zusammenfassung.....	84
6 Anhang 1.....	85
7 Literaturverzeichnis.....	87
8 Anhang 2.....	98

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström – Längeneinheit (1 Å = 100 pm = 10 ⁻¹⁰ m)
bp	„ <i>base pairs</i> “ – Basenpaare
BSA	„ <i>bovine serum albumin</i> “ – Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CIP-Konvention	Cahn-Ingold-Prelog-Konvention
Co-Sepharose	Cobalt-Sepharose
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “ – zur mRNA komplementäre DNA
CP-HPLC	„ <i>chiral phase-HPLC</i> “ – Chiralphasen-HPLC
Cu	„ <i>Cuprum</i> “ – Kuper
DNA	„ <i>desoxiribonucleic acid</i> “ – Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat-Set
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	„ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> “ – Ethylendiamintetraessigsäure
EKRM	<i>EDTA High Salt stripped Rough Microsomes</i>
Fe	„ <i>Ferrum</i> “ – Eisen
FLAP	Fünf-Lipoxygenase-Aktivierendes-Protein
5-HETE	5-Hydroxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-HETE	8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
9-HETE	9-Hydroxy-5Z,7E,11Z,14Z -eicosatetraensäure
11-HETE	11-Hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraensäure
12-HETE	12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-HETE	15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
5-H(p)ETE	5-Hydroperoxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure
8-H(p)ETE	8-Hydroperoxy-5Z,9E,11Z,14Z-eicosatetraensäure
9-H(p)ETE	9-Hydroperoxy-5Z,7E,11Z,14Z -eicosatetraensäure
11-H(p)ETE	11-Hydroperoxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraensäure
12-H(p)ETE	12-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-H(p)ETE	15-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
HDL	„ <i>high density lipoprotein</i> “ – Lipoprotein hoher Dichte
13-HODE	13-Hydroxy-9Z,11E-octadecadiensäure
HPLC	„ <i>high performance liquid chromatography</i> “ – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton – atomare Masseneinheit (1 kDa = 1000 Da)
LB _{Amp}	Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin
LB _{Amp, Cap}	Luria Bertani-Medium mit Zusatz von Ampicillin und Chloramphenicol
LDL	„ <i>low density lipoprotein</i> “ – Lipoprotein niedriger Dichte
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
LX	Lipoxin
<i>M. mulatta</i>	<i>Macaca mulatta</i>
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “ – Boten-RNA
NAGly	N-Arachidonyl-Glycin
Ni	Nickel
O	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ – Phosphat-gepufferte Saline
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ – Polymerasekettenreaktion
PDB	„ <i>Protein Data Bank</i> “ – Proteindatenbank
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “ – Ribonukleinsäure
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
<i>P. pygmaeus</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
RP-HPLC	„ <i>reverse phase-HPLC</i> “ – Umkehrphasen-HPLC
rpm	„ <i>rounds per minute</i> “ – Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP-HPLC	„ <i>straight phase-HPLC</i> “ – Normalphasen-HPLC
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TED	Triscarboxymethylethylendiamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Zsfg.	Zusammenfassung

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

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

1 Einleitung

1.1 Charakteristika der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind Enzyme, welche mit Hilfe ihres Nicht-Häm-Eisens die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Sie kommen sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren vor (Andreou und Feussner, 2009; Brash, 1999). In der Gruppe der Prokaryonten konnten bei Bakterien LOXn nachgewiesen werden (Porta und Rocha-Sosa, 2001). Dies gelang bisher noch nicht für die Archaeen. Als Lipoxygenasesubstrate fungieren prinzipiell alle mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wobei verschiedene LOX-Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Während vielen pflanzlichen Lipoxygenasen vor allem Linol- und Linolensäure als Substrate dienen, setzen Säugetierlipoxygenasen auch Arachidonsäure um (Ivanov *et al.*, 2010). Diese wird zunächst in das entsprechende Fettsäurehydroperoxid umgewandelt, um dann im nächsten Reaktionsschritt z.B. zu Leukotrienen umgesetzt zu werden (Samuelsson *et al.*, 1987). Lipoxygenasen sind in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert. So repräsentieren die 5-Lipoxygenaseprodukte Leukotrien C₄ und Leukotrien D₄ die wichtigste Wirkkomponente der "Slow reacting substances of anaphylaxis", die bei der Pathogenese des Asthma bronchiale bedeutsam ist (Austen, 2008). Auch in der Kanzerogenese spielen Lipoxygenasen eine wichtige Rolle. Im Allgemeinen gelten die 5-LOX und die Plättchen-Typ 12-LOX als prokarzinogen, wohingegen die 15-LOX-2 als tumorprotektiv gilt. Die Rolle der 15-LOX-1 wird weiterhin kontrovers diskutiert (Pidgeon *et al.*, 2007). In der Pathogenese der Atherosklerose wirken LOXn durch Oxidation von Fettsäuren in Low Density Lipoproteinen (LDL) mit (Yoshida und Kisugi, 2010). Durch diese oxidative Modifizierung wird natives LDL in eine stark atherogene Form umgewandelt, die eine wichtige Rolle bei der Schaumzellbildung spielt.

Aufgrund der Vielzahl der pathophysiologischen Prozesse, in denen Lipoxygenasen von Bedeutung sind, stellen sie ein interessantes Zielmolekül für pharmakologische Interventionen dar. Während Leukotrienrezeptor-Antagonisten in der Therapie des Asthma bronchiale etabliert sind (Reiss *et al.*, 1996), stehen für andere klinische Anwendungen noch keine zugelassenen Medikamente zur Verfügung.

Obwohl viel über die Wirkung von Lipoxygenase-Produkten bekannt ist, sind noch Fragen zu den enzymatischen Besonderheiten der verschiedenen LOX-Isoformen

offen. Zwar wird die Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung als klassisches Kriterium für die Einteilung der Lipoxygenasen in 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX verwendet, allerdings sind die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Positionsspezifität verschiedener LOX-Isoformen nur unzureichend geklärt. Es ist z.B. nach wie vor unklar, warum 5-Lipoxygenasen Arachidonsäure am C5 der Kohlenwasserstoffkette oxygenieren, während 15-Lipoxygenasen molekularen Sauerstoff am C15 einführen. Ein umfassendes Erklärungsmodell zur Reaktionsspezifität verschiedener LOX-Isoformen würde das Verständnis des Reaktionsmechanismus von Lipoxygenasen verbessern und die Entwicklung innovativer Konzepte für die therapeutische Intervention bei den Lipoxygenase-vermittelten Krankheitsprozessen ermöglichen. Die Volumenhypothese bietet dafür einen sinnvollen Ansatz (Browner *et al.*, 1998).

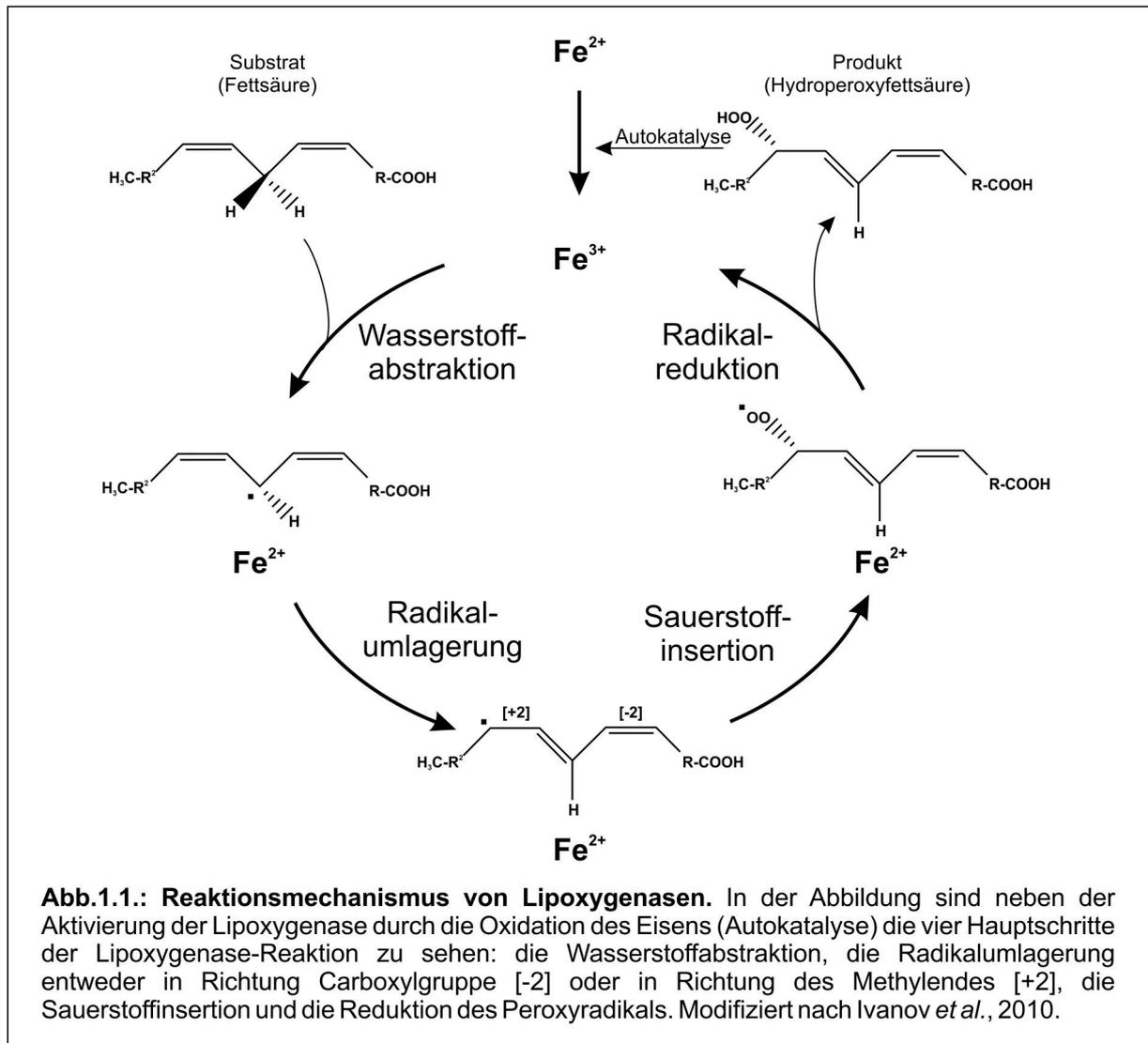
1.1.1 Mechanismus der Lipoxygenasereaktion

Lipoxygenasen sind Dioxygenasen, die ein Nicht-Häm-Eisen im aktiven Zentrum tragen (Brash, 1999; Kühn *et al.*, 2005). Sie katalysieren die stereospezifische Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Vereinfacht dargestellt läuft die LOX-Reaktion in vier konsekutiven Schritten ab (Abb.1.1.): Der erste Schritt ist die Wasserstoffabspaltung, der zweite die Radikalumlagerung, der dritte die Sauerstoffinsertion. Der vierte und letzte Schritt ist die Reduktion des Peroxyradikals. Intrazellulär liegen LOXn nach ihrer Synthese zunächst als katalytisch inaktive Proteine vor, die Fe^{2+} enthalten. Um in den katalytischen Zyklus eintreten zu können, muss das katalytisch wirksame Eisen in seine dreiwertige Form (Fe^{3+}) oxidiert werden. Dies kann z.B. dadurch erreicht werden, dass das Enzym mit Peroxiden reagiert, die als Oxidationsmittel fungieren. So können z.B. die Reaktionsprodukte von LOXn, die Hydroperoxyfettsäuren, eine derartige Oxidation des Enzymeisens induzieren. In diesem Sinn besitzen LOXn autokatalytischen Charakter (Schilstra *et al.*, 1992; Yamamoto, 1989).

1.1.1.1 Wasserstoffabstraktion

Nach der Enzymaktivierung wird zunächst stereoselektiv Wasserstoff an einer doppelallylständigen Methylengruppe abgespalten. Typischerweise geschieht dies bei Säugetierlipoxygenasen, welche hauptsächlich Arachidonsäure umsetzen, an einem von drei Kohlenstoffatomen der Arachidonsäure (C7, C10 und C13). Dabei wird ein Proton freigesetzt, das korrespondierende Elektron reduziert dabei das Eisenion von seiner Fe^{3+} -Form zur korrespondierenden Fe^{2+} -Form. Die Wasserstoffabstraktion ist in

zweierlei Hinsicht stereoselektiv. Zum einen wird Wasserstoff nur von einem der drei doppelallylständigen Methylengruppen der Arachidonsäure (z.B. C7 bei 5-LOXn) abstrahiert. Die anderen bleiben unberührt. Zum anderen wird entweder das proS oder das proR Wasserstoffatom, nie aber beide gleichzeitig, von der doppelallylständigen Methylengruppe abgespalten.



1.1.1.2 Radikalumlagerung

Das Radikalelektron ist durch die benachbarten Doppelbindungen delokalisiert und kann sich an verschiedenen C-Atomen aufhalten. Dadurch kann es zu einer Verschiebung in Richtung Carboxylende [-2] oder in Richtung Methylende [+2] kommen. Warum eine von beiden Richtungen in den meisten Enzymen favorisiert wird, ist bislang ungeklärt. Aus den isolierten *cis*-Doppelbindungen der Substratfettsäure entsteht bei der Radikalumlagerung ein *cis-trans*-konjugiertes System, das durch ein Absorptionsmaximum bei 235nm gekennzeichnet ist (Ivanov *et al.*, 2010). Auf dieser

Doppelbindungskonjugation beruht der spektrophotometrische Aktivitätsassay von Lipoxygenasen und der Produktnachweis in der HPLC.

1.1.1.3 Sauerstoffinsertion

Danach erfolgt die Insertion molekularen Sauerstoffs. Dies geschieht *antarafacial*, das bedeutet, dass der Sauerstoff an der Seite der Doppelbindungsebene, die der Wasserstoffabstraktion gegenüberliegt, eingefügt wird. Die strukturellen Ursachen für den *antarafacialen* Charakter der Sauerstoffinsertion sind derzeit noch nicht geklärt. Es existieren jedoch verschiedene Theorien: i) Alle anderen möglichen Reaktionsorte werden durch das Enzym abgeschirmt, ii) separater Sauerstofftunnel, iii) Stabilisierung des Peroxyradikals in einer bestimmten Konformation, iv) gezielte Radikalstabilisierung, sodass der Sauerstoff nur einen möglichen Angriffspunkt hat (Schneider *et al.*, 2007b).

1.1.1.4 Radikalreduktion

Im letzten Schritt wird das Peroxyradikal zunächst zum entsprechenden Anion reduziert. Das dafür notwendige Elektron stammt von der Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} . Das oxidierte Enzym steht nun für einen neuen Katalysezyklus zur Verfügung. Abschließend folgt die Protonierung, welche zum Endprodukt der Lipoxygenase-Reaktion, einer Peroxyfettsäure, führt.

1.1.2 5-Lipoxygenase modifizierende Faktoren

Gerade die 5-Lipoxygenase zeichnet sich durch eine Vielzahl von Faktoren aus, die ihre Aktivität modifizieren (Rådmark, 2002). So konnte gezeigt werden, dass die LTA_4 -Synthese durch Ca^{2+} -Zugabe zu aus Schweine-Leukozyten isolierter 5-Lipoxygenase gesteigert werden konnte (Riendeau *et al.*, 1991). Das Ca^{2+} wirkt über eine Ca^{2+} -Bindedomäne im N-terminalen Anteil der LOX (Kulkarni *et al.*, 2002). Die Stimulierbarkeit durch ATP sowie die Tatsache, dass die 5-LOX über eine ATP-Säule aufreinigbar ist, sprechen für eine ATP-Bindedomäne (Zhang *et al.*, 2000). Auch Phosphatidylcholin-Vesikel (PC) können als stimulierender Faktor wirken (Puustinen *et al.*, 1988). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Phosphorylierung an bestimmten Serinresten die Aktivität der 5-LOX erhöhen kann. Dies gilt für die Serine 271 und 663 (Rådmark, 2002; Werz *et al.*, 2002). Eine Phosphorylierung an Serin 523 durch Proteinkinase A zeigt einen gegenteiligen Effekt (Luo *et al.*, 2004).

Eine Besonderheit der 5-Lipoxygenase ist das Fünf-Lipoxygenase-Aktivierende-Protein (FLAP). Zwar konnte keine direkte Assoziation zwischen den beiden Proteinen

nachgewiesen werden, doch wird vermutet, dass FLAP die Membranbindung fördert und/oder als Transportprotein für die Arachidonsäure zur Lipoxygenase fungiert. Damit könnte FLAP die Substratbindung der 5-LOX effektivieren (Rådmark, 2002).

1.1.3 Nomenklatur

Bereits 1932 konnte die erste Lipoxygenase identifiziert werden. Es handelte sich hierbei um eine pflanzliche Lipoxygenase, nämlich die Sojabohnen-LOX-1 (Andre und Hou, 1932). Knapp vierzig Jahre später konnten die ersten Säugetierlipoxygenasen in humanen Thrombozyten und in Retikulozyten des Kaninchens gefunden werden (Hamberg und Samuelsson, 1974; Schewe *et al.*, 1975). Im Laufe der vergangenen Jahre konnten immer mehr Lipoxygenasen in Pflanzen und Pilzen identifiziert werden (Andreou und Feussner, 2009; Oliw, 2002). Auch der Nachweis von weiteren LOX-Isoformen in Säugetiergewebe konnte erbracht werden. So enthält allein das Mausgenom sieben funktionelle LOX-Gene (Ivanov *et al.*, 2010). Die Expression der einzelnen LOXn hängt unter anderem vom Gewebetyp ab. So findet sich die 5-Lipoxygenase vor allem in Zellen, die mit Entzündungsreaktionen vergesellschaftet sind, wie z.B. Monozyten, Mastzellen, eosinophilen sowie neutrophilen Granulozyten (Duroudier *et al.*, 2009).

Mit der steigenden Anzahl an Lipoxygenasen wird eine einheitliche Nomenklatur immer wichtiger. Pflanzliche Lipoxygenasen werden nach der Pflanze ihrer Entdeckung benannt, bei mehreren Lipoxygenasen wird durchnummeriert, so z.B. die Sojabohnen-LOX-1, LOX-2 und LOX-3. Momentan werden die Säugetierlipoxygenasen nach ihrer Positionsspezifität in Bezug auf Arachidonsäure benannt (Ivanov *et al.*, 2010). Dieses System birgt jedoch mehrere Probleme. Zum einen ist es nicht auf pflanzliche Lipoxygenasen übertragbar, da diese zumeist ein anderes Substrat als Arachidonsäure verwenden (Andreou und Feussner, 2009). Zum anderen gibt es auch bei den Säugetierlipoxygenasen mehrere Lipoxygenasen mit derselben Positionsspezifität, sodass als Zusatz noch der Gewebetyp hinzugefügt wird, in dem die jeweilige Lipoxygenase erstmalig beschrieben wurde. Als Beispiel sei die 12-LOX genannt, die es als Plättchen-Typ, Leukozyten-Typ und Epidermis-Typ gibt (Yamamoto *et al.*, 1997). Problematisch bleibt allerdings die Tatsache, dass viele Lipoxygenasen erst klassifiziert werden können, wenn ihr Produktspektrum identifiziert wurde. Dies ist insbesondere zur heutigen Zeit eine Schwierigkeit, da aufgrund der fortschreitenden Sequenzierung einzelner Genome immer mehr Lipoxygenasen gefunden werden. Zwar zeigen einige

Lipoxygenasen, die große Gemeinsamkeit bezüglich ihrer Sequenzen aufweisen, ein ähnliches Produktspektrum, wie z.B. die humane und die Kaninchen 12/15-LOX (Walther *et al.*, 2011), andere wiederum haben einen hohen Sequenzhomologiegrad, zeigen aber keinerlei Übereinstimmung im Produktspektrum, wie z.B. die humane 15-LOX-2 und ihr murines Ortholog (8-LOX) (Jisaka *et al.*, 2000). Umso wichtiger ist es daher, eine einheitliche Theorie zur Positionsspezifität von LOXn, die über bestimmte Positionsdeterminanten Rückschlüsse auf die zu erwartenden Produkte zulässt, zu entwickeln.

1.1.4 Biologische Funktion tierischer Lipoxygenasen

Lipoxygenasen sind in verschiedenste biologische Prozesse involviert. In den folgenden Kapiteln sollen wesentliche physiologische und pathophysiologische Prozesse in tierischen Organismen, in denen Lipoxygenasen eine Rolle spielen, dargestellt werden. Für die Bedeutung der Lipoxygenasen in pflanzlichen Organismen sei auf einige Übersichtsartikel verwiesen (Andreou *et al.*, 2009; Mosblech *et al.*, 2009; Wasternack, 2007).

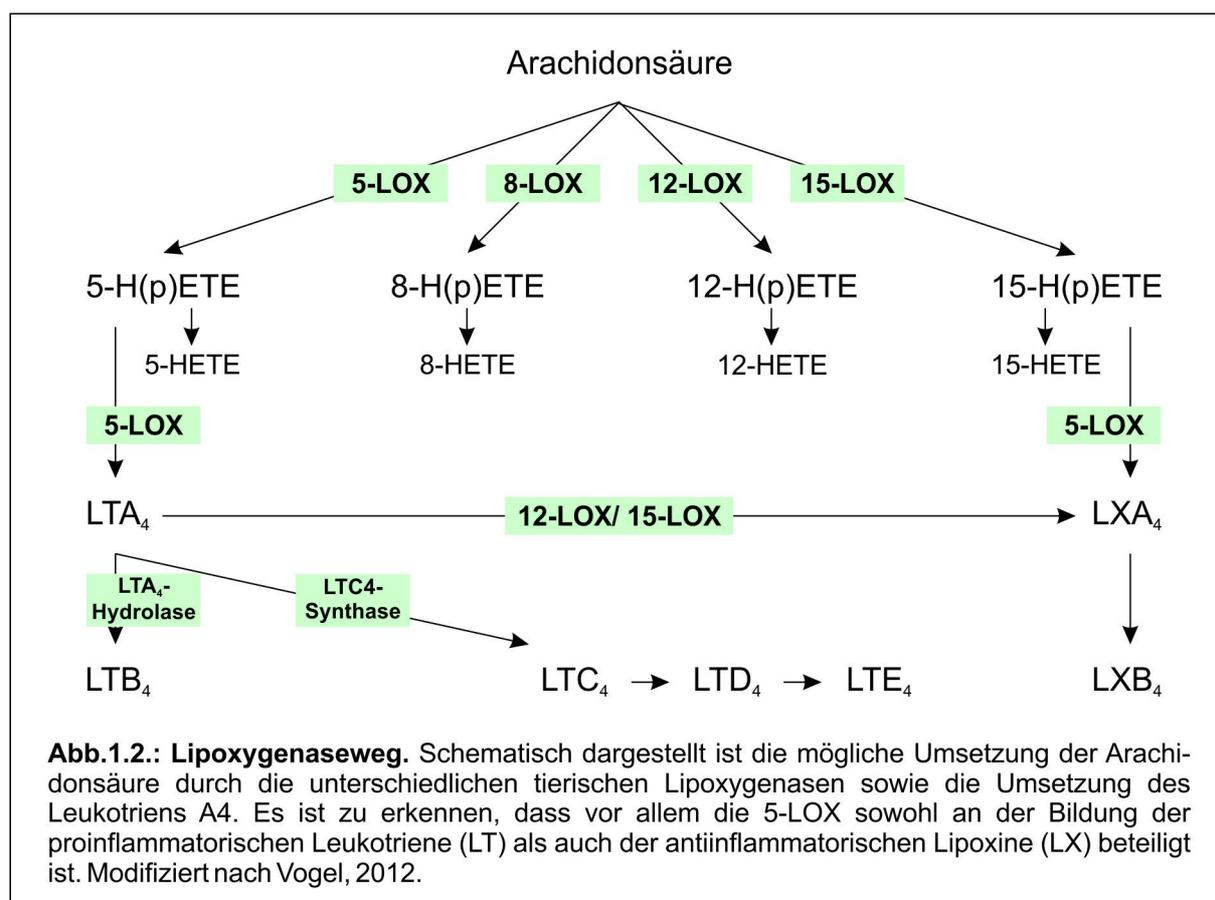
1.1.4.1 Der Lipoxygenaseweg im Zusammenhang mit Inflammation und Asthma bronchiale

Um den Einfluss der Lipoxygenasen auf verschiedene Krankheitsgeschehen zu verstehen, ist es notwendig, sich ihre Funktion vor Augen zu führen.

Die 5-LOX ist entscheidend in die Bildung von Leukotrienen involviert. Zunächst setzt sie Arachidonsäure zu dem instabilen Zwischenprodukt 5-H(p)ETE um. Dieses kann dann in einem weiteren Reaktionsschritt von der 5-LOX zu LTA₄ umgewandelt werden (Rouzer *et al.*, 1986). LTA₄ bildet den Ausgangspunkt für eine Reihe weiterer Leukotriene. So werden die Cysteinyl-Leukotriene durch die LTC₄-Synthase gebildet, LTB₄ entsteht durch die katalytische Aktivität der LTA₄-Hydrolase (Abb.1.2.).

Leukotriene gelten als proinflammatorisch und spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Asthmas (Duroudier *et al.*, 2009). Nicht ohne Grund sind sie schon seit über 70 Jahren als "slow reacting substance of anaphylaxis" bekannt (Samuelsson, 1983). So vermitteln sie unter anderem über die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege (Devchand *et al.*, 1996; Gronert *et al.*, 2001) die obstruktive Komponente des Asthmas und führen damit zu einem Abfall der Einsekundenkapazität (FEV₁), d.h. einer Einschränkung der ventilatorischen Flussreserve (Heise *et al.*, 2000). Die gesteigerte Gefäßpermeabilität und die daraus resultierende Plasmaextravasion (Mellor

et al., 2001; Thunnissen *et al.*, 2001) verschlechtern diese zusätzlich. Auch die sekretorische Komponente des Asthma bronchiale wird wesentlich von Leukotrienen mitbestimmt. Cysteinyl-Leukotriene steigern die Mukusproduktion der Becherzellen (Yu *et al.*, 1995) und führen über längere Zeit zu einer Becherzellhyperplasie (Kliwer *et al.*, 1995). Zusätzlich wird die Zilienbewegung des Bronchialepithels herabgesetzt (Devchand *et al.*, 1996). Auch die für Asthma charakteristische bronchiale Hyperreagibilität wird durch Cysteinyl-Leukotriene vermittelt (Thunnissen *et al.*, 2001). Über einen längeren Zeitraum bewirken sie den Umbau der Atemwege (Kliwer *et al.*, 1995). Die genannten Pathomechanismen dienen als Angriffspunkt für die Therapie des Asthma bronchiale. So ist in den USA Zileuton, ein Inhibitor der 5-LOX, zugelassen. Leukotrienrezeptorantagonisten, wie zum Beispiel Montelukast, sind vor allem in der frühen Phase des allergischen Asthmas eine gute Option und können auch beim Analgetika-Asthma eingesetzt werden (Mastalerz und Kumik, 2010).



Auch bei der Pathogenese der allergischen Rhinitis sind Leukotriene involviert. Allerdings spielen sie im Vergleich zum Histamin hierbei nur eine untergeordnete Rolle (He *et al.*, 1999).

Die 5-LOX entfaltet jedoch über ihre Beteiligung an der Biosynthese von Lipoxinen auch antiinflammatorische Wirkungen. So setzt sie zum einen 15-H(p)ETE, ein Produkt der 15-LOX-1 zu Lipoxin A₄ um. Auch dient das Produkt der 5-LOX, LTA₄, als Vorstufe zur Bildung von Lipoxin A₄. Dieser Schritt kann unter anderem durch verschiedene 12-LOXn katalysiert werden (Serhan *et al.*, 2008).

1.1.4.2 Kanzerogenese

Lipoxygenasen und ihren Produkten werden sowohl pro- als auch antikanzerogene Wirkungen zugeschrieben. Dies hängt zum einen von der Tumorart ab, zum anderen von der Lipoxygenaseform. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die 15-LOX-2 als auch die 8-LOX eine antikanzerogene Wirkung vermitteln (Pidgeon *et al.*, 2007). So zeigten Mäuse, die eine Gain-of-function Mutation im Bereich der 8S-LOX aufwiesen (8S-LOX Gen unter der Kontrolle des Loricrin-Promoters), besser differenzierte Karzinome der Haut als Mäuse in der Vergleichsgruppe. Außerdem konnte im Rahmen von *in vitro* Studien nachgewiesen werden, dass die Zugabe von 8-HETE, einem Produkt der 8S-LOX, zu einem Zellzyklusarrest führt (Kim *et al.*, 2005). Analoge Ergebnisse konnten für die murine epitheliale 12S-LOX gefunden werden, einem Enzym, das beim Menschen nicht exprimiert wird (Ivanov *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2002). Diese antikanzerogene Wirkung wird durch verschiedene molekulare Mechanismen vermittelt, bei denen ein Wachstumsarrest, eine Induktion der Zelldifferenzierung und eine Apoptoseinduktion im Vordergrund stehen (Pidgeon *et al.*, 2007).

Als prokarzinogen gelten die 5-LOX und die Plättchen-Typ 12-LOX. Diese Erkenntnis wird unter anderem daraus abgeleitet, dass die beiden Enzyme in der Regel in normalem Gewebe nicht oder nur gering exprimiert werden. In Tumorgewebe kann man dahingegen erhöhte Spiegel dieser Lipoxygenasen nachweisen (Pidgeon *et al.*, 2007). So zeigt sich in Prostatatumoren ein erhöhter Spiegel der 5-LOX im Vergleich zum Normalgewebe. Dabei konnte auch ein erhöhter Spiegel des Produktes 5-HETE nachgewiesen werden (Gupta *et al.*, 2001). Es bleibt jedoch unklar, ob die 5-LOX-Expression nicht lediglich Folge der karzinombegleitenden Entzündungsreaktion ist oder ob sie ursächlich mit der Karzinogenese zu tun hat.

Auch für Brustkrebs spielt die 5-LOX eine wichtige Rolle (Wang *et al.*, 2008). Dabei ist sie nicht nur für die Entstehung des Primärtumors von Relevanz, sondern auch für den Metastasierungsprozess (You *et al.*, 2009). Beim hepatozellulären Karzinom bewirkt die

5-LOX eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Diesem wird eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben. So fördert er die Angiogenese, hemmt die Apoptose und stimuliert die Zellproliferation (Zhao *et al.*, 2012).

Widersprüchliche Daten liegen zur Rolle der 15-LOX-1 beim Colon-Karzinom vor. So konnte in einer Studie mittels Western Blot eine erhöhte Expression der 15-LOX-1 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden (Ikawa *et al.*, 1999). Gegenteilige Ergebnisse konnten in einer anderen Studie erzielt werden. Hier wurde gezeigt, dass die Zugabe von 13S-HODE, einem Produkt der 15-LOX-1, in einem *in vitro* Zellmodell die Proliferation hemmt sowie Apoptose induziert (Shureiqi *et al.*, 1999). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass die 15-LOX-1 über PPAR γ -Aktivierung die Metastasierung verhindert und somit antikarzinogen wirkt (Il Lee *et al.*, 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bestimmte LOX-Isoformen wie die 5-LOX eher prokarzinogene Tendenzen zeigen, während andere wie die 8-LOX eher anti-karzinogen wirken (Steinhilber *et al.*, 2010; Pidgeon *et al.*, 2007). Eine einheitliche Theorie zur Rolle der LOXn bei der Karzinogenese gibt es bisher jedoch nicht.

1.1.4.3 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der Arterienwand, die als Ursache für eine Reihe von kardiovaskulären Komplikationen wie ischämischen Schlaganfall, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sowie die koronare Herzerkrankung (KHK) fungiert (Artenjak *et al.*, 2012). Ihren Ursprung hat die Atherosklerose in einem chronisch inflammatorischen Prozess der Arterien, der durch physikalische (z.B. turbulente Blutströmung) und chemische Veränderungen (z.B. Hypercholesterinämie) induziert wird (Weber und Noels, 2011). Durch die Infiltration von Entzündungszellen in betroffene Gefäßareale kommt es zur Überexpression der 5-Lipoxygenase, welche über die Bildung verschiedener Entzündungsmediatoren (LTB₄, LTC₄) die Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert, sodass weitere Entzündungszellen in die Arterienwand eindringen können (Funk, 2001; Mehrabian und Allayee, 2003; Spanbroek und Habenicht, 2003).

Traditionell wird dem Cholesterinstoffwechsel eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose zugeschrieben. So finden sich bereits in den frühen subendothelialen Läsionen fettbeladene Makrophagen (Schaumzellen), die aus den transmigrierten Monozyten hervorgegangen sind. Die Schaumzellen entstehen durch

die unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem Low Density Lipoprotein (LDL) über Scavenger-Rezeptoren. Dabei ist zu berücksichtigen, dass oxidiertes LDL für eine Hochregulation der Scavenger-Rezeptoren sorgt (Yoshida und Kisugi, 2010). Dieser positive Feedback-Mechanismus verstärkt die intrazelluläre Lipidablagerung in den Schaumzellen. Schaumzellen haben eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit und sind damit nicht mehr in der Lage, den Subendothelialraum der Arterien zu verlassen. Sie sammeln sich in diesem Reaktionsraum an, sterben ab und lagern das internalisierte Lipid im Extrazellulärraum ab. Es folgt die Einwanderung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten und damit eine Fibrosierung der Arterienwand. Im weiteren Verlauf kann es zu einer Kalzifizierung der Läsionen kommen (Lusis, 2000). Mehrere Studien belegen, dass zumindest in frühen Stadien der Atherogenese eine katalytisch aktive 15-LOX in atherosklerotischen Gefäßläsionen vorkommt (Ylä-Herttuala *et al.*, 1990). Das Auftreten spezifischer 15-LOX Produkte in einem Tiermodell (Cholesterolfüttertes Kaninchen) steht in zeitlichem Zusammenhang mit den beobachteten Lipidablagerungen in der Gefäßwand (Kühn *et al.*, 1994). In frühen menschlichen Läsionen konnten ebenfalls spezifische 15-LOX Produkte nachgewiesen werden (Cathcart und Folcik, 2000; Kühn *et al.*, 1997). Durch ihre Fähigkeit, Lipoproteine zu oxidieren, können Lipoxygenasen einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose nehmen. So stieg die Anzahl atherosklerotischer Plaques bei endothel-spezifischer Überexpression einer 12/15-LOX signifikant an (Harats *et al.*, 2000). Wird hingegen im Rahmen von Knock-out-Versuchen das Gen für die 12/15-LOX ausgeschaltet bei gleichzeitigem Knock-out des LDL-Rezeptors, zeigt sich eine geringere Rate an atherosklerotischen Plaques (George *et al.*, 2001). Allerdings konnten auch gegenteilige Ergebnisse erzielt werden. So zeigte eine 12/15-LOX-Überexpression in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen eine Schutzfunktion gegen Atherosklerose (Merched *et al.*, 2008). Es lässt sich also schlussfolgern, dass 12/15-LOXn sowohl proatherogene als auch antiatherogene Wirkung entfalten können (Wittwer und Hersberger, 2007).

1.1.4.4 Sonstige Wirkungen

Neben ihrer Rolle in inflammatorischen Geschehen, der Kanzerogenese sowie der Atherogenese sind Lipoxygenasen in diverse andere Prozesse involviert. So inhibiert die Retikulozyten-Typ 15-LOX die Atmungskette und trägt somit zur Ausreifung der Retikulozyten bei (Rapoport *et al.*, 1982; Schewe *et al.*, 1986). Die 15-LOX der Maus ist entscheidend an der Spermatogenese beteiligt. Knock-out Mäuse, bei denen das

Alox15-Gen ausgeschaltet war, produzierten morphologisch auffällige Spermatozoen (Moore *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zebrafisch 12S-LOX wichtig für die Embryogenese ist. Zebrafische, deren 12S-LOX-Gen ausgeschaltet war, wiesen unter anderem eine abnorme neuronale Entwicklung sowie eine fehlerhafte Augenanlage und Perikardergüsse auf (Haas *et al.*, 2011). Die 12R-LOX und die Epidermis-Typ LOX (eLOX-3) fördern die Differenzierung von Keratinozyten und Adipozyten der Haut (Fürstenberger *et al.*, 2007). Wird das Gen der 12R-LOX bei Mäusen ausgeschaltet, versterben diese nach normaler Entwicklung *in utero* kurz nach der Geburt aufgrund von Dehydratation. Die 12R-LOX ist demnach wichtig für die Ausbildung der epithelialen Barriere (Epp *et al.*, 2007). Dass diese Lipoxygenase für die Differenzierung der Epidermis vorrangig ist, konnte durch molekulare Untersuchung an einem an Ichthyose erkrankten Patientenkollektiv bestärkt werden (Eckl *et al.*, 2009). An 12/15-LOX defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass ebendiese LOX und ihre Produkte eine antifibrotische Wirkung bei der dermalen Fibrose zeigen (Krönke *et al.*, 2012).

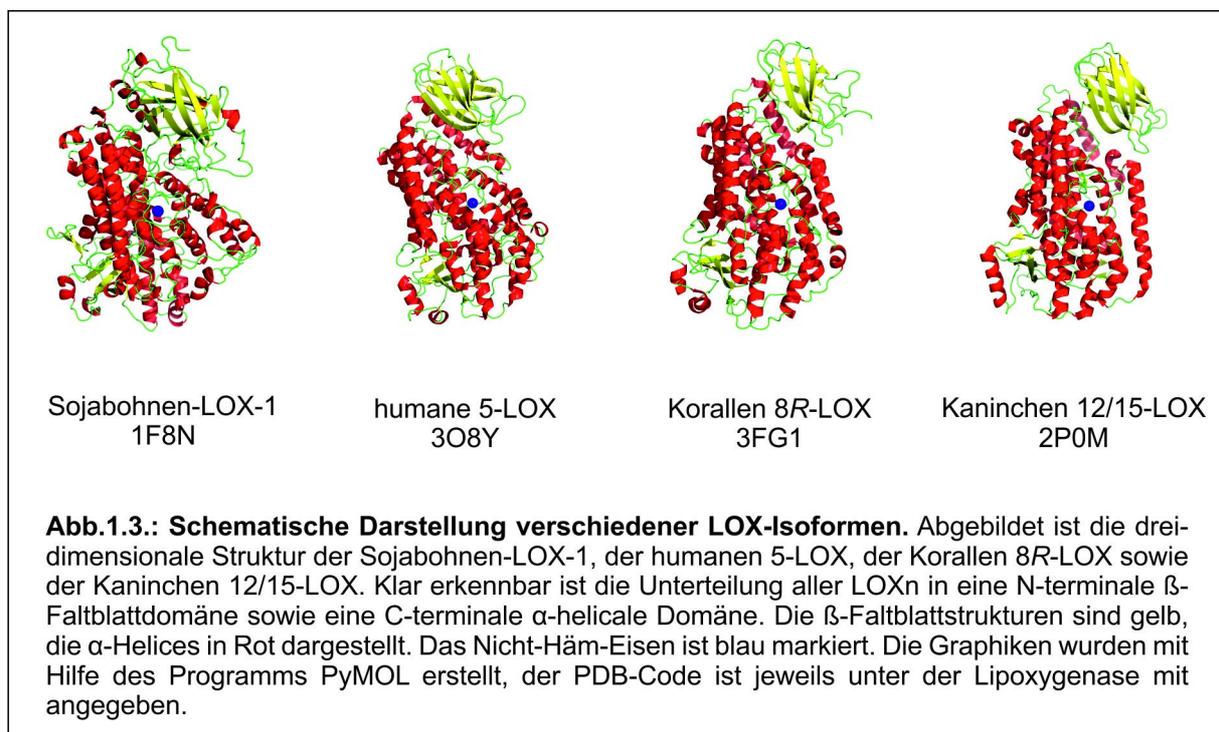
1.2 Strukturelle Grundlagen der Lipoxygenase-Reaktion

1.2.1 Kristall- und Primärstruktur

Zwar sind Lipoxygenasen seit über 80 Jahren bekannt, doch gelang es erst in den 1990er Jahren, die Raumstruktur einer Lipoxygenase aufzuklären (Boyington *et al.*, 1993). Die Qualität der Strukturdaten der Sojabohnen-LOX-1 konnte wenige Jahre später von 2,6 Å auf 1,4 Å verbessert werden (Minor *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, dass diese Lipoxygenase aus zwei unterschiedlichen Domänen besteht. So teilt sich die 839 Aminosäuren große Lipoxygenase in einen vornehmlich aus β -Faltblättern bestehenden N-terminalen Anteil mit 146 Aminosäuren und ein vorwiegend aus α -Helices bestehendes C-terminales Peptid mit 693 Aminosäuren auf. Dabei beinhaltet die C-terminale Domäne das katalytische Eisen (Boyington *et al.*, 1993; Minor *et al.*, 1996). 1997 folgte die Strukturaufklärung der ersten tierischen Lipoxygenase. Die Kristallisation der 12/15-LOX des Kaninchens gelang im Komplex mit dem Inhibitor RS7 bei einer Auflösung von 2,4 Å (Gillmor *et al.*, 1997). In den folgenden Jahren wurden noch andere tierische LOXn hinsichtlich ihrer 3D-Struktur aufgeklärt. Die zugehörigen Strukturdaten sind in der öffentlichen Proteindatenbank PDB hinterlegt. Im Jahre 2011 gelang die Darstellung der rekombinanten humanen 5-LOX (Gilbert *et al.*, 2011). Da das

native Enzym instabil ist und während der Kristallisation inaktiviert, wurde für den Kristallisationsprozess eine stabile Enzymchimäre aus humaner 5-LOX und Korallen 8R-LOX (Oldham *et al.*, 2005) hergestellt.

Wie schon bei der Sojabohnen-LOX-1 zeigte sich auch bei den tierischen Lipoxygenasen ein zweigeteilter Aufbau. So gliedern sich alle bisher kristallisierten LOXn in eine katalytisch aktive C-terminale und eine N-terminale Domäne. Allerdings sind die tierischen Lipoxygenasen deutlich kleiner als pflanzliche Enzyme. So besteht z.B. die humane 5-LOX aus 673, die 12/15-LOX des Kaninchens aus 663 Aminosäuren (Gilbert *et al.*, 2011; Gillmor *et al.*, 1997).



Insgesamt besitzen die tierischen Lipoxygenasen eine zylindrische Form, wohingegen die Sojabohnen-LOX-1 eher einem Ellipsoid ähnelt. Auch die Korallen 8R-LOX, die eine Sequenzhomologie von 40% zur humanen 5-LOX aufweist, kann als Zylinder dargestellt werden (Abb.1.3.).

1.2.2 Die N-terminale Domäne

Die Strukturdaten aller bisher kristallisierten Lipoxygenasen zeigen, dass die N-terminale Domäne vornehmlich aus β -Faltblättern besteht. Die Länge variiert zwischen 110 und 146 Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne der 15-Lipoxygenase strukturell der C2-Domäne humaner Lipasen ähnelt. Da diese für ihre Membranbindungseigenschaften bekannt ist, wurde angenommen, dass die N-

terminale Domäne der Lipoxygenasen ähnliche Wirkung hat (Chahinian H. *et al.*, 2000). Im Rahmen von Trunkationsexperimenten konnte diese Eigenschaft für verschiedene LOX-Isoformen wie die Kaninchen 12/15-LOX oder die humane Plättchen-Typ 12-LOX auch nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich allerdings lediglich eine Reduktion der Membranbindung, eine Aufhebung dieser Eigenschaft konnte nicht erzielt werden (Aleem *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2002). Für die humane 5-LOX konnte in Versuchen, in denen sie mit grün fluoreszierendem Farbstoff markiert war, gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne essentiell für die Bindung an Kernmembranen ist. Diese Bindung kann durch Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle getriggert werden (Chen und Funk, 2001). Dabei konnte festgestellt werden, dass in der N-terminalen Domäne eine Ca^{2+} -Bindedomäne lokalisiert ist, welche unter anderem drei oberflächenexponierte Tryptophane enthält. Gezielte Mutation dieser Tryptophane führte zu einer herabgesetzten Membranbindung (Kulkarni *et al.*, 2002). Zudem kann die katalytische Aktivität der humanen 5-LOX durch Ca^{2+} -Zugabe gesteigert werden (Hammarberg *et al.*, 2000). Anders als die 5-Lipoxygenase zeigt die Kaninchen 12/15-LOX keine spezielle Ca^{2+} -Bindedomäne. Dennoch ist eine Membranbindung nur bei Ca^{2+} -Zugabe möglich. Vermutet wird eine Ladungsmaskierung (Brinckmann *et al.*, 1998; Walther *et al.*, 2004).

Neben den Membranbindungseigenschaften wird der N-terminalen Domäne eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität zugeschrieben. Dies konnte experimentell bestätigt werden. Allerdings scheint die Wirkung bei verschiedenen Lipoxygenasen unterschiedlich zu sein. So zeigt die durch limitierte Proteolyse der Sojabohnen-LOX-1 geschaffene "Mini-LOX" eine gesteigerte Aktivität, was z.B. auf eine erleichterte Substratbindung zurückzuführen sein könnte (Maccarrone *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu besitzen die gentechnisch trunktierten Varianten der Kaninchen 12/15-LOX sowie der humanen Plättchen-Typ 12-LOX eine verringerte katalytische Aktivität (Aleem *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2002).

Die N-terminale Domäne der Sojabohnen-LOX-1 ist über eine 2600 \AA^2 Kontaktfläche mit der C-terminalen Domäne verbunden. Dahingegen ist die Kontaktfläche der Kaninchen 12/15-LOX lediglich 1600 \AA^2 groß, was schwächere Bindungskräfte zwischen den beiden Domänen vermuten lässt (Gillmor *et al.*, 1997).

1.2.3 Die C-terminale Domäne

In der C-terminalen Domäne finden sich das katalytisch wirksame Nicht-Häm-Eisen sowie die hydrophobe Substratbindetasche. Sie besteht zu einem großen Teil aus α -

Helices. Die Anzahl dieser variiert zwischen den einzelnen Enzymen. So enthält die Sojabohnen-LOX-1 20 α -Helices. Diese sind parallel und/oder antiparallel ausgerichtet und gruppieren sich um die zentrale Helix 9 (Minor *et al.*, 1996). Die katalytische Domäne der Kaninchen 12/15-LOX unterteilt sich in 21 Helices, die durch ein β -Faltblattmotiv unterbrochen sind (Gillmor *et al.*, 1997). Ähnlich stellt sich auch die Korallen 8R-LOX mit ihren 23 Helices sowie die humane 5-LOX mit 26 Helices dar (Gilbert *et al.*, 2011; Neau *et al.*, 2009) (Abb.1.3.).

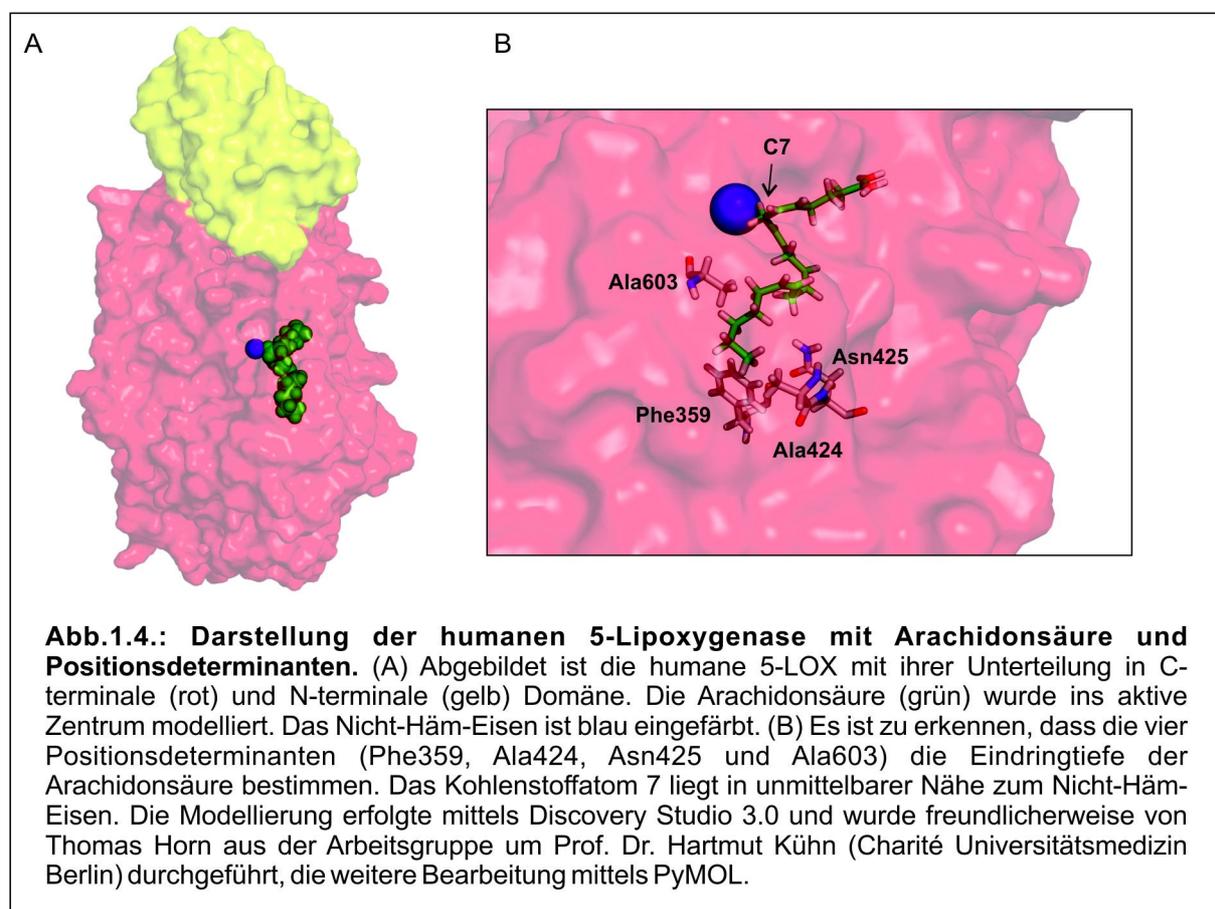
Das katalytische Nicht-Häm-Eisen wird in allen LOX-Isoformen sechsfach ligandiert (oktaedrische Ligandensphäre). Dazu dienen fünf Aminosäureseitenketten sowie mit großer Wahrscheinlichkeit ein Hydroxidion, welches bei der initialen Wasserstoffabstraktion eine Rolle spielt (Ivanov *et al.*, 2010). Bei der humanen 5-Lipoxygenase dienen drei konservierte Histidine (His367, His372 und His550), das terminale Isoleucin (Ile673) und ein Asparagin (Asn554) als Proteinliganden. Als Besonderheit weist die humane 5-LOX eine relative kurze Helix 2 auf, welche zudem so orientiert ist, dass sie den Zugang zum katalytischen Eisen erschwert. Daraus resultiert eine besonders geformte Substratbindetasche (Gilbert *et al.*, 2011).

Auch in der Sojabohnen-LOX-1 ist das Nicht-Häm-Eisen durch drei Histidine, ein Asparagin sowie das terminale Isoleucin ligandiert (Boyington *et al.*, 1993; Minor *et al.*, 1996), wohingegen die Kaninchen 12/15-LOX vier Histidine und das terminale Isoleucin als Eisen-Liganden aufweist (Gillmor *et al.*, 1997).

1.2.3.1 Die Substratbindetasche

Die Substratbindetasche zeigt bei verschiedenen Lipoxygenasen unterschiedliche Formen. So besitzt die Sojabohnen-LOX-1 zwei Hohlräume, die in der Nähe des Nicht-Häm-Eisens aufeinandertreffen. Dem ersten Hohlraum wird die Funktion eines Sauerstofftunnels zugeschrieben, wohingegen der zweite Hohlraum als Substratbindetasche fungiert und sich nochmals in zwei Untereinheiten aufgliedert (Boyington *et al.*, 1993). Die Besonderheit der Substratbindetasche der Kaninchen 12/15-LOX besteht darin, dass sie zwei unterschiedliche Konformationen annehmen kann. So zeigt sie eine "entspannte" Form, wenn kein Ligand gebunden ist, und eine "kondensierte" Form, wenn ein Ligand gebunden ist. Während bei der "entspannten" Form die Substratbindetasche flach und trichterförmig ist, zeigt die "kondensierte" Form eine gebogene und tiefere Substratbindetasche. Der Grund dafür ist in einem Leucin der Helix 18 (Leu597) zu finden. In der ligandenfreien Form ragt die Seitenkette des

Leucins ins aktive Zentrum und begrenzt somit dessen Tiefe. Mit der Ligandenbindung schwingt die Helix 18 um etwa 6 Å zur Seite und gibt somit die restliche Substratbindetasche frei (Choi *et al.*, 2008). Den eigentlichen Boden der Substratbindetasche bilden die Aminosäuren Phe353, Ile418, Met419 und Ile593. Der Ausgang an der Proteinoberfläche wird durch ein Arginin (Arg403) gesäumt. Man geht davon aus, dass die Guanidinogruppe des Arginins mit der Carboxygruppe der Arachidonsäure interagiert (Gillmor *et al.*, 1997). Bei der Korallen 8R-LOX findet sich ein U-förmiger Tunnel, welcher den Zugang zum Nicht-Häm-Eisen von zwei Seiten erlaubt. An den beiden Ausgängen des Tunnels ist jeweils ein Arginin lokalisiert, welches mit der Carboxygruppe der Arachidonsäure interagieren könnte (Neau *et al.*, 2009).



Das aktive Zentrum der humanen 5-LOX zeigt eine längliche Form. Die beiden Enden werden durch ein Tryptophan (Trp147) auf der einen Seite und ein Tyrosin sowie Phenylalanin (Tyr181, Phe177) auf der anderen Seite verschlossen. Vermutlich sorgt eine Verschiebung des Tryptophans für die Freigabe der Substratbindetasche und die nachfolgende Substratbindung. Dabei kann die Arachidonsäure mit dem Methylende

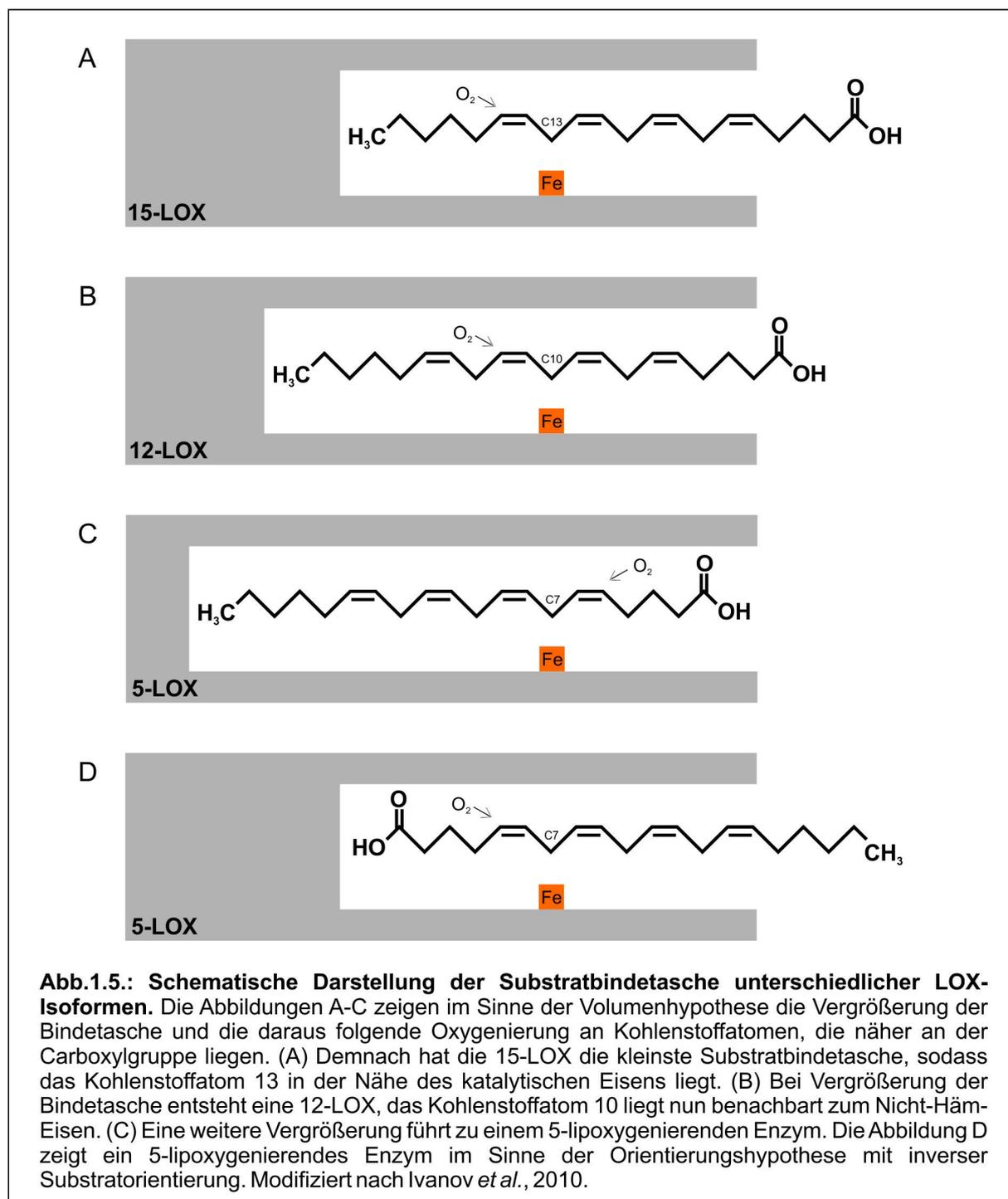
voran ins aktive Zentrum gelangen, die Carboxylgruppe kann mit einem Lysin-Seitenrest interagieren, der dem Arginin-Seitenrest 403 in der Kaninchen 12/15-LOX entspricht (Abb.1.4.). Der hydrophobe Charakter der Substratbindetasche wird durch vier konservierte Leucine sowie ein Isoleucin (Leu368, Leu373, Leu414, Leu607, Ile406) bedingt (Gilbert *et al.*, 2011).

1.2.4 Grundlagen der Positionsspezifität

Da derzeit noch keine Strukturdaten von Enzym-Substrat-Komplexen von Wildtyp-LOXn publiziert wurden, können bisher noch keine definitiven Aussagen über die strukturelle Basis der unterschiedlichen Positionsspezifitäten von LOXn gemacht werden. Zwar existieren Daten zu einer pseudophosphorylierten Mutante der humanen 5-LOX im Komplex mit Arachidonsäure (Gilbert *et al.*, 2011), doch ist die Auflösung nicht ausreichend, um definitive Aussagen über die Orientierung der Arachidonsäure zu treffen. Zudem ist nicht klar, ob es sich um einen produktiven Komplex handelt und wie die Orientierung der Arachidonsäure im Wildtyp wäre.

Trotz der mangelnden Strukturdaten der Wildtyp-LOXn im Komplex mit ihrem Substrat existieren aufgrund von Mutagenese-Experimenten einige Theorien zur Positionsspezifität. Das Triadenkonzept der Positionsspezifität wurde für die Kaninchen 12/15-LOX entwickelt. Grundlegender Gedanke dabei ist, dass die Arachidonsäure mit ihrem Methylende voran in die Substratbindetasche eindringt, während die Carboxygruppe in Wechselwirkung mit einer basischen Aminosäure (Arg403) am Eingang der Substratbindetasche tritt. Die Tiefe der Substratbindetasche bestimmt, welches Kohlenstoffatom in die Nähe des katalytischen Eisens gelangt und somit, wo die Wasserstoffabstraktion stattfindet. Drei Aminosäuren (Phe353, Ile418 und Ile593), die sich am Boden der Substratbindetasche befinden, definieren deren Tiefe. Durch Austausch dieser Aminosäuren gegen weniger raumfüllende Aminosäuren konnte eine Verschiebung der Positionsspezifität hin zur 12-Lipoxygenierung hervorgerufen werden. Der Grund wird darin gesehen, dass die Bindetasche durch den Austausch größer wird und dadurch die Arachidonsäure tiefer in eben diese eindringen kann. So kann das Kohlenstoffatom 10 in die Nähe des Nicht-Häm-Eisens gelangen und die Sauerstoffinsertion am C12 stattfinden. Wenn umgekehrt bei 12-lipoxygenierenden Enzymspezies größere Aminosäuren an diesen Stellen eingesetzt werden, lässt sich die Positionsspezifität vermehrt in Richtung 15-Lipoxygenierung verschieben. Das kann damit erklärt werden, dass die Arachidonsäure nicht mehr so tief ins aktive Zentrum

gelangen kann und somit das Kohlenstoffatom 13 dem Nicht-Häm-Eisen am nächsten ist. Diese Theorie konnte durch Strukturdaten der Kaninchen 12/15-LOX mit einem Inhibitor untermauert werden (Borngräber *et al.*, 1999; Gillmor *et al.*, 1997). Die Volumenhypothese besagt demnach, dass die Größe der Substratbindetasche der definierende Faktor für die Positionsspezifität der Lipoxygenasen ist (Abb.1.5.) (Browner *et al.*, 1998).



In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die Volumenhypothese auch auf andere LOXn anwendbar ist. So gilt sie auch für die humane 12/15-LOX (Sloane *et al.*, 1991, 1995), die 12/15-LOX des Rhesusaffen und des Orang-Utan (Vogel *et al.*, 2010), die 12/15-LOX des Schweins (Suzuki *et al.*, 1994) sowie teilweise für die humane 12-LOX vom Plättchentyp. Auf andere humane LOX-Isoformen (15-LOX-2, 12R-LOX) ist das Konzept jedoch nicht anwendbar (Vogel *et al.*, 2010).

Da Strukturmodellierungen zeigten, dass die Bindetasche der 5-Lipoxygenasen knapp 20 % größer ist als die der Kaninchen 12/15-LOX (Gillmor *et al.*, 1997), wurde versucht, die Volumenhypothese auch auf die 5-LOXn zu übertragen. Zwar gelang es nicht, durch ortsgeringe Mutagenese die humane 12/15-LOX in eine 5-LOX umzuwandeln, doch konnte umgekehrt aus der humanen 5-Lipoxygenase ein Enzym mit vorwiegender 15-Lipoxygenierungsaktivität erzeugt werden. Durch Austausch der Aminosäuren Phe353, Ala424, Asn425 und Ala603 der humanen 5-LOX gegen größere Aminosäuren konnte das Produktspektrum fast vollständig zu 15-HETE verschoben werden. In Analogie zu den 12/15-LOXn wird auch hier davon ausgegangen, dass die Substratbindetasche so weit verkleinert wurde, dass das Kohlenstoffatom 13 in die Nähe des Nicht-Häm-Eisens gelangen konnte und somit die Oxygenierung an C15 favorisiert wird (Schwarz *et al.*, 2001).

Als Problem stellt sich allerdings die Tatsache dar, dass das 15-HETE vornehmlich S-konfiguriert ist. Der Wildtyp der humanen 5-LOX stellt als Hauptprodukt 5S-HETE her. Nach der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention liegt der proS-Wasserstoff des C7 auf der selben Seite der Doppelbindungsebene wie die proR-Wasserstoffe vom C10 und C13 (Cahn *et al.*, 1966). Dies gilt für die Konfiguration der Arachidonsäure, bei der alle bisallylständigen Methylengruppen zur gleichen Seite orientiert sind. Unter der Annahme, dass die Sauerstoffinsertion immer von der selben Seite her stattfindet, würde man für durch ein ehemals 5-lipoxygenierendes Enzym hergestelltes 15-HETE eine R-Konfiguration erwarten. Eine mögliche Erklärung für die Bildung von 15S-HETE könnte in der hohen strukturellen Flexibilität der Arachidonsäure begründet sein (Browner *et al.*, 1998).

Einen alternativen Ansatz bietet die Theorie der inversen Substratorientierung (Orientierungshypothese). Sie geht davon aus, dass sowohl in 12- als auch in 15-LOXn die Arachidonsäure mit dem Methylende voran in die Substratbindetasche gelangt, wohingegen sie bei 5-LOXn mit der Carboxylgruppe in die Bindetasche eindringt (Abb.1.5.). Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Produktion von S-Enantiomeren

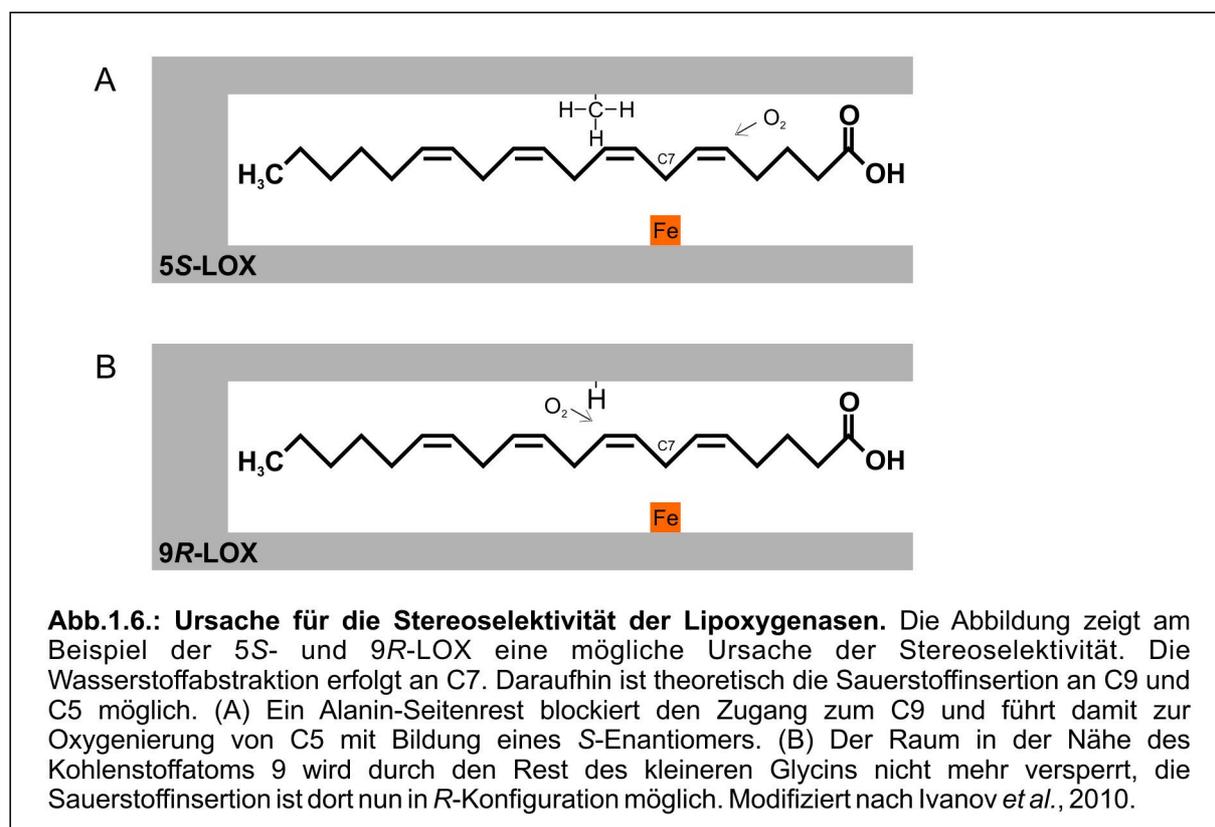
durch 5-LOXn unter der Annahme, dass die Wasserstoffabstraktion von der selben Seite geschieht wie bei 12- und 15-LOXn (Prigge *et al.*, 1997). Allerdings müsste dafür eine hohe Energie aufgebracht werden, da eine polare Gruppe (COO^-) in eine hydrophobe Umgebung eingebracht werden soll, was als thermodynamisch schwierig zu werten ist (Browner *et al.*, 1998). Diese Problematik konnte bei der Umwandlung der Gurken 13-LOX in ein Enzym mit hauptsächlichlicher 9-Lipoxygenierung umgangen werden, indem durch ortsgerichtete Mutagenese der polare Rest des Arg758 in der Substratbindetasche demaskiert werden konnte. Somit konnte die inverse Substratorientierung erleichtert werden (Hornung *et al.*, 1999), da am Boden der Substratbindungstasche eine positive Ladung verfügbar war, die mit der dissoziierten Carboxylgruppe der Substratfettsäure interagieren konnte. Auch für die Kaninchen 12/15-LOX konnte anhand von Arachidonsäurederivaten wahrscheinlich gemacht werden, dass eine inverse Substratorientierung zu einer 5-Lipoxygenierung führt (Walther *et al.*, 2001). Für eine pseudophosphorylierte Mutante an Ser663 der humanen 5-LOX liegen Hinweise vor, die die Theorie der inversen Substratorientierung unterstützen. Bisher noch nicht bestätigte Untersuchungen an der humanen 5-LOX deuten darauf hin, dass die S663D Mutante 15S-HETE als Hauptprodukt bildet. Ausgehend von der Annahme, dass der Wildtyp Arachidonsäure umsetzt, die mit der Carboxylgruppe voran in das aktive Zentrum eindringt, spricht die 15-Lipoxygenierung durch das pseudophosphorylierte Enzym dafür, dass in diesem Fall die Arachidonsäure mit dem Methylenende zuerst in das aktive Zentrum gelangt. Des Weiteren kann diese Mutante auch NAGly umsetzen, also Arachidonsäure, welche über eine Säureamidbindung mit einem Glycin verknüpft ist. Aufgrund der sperrigen "Kopfgruppe" ist das Eindringen mit der Carboxylgruppe voran in die Substratbindetasche des Wildtyps kaum mehr möglich und somit der Umsatz sehr gering. Die unterschiedliche Orientierung der Arachidonsäure im Wildtyp und der pseudophosphorylierten Mutante wird auf die veränderte Rigidität des Enzyms zurückgeführt (Gilbert, 2011). Dahingegen konnte ein an beiden Enden carboxyliertes Arachidonsäurederivat von der humanen 5-Lipoxygenase nicht umgesetzt werden, was wiederum darauf hindeutet, dass die inverse Substratorientierung (Eintauchen der Fettsäure mit der Carboxylgruppe in das aktive Zentrum) für 5-LOXn nicht möglich ist (Walther *et al.*, 2001). Aufgrund von fehlenden direkten Strukturdaten für Wildtyp-LOX-Fettsäurekomplexe und mit Blick auf die gegensätzlichen Interpretationen von indirekten experimentellen Daten lassen sich derzeit noch keine definitiven Schlussfolgerungen zur Substratorientierung am aktiven

Zentrum von 5-LOXn machen.

1.2.5 Grundlagen der Stereospezifität

Lipoxygenasen zeichnen sich nicht nur durch ihre hohe Positionsspezifität aus, sondern auch durch eine stereoselektive Sauerstoffinsertion. So ist es nach der Wasserstoffabstraktion von einer doppelallylständigen Methylengruppe und der nachfolgenden Radikalumlagerung möglich, molekularen Sauerstoff an zwei unterschiedlichen Positionen einzuführen ([+2] und [-2] Verschiebung des radikalischen Elektrons). An jeder dieser beiden Positionen besteht wieder eine duale Möglichkeit der Sauerstoffinsertion. So kann sowohl nach einer [+2] als auch einer [-2] Radikalverschiebung der Sauerstoff in *S*- oder in *R*-Konfiguration an den sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff eingeführt werden. Damit ergeben sich bei der Wasserstoffabstraktion von einer bisallylständigen Methylengruppe vier prinzipielle Reaktionsprodukte (Produktisomere), die im Falle der nichtenzymatischen Fettsäureoxygenierung zu etwa gleichen Teilen gebildet werden. Lipoxygenasen hingegen steuern die Stereochemie der Oxygenierungsreaktion dahingehend, dass hauptsächlich ein definiertes Produktisomer gebildet wird. Im Falle der 5-Lipoxygenasen handelt es sich hierbei um die Wasserstoffabstraktion vom C7 und die nachfolgende Insertion von Sauerstoff an C5 ([-2] Verschiebung des radikalischen Elektrons) in *S*-Konfiguration. Bei einer theoretischen [+2] Radikalverschiebung würde das entsprechende *9R*-Hydroperoxid entstehen. In ähnlicher Weise ist bei einer Wasserstoffabstraktion vom C10 eine *8R*- bzw. *12S*- oder eine *8S*- bzw. *12R*- und bei einer Wasserstoffabstraktion vom C13 eine *11R*- bzw. *15S*-Konfiguration möglich. Um die Grundlagen für die unterschiedliche Enantioselektivität von LOXn herauszufinden, wurden die Primärstrukturen verschiedenster Lipoxygenasen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass LOXn, welche *S*-konfigurierte Produkte erzeugen, an einer bestimmten Stelle ihrer Primärstruktur ein Alanin tragen. An dieser Stelle fand sich bei *R*-LOXn jedoch ein Glycin. Um dieses Konzept zu bestätigen, wurde versucht, *R*-LOXn durch ortsgerichtete Mutagenese in *S*-LOXn umzuwandeln, indem das Gly in ein Ala geändert wurde. So ließ sich die Korallen *8R*-LOX durch Austausch von Gly428 gegen Alanin in ein fast vollständig *12S*-lipoxygenierendes Enzym umwandeln (Coffa und Brash, 2004). Auch die humane 15-LOX-2 konnte von einem *15S*-lipoxygenierenden Enzym durch die Mutation A416G zur Bildung von *11R*-HETE als Hauptprodukt veranlasst werden (Coffa und Brash, 2004; Jansen *et al.*, 2011). Auf der Grundlage

dieser Experimente wurde postuliert, dass die zusätzliche Methylgruppe des Alanins den Zugang des Sauerstoffs zur *R*-Position des Pentadiens versperrt und somit die Sauerstoffinsertion in *S*-Position erfolgen muss. Das kleinere Glycin hingegen könnte den Zugang zur *R*-Position ermöglichen (Abb.1.6.). Genauere Strukturanalysen an der Korallen 8*R*-LOX legen die Vermutung nahe, dass das Alanin bzw. Glycin mit der Seitenkette eines Leucins (Leu432) interagiert und somit den Zugang versperrt bzw. freigibt. So bewirkt Gly428, dass die Seitenkette des Leu432 die 12*S*-Position abschirmt. Die Änderung zum Ala428 führt zu einer Umlagerung des Leucin-Restes und einer konsekutiven Abschirmung der 8*R*-Position. Zwar konnte diese Theorie durch ortgerichtete Mutagenese des Leu432 bestätigt werden, doch ist dabei kritisch zu betrachten, dass die spezifische Aktivität der erzeugten Mutanten bis auf eine Ausnahme unter 5% des Wildtyps lag (Neau *et al.*, 2009).



Vor kurzem konnte das Produktspektrum der Zebrafisch 12-LOX analysiert werden. Die Primärstruktur dieser LOX ließ aufgrund des Glycins an der kritischen Position ein 12*R*-lipoxygenierendes Enzym vermuten. Es zeigte sich allerdings, dass das Produkt zu 96% *S*-konfiguriert war. Das Ala-Gly-Konzept scheint für diese LOX-Isoform also nicht anwendbar zu sein. Ein entsprechender Ala-Gly Austausch bei der humanen 12/15-LOX zeigte nur geringfügige Veränderungen in der Enantioselektivität des Enzyms, so dass

man davon ausgehen kann, dass andere bisher nicht näher identifizierte Faktoren für diese Enzymeigenschaft bedeutsam sind (Jansen *et al.*, 2011). Damit bleibt die Frage nach einem universal anwendbaren Konzept für die Stereoselektivität von Lipoxygenasen also weiterhin unbeantwortet.

1.3 Ziel der Arbeit

Verschiedene Lipoxygenasen haben durch ihre unterschiedlichen Produkte großen Einfluss auf diverse biologische Funktionen. Dabei bestimmt die Positionsspezifität das Muster der Reaktionsprodukte. Allerdings ist die Datenlage zu den strukturellen Grundlagen der Positionsspezifität von Lipoxygenasen noch unzureichend, sodass keine allgemeine Theorie zu dieser Fragestellung existiert. Durch multiple Mutageneseuntersuchungen konnten für tierische Lipoxygenasen Spezifitätsdeterminanten identifiziert werden, welche durch die Geometrie ihrer Aminosäureseitenketten die Tiefe der Substratbindetasche definieren. Ihr Austausch führt zu Veränderungen in der Größe und Form der Bindetasche und somit zu einer anderen Lage der Substratfettsäure. Diese Arbeit verfolgte das Ziel, die Relevanz der bisher identifizierten Sequenzdeterminanten der Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen für die murine 5-Lipoxygenase zu überprüfen. Damit sollte geklärt werden, welches der derzeit existierenden Konzepte zur Substratspezifität von 5-Lipoxygenasen (Volumenhypothese vs. Orientierungshypothese) für diese Isoform zutrifft.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob noch zusätzliche, bisher nicht identifizierte, Sequenzdeterminanten für die Reaktionsspezifität der murinen 5-Lipoxygenase bedeutsam sind und ob Pseudophosphorylierungsmutanten des Enzyms eine signifikante 15-LOX Aktivität aufweisen, wie das für das menschliche Enzym postuliert wurde.

Für die biologische Wirkung der Lipoxygenase-Produkte spielt neben der Positionsauch die Stereoselektivität eine entscheidende Rolle. So werden *S*- von *R*-lipoxygenierenden Enzymen unterschieden. Durch Aminosäureabgleiche sowie Mutagenesestudien konnte eine Determinante identifiziert werden, welche eine Rolle für die Stereoselektivität spielt. So zeigen die meisten *S*-Lipoxygenasen an einer kritischen Stelle ein Alanin, wohingegen *R*-Lipoxygenasen dort ein Glycin aufweisen. Die Bedeutung dieser Determinante für die murine 5-LOX sollte als weiterer Teil dieser Arbeit untersucht werden.

Strukturanalysen haben ergeben, dass sich LOXn in einen C-terminalen α -helikalen Bereich sowie einen N-terminalen Bereich mit vorwiegender β -Faltblattstruktur untergliedern. Während der C-Terminus für die katalytische Aktivität wesentlich ist, wird

dem N-Terminus ein Einfluss auf die Membranbindung sowie die Regulation der katalytischen Aktivität zugeschrieben. Im Rahmen der Expression von Trunktionsmutanten der murinen 5-LOX, die nur noch aus der C-terminalen Domäne bestehen, sollte die Rolle der N-terminalen Domäne für die Membranbindung und für die katalytische Aktivität getestet werden. Die erhobenen Daten sollen das Verständnis der Funktion der N-terminalen β -Faltblattdomäne verbessern.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Promega, Mannheim
Ampicillin-Natrium	Roth, Karlsruhe
Antikörper Anti-His G-HRP	Invitrogen, Darmstadt
Arachidonsäure	Serva, Heidelberg
ATP	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma, Dreisenhofen
Cobalt-Sepharose	Clontech, Heidelberg
Diazald	Sigma, Dreisenhofen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Heidelberg
dNTP-Lösung	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Dreisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Hexan	Baker Deventer, Niederlande
HPLC-Standards 5-, 8-, 9-, 11, 12-, 15-HETE (<i>R/S</i>)	Cayman Chem., Vertrieb: Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
Imidazol	Serva, Heidelberg
IPTG	Dioxanfrei Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Baker Deventer, Niederlande
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat	Sigma, Dreisenhofen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe

Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Baker Deventer, Niederlande
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumborhydrid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nickelsulfat	Sigma, Dreisenhofen
Nickel-Agarose (Ni-TED)	Qiagen, Hilden
Phosphatidylcholin	Sigma, Dreisenhofen
Sepharose	Sigma, Dreisenhofen
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
EnPresso Tablet Set	Bio Silta, Berlin

LB-Medium (Ampicillin):

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

LB-Medium (Ampicillin, Chloramphenicol):

Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5 %), Natronlauge (1 mM), Ampicillin (100 mg/l), Chloramphenicol (70 mg/l)

LB-Agar (Ampicillin):

Bacto-Agar (1,5 %), Bacto-Trypton (1 %), Hefe-Extrakt (0,5 %), Natriumchlorid (0,5 %), Natronlauge (1 mM), Ampicillin (100 mg/l), Chloramphenicol (70 mg/l)

LB-Agar (Ampicillin, Chloramphenicol):

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

SOC-Medium:

Hefeextrakt (0,5 %), Trypton (2 %), Natriumchlorid (10 mM), Kaliumchlorid (2,5 mM), Magnesiumchlorid (10 mM), Magnesiumsulfat (10 mM), Glucose (20 mM)

PBS:

Natriumchlorid (150 mM), Dinatriumhydrogenphosphat (8 mM), Kaliumchlorid (3 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (1,5 mM), pH = 7,0

TAE-Puffer (für Agarose-Gele):

Tris (40 mM), Natriumacetat (20 mM), Essigsäure (29,6 mM), EDTA (2 mM), pH = 7,8

Waschpuffer für Co-Sepharose/ Ni-TED:

Natriumdihydrogenphosphat (50 mM), Natriumchlorid (300 mM), pH = 8,0

Elutionspuffer für Co-Sepharose/ Ni-TED:

Natriumdihydrogenphosphat (50 mM), Natriumchlorid (300 mM), Imidazol (250 mM), pH = 8,0

2.1.3 Enzyme und Kits

Blut-RNA-Kit	Qiagen, Hilden
DNA Ligase	Bacteriophage Roche, Mannheim
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St- Leon-Rot
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
Western Lightning Chemilumineszenz plus	Perkin Elmer, Boston (USA)

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

TOPO	Invitrogen, Darmstadt
pRSET A	Invitrogen, Darmstadt
humane 5-LOX im pKK 233-2	(Schwarz <i>et al.</i> , 2001)

Folgende Primer wurden für die Amplifikation der Lipoxxygenase, Mutationen an den Sequenzdeterminanten bzw. für Trunkationsexperimente von der Firma BioTez, Berlin hergestellt und verwendet. Die veränderten Basentriplets sind fett markiert.

Klonierung der murinen 5-LOX aus Blut

WT up ATG CCC TCC TAC ACG GTC ACC G

WT dw TTA GAT GGC TAC GCT GTT GGG AAT

Einfügen einer *Xho* I und einer *Hind* III Schnittstelle

Hind III up GTA GCC ATC **TAA GCT** TGA ATT CTG CAG A

Hind III dw TCT GCA GAA TTC **AAG CTT** AGA TGG CTA C

Xho I up GCC CTT GAA **CTC GAG** CCC ATG GCC TCC

Xho I dw GGA GGC CAT GGG **CTC GAG** TTC AAG GGC

Mutationen der Sequenzdeterminanten der murinen 5-LOX

F359W up GTT CCA GTG **ACT GGC** ACG TCC ATC AAA C

F359W dw GTT TGA TGG ACG **TGC CAG** TCA CTG GAA C

A424I up CTT TTT GAC AAG **ATC** AAT GCC ACC GG

A424I dw CCG GTG GCA **TTG ATC** TTG TCA AAA AG

N425M up GAC AAG GCC **ATG** GCC ACC GGG GT

N425M dw ACC CCG GTG **GCC ATG** GCC TTG TC

A603I up GGC ATC TAG **GTA TAG** TGT GGG CC

A603I dw GGC CCA CAC **TAT** ACC TAG ATG CC

A424I,N425M up TTT TGA CAA **GAT CAT** GGC CAC CGG GG

A424I,N425M dw CCC CGG TGG **CCA TGA** TCT TGT CAA AA

A606Q up GGT GCA GTG TGG **CAG** TTG AGC CAG TTT

A606Q dw AAA CTG GCT CAA **CTG** CCA CAC TGC ACC

P569C up CCC AAC GCT CCT **TGC** ACT ATG CGG GCC

P569C dw GGC CCG CAT AGT **GCA** AGG AGC GTT GGG

Trunkationsexperimente (Einfügen einer *Xho*I-Schnittstelle)

D114 up **CTC GAG** GAT GGA CGT GCA AAA TTG GCC CG

Hind III dw AAG CTT AGA TGG CTA CGC TGT TGG

Pseudophosphorylierungen an der murinen 5-LOX

S271D up GAG CGG CAG CTC **GAC** TTA GAA CAG GAA

S271D dw TTC CTG TTC TAA **GTC** GAG CTG CCG CTC

S523D up GGC AAA AAG GCC **GAC** GGT TTC CCC AAG

S523D dw CTT GGG GAA ACC **GTC** GGC CTT TTT GCC

S663D up TAC TAC TAC CTG **GAC** CCA GAC AGG ATT

S663D dw AAT CCT GTC TGG **GTC** CAG GTA GTA GTA

K553E,K555L,
K556E up GCC GAG CGC AAT **GAG** AAC **CTA GAG** CTC CCC TAC TAC

K553E,K555L,
K556E dw GTA GTA GGG GAC **CTC TAG** GTT **CTC** ATT GCG CTC GGC

Umklonieren der humanen 5-LOX in pRSET A

Del *Xho* I up TTC CGC AAG AAC CTG GAG GCC ATT GTC

Del *Xho* I dw GAC AAT GGC CTC CAG GTT CTT GCG GAA

pKK *Xho* I up CGG ATA ACA ATT TCA **CTC GAG** AAA CAG ACC ATG GCC

pKK *Xho* I dw GGC CAT GGT CTG TTT **CTC GAG** TGA AAT TGT TAT CCG

Pseudophosphorylierungen an der humanen 5-LOX

S271D up GAG CGG CAG CTC **GAC** TTG GAG CAG GAG

S271D dw CTC CTG CTC CAA **GTC** GAG CTG CCG CTC

S523D up GGC CGC AAG TCC **GAC** GGC TTC CCC AAG

S523D dw CTT GGG GAA GCC **GTC** GGA CTT GCG GCC

S663D up TAT TAC TAC TTG **GAC** CCA GAC CGG ATT

S663D dw AAT CCG GTC TGG **GTC** CAA GTA GTA ATA

2.1.5 Bakterienstämme

Top10	Invitrogen, Karlsruhe
XL-1 Blue	Stratagene, La Jolla (USA)
BL21(DE3)pLysS	Stratagene, La Jolla (USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden nach Standardprotokollen aus der Literatur (Maniatis *et al.*, 1989) bzw. nach Herstellerprotokollen durchgeführt. Hierzu zählten unter anderem:

- Agarosegelelektrophorese
- analytische und präparative Plasmidpräparation
- Ligation
- PCR
- Spaltung mit Restriktionsendonukleasen
- Transformation

Die Sequenzierung erfolgte durch Eurofins MWG Operon in Ebersberg.

2.2.1 Klonierung der murinen 5-LOX

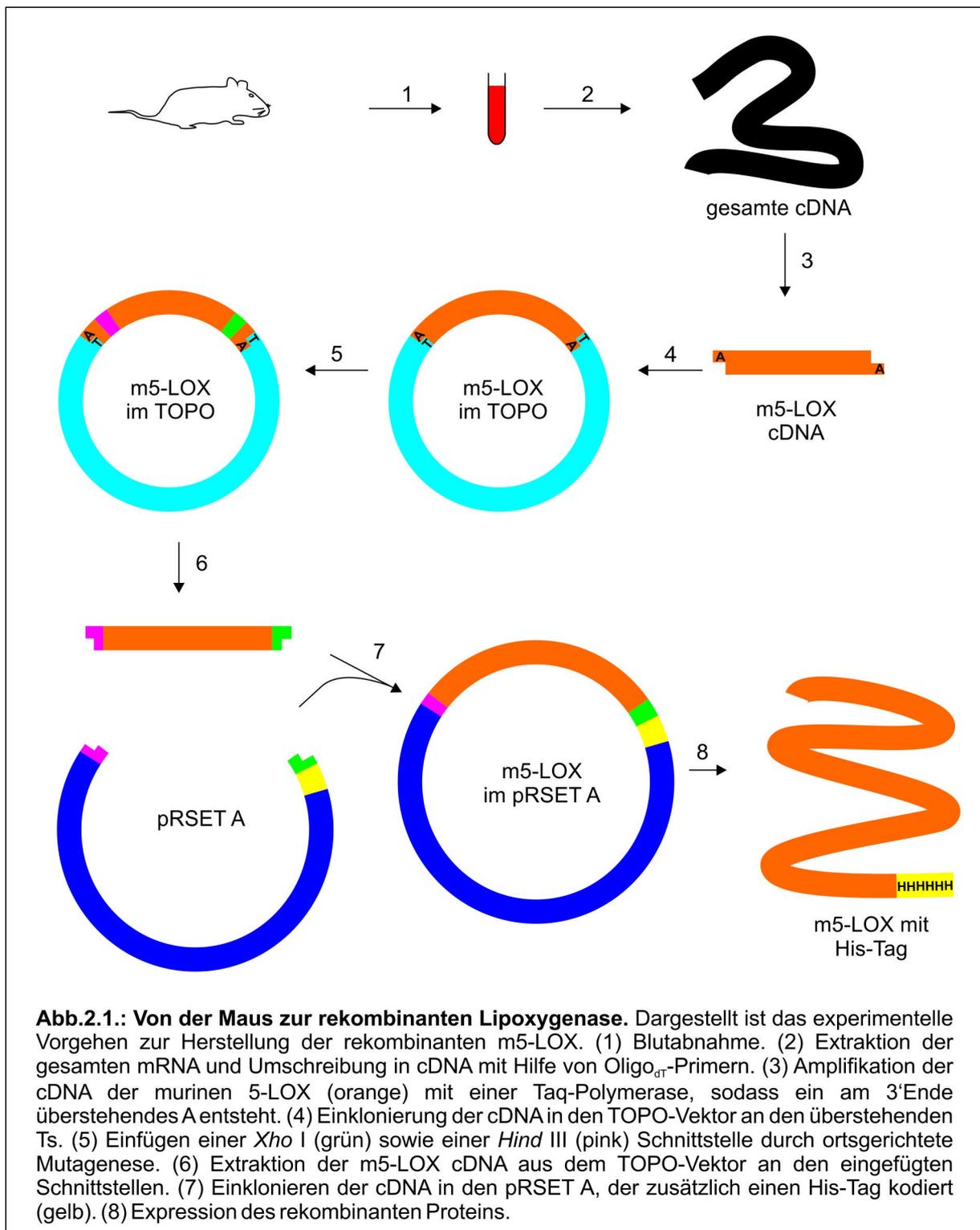
Zunächst wurde mittels Blut-RNA-Kit nach Herstellerangaben mRNA aus Mäuseblut gewonnen. Diese wurde mittels Superscript II RNase H-RT (Invitrogen) und einem Oligo_{dT}18-Primer in cDNA umgeschrieben. Mit den Wildtyp-Primern wurde die DNA mittels Advantage 2 Polymerasemix (Clontech) nach Herstellerangaben amplifiziert.

Die verwendete *Taq*-Polymerase sorgt für einen 3'-A-Überhang, welcher die Einklonierung in den TOPO Vektor erleichtert. Die DNA wurde elektrophoretisch in 1%igem Agarosegel unter der Verwendung von 5% Ethidiumbromid in einfach-TAE-Puffer getrennt. Es folgte die Gelextraktion mit dem QIAquick Gelextraktionskit nach Herstellerangaben. Die gewonnene DNA wurde mittels TOPO-Cloning nach Herstellerangaben in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert und anschließend in Top10-Zellen transformiert (Abb.2.1.). Es erfolgte die Präparation der DNA und deren Sequenzierung.

2.2.2 Ligation der murinen 5-LOX cDNA in den Vektor pRSET A

In die nun im TOPO Vektor vorliegende murine 5-LOX wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4) eine *Xho* I Schnittstelle direkt vor dem Startcodon sowie eine

Hind III Schnittstelle am C-Terminus eingefügt. Das PCR-Produkt wurde in Top10-Zellen transformiert. Nach DNA-Präparation wurde die murine 5-LOX durch Restriktionsspaltung an den Schnittstellen *Xho* I und *Hind* III aus dem TOPO Vektor heraus gespalten.



Der Vektor pRSET A wurde ebenfalls an diesen Schnittstellen gespalten. Insert

(murine 5-LOX) und Vektor (pRSET A) wurden anschließend mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese gewonnen. Als Größenreferenzen dienten die GIBCO Low DNA Mass Ladder für die 5-LOX und die GIBCO High DNA Mass Ladder für den Vektor. Danach erfolgte die Ligation mittels T4 DNA Ligase.

2.2.3 Umklonierung der humanen 5-LOX aus dem pKK in den pRSET A

Zunächst wurde eine interne *Xho* I Schnittstelle in der humanen 5-LOX deletiert. Anschließend wurde eine *Xho* I Schnittstelle vor dem Startcodon eingefügt. Eine *Hind* III Schnittstelle war bereits vorhanden. Es erfolgte die Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen an *Xho* I und *Hind* III und die Ligation in den pRSET A.

2.2.4 Erstellung einzelner Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese

Zur Erstellung der DNA der gewünschten Mutanten wurden Primer verwendet, die einen „Mismatch“ am entsprechenden Codon in der Ursprungs-DNA aufweisen. Der jeweilige Primer lagert sich an den DNA-Strang an, die *Pfu* Turbo DNA-Polymerase erzeugt dann den komplementären Strang, welcher im Gegensatz zur Ausgangs-DNA nicht methyliert ist. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um durch gezielte Spaltung der methylierten DNA die Ursprungs-DNA mittels der Restriktionsendonuklease *Dpn* I zu entfernen (Abb.2.2.).

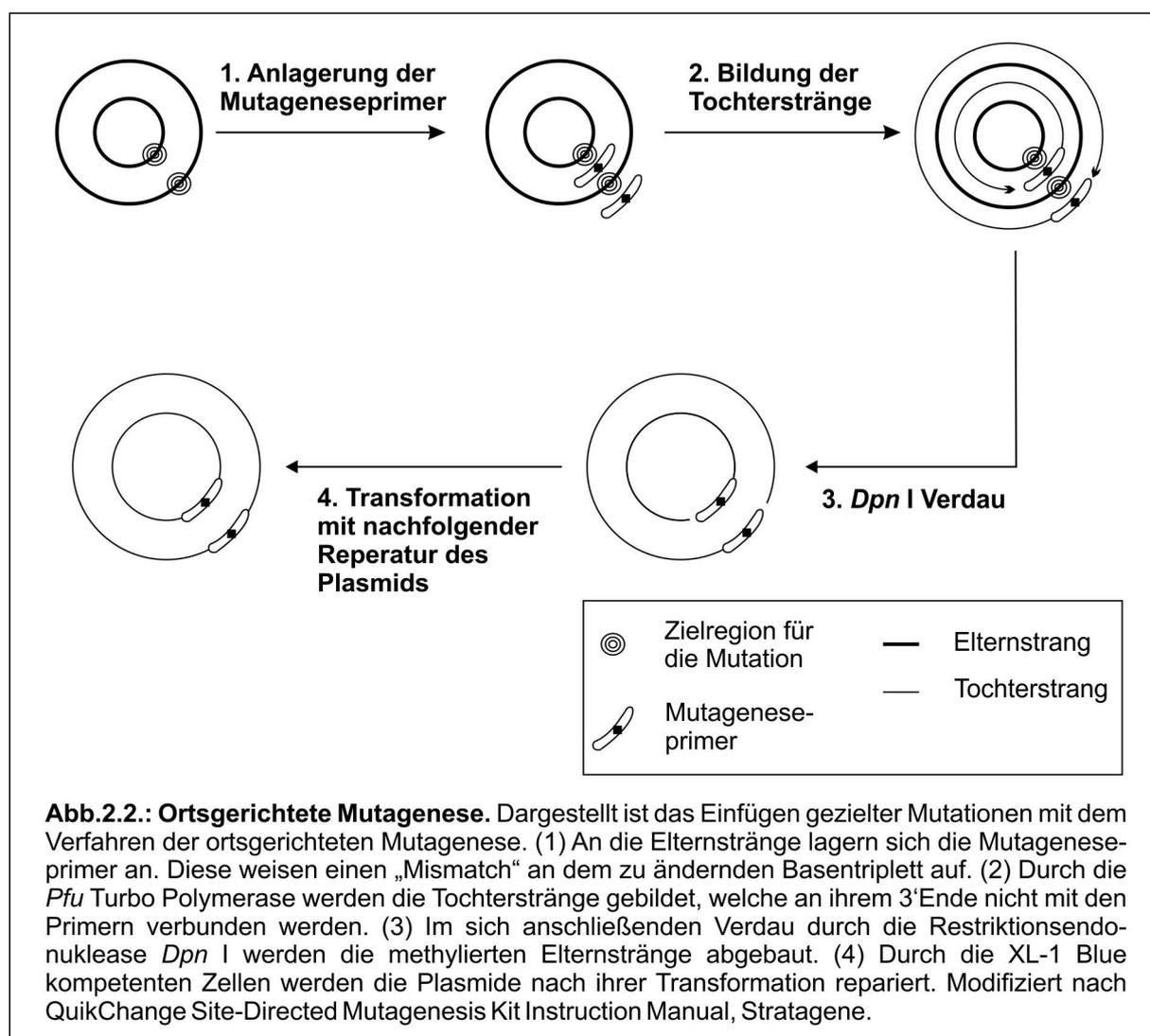
Die mittels ortsgerichteter Mutagenese erzeugten Plasmide wurden in XL-1 Blue transformiert. Anschließend wurden sie auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einige gewachsene Klone wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in kleine Kulturen a 4 ml LB_{Amp}-Medium überführt. Auch diese wurden wieder über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die DNA der jeweiligen Klone mittels GeneJet Plasmid Miniprep Kit präpariert und anschließend sequenziert.

2.2.5 Expression der rekombinanten Lipoxygenasen

Der Vektor pRSET A diente als Expressionsplasmid. Dieser bietet zwei wesentliche Vorteile. Zum einen ist über ihn die Herstellung eines His-Tag-Fusionsproteins möglich. Dies bedeutet, dass an das Protein noch sechs Histidine angefügt werden, welche zum einen die Aufreinigung des Proteins erleichtern, zum anderen die Detektion im Western-Blot durch Anti-His-Antikörper ermöglichen. Zum anderen beinhaltet der Vektor pRSET A einen T7-Promotor, welcher durch die Expression der T7 RNA-Polymerase in BL21(DE3)pLysS Zellen eine höhere Proteinexpression ermöglicht.

Die Expression der Lipoxygenasen erfolgte in 31 Kulturen. Die DNA der Lipoxygenasen

wurde in kompetente Zellen transformiert. Als Expressionsorganismus dienten *E. coli* der Reihe BL21(DE3)pLysS, welche neben der T7 RNA Polymerase auch noch eine Chloramphenicolresistenz aufweisen. Die auf LB_{Amp, Cap}-Agar ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden ein bis zwei Klone gepickt und in je 20 ml Vorkulturen aus LB_{Amp, Cap}-Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden zwölf Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die 20 ml Vorkultur in 3 l LB_{Amp}-Medium überführt und bildeten damit die Hauptkultur. Diese wurde über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Danach erfolgte die Expressionsinduktion durch 1 mM IPTG (Endkonzentration) und 180 rpm. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten (1-6 h) und verschiedene Temperaturen (37°C, Raumtemperatur) getestet. Abschließend wurden die Kulturen bei 4500 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert.



Für die spektrophotometrischen Untersuchungen des Wildtyps (3.1.3) wurde dieser mit dem EnPresso-System nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

2.2.6 Aufreinigung der rekombinanten Lipoxygenasen

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 20 ml eiskalter PBS-Lösung resuspendiert und anschließend durch den Emulsiflex C5 Homogenisator bei 10 000 kPa aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden bei 4°C und 14 000 rpm über 30 min abzentrifugiert und das verbliebene Lysat 45 min mit verschiedenen Metallen (Cu, Co, Ni) nach Herstellerangaben gebunden an Sepharose im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose für 2 min bei 900 rpm und 4°C abzentrifugiert und in eine Leersäule überführt. Diese wurde zweimal mit dem doppelten Säulenvolumen mit Waschpuffer gespült, anschließend wurde sechsmal mit Elutionspuffer eluiert. Dabei entsprach die erste Fraktion dem halben Säulenvolumen, die zweite dem einfachen Säulenvolumen und jede weitere zwei Drittel des Säulenvolumens. Die gewonnenen Fraktionen wurden mit 10 % Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden sie bei -80°C gelagert. Sie wurden dann mittels HPLC, Acrylamidgel in Coomassie-Färbung und Western Blot auf ihre Aktivität bzw. Proteinmenge geprüft.

Die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie nutzt den eingeführten His-Tag. Die Lipoxygenase bindet über die Histidine stärker an die Metalle, die mit der Sepharose verbunden sind, andere Proteine schwächer. Durch die Waschschriffe wird ein Teil der schwach gebundenen Proteine gelöst. Das Imidazol im Elutionspuffer verdrängt die Histidine aus der Bindung mit der Metall-Sepharose und sorgt damit für die Elution der Lipoxygenase.

Für die spektrophotometrischen Untersuchungen des Wildtyps (3.1.3) wurde dieser über Ni-TED nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 HPLC basierter LOX Aktivitätsassay

Die Grundlage der Aktivitätsassays bildete PBS mit einem pH von 7,4 sowie einer Endkonzentration von 0,4 mM CaCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ATP und 1,4 µg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin bei einem Reaktionsvolumen von 0,5 ml.

Das gewonnene Eluat wurde in der beschriebenen Lösung mit Arachidonsäure (Endkonzentration 0,1 mM) als Substrat für 10 min und 180 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden entstandene Hydroperoxyverbindungen durch Natriumborhydridzugabe zu Hydroxyfettsäuren reduziert. Die Lösung wurde dann mit

50 µl konzentrierter Essigsäure auf pH 3 angesäuert und mit 500 µl Methanol versetzt. Nachdem die Proben gevortext wurden, wurden sie 10 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt für die HPLC-Analytik verwendet werden.

2.3.2 Produktanalyse

Die entstandenen Produkte wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert (Abb.2.3.). Hierbei besteht die Möglichkeit, die Produktmenge über die Peakoberflächen in Relation zu setzen, da bei den jeweiligen Systemen die Absorptionseigenschaften der gemessenen Produkte annähernd identisch sind.

2.3.2.1 Umkehrphasen-HPLC

Zur Durchführung der RP-HPLC diente eine Nucleodur C18 Gravity Säule (Marchery-Nagel, Düren, 250 x 4 mm) mit einer entsprechenden Vorsäule (8 x 4 mm). Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Methanol/ Wasser/ Essigsäure im Verhältnis 85/ 15/ 0,05 bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Beim Extinktionsmaximum von 235 nm erfolgte die Detektion der konjugierten Diene (Hydro[pero]xyfettsäuren) mittels Hewlett-Packard Diodenarraydetektor 1040 A bzw. SPD M20A-Detektor an einem Shimadzu-Instrumentarium.

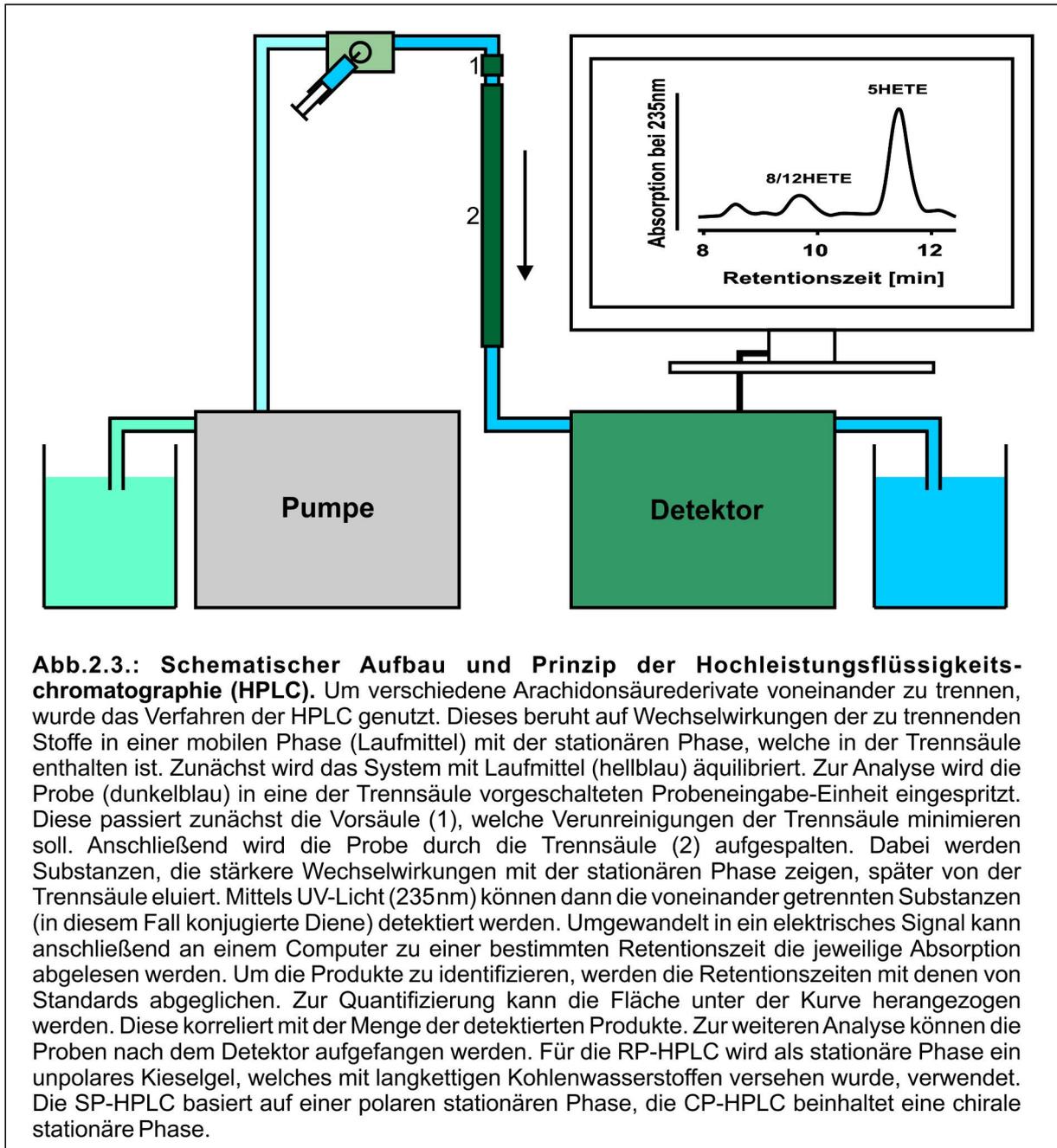
2.3.2.2 Normalphasen-HPLC

Zur weiteren Auftrennung einzelner Produkte, die über die Umkehrphasen-HPLC nicht ausreichend zu separieren waren, wurde die Normalphasen-HPLC verwendet. Dafür wurden die Reaktionsprodukte nach der RP-HPLC aufgefangen, mittels Vakuumverdampfer getrocknet und in SP-HPLC-Laufmittel aufgenommen. Die Auftrennung erfolgte über eine Nucleosil 100-5 Säule (Marchery-Nagel, Düren, 250 x 4 mm) und einem Fluss von 1 ml/ min und einem Laufmittel bestehend aus n-Hexan/ Isopropanol/ Essigsäure in einem Verhältnis von 100/ 2/ 0,1. Die Detektion erfolgte mit einem SPD-M6A-Detektor (Shimadzu).

2.3.2.3 Chiralphasen-HPLC

Mit dem Wissen über die Chiralität der Produkte können Aussagen darüber getroffen werden, ob das gemessene Produkt durch eine enzymatische Reaktion oder durch Autoxidation entstanden ist. Typischerweise finden sich bei enzymatischen Reaktionen stereospezifische Produkte, bei durch Autoxidation entstandenen Produkten racemische Gemische. Zur Feststellung der Chiralität wurde die CP-HPLC verwendet. Hierfür

wurden Säulen mit einer chiralen stationären Phase verwendet (Chiralcel OD bzw. OB 250 x 4,6 mm, Diacel. Chem. Industries, USA) und als Laufmittel Gemische aus n-Hexan/ Isopropanol/ Essigsäure in einem Verhältnis von 100/ 2-5/ 0,1. Die vorher aufgefangenen Produkte der RP-HPLC beziehungsweise der SP-HPLC wurden mittels Vakuumverdampfer getrocknet und in CP-Laufmittel aufgenommen. Die 5-/ 8- und 12-HETE-Proben wurden mit Diazomethan methyliert. Die Detektion erfolgte auch hier wieder mit einem SPD-M6A-Detektor (Shimadzu).



2.3.2.3.1 Methylierung mit Diazomethan

Diazomethan wurde aus Diazald hergestellt. Dafür wurde Kalilauge mit Diethylether überschichtet und darauf das Diazald gegeben. Dieses sinkt durch den Diethylether hindurch und reagiert mit der Kalilauge zu Diazomethan. Das Gas Diazomethan steigt auf und wird im Diethylether gelöst. Dieses in Diethylether gelöste Diazomethan wurde zu den in der RP- bzw. SP-HPLC gewonnenen Proben hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde der Überstand verblasen, zurück blieben die methylierten HETEs.

2.3.3 Spektrophotometrische Untersuchungen

Die spektrophotometrischen Untersuchungen wurden an einem Shimadzu-Instrumentarium (UV-2102 PC) durchgeführt. Als Reaktionsansatz wurde PBS mit einem pH von 7,4 sowie einer Endkonzentration von 0,4 mM CaCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ATP und 1,4 µg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin bei einem Volumen von 1,0 ml verwendet. Zusätzlich wurden 10-30 µl des Eluats 2 vom Wildtyp bzw. der Trunktionsmutante (siehe 1.4.1) verwendet. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von Arachidonsäure mit Endkonzentrationen von 5-100 µM. Es erfolgte dann die Absorptionsmessung bei 235 nm. Dabei korreliert die Menge der hergestellten Produkte mit der gemessenen Absorption. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot.

2.3.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte auf Grundlage von Bradford (Bradford, 1976) mittels Roti-Quant System (Roth). Die Eichung erfolgte im Bereich von 2 mg/ml bis 14 mg/ml mit BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

2.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Es wurden 10 %ige Gele (für Molekulargewicht 20 – 300 kDa) verwendet bei einer Stromstärke von 20 - 25 mA. Die entstandenen Gele wurden entweder für eine Coomassie-Färbung weiterverwendet oder für einen Immunoblot.

2.3.6 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der *semidry*-Methode auf

eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Dies geschah bei 10V über 1 h. Der entstandene Blot wurde im nachfolgenden Schritt 1 h mit 5%iger Magermilch in PBS_{Tween} (PBS mit einem Zusatz von 0,1% Tween 20) blockiert und dann mit PBS_{Tween} gewaschen. Darauf wurde der Blot 1 h mit einem Anti-His-Antikörper inkubiert und erneut mit PBS_{Tween} gewaschen. Der Blot wurde dann mit Western Lightning Chemilumineszenz gefärbt.

2.3.7 Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte anhand der entwickelten Western Blots mittels der Software TotalLab TL 100. Dabei wurden die Banden in Größe und Intensität verglichen. Die Quantifizierung erfolgte immer als relativer Wert in Bezug zum Wildtyp.

2.4 Untersuchung der Membranbindungseigenschaften von unterschiedlichen LOXn

2.4.1 Herstellung einer trunktierten Version der murinen 5-LOX

Zunächst wurde anhand der Strukturdaten der humanen 5-LOX eine mögliche Trunkierungsstelle für eben diese identifiziert. Durch Sequenzabgleiche zwischen der humanen und der murinen 5-LOX konnte der entsprechende Ort für die murine 5-LOX festgelegt werden. Mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung einer *Pfu* Turbo-Polymerase wurden ein neues Startcodon sowie eine *Xho* I Schnittstelle in die im pRSET A vorliegende murine 5-LOX eingefügt. Die durch die PCR gewonnene DNA wurde in Top10-Zellen transformiert. Die anschließend aus der DNA-Präparation gewonnene 5-LOX wurde nun an den Schnittstellen *Xho* I und *Hind* III aus dem pRSET A gespalten. Es erfolgte eine präparative Agarosegelelektrophorese. Die gewonnene DNA wurde mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert und anschließend in den TOPO Vektor inkloniert. Auch hier erfolgte wieder eine Spaltung an den Schnittstellen *Xho* I und *Hind* III und die anschließende Ligation in den pRSET A.

2.4.2 Membranbindungsassay

Für die Membranbindungsassays wurde zunächst das eingesetzte Eluat zentrifugiert, um Präzipitationen zu entfernen. Dann wurde das Eluat und damit die Lipxygenase mit definierten Mengen von Membranen (EKRM, 200 µg Protein) in 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit 144 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ bei einem Endvolumen von 25 µl für 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Membran-Lipoxygenase-Gemisch auf 100 μ l Sucrose-Puffer geschichtet und für 15 min in einer Beckmann-Tabletop-Zentrifuge bei 100 000g und 4°C zentrifugiert. Aufgrund der Molekülgröße wandert membrangebundene Lipoxygenase durch den Sucrose-Puffer und schlägt sich im Pellet nieder, nicht membrangebundene Lipoxygenase findet sich im Überstand. Das Pellet wurde mit 35 μ l Zweifach-Ladungspuffer (Roti-Load) resuspendiert. Die Proteine im Überstand wurden mit der Methode nach Wessel und Flügge (Wessel und Flügge, 1984) gefällt und ebenfalls in 35 μ l Zweifach-Ladungspuffer aufgenommen. Es wurde mit Aliquots von 10 μ l eine SDS-Page sowie ein Westernblot gemacht. Die membrangebundenen und nicht-membrangebundenen Anteile wurden nach erfolgter Immunofärbung mit dem Anti-His-Antikörper quantifiziert.

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel 2003 für Windows verwendet. Es erfolgt die Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen in den Ergebnissen. Für die HPLC-Analytik wurden jeweils mindestens drei Proben verwendet. Eine detailliertere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Zweistichproben-t-Test für Proben mit unterschiedlicher Varianz. Bei Unterschieden unter dem Niveau von $p < 0,05$ wurde von Signifikanz ausgegangen.

3 Ergebnisse

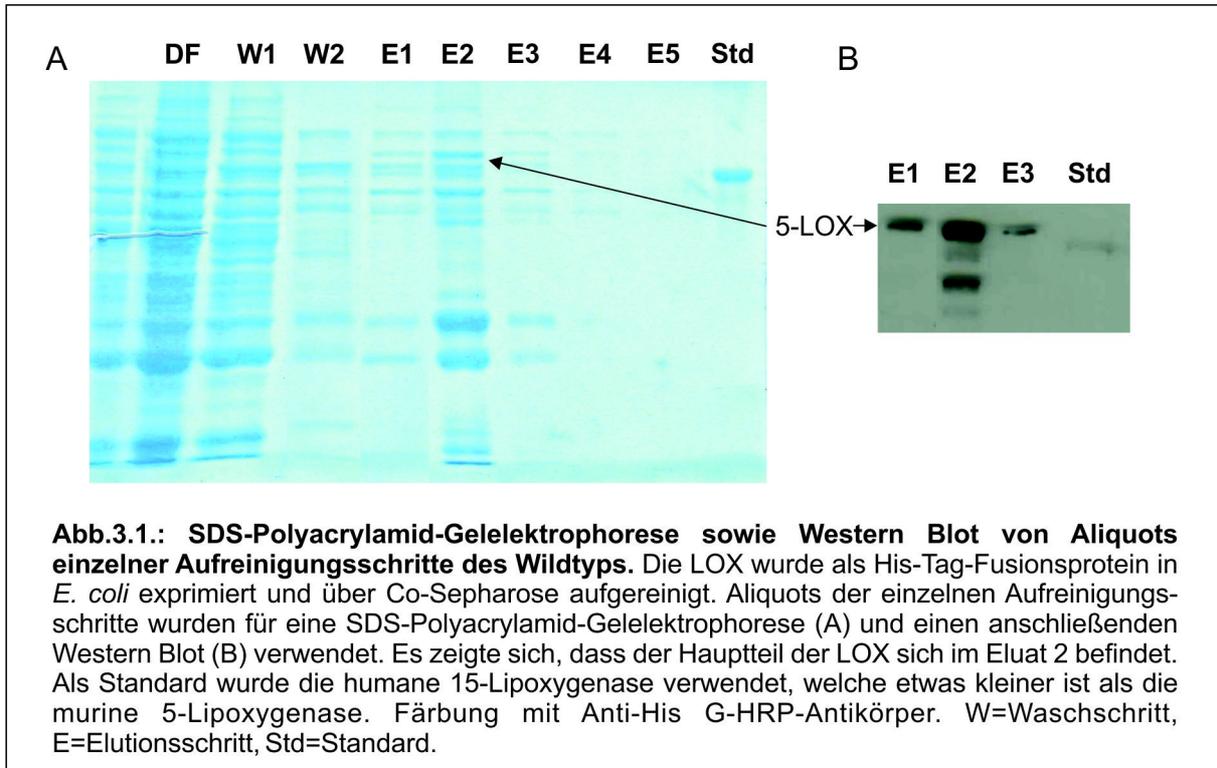
3.1 Rekombinante Expression und Charakterisierung der Maus-5-Lipoxygenase

Um die Veränderungen der enzymatischen Eigenschaften der Maus-5-LOX, die sich als funktionelle Konsequenzen der Mutagenese der Sequenzdeterminanten dieses Enzyms ergeben, zu charakterisieren, wurde zunächst das Wildtypenzym in *E. coli* exprimiert und das rekombinante Protein aus dem Bakterienlysat aufgereinigt. Anschließend wurden wesentliche katalytische Eigenschaften des Enzyms bestimmt und mit anderen Lipoxygenasen verglichen.

3.1.1 Expression der rekombinanten Maus-5-Lipoxygenase

Die Expression der rekombinanten Lipoxygenase erfolgte als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli*. Zunächst wurden die Induktionsbedingungen optimiert. Dafür wurde die Enzymkonzentration sowie die Aktivität der Enzyme nach unterschiedlichen IPTG-Inkubationszeiten sowie bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Es zeigte sich, dass 4h bei Raumtemperatur die besten Ergebnisse erbrachten. Die Aufreinigung wurde dann mittels Affinitätschromatographie durchgeführt. Auch hierfür wurden verschiedene Versuchsbedingungen getestet. Die Aufreinigung über ein Cobalt-Sepharose-Säule zeigte die besten Resultate. Von dieser Säule wurde die Lipoxygenase nach zweimaligem Waschen in mehreren Schritten eluiert. Aus Abb. 3.1.A ist ersichtlich, dass die rekombinante 5-LOX weder in der Durchflussfraktion (DF) noch in den Wasch- (W1, W2) bzw. Elutionsfraktionen (E1-E5) zu den dominanten Proteinen zählt. Bei einer unspezifischen Proteinfärbung (Coomassie-Blau) ließ sich in keiner der gesammelten Fraktionen eine dominante Proteinbande identifizieren, die in der Elektrophorese gemeinsam mit dem LOX Standard (Std) migrierte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die murine 5-LOX in diesem Expressionssystem nur auf niedrigem Niveau exprimiert wurde. Bei einer spezifischen LOX-Färbung, die im Immunoblot (Abb.3.1.B) mit einem gegen den His-Tag gerichteten Antikörper durchgeführt wurde, zeigte sich die Expression des Enzyms. Weiterhin konnte durch den Immunoblot nachgewiesen werden, dass die Hauptmenge des rekombinant exprimierten Enzyms in der zweiten Elutionsfraktion von der Affinitätssäule eluiert wird.

Die finale Enzympräparation ist elektrophoretisch nicht homogen, eignet sich aber trotzdem für eine kinetische Charakterisierung und für detaillierte Mutagenesestudien.

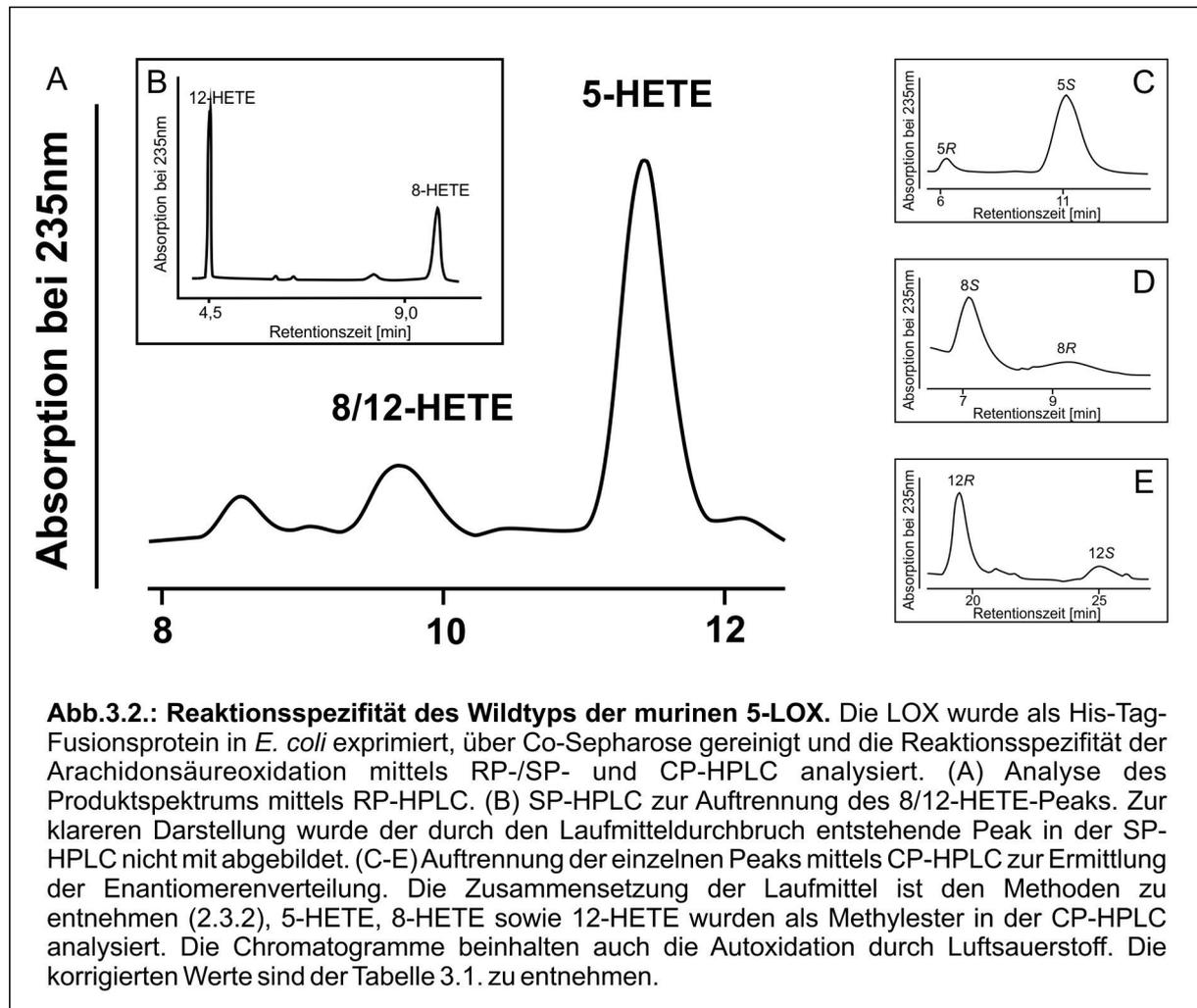


Zsfg.: Die murine 5-LOX kann in *E. coli* als rekombinantes His-Tag-Fusionsprotein exprimiert werden. Die angereicherte Enzympräparation (E2-Elutionsfraktion) ist elektrophoretisch nicht homogen, kann aber zur kinetischen Charakterisierung und für detaillierte Mutagenesestudien verwendet werden.

3.1.2 Produktspektrum der rekombinanten murinen 5-LOX

Nach der Aufreinigung des Enzyms wurde ein Aliquot der E2-Elutionsfraktion zur Testung der katalytischen Aktivität der rekombinanten LOX in einem HPLC-basierten Aktivitätsassay eingesetzt. Dazu wurde die LOX in Gegenwart einer Substratfettsäure (Arachidonsäure) für 10 min inkubiert und anschließend die gebildeten Reaktionsprodukte mittels Umkehrphasen-HPLC analysiert. Die dabei erzielten Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden: 1. Der Wildtyp der murinen 5-Lipoxygenase setzt Arachidonsäure überwiegend (81,4%) zu 5-HETE um. Die Chiralphasen-HPLC zeigte, dass der Anteil des S-Enantiomers von 5-HETE bei über 90 % lag. 2. 18,6% der entstandenen Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC als eine Mischung von 8- und 12-HETE identifiziert. Beide Reaktionsprodukte lassen sich in der RP-HPLC nicht voneinander trennen. Eine detailliertere Untersuchung des 8/12-

HETE-Peaks mit Hilfe der Normalphasen-HPLC ergab jedoch, dass 9,5 % 8-HETE (>80 % S-konfiguriert) und 9,1 % 12-HETE (ca. 80 % R-konfiguriert) gebildet wurden. 3. Eine 15-HETE-Bildung konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.2.).



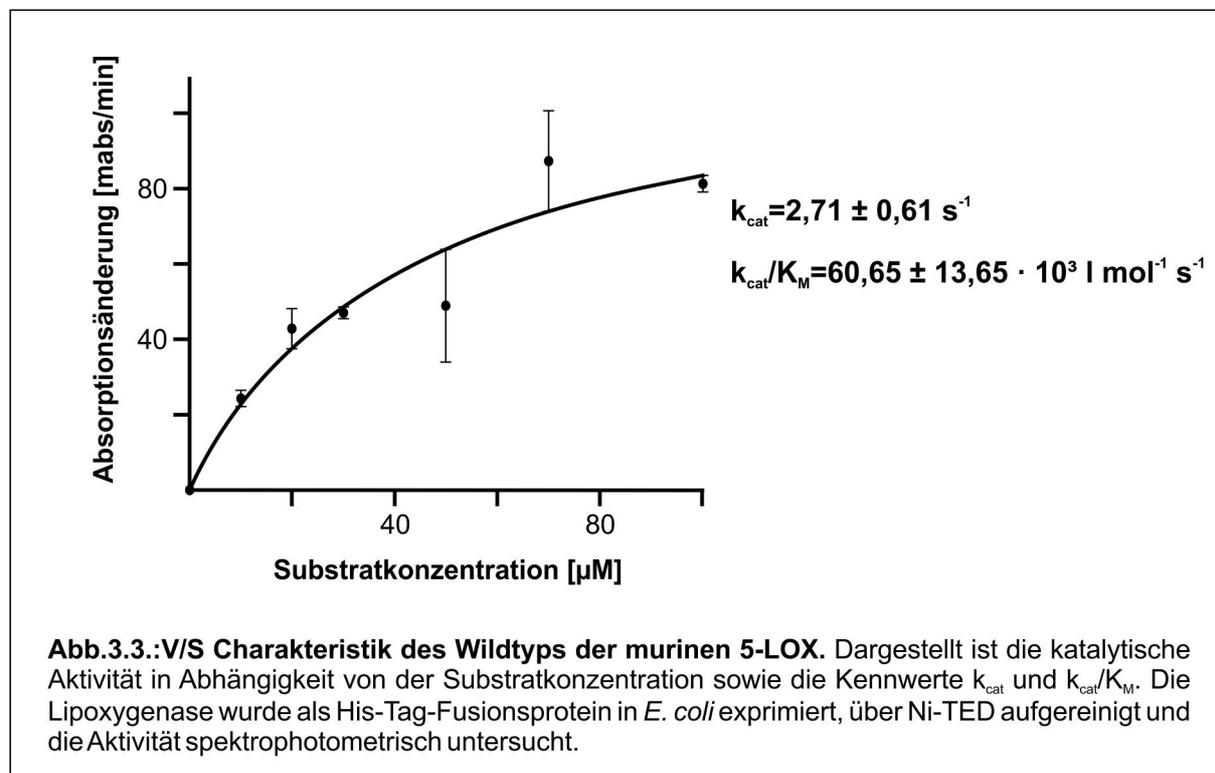
Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen vergleichbarer Untersuchungen, die für die rekombinante 5-LOX des Menschen durchgeführt wurden (Denis *et al.*, 1991). Beim menschlichen Enzym ist jedoch der relative Anteil an 8/12-HETE etwas geringer.

Zsfg.: Die exprimierte murine 5-LOX ist katalytisch aktiv und oxygeniert Arachidonsäure hauptsächlich (82 %) zu 5-HETE (>90 % S-konfiguriert). Als Nebenprodukte konnten geringe Mengen an 8S- und 12R-HETE nachgewiesen werden.

3.1.3 Kinetische Untersuchung der rekombinanten murinen 5-LOX

Die basale kinetische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms konnte durch spektrophotometrischen Untersuchung erreicht werden. Dabei wurde die Menge der

gebildeten konjugierten Diene pro Zeiteinheit (Minute) quantifiziert und zur verwendeten Enzymmenge ins Verhältnis gesetzt. Da diese Messungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt wurden, ließen sich aus der in Abb.3.3. gezeigten Michaelis-Menten-Kurve K_M und v_{max} (k_{cat}) berechnen.



Dabei ergab sich unter den Bedingungen der Substratsättigung ein k_{cat} von $2,71 \text{ s}^{-1}$, das heißt ein 5-LOX-Molekül setzte pro Sekunde etwa 3 Moleküle Arachidonsäure um. Dementsprechend benötigte ein Enzymmolekül ca. 0,4s für die Umwandlung eines Moleküls Arachidonsäure zu 5S-HETE. Der ermittelte K_M -Wert lag bei $44,7 \pm 22,4 \mu\text{M}$. Der sich aus diesen beiden kinetischen Grundparametern ergebende Koeffizient der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) lag bei $60\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abb.3.3.). Vergleicht man die für die murine 5-LOX ermittelten kinetischen Parameter mit entsprechenden Werten anderer LOX-Isoformen, kann eingeschätzt werden, dass der ermittelte K_M -Wert im Bereich des entsprechenden Wertes der menschlichen 5-LOX in *E. coli* ($11,1 \mu\text{M}$) bzw. im Baculovirussystem (ca. $10 \mu\text{M}$) exprimiert und der Meerschweinchen 5-LOX ($25,0 \mu\text{M}$) liegt (Aharony und Stein, 1986; Denis *et al.*, 1991; Gilbert, 2011). Dieser Wert liegt aber mehr als eine Größenordnung über dem K_M -Wert, der für die rekombinante Plättchen-Typ 12-LOX des Menschen ermittelt wurde ($3 \mu\text{M}$) (Aleem *et al.*, 2008)

Zsfg.: Die rekombinante murine 5-LOX hat eine hohe Affinität für Arachidonsäure (K_M von $45\mu\text{M}$) und weist unter Bedingungen der Substratsättigung einen molekularen *turnover* von ca. 3s^{-1} auf. Diese Werte entsprechen in etwa den Parametern des humanen Enzyms, sind aber deutlich schlechter als die von 12/15-LOXn.

3.2 Versuche zur Volumenhypothese

Abhängig davon, welches Kohlenstoffatom der Arachidonsäure sich nach Substratbindung am aktiven Zentrum in der Nähe des katalytischen Eisens befindet, variiert die Produktspezifität von Lipoxygenase. Die Volumenhypothese bietet einen möglichen Ansatz dafür, die Art und Weise der Bindung der Arachidonsäure in die Substratbindungstasche zu erklären. Es wird davon ausgegangen, dass die Eindringtiefe der Arachidonsäure in das aktive Zentrum die Produktspezifität der Lipoxygenase bestimmt. Entwickelt wurde dieses Konzept für die Kaninchen 12/15-LOX. Bei dieser bildet die Triade der Aminosäuren Phe353, Ile418, Ile593 den Boden der Substratbindetasche. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der oben genannten Aminosäuren gegen solche mit kleineren Seitenresten die Produktspezifität der Kaninchen 12/15-LOX in Richtung 12-Lipoxygenase verschiebt. Demgegenüber induzierte ein Austausch der entsprechenden Reste von 12-lipoxygenierenden Enzymvarianten gegen Aminosäuren mit größeren Seitenketten eine Erhöhung der 15-HETE Bildung (Borngräber *et al.*, 1999). Dieses Konzept ist auf diverse Lipoxygenasen anwendbar, wobei die relative Gewichtung der einzelnen Determinanten unterschiedlich ist. Für die humane 5-Lipoxygenase konnten vier Determinanten gefunden werden, welche die Positionsspezifität beeinflussen. Neben Phe359, Ala424 und Ala603 spielt auch noch Asn425 eine Rolle (Ivanov *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2001).

3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese und der Einfluss auf die Positionsspezifität

Im Rahmen eines Aminosäureabgleichs mit der humanen 5-Lipoxygenase konnten für die murine 5-Lipoxygenase mögliche Sequenzdeterminanten identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Phe353, Ala424, Asn425 und Ala603 (Abb.3.4.). Im ersten Schritt der Mutagenesestudien wurden nun einzelne Aminosäuren ausgetauscht und die Reaktionsprodukte analysiert. Danach wurden durch Kombination von relevanten Einfachmutanten Zwei-, Drei- und Vierfachmutanten erzeugt und deren Reaktions-

spezifität durch Quantifizierung des Musters der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte ermittelt.

Bei Mutageneseuntersuchungen ist es generell von besonderem Interesse, die katalytische Aktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtypenzym (relative spezifische Aktivität) zu quantifizieren. Diese kann aus der Menge der gebildeten Produkte (RP-HPLC Quantifizierung) und der eingesetzten Enzymmenge (Quantifizierung im Immunoblot) berechnet und als Prozent der Aktivität des Wildtypenzyms ausgedrückt werden. Diese Daten sind vor allem dann von Interesse, wenn die relative katalytische Aktivität einer Mutante auf Werte unter 10% des Wildtypenzyms absinkt. In diesen Fällen verändern sich die katalytischen Eigenschaften des Enzyms so gravierend, dass Veränderungen der Positionsspezifität nur schwer zu interpretieren wären. Deshalb wurden für diese Arbeit nur Mutanten berücksichtigt, die eine relative spezifische Aktivität von >10% aufwiesen. Eine Ausnahme stellt die Trunktationsmutante der murinen 5-LOX dar.

Borngräber I	murine 5-LOX	355	R S S D F H V H Q T
	humane 5-LOX	355	R S S D F H V H Q T
Sloane	murine 5-LOX	420	L F D K A N A T G G
	humane 5-LOX	420	S F D K A N A T G G
Borngräber II	murine 5-LOX	598	W H L G A V W A L S
	humane 5-LOX	598	W H L G A V W A L S

Abb.3.4.: Aminosäureabgleich der murinen 5-LOX mit ihrem humanen Ortholog im Bereich bekannter Positionsdeterminanten. Es zeigt sich, dass die murine 5-LOX wie erwartet die selben Aminosäuren an den Positionsdeterminanten aufweist. Die Determinanten sind fett dargestellt.

3.2.1.1 Einfachmutanten einzelner Positionsdeterminanten

Um den Einfluss verschiedener Determinanten auf das Produktspektrum der 5-LOX zu testen, wurden zunächst Einfachmutanten erzeugt. Diese wiesen an den Determinanten Borngräber I und II sowie Sloane größere Aminosäurereste auf als der Wildtyp. Damit sollte getestet werden, ob die Volumenhypothese prinzipiell auf die murine 5-LOX angewendet werden kann.

3.2.1.1.1 Borngräber I Mutante

Bei einem Austausch des Phenylalanins an Position 359 gegen das größere Tryptophan zeigte sich eine signifikante Zunahme des 8/12-HETE auf 65,0% ($p < 0,001$ verglichen

mit dem Wildtyp). Mittels Normalphasen-HPLC konnte festgestellt werden, dass dieser Peak vornehmlich aus 8-HETE bestand (93,4 %), welches hauptsächlich S-konfiguriert (93 %) war. Der Anteil des 5-HETE nahm entsprechend ab und lag bei 32,0 %. Außerdem konnten geringe Mengen 15-HETE nachgewiesen werden (Tab.3.1., Abb.3.5.), dessen Enantiomerverhältnis nicht bestimmt wurde.

3.2.1.1.2 Sloane-Mutante

Auch Mutationen im Bereich der Sloane-Determinanten ergaben ein verändertes Produktspektrum. So setzte die Mutante A424I (Austausch des Alanins gegen ein größeres Isoleucin) Arachidonsäure vermehrt zu 8-HETE (34,7 %) und 12-HETE (11,3 %) um. Das Hauptprodukt blieb allerdings mit einem Anteil von 53,9 % 5-HETE. 15-HETE wurde bei dieser Mutante nicht als Reaktionsprodukt identifiziert.

Dahingegen konnte als Produkt der Arachidonsäureoxygenierung durch die Mutante N425M (Austausch des Asparagins gegen ein größeres Methionin) größere Mengen an 15-HETE (>20 %) nachgewiesen werden. Mehr als zwei Drittel dieses Reaktionsproduktes lagen als 15S-HETE vor, was darauf hindeutet, dass es dominant enzymatischen Ursprungs ist. Weiterhin stieg der Anteil an 8-HETE auf 29,3 % und von 12-HETE auf 28,8 % an (Tab.3.1., Abb.3.5.).

Tabelle 3.1.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Einzelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP- und SP-HPLC analysiert. * $p < 0,05$ verglichen mit dem Wildtyp. Der Übersichtlichkeit halber sind lediglich die Mittelwerte angegeben. Für detailliertere statistische Angaben siehe Tab.6.1.

Determinante	5-HETE [%]	8-HETE [%]	12-HETE [%]	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
Wildtyp	81,4	9,4	9,1	0,0	100
Borngräber I					
F359W	32,0	60,7	4,3	3,0*	161
Sloane					
A424I	53,9	34,7	11,3	0,0	193
N425M	20,7	29,3	28,8	21,3*	117
Borngräber II					
A603I	65,7	15,6	13,1	5,5*	197

3.2.1.1.3 Borngräber II Mutante

Ein Wechsel des Alanins der Borngräber II Determinante an Position 603 gegen ein Isoleucin bewirkte lediglich kleine Änderungen im Produktspektrum. Das Hauptprodukt blieb bei 5S-HETE. 8- und 12-HETE trugen zu je 14% zur Produktmischung bei, während ca. 5% 15-HETE nachweisbar war. Das Enantiomerverhältnis dieser Nebenprodukte konnte aufgrund der geringen Produktmengen nicht bestimmt werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Borngräber II Mutante für das Produktspektrum der murinen 5-Lipoxygenase nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Zsfg.: Einfachmutationen der potentiellen Sequenzdeterminanten der murinen 5-LOX verändern das Produktspektrum des Enzyms. Der relative Anteil der 5-HETE Bildung nimmt ab, während der Anteil an 8-HETE ansteigt. Ein N425M Austausch führt zur Bildung signifikanter Mengen an 15S-HETE.

3.2.1.2 Doppelmutanten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass einzelne Mutationen an den Positionsdeterminanten eine Auswirkung auf die Reaktionsspezifität des Enzyms haben, wurde versucht, die erzielten Effekte durch Kombination ausgewählter Einzelmutanten deutlicher herauszuarbeiten.

3.2.1.2.1 Borngräber I + Sloane

Ausgehend von der Idee, dass die Kombination von zwei Einzelmutanten den Raum des aktiven Zentrums noch weiter verkleinern sollte, was die Positionsspezifität des Enzyms noch weiter Richtung 15-HETE verschiebt, wurden verschiedene Einfachmutanten miteinander kombiniert. Hierbei wurde vor allem davon ausgegangen, dass die beiden Determinanten, die schon bei den Einzelmutanten die größte Veränderung erbrachten (F359W, N425M), zu noch klareren Ergebnissen führen sollten.

Diese Vermutung ließ sich experimentell bestätigen. Während die Einzelmutanten N425M 21,3% und die Mutante F359W 3,0% 15-HETE bildeten, erreichte die Kombinationsmutante F359W+N425M eine 15-HETE-Produktion von 26,4%. Diese Veränderung war im Vergleich zur Einfachmutante F359W statistisch signifikant ($p < 0,001$). Durch Chiralphasen-HPLC konnte gezeigt werden, dass das gebildete 15-HETE zu über 80% in der S-Konfiguration vorlag, was seinen enzymatischen Ursprung bestätigt. Sowohl 12-HETE als auch 8-HETE entstanden zu jeweils ca. 30%. Dabei

war das 12-HETE racemisch, wohingegen das 8-HETE vornehmlich als S-Enantiomer vorlag. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Entstehung des 12-HETE lediglich die Wasserstoffabspaltung am C10 enzymatisch katalysiert wird, während die Sauerstoffinsertion nicht vollständig vom Enzym kontrolliert wird.

Tabelle 3.2.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Doppelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP- und SP-HPLC analysiert. * $p < 0,05$ verglichen mit dem Wildtyp. Der Übersichtlichkeit halber sind lediglich die Mittelwerte angegeben. Für detailliertere statistische Angaben siehe Tab.6.2.

Mutante	5-HETE [%]	8-HETE [%]	12-HETE [%]	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
F359W+A424I	0,0	97,3	2,7	0,0	212
F359W+N425M	2,7	38,6	32,3	26,4*	67
F359W+A603I	32,3	54,3	0,5	12,9*	85
A424I+N425M	3,2	74,0	22,2	0,5	242
A424I+A603I	54,6	38,8	6,5	0,0	123
N425M+A603I	8,5	50,0	31,8	9,7*	317

Die Mutante F359W+A424I führte zu einer fast ausschließlichen 8S-HETE – Produktion (Abb.3.5.).

3.2.1.2.2 Weitere Doppelmutanten

Wie für die F353W+N425M Doppelmutante war das dominierende Arachidonsäure-oxygenierungsprodukt fast aller Doppelmutanten 8-HETE. Einzige Ausnahme bildet dabei die A424I+A603I Mutante, für die 5-HETE als Hauptprodukt identifiziert werden konnte. Die Doppelmutanten F359W+A603I und N425M+A603I bildeten zusätzlich geringe Mengen 15-HETE (Tab.3.2.), wobei das Enantiomerenverhältnis aufgrund der geringen Mengen nicht bestimmt werden konnte.

Zsfg.: Durch kombinatorische Doppelmutationen der Spezifitätsdeterminanten entstehen Enzymspezies, die Arachidonsäure hauptsächlich zu 8-HETE umwandeln. Von der F353W+N425M Mutante wurden größere Mengen 15-HETE (ca. 80% S-konfiguriert) synthetisiert.

3.2.1.3 Dreifachmutanten

Da mit den Doppelmutationen das Produktspektrum verschoben werden konnte, wurde versucht, diesen Effekt mit Dreifachmutanten nochmals zu vergrößern.

3.2.1.3.1 Borngräber I + Sloane

Die Kombination größerer Aminosäuren an den Determinanten Borngräber I und Sloane führte zu einer Lipoxygenase, die Arachidonsäure zu 67 % zu 15-HETE umsetzte. Die Chiralphasenanalytik dieses Hauptproduktes ergab einen S-Enantiomer-Anteil von über 93 %. Als Nebenprodukte entstanden 18 % 8- und 15 % 12-HETE. 5-HETE konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Tab.3.3., Abb.3.5.).

Tabelle 3.3.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Tripelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP- und SP-HPLC analysiert. * $p < 0,05$ verglichen mit dem Wildtyp. Der Übersichtlichkeit halber sind lediglich die Mittelwerte angegeben. Für detailliertere statistische Angaben siehe Tab.6.3.

Mutante	5-HETE [%]	8-HETE [%]	12- HETE [%]	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
F359W+A424I+N425M	0,0	18,0	15,0	67,0*	117
F359W+A424I+A603I	11,9	88,1	0,0	0,0	398
F359W+N425M+A603I	3,9	52,3	22,7	21,0*	79
A424I+N425M+A603I	6,0	90,1	0,1	3,9*	167

3.2.1.3.2 Weitere Dreifachmutanten

Das Hauptprodukt der anderen kombinatorischen Dreifachmutanten war 8S-HETE. Die F359W+N425M+A603I erzeugte zusätzlich noch signifikante Mengen (21 %) 15S-HETE. Der 5-HETE Anteil am Spektrum der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte sank bei allen Dreifachmutanten auf unter 15%.

Zsfg.: Konsekutive Mutationen der Spezifitätsdeterminanten F353, A424, N425 und A603I zu Aminosäuren mit größeren Seitenketten führen zu einer schrittweisen Erhöhung des Anteils von 8S- und 15S-HETE. Die F359W+A424I+N425M Dreifachmutante der murinen 5-LOX ist eine dominante 15S-LOX.

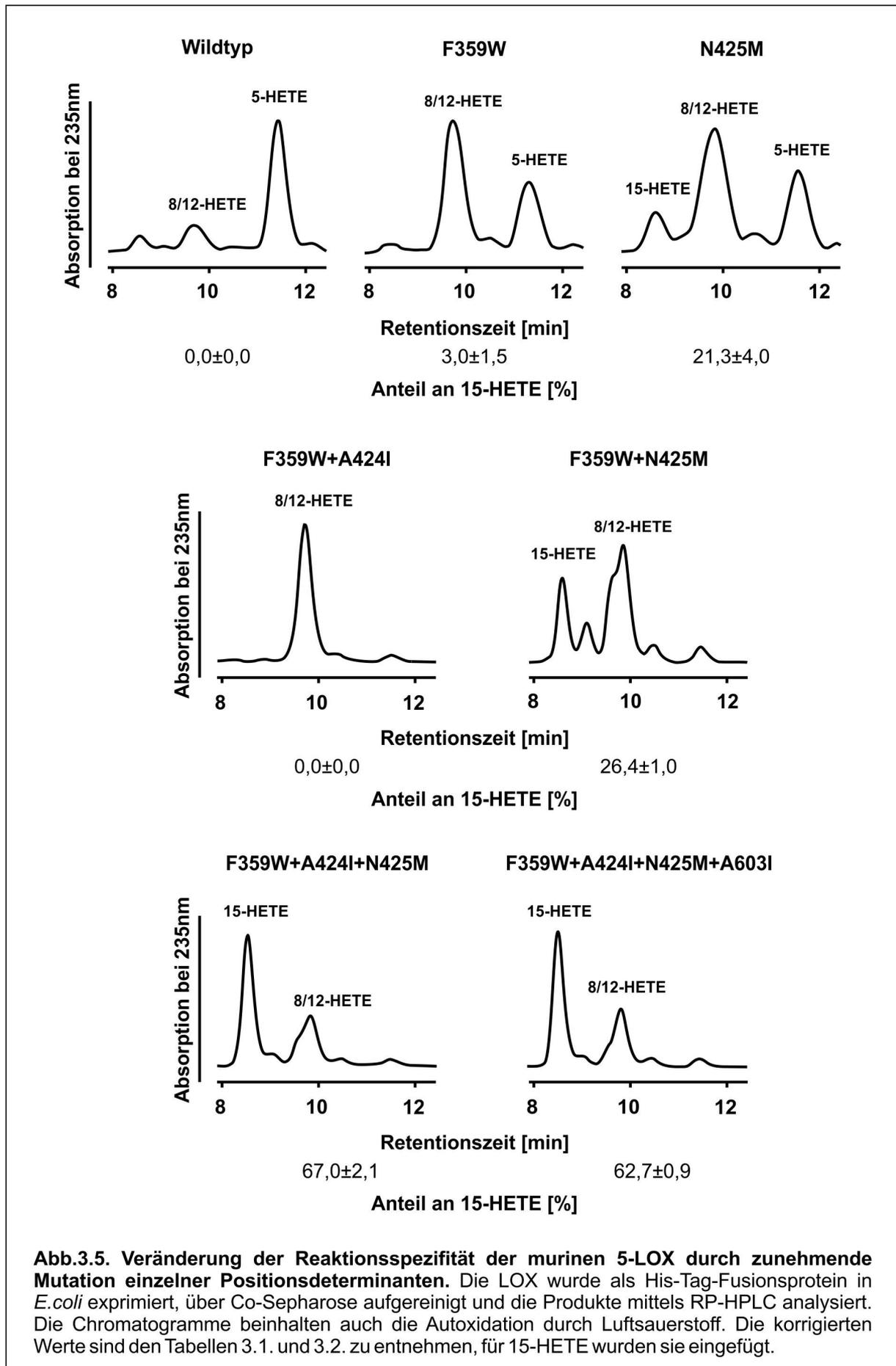


Abb.3.5. Veränderung der Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX durch zunehmende Mutation einzelner Positionsdeterminanten. Die LOX wurde als His-Tag-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert, über Co-Sepharose aufgereinigt und die Produkte mittels RP-HPLC analysiert. Die Chromatogramme beinhalten auch die Autoxidation durch Luftsauerstoff. Die korrigierten Werte sind den Tabellen 3.1. und 3.2. zu entnehmen, für 15-HETE wurden sie eingefügt.

3.2.1.4 Vierfachmutante

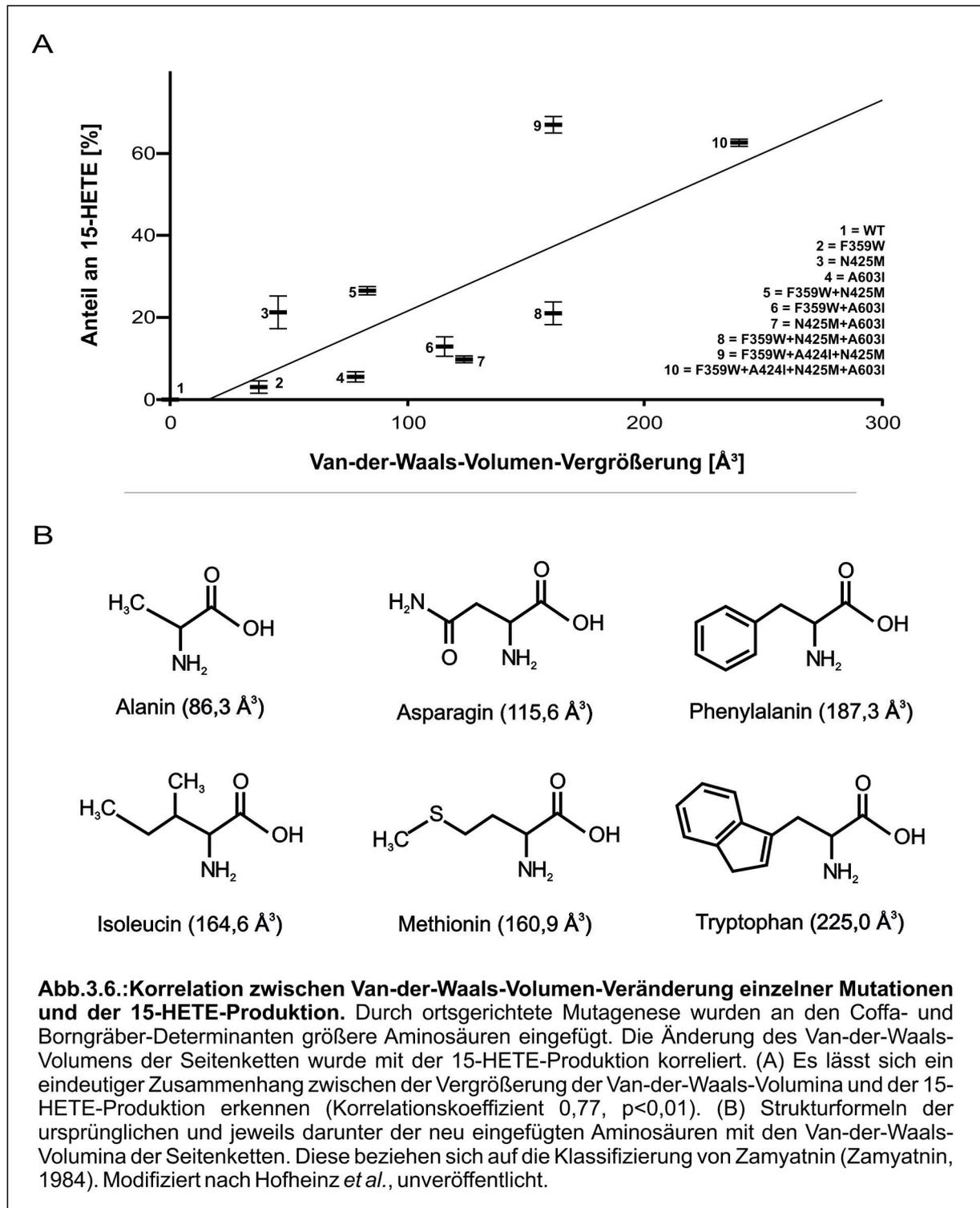
Die Ergebnisse zur Mutation von Ala603 (Tab.3.1. und 3.3.) deuteten darauf hin, dass diese Aminosäure für die Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX weniger bedeutsam zu sein scheint. Trotzdem wurde der Versuch unternommen, durch Kombination der Dreifachmutante F359W+A424I+N425M mit einer A603I Mutation den Anteil des 15S-HETE am Produktspektrum der murinen 5-LOX noch weiter zu erhöhen, wie das bei der humanen rekombinanten 5-LOX der Fall war (Schwarz *et al.*, 2001). Dabei entstand ein Enzym, welches Arachidonsäure zu 62% zu 15-HETE umwandelte (>90% S-konfiguriert). Dies ist signifikant weniger als bei der Tripelmutante F359W+A424I+N425M ($p < 0,05$). Als Nebenprodukte entstanden 23% 8-HETE und 12% 12-HETE (Abb.3.5.). Das Einfügen der Mutation A603I in die am stärksten 15-lipoxygenierende Tripelmutante führte also nicht zu einer weiteren Erhöhung der 15-LOX Aktivität, sondern zu einem leichten Abfall der 15-HETE-Produktion.

Zsfg.: Die Vierfachmutante F359W+A424I+N425M+A603I ist zwar eine dominante 15S-Lipoxygenase, produziert aber weniger 15-HETE als die Dreifachmutante F359W+A424I+N425M.

3.2.2 Abhängigkeit der 15-HETE-Produktion von der Volumenverkleinerung der Substratbindetasche

Ausgehend von der zentralen Vermutung der Volumenhypothese, dass die 15-HETE-Produktion von der Größe der Substratbindetasche abhängt, wurden die Van-der-Waals-Volumina der Aminosäureseitenketten betrachtet, die den Boden dieses Hohlraums bilden. Sie wurden mit dem relativen Anteil des 15-HETE an der Gesamtproduktbildung korreliert. Passend zu den experimentellen Ergebnissen zeigte sich, dass mit dem Austausch von Phenylalanin zu Tryptophan und der leichten Steigerung des 15-HETE-Anteils von 3,0% eine Volumenänderung von ca. 38 \AA^3 einherging. Der Austausch des Asparagins 425 gegen ein Methionin bewirkte eine Volumenabnahme von ca. 45 \AA^3 , was sich in einer deutlich größeren Steigerung des 15-HETE-Anteils ausdrückte. Der Austausch des Alanins 424 bzw. 603 gegen ein Isoleucin (Raumverlust von ca. 80 \AA^3) führte im Vergleich dazu zu einem geringen Anstieg der 15-HETE-Produktion. Setzt man die theoretischen Volumeneffekte, die durch die durchgeführten Mutationen erzielt wurden, mit der Veränderungen im Produktmuster (Anteil der 15-HETE-Bildung) in Zusammenhang, ergibt sich bei linearer Korrelation ein

Korrelationskoeffizient von 0,77 bei einem $p < 0,01$. Dies lässt die Aussage zu, dass die Größe der Aminosäureseitenketten an diesen Positionen stark mit der 15-HETE-Produktion zusammenhängt (Abb.3.6).



3.2.3 Bisher unidentifizierte Spezifitätsdeterminanten

Die murine 5-Lipoxygenase zeigt in ihrer Primärstruktur im Vergleich zu diversen 15-Lipoxygenasen lediglich eine Sequenzhomologie von ungefähr 30% (Walther *et al.*, 2011). Trotzdem gibt es Abschnitte, die in den verschiedenen Lipoxygenaseformen hoch konserviert sind. Diese wurden auf mögliche Positionsdeterminanten untersucht. Dafür wurden zum einen die Sequenzen der humanen 5-LOX, der humanen 12R-LOX und Plättchen-Typ 12S-LOX sowie der humanen 12/15-LOX miteinander verglichen. Zum anderen erfolgten Dockingstudien der Arachidonsäure ins aktive Zentrum der humanen 5-LOX, um herauszufinden, welche der bei den Aminosäurevergleichen identifizierten Reste bei der Substratbindung bedeutsam sein könnten. Dabei wurden zwei Aminosäuren identifiziert, die regelhaft in den 12/15-Lipoxygenasen vorkommen, bei 5-LOXn jedoch nicht konserviert sind (Abb.3.7.). Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Aparoy Polymarasetty und Kumar Kalkularam aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Pallu Redanna durchgeführt (University of Hyderabad, Indien).

P569C	murine 5-LOX	565	P N A P P T M R A P
	humane 12/15-LOX	554	P N A P C T M R L P
A606Q	murine 5-LOX	602	G A V W A L S Q F Q
	humane 12/15-LOX	590	S I T W Q L G R R Q

Abb.3.7.: Aminosäureabgleich der murinen 5-LOX mit der humanen 12/15-LOX im Bereich möglicher Positionsdeterminanten. Es konnten zwei Aminosäuren ermittelt werden, welche zwischen den beiden LOXn differieren und in Strukturmodellierungen die Geometrie der Substratbindetasche mitbestimmen.

3.2.3.1 A606Q und P569C

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Aminosäuren eine entscheidende Rolle in der 15-HETE-Produktion spielen, wurden die entsprechenden Mutanten mittels ortsgerechter Mutagenese erzeugt. Nach Expression in *E. coli* und Aufreinigung über Co-Sepharose wurden die entstandenen Produkte mittels RP-HPLC analysiert.

Für beide Mutanten zeigte sich kein bedeutsamer Anstieg der 15-HETE-Produktion. Im Gegensatz dazu kam es zu einer weiteren Erhöhung der 5-HETE Bildung ($p < 0,001$ verglichen zum Wildtyp). Dementsprechend fiel die 8/12-HETE-Produktion auf unter 5% ab.

Diese Daten legen nahe, dass die Aminosäuren Ala606 und Pro569 keine Bedeutung

für die Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX haben.

3.3 Phosphorylierungsmutanten

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung der 5-LOX zu einer Veränderung der katalytischen Aktivität führt. So erhöhen sowohl die Phosphorylierung des Serins an Position 663 als auch an Position 271 die Aktivität der Lipoxygenase (Rådmark, 2002; Werz *et al.*, 2002). Dahingegen führt eine Phosphorylierung des Serins an Position 523 zu einer Herabregulierung der 5-LOX-Aktivität (Luo *et al.*, 2004). Bei diesen Experimenten wurde aber keine Veränderung der Produktspezifität des Enzyms beschrieben, obwohl das bei der HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte hätte auffallen müssen.

Um die Effekte einer Serinphosphorylierung *in vitro* zu simulieren, kann die Zielaminosäure gegen ein Aspartat ausgetauscht werden. Die dadurch induzierten Strukturveränderungen (Raum- und Ladungsveränderungen) ähneln denen, die bei einer Serinphosphorylierung erzielt werden (Huang und Erikson, 1994).

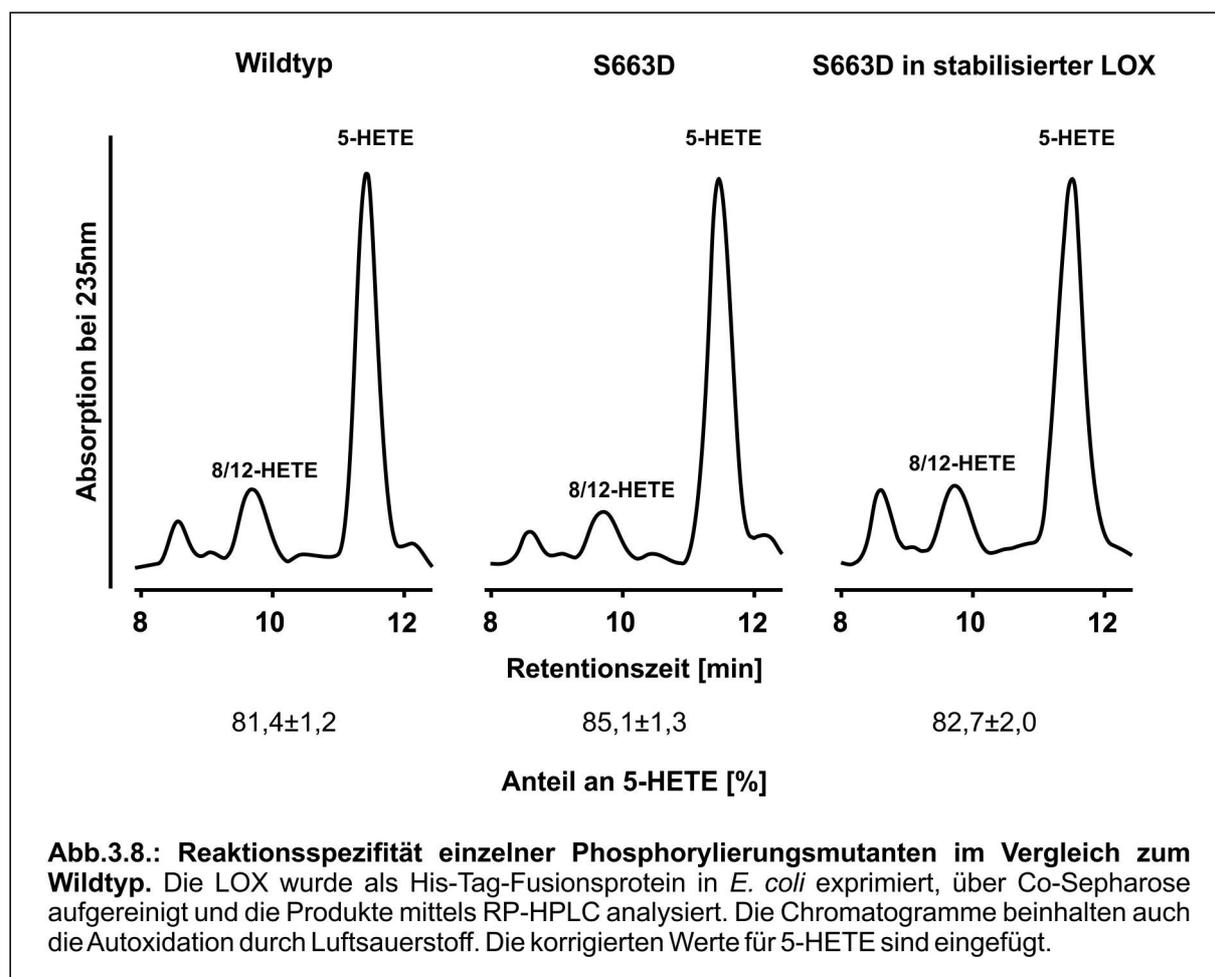
In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der humanen 5-LOX durch Phosphorylierungsimitation an Ser663 gesteigert und das Produktspektrum in Richtung 15-HETE verschoben werden kann (Gilbert, 2011).

Um die Auswirkungen dieser Imitation einer Phosphorylierung auf die murine 5-Lipoxygenase zu überprüfen, wurde zunächst ein Aminosäureabgleich von muriner und humaner 5-LOX gemacht, um die entsprechenden Phosphorylierungsstellen in der Sequenz der murinen 5-LOX zu identifizieren. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren Ser271, Ser523 und Ser663. Alle drei Aminosäurereste sind in der murinen 5-LOX als Serine konserviert, was auf eine funktionelle Bedeutung hinweisen könnte.

3.3.1 Mutation an den Phosphorylierungsstellen Serin 271, 523 und 663 der murinen 5-LOX

Der Austausch des Serins an Position 663 gegen ein Aspartat bewirkte einen Anstieg der relativen spezifischen Aktivität des Enzyms auf ca. 130 %, was im Einklang mit den Daten steht, die für das humane Enzym erhalten wurden. Die Analyse des Spektrums der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte ergab für die Mutanten S271D und S663D jedoch keine Hinweise auf die Bildung größerer Mengen 15S-HETE (ca. 2 %). Zudem stieg der relative Anteil von 5-HETE an der Mischung der Reaktionsprodukte der beiden

Mutanten verglichen mit dem Wildtypenzym signifikant an ($p < 0,05$). Es wurden weniger 8- und 12-HETE als Nebenprodukte gebildet (Abb.3.8.). Die Mutation der Phosphorylierungsstelle Serin 523 veränderte die 5-HETE-Produktion nicht signifikant. Auch führte sie zu keinem signifikanten Anstieg der 15-HETE-Produktion. Die relativen spezifischen Aktivitäten der Mutanten S271D und S523D im Vergleich zum Wildtyp betragen nur noch knapp 25 bzw. 75 %.



3.3.2 Mutationen an der stabilen murinen 5-LOX an Serin 663

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die Phosphorylierungssimulationen an der humanen 5-LOX nicht mit dem nativen Enzym, sondern mit einer stabilisierten Enzymvariante (zusätzliche Mutationen in einer kritischen Schleifenregion des Enzyms) durchgeführt wurden. Diese Tatsache eröffnete die Möglichkeit, dass die Kombination der Stabilisierungsmutation mit den Pseudophosphorylierungsmutanten die Veränderungen im Produktspektrum (15S-HETE Bildung) hervorgerufen hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst die Stabilisierungsmutation an der murinen 5-LOX durchgeführt. Die dabei entstandene Enzymvariante besaß eine spezifische

Aktivität von > 350 % des Wildtyps und ein identisches Produktspektrum. Anschließend wurde die Pseudophosphorylierungsmutation S663D an der stabilisierten murinen 5-LOX durchgeführt und eine Analyse ihrer Produkte durchgeführt.

Der Austausch von Serin 663 gegen ein Aspartat in der stabilisierten Form der murinen 5-LOX führte nicht zu einer Erhöhung der 15S-HETE Bildung, wie das für das humane Enzym beschrieben wurde (Abb.3.8.). Die relative Aktivität im Vergleich zum Wildtyp lag bei 335 %.

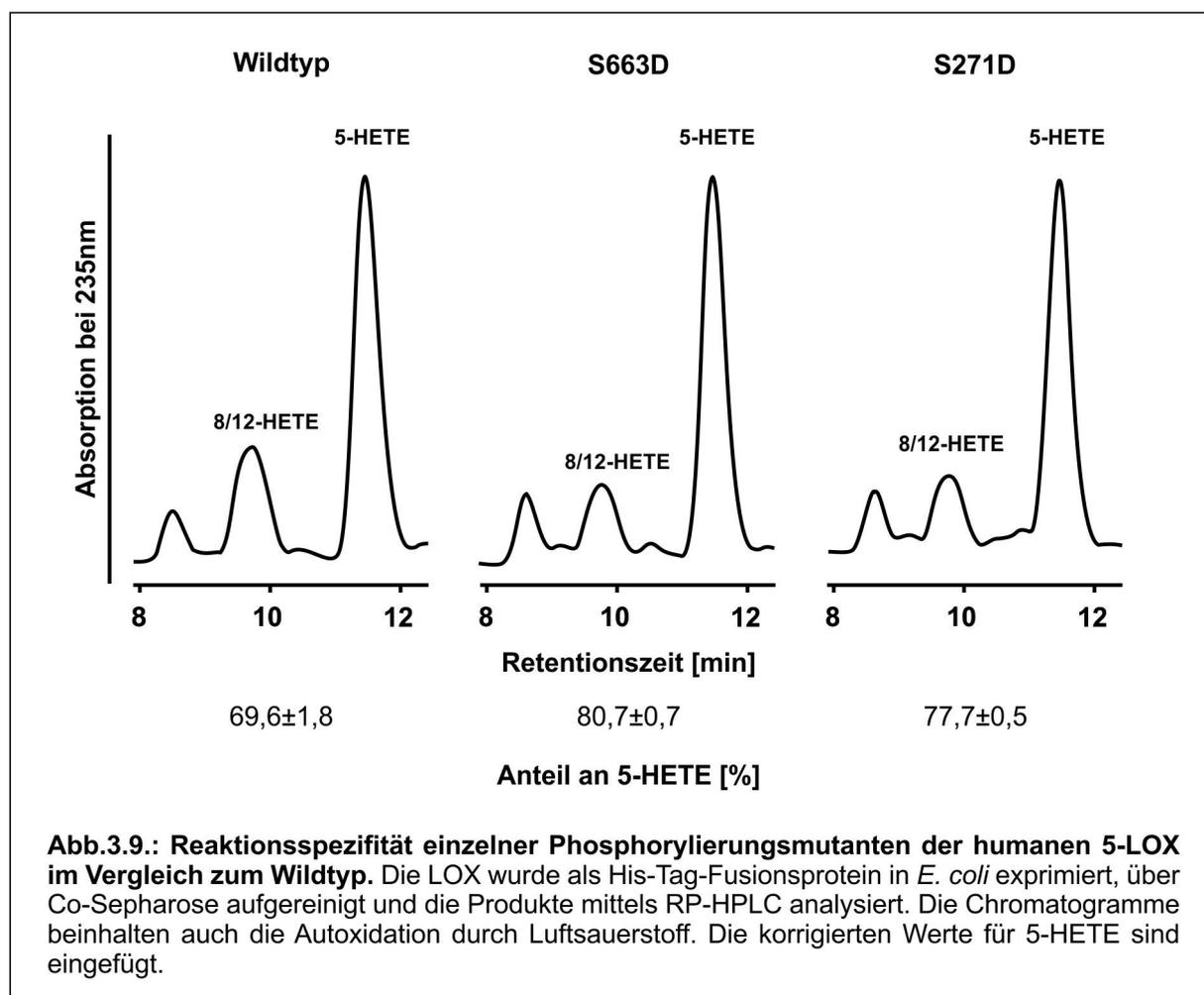
Zsfg.: Mutationen, welche die Phosphorylierung der Aminosäuren Ser271 und Ser663 an der murinen 5-LOX simulieren, führen zu einer geringen Erhöhung der 15-HETE Bildung (2%) bei gleichzeitigem signifikanten Anstieg der 5-HETE-Bildung. Die Mutation an Ser523 führt zu keiner signifikanten Änderung des 5- und 15-HETE-Anteils.

3.3.3 Pseudophosphorylierung der humanen 5-LOX

Da die Ergebnisse der murinen 5-LOX anders als erwartet keinen großen Anstieg der 15-HETE-Produktion erbrachten, wurden die Pseudophosphorylierungen im humanen Enzym vorgenommen. Diese Experimente sollten die Richtigkeit der kürzlich veröffentlichten Literaturdaten bestätigen. Daraus sollten dann Schlussfolgerungen abgeleitet werden können, warum sich humane und murine 5-LOX hinsichtlich ihres potentiellen Phosphorylierungsverhaltens unterscheiden. Solche Unterschiede wären von biologischer Bedeutung, wenn Resultate, die an der murinen 5-LOX erhalten wurden, auf die humane Situation übertragen werden. Die humane 5-LOX wurde nach dem Protokoll der murinen 5-LOX in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und die Produkte mittels RP-HPLC analysiert.

3.3.3.1 Mutation an den Phosphorylierungsstellen Serin 271, 523 und 663

Die RP-HPLC-Analytik ergab für den Wildtyp 69,6 % 5-HETE sowie 30,4 % 8/12-HETE. Die Mutante S663D bildete 80,7 % 5-HETE und 19,3 % 8/12-HETE. Der Nachweis von signifikanten Mengen an 15-HETE war nicht möglich (Abb.3.9.). Ähnliche Resultate ergab die Untersuchung des Produktspektrums der Mutante S271D. Bei beiden Mutanten war der Anteil an 5-HETE signifikant ($p < 0,001$) höher als beim Wildtypenzym, was auf die Reduzierung der Bildung von Nebenprodukten (8- und 12-HETE) zurückzuführen war. Das Einfügen der Mutation S523D führte zu einem inaktiven Enzym.



Zsfg.: Mutationen, die die Phosphorylierung der Aminosäuren Ser271 und Ser 663 an der humanen 5-LOX simulieren, führen nicht zur Erhöhung der 15-HETE Bildung. Zudem war die Mutante S523D inaktiv.

3.4 Einfluss von A zu G Mutanten auf die Reaktionsspezifität

Untersuchungen an diversen Lipoxygenasen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass ein Alanin beziehungsweise Glycin an einer wichtigen Stelle der Primärstruktur eine entscheidende Rolle für die Spezifität von Lipoxygenasen spielt. Die meisten S-Lipoxygenasen tragen an dieser Stelle ein Alanin, bei R-Lipoxygenasen findet sich dahingegen ein Glycin (Abb.3.10.). Ein Austausch des Alanins an dieser Stelle gegen ein Glycin in S-Lipoxygenasen induziert eine Erhöhung der R-Oxygenierungsprodukte. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Gly-zu-Ala Mutation an der entsprechenden Stelle von R-Lipoxygenasen eine Erhöhung der S-Oxygenierungsprodukte (Coffa und Brash, 2004).

Humane 5(S)-LOX	406	I N T K A R E Q L I
Murine 5(S)-LOX	406	I N T R A R T Q L I
Humane 12(R)-LOX	436	I N S I G R A V L L
Murine 12(R)-LOX	436	I N S I G R A L L L

Abb.3.10.:Aminosäureabgleich verschiedener LOX-Isoformen im Bereich der Coffa-Determinante. Es zeigt sich, dass Lipoxygenasen, die Produkte mit S-Konfiguration bilden, im Bereich der Coffa-Determinante (fett gedruckt) ein Alanin aufweisen, wohingegen Lipoxygenasen mit Produkten in R-Konfiguration in diesem Bereich ein Glycin zeigen.

3.4.1 Mutation des Alanin 410 zu einem Glycin

Eine Analyse der Sequenz der murinen 5-Lipoxygenase zeigte, dass diese an der entsprechenden Stelle ein Alanin besitzt (Abb.3.10.), was auf eine vorwiegende Produktion von 5S-HETE hinwies. Dies konnte experimentell bestätigt werden (Abb. 3.2.).

Dem Konzept von Coffa und Brash folgend, erwartete man bei einem Austausch des Ala410 gegen ein Gly eine Konvertierung der Enzymaktivität hin zu einer 9R-Lipoxygenase. In der Tat zeigte die A410G Mutante in initialen Untersuchungen eine 9-HETE-Bildung von 29% (Jansen *et al.*, 2011).

Für diese Arbeit wurde die A410G Mutante der murinen 5-LOX unter optimierten Bedingungen exprimiert und das Produktmuster mit einer verbesserten Analysestrategie untersucht. Dabei ergab sich eine 9-HETE-Bildung von 39,7%, wobei zu über 80% das R-Enantiomer gebildet wurde. Das Hauptprodukt des Wildtypenzym (5-HETE) wurde von der A410G Mutante nur noch zu 36,2% gebildet (>95% S-konfiguriert). Als Nebenprodukte der Arachidonsäureoxygenierung durch die A410G Mutante wurden 8-(5,5%) und 12-HETE (18,6%) gebildet (Abb.3.11., Tab.3.4.). Eine vollständige Umwandlung zu einem Enzym mit reiner 9R-LOX-Aktivität konnte nicht erreicht werden.

3.4.2 Kombination der Coffa-Mutante mit ausgewählten Mutanten der Volumenhypothese

Um die Vereinbarkeit der Volumenhypothese mit der Theorie zur Stereospezifität von Coffa und Brash zu testen, wurden jene Mutanten, die durch eine hohe 15S-HETE-Produktion gekennzeichnet waren, mit der Coffa-Mutation kombiniert. Es zeigte sich entsprechend dem Coffa/ Brash Konzept ein Anstieg von 11R-HETE (Tab.3.4.). Allerdings konnte auch hier keine vollständige Umwandlung der 15S-Oxygenaseaktivität zu einer 11R-Lipoxygenaseaktivität erreicht werden. Diese Daten lassen die Aussage zu, dass das Coffa/ Brash Konzept sowohl auf den Wildtyp der murinen 5-LOX als auch

auf verschiedene 15S-lipoxygenisierende Mutanten des Enzyms eingeschränkt anwendbar ist.

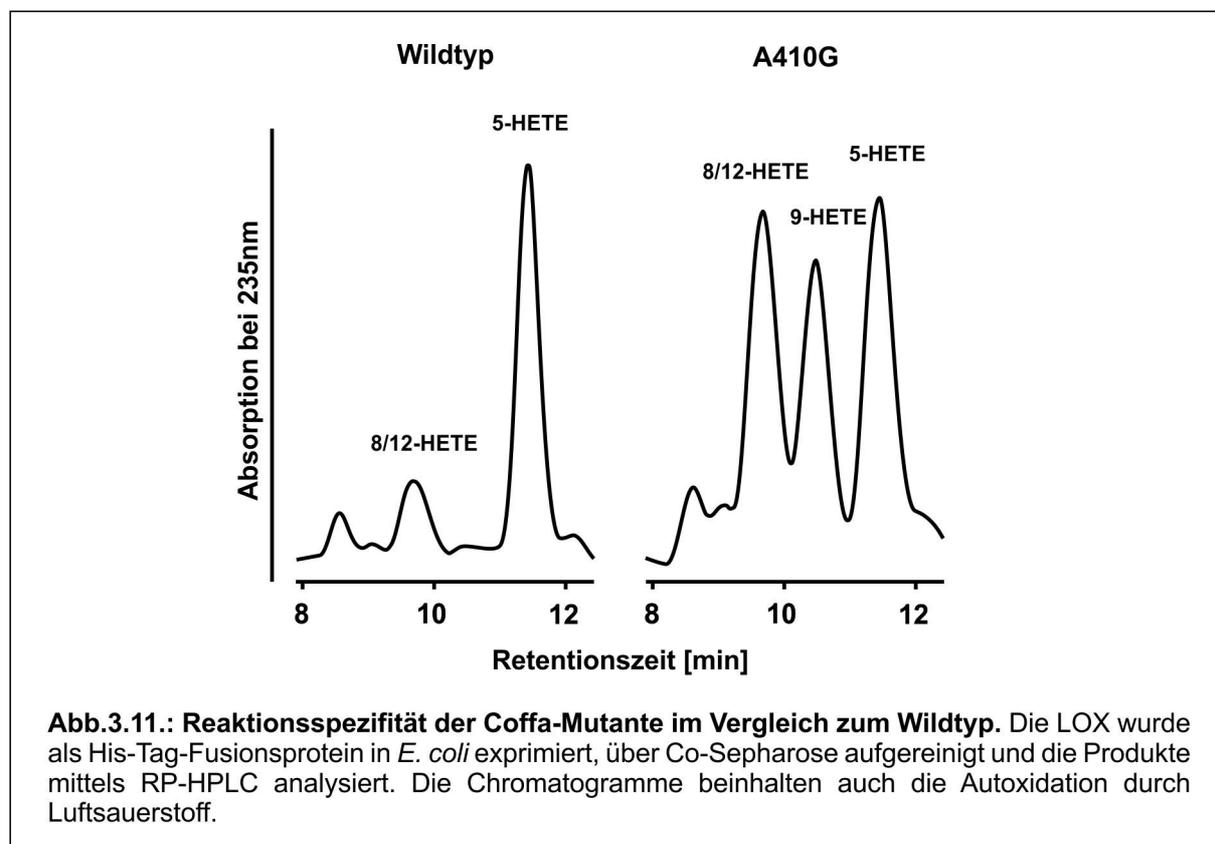


Tabelle 3.4.: Reaktionsspezifität der Coffa-Mutante sowie ausgewählter Kombinationsmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP- und SP-HPLC analysiert. * $p < 0,05$ verglichen mit dem Wildtyp. Der Übersichtlichkeit halber sind lediglich die Mittelwerte angegeben. Für detailliertere statistische Angaben siehe Tab.6.4.

Determinanten	5-HETE [%]	9-HETE [%]	8/12-HETE [%]	11-HETE [%]	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
Wildtyp	81,2	0,3	18,5	0,0	0,0	100
A410G	36,2	39,7	24,1	0,0	0,0	46
F359W+N425M	2,4	5,6	61,7	7,4	22,9	67
F359W+N425M+A410G	2,2	2,2	62,4	18,7	14,4	11
F359W+A424I+N425M	0,0	0,7	31,4	4,2	63,7	117
F359W+A424I+N425M+A410G	1,2	1,9	38,8	35,5	22,6	32

Zsfg.: A410G Austausch an der murinen 5-LOX führt entsprechend dem Coffa/ Brash Modell zur Erhöhung der 9R-Oxygenaseaktivität. Wurde diese Mutation an 15-lipoxygenierenden Varianten der murinen 5-LOX durchgeführt, war 11R-HETE ein wesentliches Reaktionsprodukt. Damit ist das Coffa/ Brash Konzept auf die murine 5-LOX eingeschränkt anwendbar.

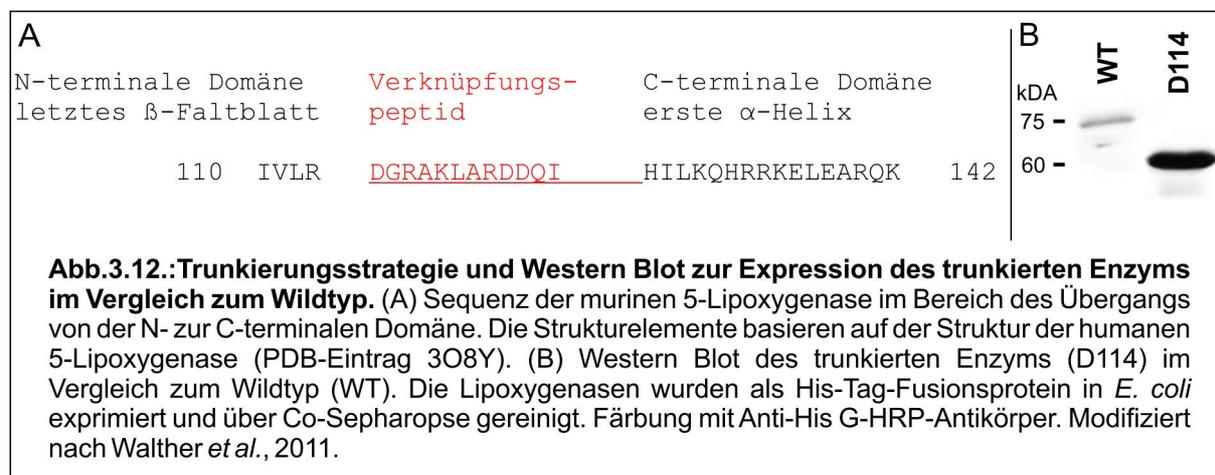
3.5 Trunkationsexperimente

Alle bisher kristallisierten Lipoxygenasen bestehen aus zwei abgrenzbaren Domänen (Ivanov *et al.*, 2010). Die C-terminale Domäne enthält das katalytisch aktive Nicht-Häm-Eisen und die Substratbindungstasche. Die kleinere N-terminale Domäne besteht vorwiegend aus β -Faltblattstrukturen und zeigt große Strukturähnlichkeit mit der C2-Domäne humaner Lipasen. Diese vermittelt unter anderem die Membranbindung der Lipase (Chahinian H. *et al.*, 2000). Für verschiedene LOX-Isoformen wie die Kaninchen 12/15-LOX oder die humane Plättchen-Typ 12-LOX konnte diese Funktion der N-terminalen Domäne im Rahmen von Trunkationsexperimenten auch nachgewiesen werden (Aleem *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2002). Für die 5-Lipoxygenase existieren *in vivo*-Studien, welche zeigen, dass in aktivierten Zellen die LOX an Kernmembranen bindet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die isolierte N-terminale Domäne in zellulären Modellexperimenten nach Zellaktivierung an die Kernmembranen bindet (Kulkarni *et al.*, 2002).

Weiterhin wurde der N-terminalen Domäne eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Lipoxygenasen zugeschrieben. Mittels limitierter Proteolyse konnte eine „Mini-LOX“ der Sojabohnen-LOX-1 hergestellt werden, die im wesentlichen der katalytischen Domäne dieses Enzyms entspricht. Diese „Mini-LOX“ besaß eine deutlich gesteigerte katalytische Aktivität (Maccarrone *et al.*, 2001). Gegenteilige Ergebnisse konnten für gentechnisch trunkierte Varianten der Kaninchen 12/15-LOX und der humanen Plättchen-Typ 12-LOX erzielt werden (Aleem *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2002). Hier zeigten die isoliert exprimierten C-terminalen Domänen eine deutlich verringerte enzymatische Aktivität. Die Trunkationsversuche an der humanen 5-LOX führten zu inaktiven Enzymen (Walther *et al.*, 2011).

Um die funktionellen Konsequenzen der N-terminalen Trunkation der murinen 5-LOX zu erforschen, wurde eine trunkierte Variante des Enzyms erzeugt. Dazu wurde ein neues Startcodon in das Verknüpfungspeptid, welches C- und N-terminale Domäne miteinander verbindet, eingefügt. Der davorliegende Teil wurde mittels Restriktions-

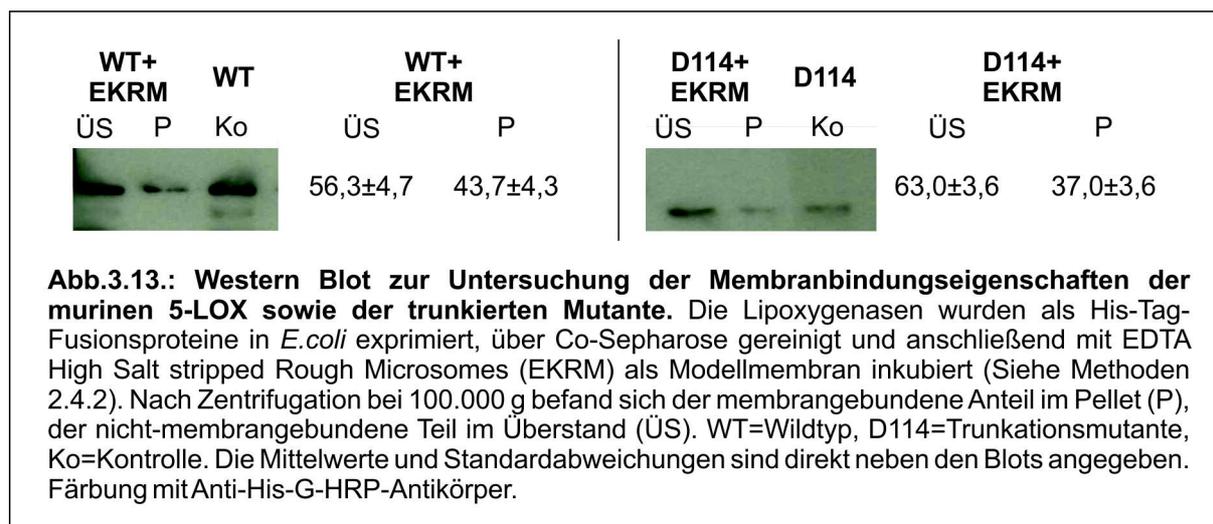
spaltung entfernt. Aufgrund der Verkleinerung des Proteins um 114 Aminosäuren wurde erwartet, dass die trunkierte LOX in der SDS-Gelelektrophorese bei ca. 60 kDa wandert. Diese Vorhersage konnte experimentell bestätigt werden (Abb.3.12.).



3.5.1 Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Membranbindungseigenschaften des Enzyms

Um die Membranbindungseigenschaften der murinen 5-LOX und ihrer N-terminalen Trunktionsvariante zu testen, wurden sowohl das trunkierte Enzym als auch der Wildtyp in einem rekonstituierten *in vitro* Membranbindungsassay eingesetzt. Dabei wurden Microsomenmembranen (EDTA High Salt stripped Rough Microsomes, EKRM) mit beiden Enzymvarianten inkubiert (siehe Methoden 2.4.2.) und nach Zentrifugation der Membranen der LOX Gehalt im Pellet und im Überstand mittels Immunoblot quantifiziert.

Es zeigte sich, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei der Trunktionsmutante ca. 40% der LOX im Pellet wiedergefunden wurde. Die restlichen ca. 60% befanden sich im Überstand und waren dementsprechend nicht membrangebunden (Abb.3.13.). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die N-terminale β -Faltblattdomäne für die Membranbindung im verwendeten *in vitro* System nicht essentiell zu sein scheint. Die N-terminale Trunktionsmutante zeigt ähnliche Membranbindungseigenschaften wie das Wildtypenzym. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von entsprechenden Resultaten, die mit der Kaninchen 12/15-LOX erhalten wurden. Bei diesem Enzym induzierte die N-terminale Trunkation eine deutliche Abnahme der Membranbindungsaktivität (Walther *et al.*, 2002). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse zur *in vitro* Membranbindung der murinen 5-LOX nicht auf die intrazellulären Bedingungen übertragen werden können.

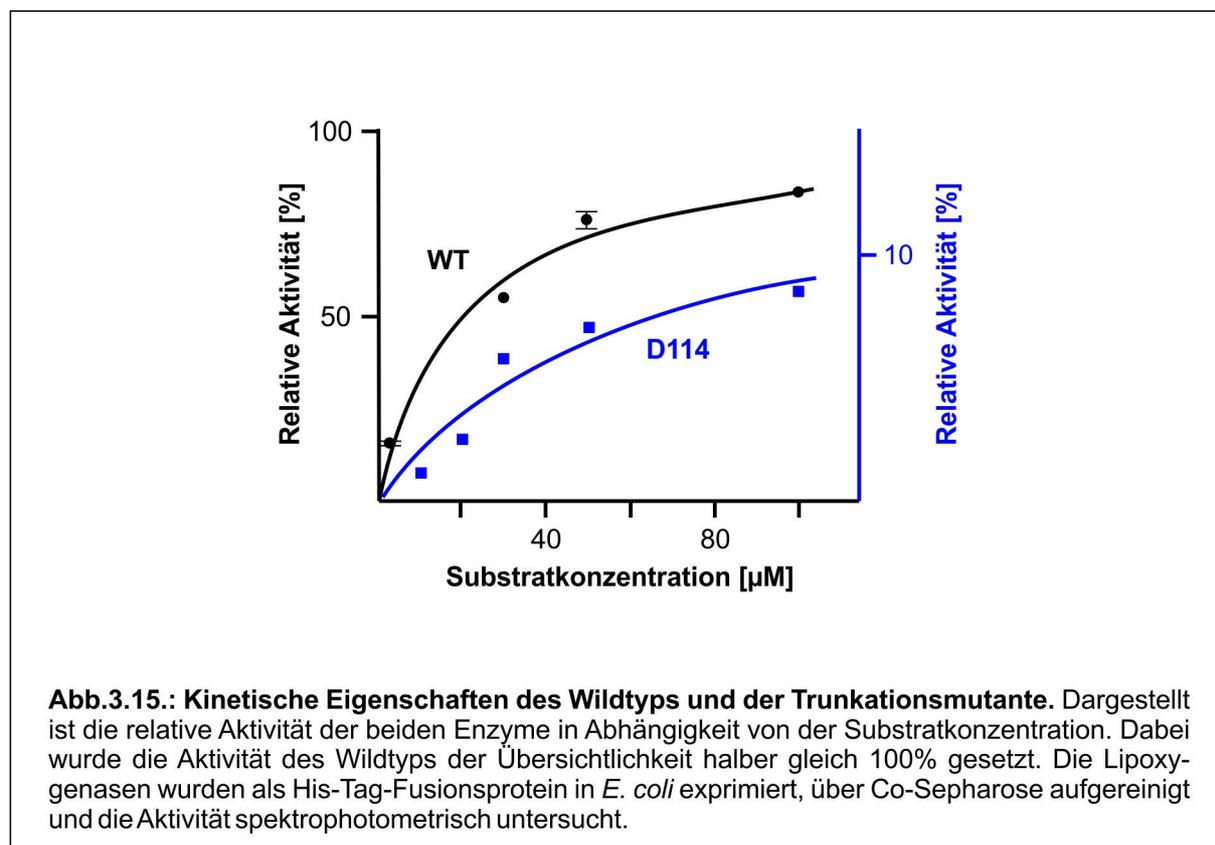
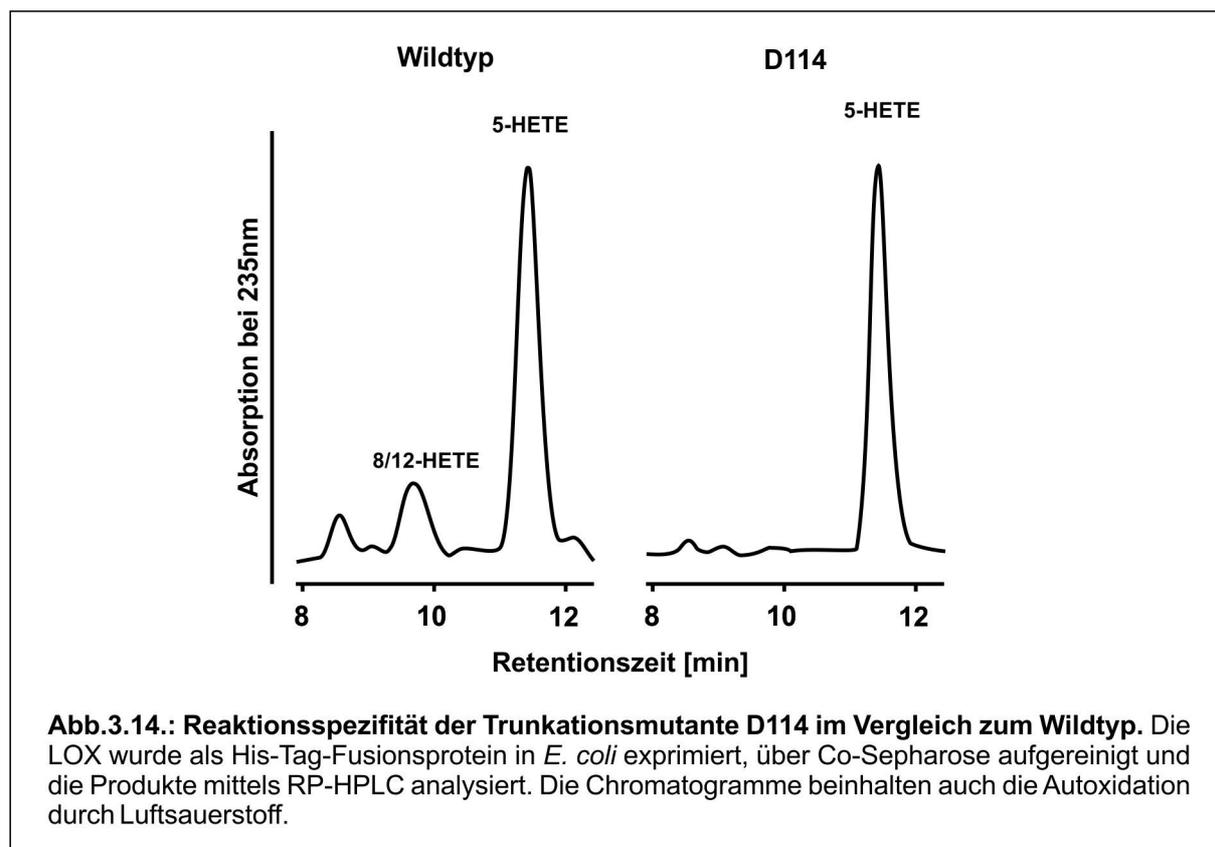


Zsfg.: Trunkation der murinen 5-LOX beeinflusst die Membranbindungsaktivität des Enzyms nicht. In einem *in vitro* Bindungsassay adhärirt das Wildtypenzym in ähnlicher Weise wie die N-Terminale Trunktionsmutante.

3.5.2 Einfluss des N-Terminus auf die katalytische Aktivität

Um den Einfluss der N-terminalen Domäne auf die katalytische Aktivität der murinen 5-Lipoxygenase zu überprüfen, wurde zunächst eine HPLC-Analytik der Reaktionsprodukte durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das trunkierte Enzym genauso wie der Wildtyp hauptsächlich 5-HETE erzeugt (Abb.3.14.). Zudem war der relative Anteil der Nebenprodukte (8- und 12-HETE) bei der Trunktionsmutante deutlich reduziert. Die Menge der während der Inkubationszeit von 10 Minuten gebildeten Reaktionsprodukte war bei der Trunktionsmutante deutlich verringert (< 10%), so dass geschlussfolgert werden konnte, dass die katalytische Aktivität der Trunktionsmutante geringer ist als die des kompletten Enzyms. Ähnliche Ergebnisse wurden für die trunkierten Varianten der Kaninchen 12/15-LOX und der humanen Plättchen-Typ 12-LOX erhalten (Aleem *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2002). Um herauszufinden, ob die verringerte katalytische Aktivität zumindest teilweise auf eine verringerte Substrataffinität des Enzym zurückzuführen ist, wurden detaillierte kinetischen Messungen mit einem spektrophotometrischen Aktivitätsassay durchgeführt. Dabei wurden Aliquots des Wildtypenzym und der N-terminalen Trunktionsmutante bei verschiedenen Substratkonzentrationen inkubiert und der zeitliche Verlauf der Bildung der konjugierten Diene gemessen. (Abb. 3.15). Durch hyperbole Regression konnte aus der Verlaufskurve für das Wildtypenzym ein K_M -Wert von 20 μ M ermittelt werden. Die Abweichungen zum ermittelten Wert in 3.1.3 resultieren aus den unterschiedlichen

Enzympräparationen.



Für die Trunktionsmutante ergab sich ein Wert von $60,4 \mu\text{M}$. Damit konnte geschlossen werden, dass die N-terminale β -Faltblattdomäne für die Substratbindung bedeutsam ist. Worin jedoch genau diese Bedeutung besteht, kann derzeit noch nicht gesagt werden.

Zsfg.: N-terminale Trunkation der murinen 5-LOX verringert die katalytische Aktivität und senkt die Affinität des Enzyms zur Arachidonsäure. Die Spezifität der Fettsäureoxygenierung wird jedoch nicht beeinflusst. Damit beeinflusst die N-terminale Domäne die Substratbindung und die Effizienz der Fettsäureoxygenierung.

4 Diskussion

4.1 Positionsspezifität von LOXn

Die aktuelle Klassifikation der tierischen Lipoxygenasen beruht auf deren Positionsspezifität. Leider kann man die Positionsspezifität dieser Enzyme in vielen Fällen nicht aus ihrer Primärstruktur erschließen, was u.a. ein Vergleich der humanen 15-LOX-2 und des Orthologs der Maus (murine 8-LOX) zeigt. Aufgrund der zunehmenden Anzahl von Lipoxygenasen, die durch Sequenzierung von Genomen verschiedenster tierischer und pflanzlicher Spezies gefunden werden, wird es aber immer wichtiger, eine plausible Klassifizierung von Lipoxygenasen vorzunehmen, die sowohl enzymatische Eigenschaften der Enzyme (z.B. Positionsspezifität) als auch deren genetische Verwandtschaftsbeziehungen berücksichtigen.

In der Vergangenheit wurde überwiegend das funktionsbasierte Konzept der LOX-Klassifizierung (Positionsspezifität als Klassifizierungskriterium) verwendet, während in den letzten Jahren das genetische Klassifizierungssystem (Einteilung anhand von Verwandtschaftsbeziehungen) immer mehr in den Vordergrund rückte. Beide Konzepte verfügen über Vor- und Nachteile, sodass derzeit noch nicht absehbar ist, welcher der beiden Vorschläge sich in Zukunft durchsetzen wird. Idealerweise sollte ein alternatives Konzept entwickelt werden, welches die Vorteile beider Systeme vereint und deren Nachteile eliminiert.

Im Folgenden soll am Beispiel von 12/15- und 5-LOXn aufgezeigt werden, welche Probleme sich bei der Entwicklung eines solchen universellen Konzeptes der Positionsspezifität von LOXn ergeben. Derzeit ist noch weitgehend unklar, warum 12/15-LOXn Arachidonsäure am C15 bzw. C12 oxygenieren, während 5-LOXn molekularen Sauerstoff am C5 der Kohlenstoffkette einführen.

Die Volumenhypothese könnte einige der mit diesem Problem verbundenen mechanistischen Fragen beantworten. Die Hypothese besagt, dass die Größe der Substratbindetasche die Eindringtiefe der Arachidonsäure ins aktive Zentrum festlegt. Dadurch sollte ein bestimmtes Kohlenstoffatom der Substratfettsäure in räumliche Nähe zum katalytisch wirksamen Enzymzentrum gebracht werden, sodass molekularer Sauerstoff angelagert werden kann (Browner *et al.*, 1998).

4.1.1 Biologische Bedeutung der Reaktionsspezifität der LOXn

Lipoxygenasen spielen in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Ihre Wirkung entfalten sie dabei über zwei unterschiedliche Wege: i) Bildung von Reaktionsprodukten, die über rezeptorvermittelte Signalwege Einfluss auf Prozesse nehmen ii) Veränderung der Struktur von komplexen Lipid-Protein-Assoziationen (Membranen, Lipoproteinen) (Haeggström und Funk, 2011; Takahashi *et al.*, 2005).

Für Rezeptor-Ligand-Interaktionen wurde das Schlüssel-Schloss-Prinzip postuliert. Dieses geht davon aus, dass der Ligand wie ein Schlüssel zum entsprechenden Rezeptor (Schloss) passt (Goh *et al.*, 2004). Die Anwendbarkeit dieses Konzeptes ist auch für Lipoxygenaseprodukte gegeben. So kann 12S-HETE an den GPR31-Rezeptor binden und diesen aktivieren. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor ist in die Karzinogenese u.a. des Prostatakarzinoms involviert und fördert bei Aktivierung beispielsweise die Metastasierung. Dabei muss betont werden, dass die Bindung von 12S-HETE stereo- und positionsspezifisch ist. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem 5S-, 15S- und 12R-HETE keinen Effekt auf die Tumorzellen haben (Guo *et al.*, 2011).

5-Lipoxygenasen katalysieren über die Bildung des Zwischenprodukts 5-H(p)ETE die Bildung von Leukotrien A₄. Damit zeigen sie eine proinflammatorische Wirkung (Rouzer *et al.*, 1986). Pharmakologisch kann in diesen proinflammatorischen Prozess durch Leukotrien-Rezeptorantagonisten eingegriffen werden (Mastalerz und Kumik, 2010). Ein interessantes Target stellt aber auch die Positionsspezifität der 5-Lipoxygenase dar. So können Medikamente, die speziell die 5-Lipoxygenase hemmen, antiinflammatorische Wirkung zeigen. Als Beispiel dafür sei Zileuton genannt. Es bildet einen Komplex mit dem Eisen in der Substratbindetasche der 5-Lipoxygenase und inhibiert somit deren Aktivität (McGill und Busse, 1996). Eine inhibierende Wirkung auf andere Lipoxygenasen, so z.B. die humane Plättchentyp 12-LOX, die Kaninchen 15-LOX oder auch die Sojabohnen-LOX konnte nicht nachgewiesen werden (Carter *et al.*, 1991).

Lipoxine hingegen, deren Bildung durch 12/15-LOXn entscheidend mit beeinflusst wird, zeigen über die Bindung an den Rezeptor FPR2/ALX eine antiinflammatorische Wirkung. Diese antiinflammatorische Eigenschaft macht Lipoxine bzw. die Enzyme, die an ihrer Bildung beteiligt sind, zu einem weiteren interessanten pharmakologischen Target (Romano, 2010).

Die Veränderung der Struktur von komplexen Lipid-Protein-Assoziationen spielt z.B. in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Hier stand vor allem die

Aktivität der 12/15-LOX im Vordergrund. Die Datenlage zur Wirkung dieser LOX-Isoform ist allerdings uneinheitlich. Sowohl pro- als auch antiatherogene Wirkungen wurden beschrieben (Harats *et al.*, 2000; Merched *et al.*, 2008). Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, dass es neben Lipoxygenasen noch andere Einflussfaktoren gibt, die in der Pathogenese der Atherosklerose mitwirken (Campbell *et al.*, 2012). Es liegt nahe, dass das Einführen molekularen Sauerstoffs in eine komplexe Lipid-Protein-Struktur die physikochemischen Eigenschaften dieser verändert. Allerdings sollte aufgrund der Gesamtgröße des Komplexes der Ort der Oxygenierung und damit die Reaktionsspezifität der verantwortlichen Enzyme von untergeordneterer Wichtigkeit sein.

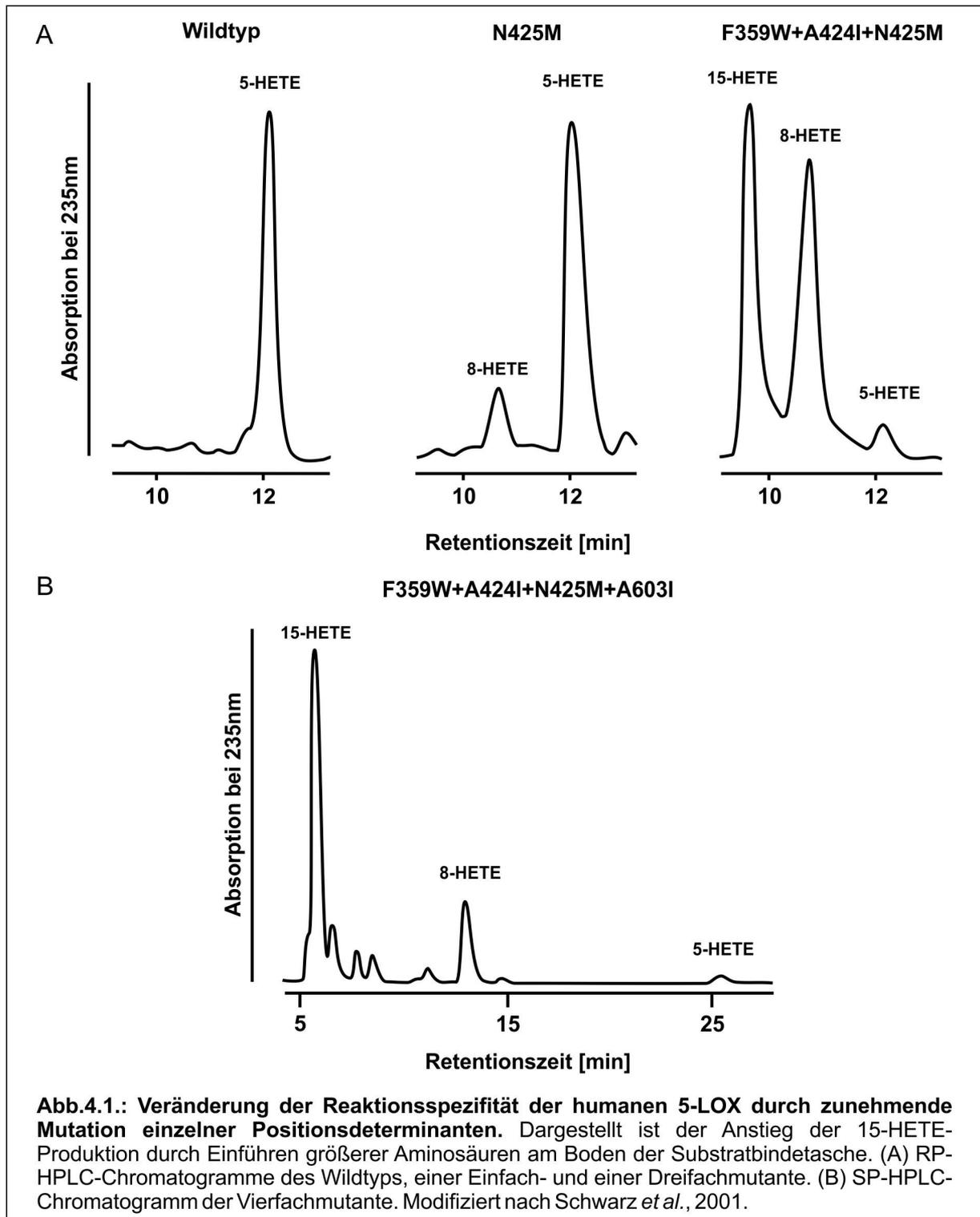
Es lässt sich also sagen, dass die Positionsspezifität der LOXn vor allem in der Rezeptor-Ligand-Interaktion einen entscheidenden Faktor für die nachgeschalteten biologischen Abläufe darstellt.

4.1.2 Anwendbarkeit der Volumenhypothese auf 5-LOXn

Ausgehend von der Volumenhypothese muss angenommen werden, dass die Substratbindetasche der 5-LOXn deutlich größer ist als die der anderen LOXn. Dies konnte in Strukturmodellierungen bestätigt werden. Es ergab sich eine um 20 % größere Substratbindetasche im Vergleich zur Kaninchen 12/15-LOX (Gillmor *et al.*, 1997). Kürzlich veröffentlichte Strukturdaten konnten diese *in silico* Daten untermauern (Gilbert *et al.*, 2011). Zudem konnte im Rahmen von Mutagenesestudien an der humanen 5-LOX die Volumenhypothese belegt werden.

Dafür wurden kritische Aminosäuren am Boden der Substratbindetasche gegen größere Aminosäuren ausgetauscht. Konkret handelte es sich hierbei um Phe359, Ala424, Asn425 und Ala603. Sukzessiv wurden diese Aminosäuren gegen Reste mit größeren Seitenketten ausgetauscht. Dabei zeigten schon die Einfachmutanten einen Anstieg der 8-HETE-Produktion, 15-HETE konnte allerdings als Reaktionsprodukt bei den Einfachmutanten nicht nachgewiesen werden. Für die Zweifachmutanten konnte der Anteil an 8-HETE weiter gesteigert werden, erstmalig konnte auch 15S-HETE bei der Mutante F359W+A424I nachgewiesen werden. Unter den Dreifachmutanten zeigte F359W+A424I+N425M mit 42 % die höchste 15-HETE-Produktion. Durch das Hinzufügen der Mutation A603I konnte der 15-HETE-Anteil auf 85-95 % gesteigert werden (Abb.4.1.). Dabei sollte betont werden, dass das gebildete 15-HETE fast ausschließlich als S-Enantiomer vorlag, was den enzymatischen Charakter des

Reaktionsproduktes verdeutlicht. Es konnte also durch den Austausch von vier Aminosäuren die humane 5-Lipoxygenase fast vollständig in ein 15S-lipoxygenierendes Enzym umgewandelt werden (Schwarz *et al.*, 2001).



Diese Daten deuten darauf hin, dass die Verkleinerung des Volumens der Substratbindungstasche eine 5-LOX in eine 15-LOX umwandelt. Ob diese Umwandlung

ein Spezifikum der humanen 5-LOX ist oder ob damit eine universelle Eigenschaft von 5-LOXn gefunden wurde, konnte anhand der vorliegenden experimentellen Daten jedoch nicht entschieden werden.

Im Rahmen meiner Promotionsarbeit konnte für die murine 5-Lipoxygenase die Anwendbarkeit der Volumenhypothese bestätigt werden. Dafür wurden zunächst durch ein multiples Aminosäurealignment die Sequenzdeterminanten identifiziert und anschließend in Analogie zur humanen 5-Lipoxygenase mutiert. Alle so erzeugten Mutanten wiesen eine relative Aktivität größer 65 % des Wildtyps auf, was auf eine hohe Zuverlässigkeit der Daten hinweist. Im Gegensatz zum humanen Enzym konnte schon bei bestimmten Einfachmutanten eine signifikante 15-HETE-Produktion gezeigt werden, welche Werte bis 21 % für die Mutanten N425M erreichte, wobei 69 % des analysierten 15-HETE S-konfiguriert waren. Diese Daten belegen, dass die 15-HETE Bildung überwiegend enzymkontrolliert ablief.

Der Trend zur 15-HETE-Bildung konnte durch das Einfügen einer zweiten Mutation verstärkt werden. So zeigte die Doppelmutante F359W+N425M zu 26 % 15-HETE, was zu über 80 % S-konfiguriert war. Durch das Einfügen der Mutation F359W+A424I konnte ein Enzym erzeugt werden, welches Arachidonsäure zu knapp 90 % zu 8S-HETE umsetzte. Die 8-HETE-Bildung stellt eine Zwischenstufe in der Umwandlung von 5-lipoxygenierenden zu 15-lipoxygenierenden Enzymen dar. Dabei ist der Ort der Wasserstoffabstraktion von C7 zu C10 verlagert worden.

Entsprechend der Volumenhypothese sollte eine weitere Mutation am Boden der Substratbindungstasche zu einer Zunahme der Wasserstoffabstraktion vom C13 der Arachidonsäure führen. Dies konnte experimentell bestätigt werden. So produzierte die Mutante F359W+A424I+N425M 67 % 15-HETE. Eine weitere Steigerung der 15-HETE-Produktion durch Einbringen einer vierten Mutation war interessanterweise nicht möglich. So bildete die Vierfachmutante sogar nur noch knapp 62 % 15-HETE, was auf eine antagonisierende Wirkung der Mutation A603I in diesem Fall hinweist. Vermutlich beeinflussen sich die Seitenketten so in ihrer Raumorientierung, dass das Volumen des aktiven Zentrums wieder etwas zunimmt und damit die Positionsspezifität zurück in Richtung 8- bzw. 5-HETE verschoben wird. Dieser Punkt muss auch Berücksichtigung finden bei der Korrelation der 15-HETE-Produktion mit der Volumenvergrößerung der Aminosäureseitenketten. Durch eine Veränderung der räumlichen Orientierung der Seitenketten könnte erklärt werden, warum der Austausch eines Alanins gegen ein Isoleucin, was die größte Volumenveränderung aller durchgeführten Mutationen

darstellt, zu einem verhältnismäßig geringen Anstieg der 15-HETE-Produktion führt. Um die Fragestellung nach der Orientierung der Seitenketten zu klären, wäre es zum einen interessant, direkte Strukturdaten zur Größe der Substratbindetasche der unterschiedlichen Mutanten der murinen 5-LOX zu erhalten. Ein alternatives Vorgehen wäre das Einbringen noch größerer Aminosäuren an den beschriebenen Positionen im Rahmen weiterführender Mutagenesestudien. Insgesamt aber spricht die gute Korrelation der Van-der-Waals-Volumina der Aminosäureseitenketten mit der 15-HETE-Produktion und der errechnete Korrelationskoeffizienten von 0,77 für die Anwendbarkeit der Volumenhypothese auf die murine 5-LOX. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Volumenhypothese nicht nur für die humane sondern auch für die murine 5-LOX gilt. Sie könnte damit ein generelles Prinzip der Positionsspezifität von 5-LOXn beschreiben.

Sollte die Volumenhypothese auf alle 5-LOXn anwendbar sein, könnten diese Ergebnisse bei der Suche nach isoform-spezifischen LOX-Hemmern genutzt werden. Hemmstoffe mit einem großen Molekylvolumen sollten aufgrund der sterischen Restriktion nicht in der Lage sein, die Substratbindetasche von 12/15-LOX zu besetzen. Damit wären sie keine geeigneten Hemmstoffe von 12/15-LOXn. Im Unterschied dazu könnten sie sehr wohl an das aktive Zentrum von 5-LOXn binden und damit die Oxygenierung von Arachidonsäure blockieren. Damit wäre das molekulare Volumen potentieller Hemmstoffe ein wesentlicher Faktor bei der Suche nach isoform-spezifischen LOX-Hemmstoffen. Dieses Konzept kann die Spezifität des Wirkstoffs Zileuton erklären.

4.1.3 Orientierungshypothese

Insbesondere für die 5-LOXn wird in der Literatur auch die Anwendbarkeit der Orientierungshypothese diskutiert. Sie bietet ein einfaches Erklärungsmodell für die Bildung von S-Enantiomeren durch die 5-LOX unter der Annahme, dass die Wasserstoffabstraktion von der selben Seite stattfindet wie bei 15-LOXn. Grundlage der Orientierungshypothese ist die Orientierung des Substrats in der Bindetasche. So soll sowohl bei 12- als auch bei 15-LOXn die Arachidonsäure mit dem Methylenende voran in die Substratbindetasche eindringen, wohingegen sie bei 5-LOXn mit der Carboxylgruppe voraus (inverse Substratorientierung) in die Bindetasche gelangt (Prigge *et al.*, 1997). Zwar bietet die Orientierungshypothese eine plausible Erklärung für die Bildung von 15S-HETE durch eine 5-LOX, sie zeigt aber auch klare Schwachpunkte: Zum einen

muss bei der inversen Orientierung die negativ geladene Carboxylgruppe der Substratfettsäure in eine hydrophobe Umgebung eingebracht werden, was einen hohen energetischen Aufwand bedeutet (Browner *et al.*, 1998). Zum anderen spricht der experimentelle Befund, dass 5-LOXn kein Dicarbonsäurederivat der Arachidonsäure umsetzen können (Walther *et al.*, 2001), deutlich dafür, dass das Einbringen der negativ geladenen Carboxylgruppe in die Substratbindungstasche problematisch ist.

Auf der anderen Seite unterstützen experimentelle Daten, die kürzlich für die humane 5-LOX gewonnen wurden, die Orientierungshypothese. So zeigt diese Lipoxygenase bei einer Pseudophosphorylierung an Ser663 eine Umkehr der Produktspezifität von 5- zu 15-Lipoxygenierung. Während der Wildtyp N-Arachidonyl-Glycin (NAGly), ein Substrat mit großer "Kopfgruppe" nicht umsetzen konnte, war die pseudophosphorylierte Variante dazu in der Lage. Zudem konnte sie Dihomogammalinolensäure (DGLA), welche sich durch die fehlende Doppelbindung zwischen C5 und C6 im Vergleich zur Arachidonsäure auszeichnet, umsetzen. Diese Befunde sind prinzipiell mit der Orientierungshypothese erklärbar (Gilbert, 2011). An dieser Stelle muss allerdings betont werden, dass im Rahmen meiner Arbeit die 15-HETE-Produktion durch pseudophosphorylierte Mutanten des humanen Enzyms nicht bestätigt werden konnte. Auch bei der pseudophosphorylierten murinen 5-LOX zeigten sich nur geringe Mengen 15-HETE (ca. 2%). Die Ursachen für die gegenteiligen experimentellen Ergebnisse sind völlig unklar. Mögliche Erklärungen dafür sind die unterschiedlichen Enzympräparationen, die verschiedenen Aktivitätsassays (unterschiedliche Reaktionsbedingungen und Aktivatoren) sowie die Mutationen, die zur Stabilisierung der Enzymaktivität eingefügt wurden. Frühere Untersuchungen an der humanen 15-LOX-2 und ihrem murinen Ortholog (Maus 8-LOX) konnten zeigen, dass die Reaktionsbedingungen keinen Einfluss auf die Produktspezifität der Wildtypenzyme haben. Dies gilt jedoch nicht für ausgewählte Mutanten. So wurde festgestellt, dass der Austausch von His604 gegen andere Aminosäuren die Reaktionsspezifität des murinen Enzyms abhängig vom pH-Wert machte. Außerdem induzierten Veränderungen der Substratkonzentration eine verstärkte pH-Sensitivität des Produktmusters (Walther *et al.*, 2009). Da zur Stabilisierung der humanen 5-LOX neben dem Austausch der Lysin-reichen Sequenz gegen den entsprechenden Abschnitt der Korallen 8R-LOX noch einige andere Mutationen vorgenommen worden sind (Gilbert *et al.*, 2011), ist es durchaus möglich, dass die Reaktionsspezifität deutlich stärker vom pH-Wert abhängig wurde. Hinzu kommt, dass die Arachidonsäurekonzentration im Vergleich zu den in meiner

Arbeit verwendeten Aktivitätsassays zum Teil deutlich geringer waren (Faktor 10), was eine mögliche pH-Abhängigkeit nochmals verstärken könnte. Dabei muss allerdings betont werden, dass die pH-Unterschiede bei den Aktivitätsassays in meiner Arbeit und der von Gilbert *et al.* mit 0,1 pH-Einheiten relativ gering waren. Dennoch bleiben die eingefügten Mutationen zur Stabilisierung der humanen 5-LOX, die für diese Arbeit nur zum Teil übernommen wurden.

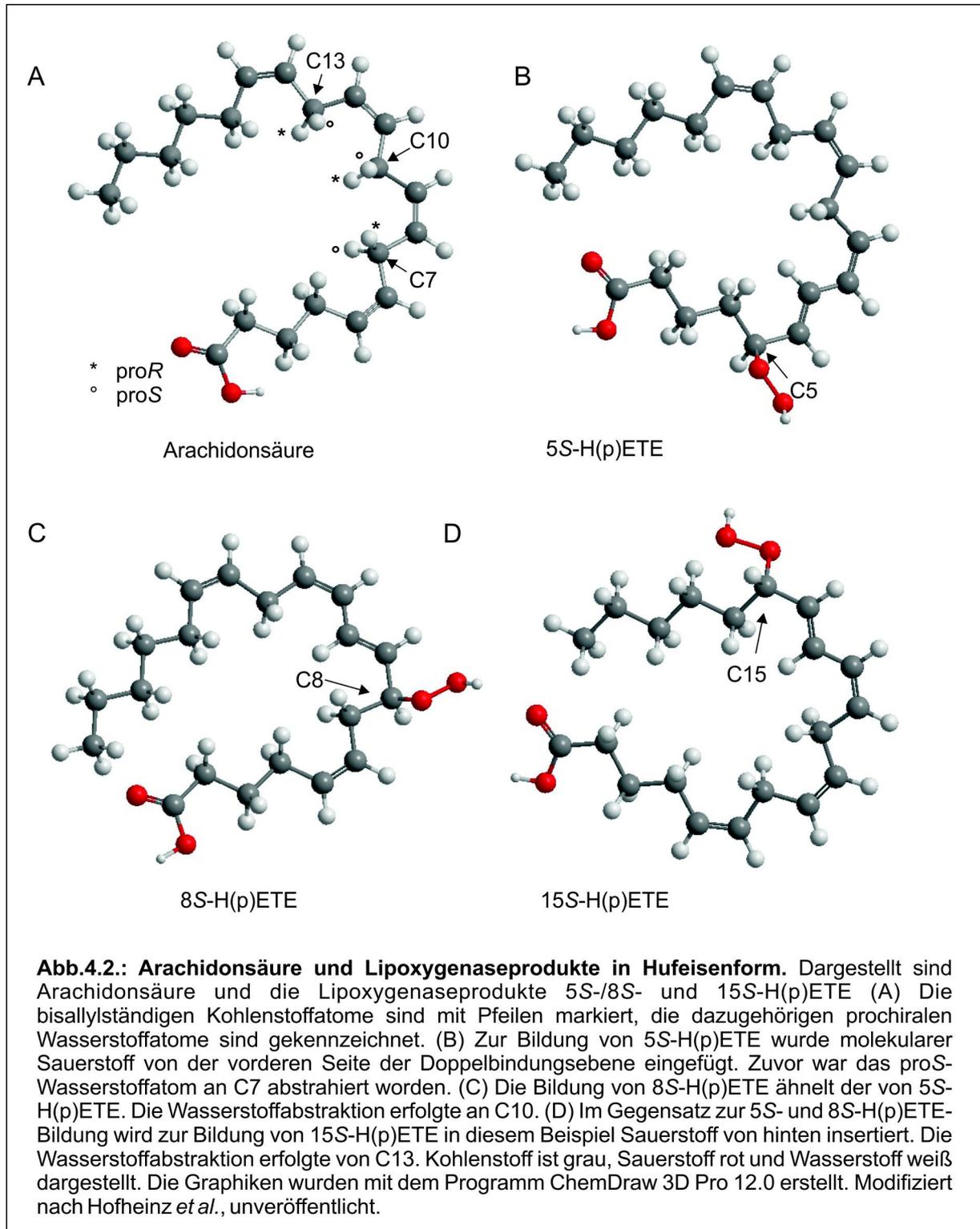
Zur Klärung dieser Diskrepanzen bei den pseudophosphorylierten Mutanten wäre es hilfreich, die LOXn jeweils mit der andere Enzympräparation aufzureinigen und die Aktivitätsassays analog dazu auszutauschen. Zudem könnte die weitere Stabilisierung der murinen 5-LOX angestrebt werden. Um die Anwendbarkeit der Orientierungshypothese auf 5-LOXn zu überprüfen, könnten weitere Studien mit veränderten Substraten hilfreich sein.

Dass die Pseudophosphorylierung der murinen 5-LOX an Ser271 anders als *in vivo* zu einer Herabregulation der Enzymaktivität führt, deutet darauf hin, dass *in vivo* noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

4.1.4 Vereinbarkeit der Stereochemie mit den Theorien zur Positionsspezifität

Für verschiedene Lipoxygenasen, darunter auch eine 5-LOX, ist der *antarafaciale* Charakter der Wassersoffabstraktion und Sauerstoffinsertion beschrieben worden. Entsprechende Versuche wurden mit Arachidonsäurederivaten durchgeführt, die an der bisallylständigen Methylengruppe ein stereospezifisches Deuterium oder Tritium aufwiesen (Corey und Lansbury, 2012; Egmond *et al.*, 1972; Hamberg und Hamberg, 1980). Die Theorien zur Positionsspezifität von LOXn beziehen sich auf eine Hufeisenform der Arachidonsäure und berücksichtigen an dieser den *antarafacialen* Charakter (Abb.4.2.). Dabei ist erkennbar, dass die Sauerstoffinsertion zur Bildung von 15S-H(p)ETE von der einen Seite der Doppelbindungsebene stattfinden muss, wohingegen sie zur Bildung von 5S-H(p)ETE von der anderen Seite abläuft. Auf diese Grundannahme stützt sich die Orientierungshypothese. Durch das umgekehrte Eintauchen der Arachidonsäure in die Substratbindetasche (Carboxylgruppe zuerst) wird das ursprünglich gegenüberliegende Wasserstoffatom dem katalytischen Eisen nahe gebracht. Entsprechend kann Sauerstoff so insertiert werden, dass ein S-konfiguriertes 5-H(p)ETE entsteht. Diese Theorie alleine vermag allerdings nicht erklären, warum es durch Mutation der Aminosäuren am Boden der

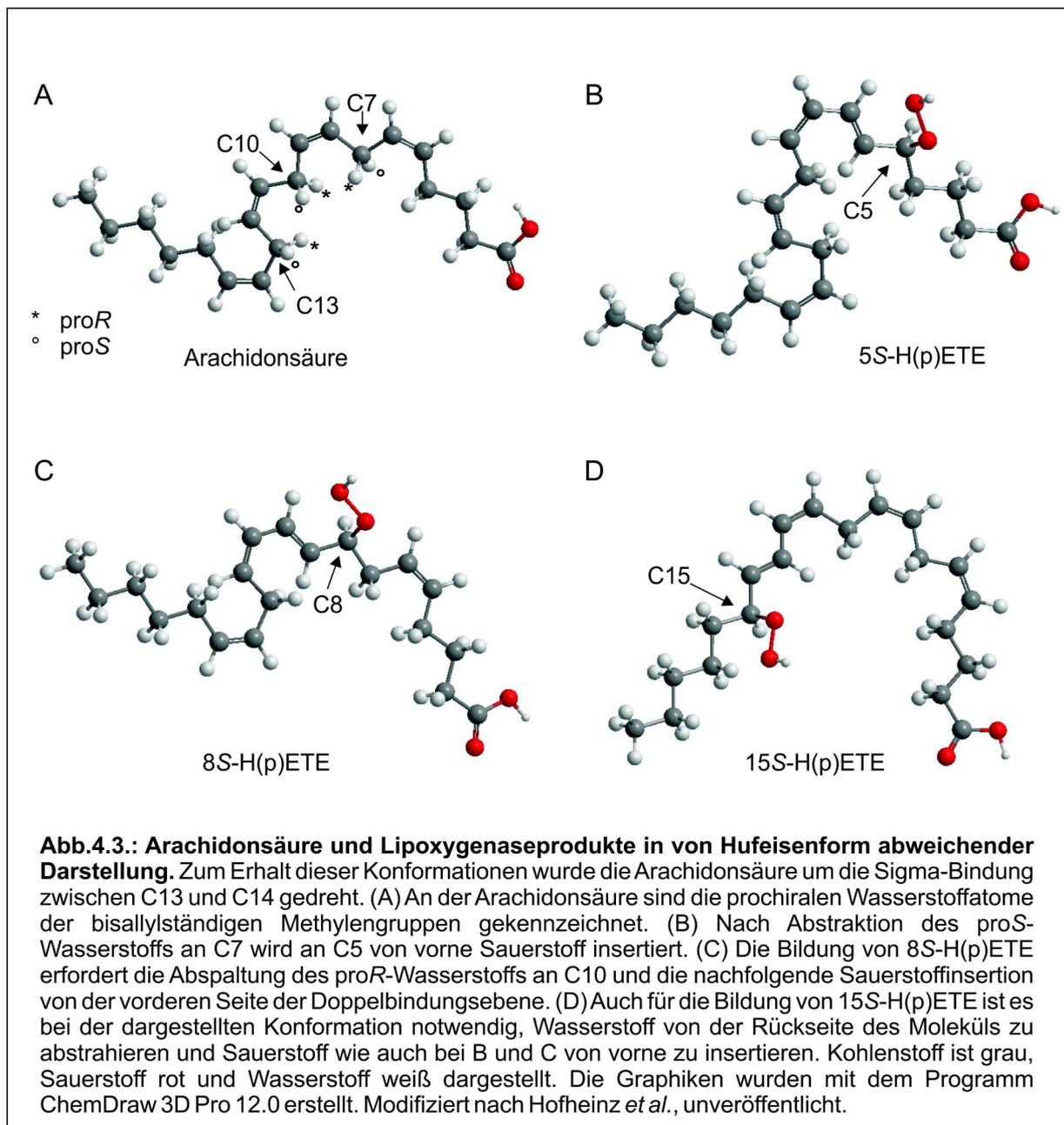
Substratbindetasche zu einer Bildung von 8S-H(p)ETE kommen kann. Hierfür bildet die Volumenhypothese einen geeigneteren Ansatz. Beispielhaft ist in Abbildung 4.3. eine Konformation der Arachidonsäure dargestellt, die alle erzeugten Produkte erklären kann, die bei Mutation der Aminosäuren am Boden der Bindetasche entstehen.



Durch eine 180° Drehung um die Sigmabindung zwischen C13 und C14 der

Arachidonsäure in Hufeisenform entsteht eine Konformation, bei der das pro*R*-Wasserstoffatom an C13 und C10 sowie das pro*S*-Wasserstoffatom an C7 auf der einen Seite der Doppelbindungsebene liegen. Die Sauerstoffinsertion an der gegenüberliegenden Seite führt zu 15*S*-/12*R*-/8*S*- und 5*S*-H(p)ETE.

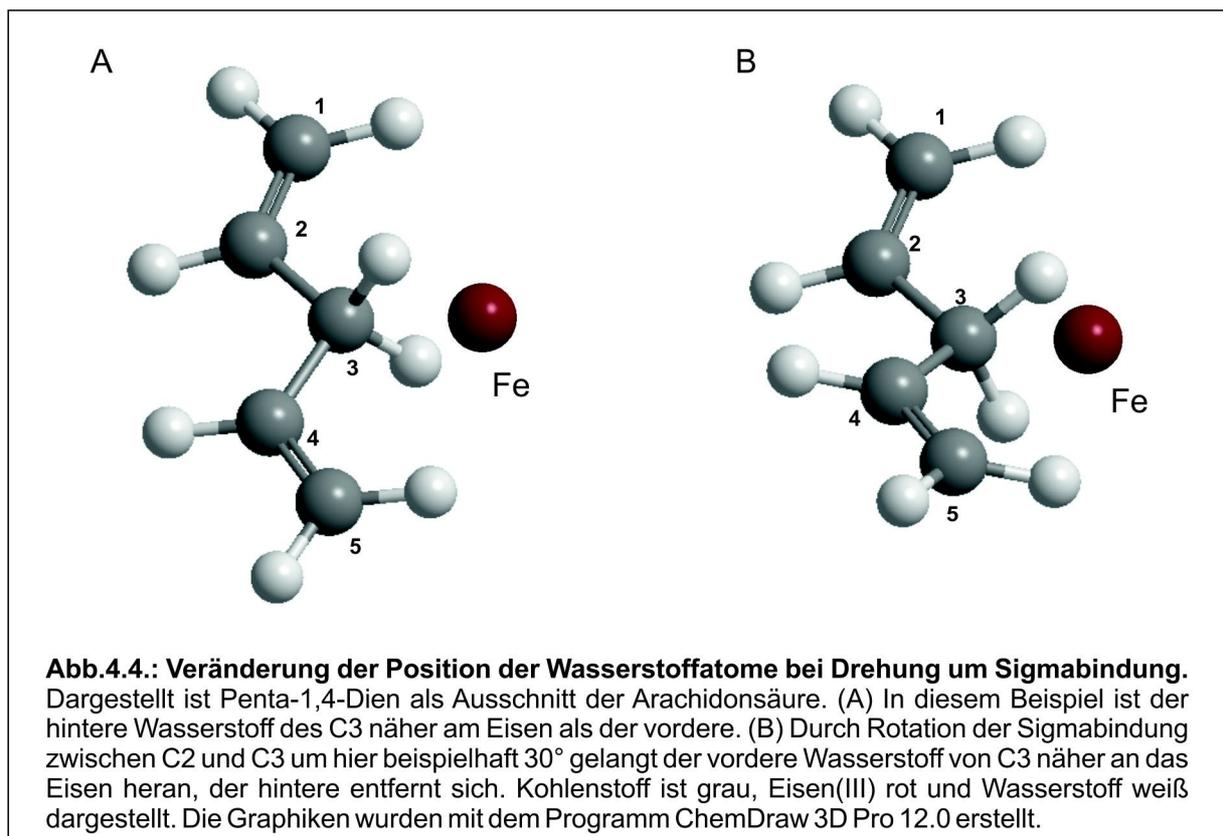
Als Nachteil erweist sich hierbei, dass die Bildung von 11*R*-H(p)ETE bei einer Mutation der Coffa-Determinante an 15-lipoxygenierenden Mutanten nicht erklärt werden kann.



Allerdings muss in diesem Fall berücksichtigt werden, dass diese Mutation anders als die vorangegangenen nicht am Boden der Substratbindetasche stattfindet, sondern an einer Seite. Dies kann zu einer Umorientierung der Arachidonsäure führen, sodass die

Sauerstoffinsertion nun von der anderen Seite möglich wird. Schon eine geringe Drehung um eine Sigmabindung kann das jeweils andere Wasserstoffatom der bisallylständigen Methylengruppe in die Nähe des katalytischen Eisens bringen (Abb.4.4.). Des Weiteren ist die spezifische katalytische Aktivität der beiden Mutanten in meiner Arbeit eher gering, sodass die Aussagekraft eingeschränkt ist.

Grundsätzlich muss berücksichtigt werden, dass Arachidonsäure in mehr als 10^7 energetisch niedrigen Konformationen vorliegen kann (Kühn *et al.*, 1986). Für beide hier diskutierten Modelle der Substratorientierung (sowohl Volumen- als auch Orientierungshypothese) wird von einer fixierten Form der Arachidonsäure ausgegangen, Konfigurationsveränderungen der Fettsäure während des katalytischen Zyklus wurden nicht berücksichtigt. Die für diese Arbeit angenommene starre Konformation der Arachidonsäure soll exemplarisch zeigen, dass die Produkte, die sich aus der alleinigen Änderung der Tiefe der Substratbindetasche ergeben, auch ohne inverse Orientierung der Arachidonsäure erklärbar sind.



4.1.4.1 Nomenklatur der Lipoxygenasesubstrate und -produkte

Optisch aktive Kohlenstoffatome sind Atome mit vier unterschiedlichen Liganden, die prinzipiell in zwei enantiomeren Konfigurationen vorliegen können. Zur Klassifizierung der Enantiomeren wurden zwei alternative Konzepte eingeführt, die sich auf

unterschiedliche Grundannahmen stützen. Als allgemeines Konzept, das auch der derzeit üblichen Klassifizierung von LOX-Produkten zugrunde liegt, wird die Cahn-Ingold-Prelog-Konvention (CIP-Konvention) betrachtet, die die Chiralitäten anhand der Prioritäten der Liganden am optisch aktiven Kohlenstoffatom definiert (Cahn *et al.*, 1966). Dabei werden zunächst die vier Substituenten betrachtet, die direkt an das sp^3 -hybridisierte Chiralitätszentrum gebunden sind. Diese erhalten einen Prioritätsscore entsprechend ihrer Ordnungszahl. Haben zwei oder mehr Atome in direkter Nachbarschaft die gleiche Ordnungszahl, so werden die Atome betrachtet, die danach kommen. Doppelt gebundene Atome zählen zweifach, dreifach gebundene dreifach. Die Summe aller Prioritäten in zweiter Nachbarschaft wird dann verglichen. Sollte immer noch kein Unterschied vorhanden sein, werden die darauf folgenden Atome mit einbezogen. Dadurch kann definitionsgemäß jedem Liganden an einem optisch aktiven Kohlenstoffatom ein Prioritätsscore zugewiesen werden. Die Strukturzuordnung von prochiralen Zentren, die in der Eikosanoïdchemie z.B. durch die doppelallylständigen Methylengruppen der Arachidonsäure repräsentiert werden, kann in analoger Weise vorgenommen werden. Dabei wird ein Wasserstoffatom an der doppelallylständigen Methylengruppe durch ein Atom ersetzt, welches eine geringgradig höhere Ordnungszahl als Wasserstoff und eine geringere als Kohlenstoff hat (z.B. Deuterium). Dieses System ist in der Stereochemie universell anwendbar, hat aber auch Nachteile, die an zwei Beispielen erläutert werden sollen: 1.) 12-LOXn abstrahieren den proS-Wasserstoff der Arachidonsäure zur Herstellung von 12S-H(p)ETE. Verwendet man Eicosapentaensäure als Substrat, wird zwar derselbe Wasserstoff abstrahiert, allerdings wird dieses Wasserstoffatom nach der CIP-Konvention als proR-Wasserstoff benannt. Dies liegt daran, dass in der Eicosapentaensäure eine weitere Doppelbindung zwischen C17 und C18 existiert und somit die Priorität des Methylgruppenliganden am C10 höher ist als die des Carboxylliganden. Bei der Arachidonsäure hingegen ist die Priorität des Carboxylliganden am C10 höher als die des Methylgruppenliganden. Diese Veränderung in der Prioritätsreihenfolge führt dazu, dass funktionell gleiche Wasserstoffatome in verschiedenen Substratfettsäuren unterschiedlich bezeichnet werden. Dadurch werden funktionelle Unterschiede suggeriert, die eigentlich nicht vorhanden sind. 2.) Die Oxidation von Arachidonsäure zu 15S-H(p)ETE macht aus dem proS-Wasserstoff am C10 der Arachidonsäure ein proR-Wasserstoffatom. Dies liegt einzig und allein daran, dass sich die Reihenfolge der Ligandenprioritäten verändert. In der Arachidonsäure befindet sich zwischen C14 und C15 eine Doppelbindung. Durch die Oxidation am C15

wird diese Doppelbindung um ein C-Atom in Richtung Carboxylgruppe verschoben und liegt damit beim 15S-H(p)ETE zwischen C13 und C14. Dadurch wird die Priorität des Methylgruppen am C10 erhöht, sodass das in der Arachidonsäure als proS bezeichnete Wasserstoffatom jetzt als proR bezeichnet werden muss, obwohl sich an der Stereochemie dieses Molekülteils nichts geändert hat.

Diese Schwierigkeit kann durch die Fischer-Projektion und die daraus resultierende Einteilung in D- und L-Chiralität umgangen werden (Kühn *et al.*, 1986). Entsprechend der Fischer-Projektion wird die längste Kohlenstoffkette eines Moleküls in eine Senkrechte gebracht, wobei das Kohlenstoffatom mit der höchsten Oxidationszahl (C1 der Arachidonsäure) oben lokalisiert ist. Das chirale Kohlenstoffatom wird jetzt so in die Projektionsebene gelegt, dass die direkt an das Chiralitätszentrum gebundenen Kohlenstoffatome vom Betrachter weggedreht werden. Damit werden die beiden anderen Liganden aus der Ebene nach vorne heraus gedreht. Nun befindet sich die D-Position rechts und die L-Position links (IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomenclature, 2012). Für die oben aufgeführten Beispiele gilt also: 1.) Das durch die 12-LOX abstrahierte Wasserstoffatom ist sowohl bei der Arachidonsäure als auch bei der Eicosapentaensäure proL. 2.) Das proS-Wasserstoffatom am C10 der Arachidonsäure ist sowohl bei dieser als auch bei 15S-H(p)ETE proL. Grundsätzlich bildet die Fischer-Projektion die enzymatischen Gegebenheiten gut ab, dadurch dass sie in rechts und links unterscheidet.

Der große Nachteil der Fischer-Projektion liegt jedoch darin, dass sie nur auf einfache Moleküle wie Zucker und Fettsäuren anwendbar ist. Komplexere Moleküle mit verzweigten Kohlenstoffketten oder auch zyklische Moleküle mit chiralen bzw. prochiralen Zentren können durch sie nicht klassifiziert werden. Beide Klassifikationen bieten dementsprechend sowohl Vor- als auch Nachteile. Eine gute Lösung scheint es zu sein, eine Kombination aus beiden Nomenklaturen zu verwenden. So hätte beispielsweise die Bezeichnung proR_(LR) bzw. proS_(LS) für das Beispiel 1 den Vorteil, dass sie durch die CIP-Konvention für alle Leser verständlich sind und dass sie durch den Zusatz L_R bzw. L_S die enzymatischen Gegebenheiten gut abbildet.

4.2 Stereoselektivität von LOXn

Lipoxygenasen zeichnen sich durch eine regio- und stereoselektive Sauerstoffinsertion aus. Nach Wasserstoffabstraktion an einer bisallylständigen Methylengruppe ist eine Radikalumlagerung in zwei Richtungen möglich. Aufgrund des *antarafacialen*

Charakters der Sauerstoffinsertion können nach dieser Wassersoffabstraktion an einem Kohlenstoffatom zwei Produkte resultieren. Lipoxygenasen bilden allerdings nur eins der möglichen Produkte. Einen möglichen Erklärungsansatz begründeten Coffa und Brash. Sie konnten zeigen, dass *R*-lipoxygenierende Enzymspezies an einer bestimmten Stelle ihrer Primärstruktur ein Glycin aufweisen, wohingegen *S*-Lipoxygenasen dort ein Alanin tragen (Coffa und Brash, 2004). Diesem grundsätzlichen System folgt auch die murine 5-Lipoxygenase. Der Wildtyp als *S*-lipoxygenierendes Enzym besitzt an der kritischen Position ein Alanin.

Für die Korallen 8*R*-LOX konnte durch den Austausch des Glycins gegen ein Alanin eine fast vollständige Konversion zu einem 12*S*-lipoxygenierenden Enzym erreicht werden. Für mehrere andere Enzyme gelang dies allerdings nicht. So konnte für die humane 15-LOX-2, die humane 12/15-LOX sowie die Kaninchen 12/15-LOX, alles vornehmlich 15*S*-lipoxygenierende Enzyme, zwar ein Anstieg der 11*R*-HETE-Anteils am Gesamtproduktspektrum gezeigt werden, dieser lag allerdings unter 30%. Für verschiedene 12*S*-LOXn, wie die murine 12/15-LOX und die 12/15-LOX des Rhesusaffen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Jansen *et al.*, 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur murinen 5-LOX zeigen eine ähnliche Tendenz. Zwar war ein signifikanter Anstieg des 9*R*-HETE messbar, doch konnte eine vollständige Konversion nicht erreicht werden. Diese Daten zeigen, dass der von Coffa und Brash postulierte alleinige Ala-Gly-Austausch nicht ausreicht, um die Stereospezifität zu erklären. Obwohl nachvollziehbar ist, dass das größere Alanin eine mögliche Position der Sauerstoffinsertion abzuschirmen vermag, muss doch kritisch betrachtet werden, dass die alleinige Freigabe dieser Position zu einer vollständigen Sauerstoffinsertion an dieser Stelle führen soll. Vielmehr müssen noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Dies untermauert auch die Tatsache, dass Strukturanalysen der Korallen 8*R*-LOX einen Leucin-Rest identifizieren konnten, der in Wechselwirkung mit dem Alanin bzw. Glycin steht und jeweils eine Position abschirmt (Neau *et al.*, 2009). Allerdings wird eben diesem Leucin auch eine Rolle im Substratalignment zugeschrieben, sodass es schwierig ist, die Effekte zu trennen. Des Weiteren bewirkt der Austausch eines Alanins gegen ein Glycin lediglich einen Raumgewinn von 20 Å³, wohingegen ein Molekül Sauerstoff knapp 50 Å³ einnimmt (Ivanov *et al.*, 2010). Dies bedeutet, dass schon ein Hohlraum für Sauerstoff vorhanden sein muss. Allerdings konnte bislang solch ein Hohlraum nicht identifiziert werden.

Weiterhin deuten Modellierungsexperimente zur Verfügbarkeit des Sauerstoffs

innerhalb der Kaninchen 12/15-LOX darauf hin, dass sich die Sauerstoffverteilung innerhalb des Enzyms bei einem Gly-Ala Austausch nicht so drastisch verändern sollte, dass die beobachteten Verschiebungen in der Enantioselektivität erklärbar wären (unveröffentlichte Daten). Möglicherweise kommt es aber durch den Gly-Ala Austausch zu größeren Strukturveränderungen, die eine gravierende Änderung der Sauerstoffverteilung induzieren. Ein weiteres wesentliches Argument gegen die alleinige Bedeutung einer einzelnen Aminosäure für die Enantioselektivität von LOXn ist die Tatsache, dass die Zebrafisch 12-LOX, welche an der entscheidenden Stelle ein Glycin trägt und daher nach der Theorie von Coffa und Brash ein *R*-lipoxygenierendes Enzym sein müsste, hauptsächlich 12*S*-HETE als Oxygenierungsprodukt der Arachidonsäure erzeugt (Haas *et al.*, 2011; Jansen *et al.*, 2011).

Die Gesamtschau der Daten zeigt, dass das Konzept von Coffa und Brash nur eingeschränkt anwendbar ist und nicht für alle Lipoxygenasen gilt. Vermutlich spielen neben dieser Aminosäure noch andere bisher nicht identifizierte Faktoren eine Rolle.

4.3 Die Rolle der N-terminalen Domäne

Die meisten der bisher erfolgreich kristallisierten LOXn zeigen eine strukturelle Gliederung in eine C-terminale sowie eine N-terminale Domäne (Gilbert *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2010). Das für Lipoxygenasen typische Nicht-Häm-Eisen befindet sich in der C-terminalen Domäne und lässt den Schluss zu, dass diese Domäne vor allem eine katalytische Funktion besitzt (Minor *et al.*, 1996). Dies konnte durch Strukturdaten der Kaninchen 12/15-LOX untermauert werden (Choi *et al.*, 2008). Die Rolle der N-terminalen Domäne ist aber weiterhin unklar. Strukturelle Ähnlichkeiten mit der C2-Domäne der humanen Lipase legten die Vermutung nahe, dass der N-Terminus die Membranbindungseigenschaften der LOXn vermittelt (Chahinian H. *et al.*, 2000). Zwar konnte anhand der trunkierten Variante der Retikulozyten-Typ 15-LOX gezeigt werden, dass der N-Terminus für die Membranbindung eine Rolle spielt, allerdings ist er für sie nicht essentiell (Walther *et al.*, 2002). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass Strukturen in der C-terminalen Domäne ebenfalls Membranbindung vermitteln müssen. In der Tat konnten zwei hydrophobe Aminosäuren im C-Terminus der Retikulozyten-Typ 15-LOX identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Membranbindung haben (Walther *et al.*, 2004). Auch für andere LOX-Isoformen wie z.B. die humane 12/15-LOX oder auch die 12/15-LOX des Orang-Utan gelang der Nachweis, dass die N-terminale Domäne eine, wenn auch nicht essentielle, Rolle für die Membranbindung spielt (Jansen *et al.*, 2011).

Für die murine 5-LOX und ihr trunkiertes Analogon konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne keinen Einfluss auf die *in vitro* Bindung an EKRM in einem zellfreien Assaysystem hat. Für verschiedene LOX-Isoformen, die mit grün fluoreszierendem Farbstoff markiert waren, konnte in vorangegangenen Arbeiten im zellulären Testsystem eine Bindung des Enzyms an Kernmembranen gezeigt werden. In diesen Versuchen ergab sich, dass nach Stimulation von HEK 293-Zellen mit Calcium-Ionophore der N-Terminus, das Wildtyp-Enzym sowie Chimäre, die den N-Terminus der 5-LOX und den C-Terminus anderer LOX-Isoformen beinhalteten, an Kernmembranen banden (Chen und Funk, 2001). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Versuche in Zellen stattfanden und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass andere Moleküle die Membranbindung gefördert haben. Für zwei Zelllinien konnte der Nachweis erbracht werden, dass FLAP für die Membranbindung nicht essentiell ist (Kargman *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1995). Als interessant könnten sich weitere Untersuchungen mit chimären Enzymen im Rahmen des für diese Arbeit verwendeten Membranbindungsassays erweisen. Auch der Einsatz anderer Arten von Biomembranen könnte aufschlussreich sein.

Viele Jahre gelang es trotz intensiver Bemühungen nicht, eine katalytisch aktive Trunktionsmutante einer 5-LOX zu erzeugen. Dies legte die Vermutung nahe, dass die N-terminale Domäne essentiell für die katalytische Aktivität der 5-LOXn ist (Chen und Funk, 2001; Walther *et al.*, 2011). Tatsächlich scheint der N-Terminus bei verschiedenen LOX-Isoformen eine unterschiedliche Rolle zu spielen. Beispielsweise zeigte die "Mini-LOX", die durch limitierten proteolytischen Verdau der Sojabohnen-LOX-1 entstand, eine verbesserte katalytische Effizienz (Maccarrone *et al.*, 2001). Für diverse Säugetierlipoxygenasen, wie z.B. die Kaninchen 12/15-LOX, die humane Plättchen-Typ 12-LOX sowie die 12/15-LOXn des Rhesusaffen und des Orang-Utan, konnte dahingegen ein Abfall der katalytischen Aktivität sowie der Substrataffinität gezeigt werden (Walther *et al.*, 2011). Im Rahmen meiner Arbeit gelang es erstmals, eine Trunktionsmutante der murinen 5-LOX herzustellen, die katalytisch aktiv war. Zwar zeigte sie im Vergleich zum Wildtyp eine katalytische Restaktivität, die unter 10% der Aktivität des Wildtypenzym lag, aber die Bildung von 5-HETE als dominierendes Reaktionsprodukt belegt, dass die Katalysemechanismen von Wildtypenzym und Trunktionsmutante prinzipiell identisch sein müssen. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmalig die Hypothese widerlegt werden, dass die N-terminale Domäne für die katalytische Aktivität von 5-LOXn essentiell ist. Vielmehr scheint der N-Terminus für die

murine 5-LOX eine ähnliche regulatorische Rolle wie für die anderen Säugetierlipoxygenasen zu spielen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Aktivität des trunkierten Enzyms der humanen 5-LOX in früheren Experimenten kann in methodologischen Artefakten der Mutagenesestudien begründet sein. In Abhängigkeit vom Ort der Trunkation kann es während der Translation der veränderten mRNA zu Fehlfaltungen des Translationsprodukts kommen. Die erzielten Ergebnisse zur murinen 5-LOX sowie die Daten, die zu den anderen Säugetierlipoxygenasen vorliegen, legen diese Vermutung nahe.

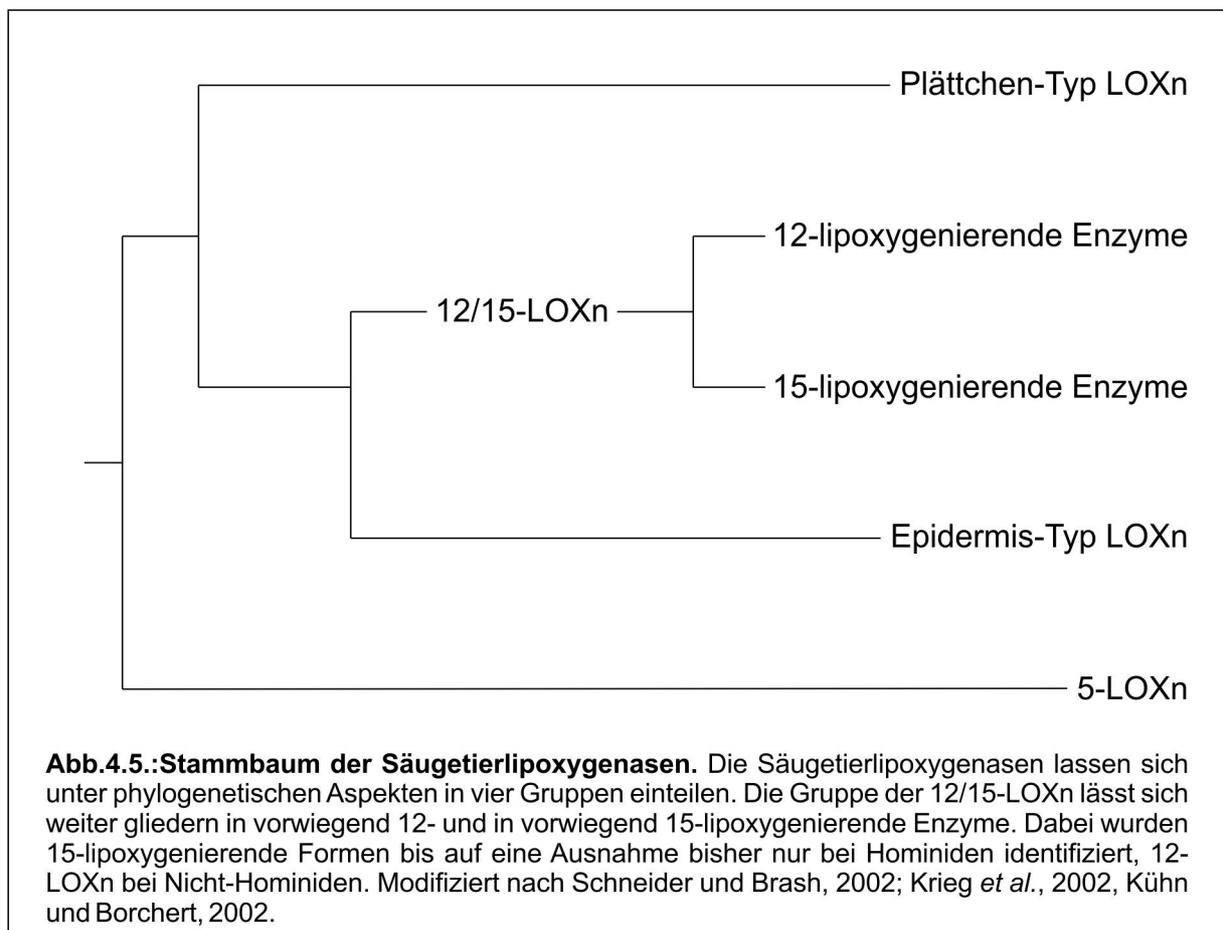
4.4 Entwicklung eines Klassifizierungssystems, welches die Volumenhypothese sowie die phylogenetischen Beziehungen berücksichtigt

Sämtliche Organismen auf der Erde können in drei Domänen eingeteilt werden: Bacteria, Archaea und Eukarya. Diese Domänen untergliedern sich weiter in Reiche. So fasst die Domäne der Eukarya die Reiche Animalia, Fungi und Plantae sowie weitere noch zu definierende Reiche zusammen (Woese *et al.*, 1990). In zwei dieser drei Domänen kommen Lipoxygenasen vor. So enthalten beispielsweise Cyanobakterien als Vertreter der Domäne Bacteria Lipoxygenasen (Schneider *et al.*, 2007a). In der Domäne der Eukarya sind Lipoxygenasen in den Reichen der Animalia, Plantae, Protista und Fungi verbreitet. Bei Mitgliedern der Domäne der Archaea wurden bisher keine LOXn gefunden. Dies erscheint aufgrund der Umweltbedingungen, in denen Archaea auftauchen, nicht ungewöhnlich. Grund für das Fehlen von Lipoxygenasen kann die Tatsache sein, dass molekularer Sauerstoff für viele Mitglieder dieser Domäne toxisch ist (Ivanov *et al.*, 2010). Betrachtet man die Gruppe der Säugetiere unter phylogenetischen Aspekten, so zeigt sich eine Einteilung der Lipoxygenasen in vier Kategorien: 12/15-LOXn, Plättchen-Typ LOXn, Epidermis-Typ LOXn sowie 5-LOXn (Kühn und Borchert, 2002)(Abb.4.5.). Die Zuordnung der verschiedenen Lipoxygenasen in die einzelnen Gruppen erfolgt aufgrund von Sequenzvergleichen. Allerdings lässt die Zugehörigkeit zu einer der vier Kategorien noch keine Aussage zur Positionsspezifität der Lipoxygenasen zu. So umfasst zum Beispiel die Gruppe der 12/15-LOXn sowohl vorwiegend 12- als auch vorwiegend 15-lipoxygenierende Enzyme. Eine gute Möglichkeit zur weiteren Differenzierung anhand der Aminosäuresequenz bietet hier die Volumenhypothese. Umfassende Mutagenesestudien sowie Sequenzalignments haben ergeben, dass bestimmte Positionsdeterminanten für einzelne LOX-Isoformen

spezifisch sind.

So zeigen 12/15-LOXn, die im Bereich der Sloane-Determinante ein Valin aufweisen und deren Produktspektrum bisher untersucht wurde, 12-lipoxygenierende Eigenschaften (u.a. 12/15-LOX von *M. mulatta*, murine 12/15-LOX). LOXn, die ein Isoleucin an der entsprechenden Stelle aufweisen, oxygenieren C15 (u.a. 12/15-LOX von *P. pygmaeus*, humane 12/15-LOX). Interessanterweise kommen 15-lipoxygenierende Enzyme vor allem bei Hominiden vor, wohingegen die orthologen Enzyme bei Nichthominiden überwiegend 12-LOXn sind. Zwar wurde diese Hypothese bisher nicht für die 12/15-LOXn von Schimpanse und Gorilla getestet, doch legen Aminosäureabgleiche die Richtigkeit nahe. Eine Ausnahme stellen Kaninchen dar. Sie verfügen über zwei separate 12/15-LOX Gene, wobei eines für ein 15-lipoxygenierendes, das andere für ein 12-lipoxygenierendes Enzym kodiert (Ivanov *et al.*, 2010; Vogel *et al.*, 2010).

Warum es im Verlauf der Hominidenevolution zu einem Wechsel der Positionsspezifität der 12/15-LOXn (Nichthominiden 12-LOX, Hominiden 15-LOX) gekommen ist, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.



Die Volumenhypothese ist auch auf die Gruppe der 5-LOXn anwendbar, was die Arbeit von Schwarz *et al.* sowie die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen. Für die Spezifität der 5-LOXn scheinen Phe359, Ala424, Asn425 und Ala603 von Relevanz zu sein.

Beispielhaft konnte anhand der humanen Plättchen-Typ 12-LOX gezeigt werden, dass die Volumenhypothese auch für die Gruppe der Plättchen-Typ LOXn, wenn auch in begrenztem Umfang, anwendbar ist (Vogel *et al.*, 2010).

Allerdings lässt sich die Volumenhypothese nicht auf Epidermis-Typ LOXn übertragen. Weder für die humane 15-LOX-2 noch für die 12R-LOX konnte eine Anwendbarkeit gezeigt werden (Vogel *et al.*, 2010). Möglicherweise hat sich in der Entwicklung der Epidermis-Typ LOXn ein anderer Mechanismus für die Ursache der Positionsspezifität entwickelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Volumenhypothese auf drei der vier bekannten LOX-Klassen der Säugetiere, die sich unter phylogenetischen Gesichtspunkten ergeben, anwendbar ist. Warum dies nicht für Epidermis-Typ LOXn zutrifft, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

5 Zusammenfassung

Lipoxygenasen (LOXn) sind Fettsäuredioxygenasen, die in der Pathogenese entzündlicher und hyperproliferativer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Reaktionsspezifität aus, die für die biologische Wirkung der Enzyme bedeutsam ist. Die Kristallstruktur der meisten LOXn belegt, dass sie aus einer kleinen N-terminalen Domäne und einer großen C-terminalen Domäne bestehen. Trotz der umfangreichen Strukturdaten ist die mechanistische Basis der Reaktionsspezifität von LOXn und die Funktion ihrer N-terminalen Domäne noch nicht völlig geklärt. Während die Volumenhypothese der Reaktionsspezifität davon ausgeht, dass die Eindringtiefe der Arachidonsäure ins aktive Zentrum die Positionsspezifität bestimmt, postuliert die Orientierungshypothese, dass dies von der Ausrichtung des Substrats am aktiven Zentrum abhängt, wobei alternativ das Methyl- oder das Carboxylende der Fettsäure in die Substratbindetasche eintaucht.

In dieser Arbeit wurden die humane und die murine 5-LOX als rekombinante Enzyme in *E. coli* exprimiert und ihre katalytischen Eigenschaften charakterisiert. Anschließend wurden durch ortsgerichtete Mutagenese verschiedene Enzymvarianten erzeugt, um festzustellen, welche Theorie zur Reaktionsspezifität auf diese LOXn anwendbar ist.

Die hier erhaltenen Daten belegen die Anwendbarkeit der Volumenhypothese auf 5-LOXn. Durch konsekutive Mutation kritischer Aminosäuren gelang es, die murine 5-LOX schrittweise in ein 15-lipoxygenierendes Enzym umzuwandeln. Obwohl die Validität der Orientierungshypothese nicht ausgeschlossen wurde, konnten keinerlei Daten erhoben werden, welche die Anwendbarkeit dieser Hypothese wahrscheinlich machen. Weitergehende Untersuchungen ergaben die eingeschränkte Anwendbarkeit des G-vs-A-Konzepts für die Enantioselektivität der murinen 5-LOX.

Frühere Trunkationsexperimente an der humanen 5-LOX deuteten darauf hin, dass die N-terminale Domäne für die katalytische Aktivität dieses Enzyms unverzichtbar sei. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass gentechnische Trunkation der murinen 5-LOX zu einer katalytisch aktiven Enzymspezies führt, die trotz eingeschränkter katalytischer Aktivität eine unveränderte Positionsspezifität zeigt. Diese Daten deuten auf eine regulatorische Funktion der N-terminalen Enzymdomäne im Katalysemechanismus hin.

6 Anhang 1

Tabelle 6.1.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Einzelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP-HPLC analysiert. Das Verhältnis von 8- zu 12-HETE wurde mittels SP-HPLC ermittelt. * p<0,05 verglichen mit dem Wildtyp

Determinante	5-HETE [%]	8-HETE + 12 HETE [%]	Verhältnis 8-HETE/ 12-HETE	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
Wildtyp	81,4±1,2	18,6±1,2	51/49	0,0±0,0	100
Borngräber I					
F359W	32,0±3,4	65,0±4,0	93/7	3,0±1,5*	161
Sloane					
A424I	53,9±1,3	46,1±1,3	75/25	0,0±0,0	193
N425M	20,7±0,8	58,1±3,6	50/50	21,3±4,0*	117
Borngräber II					
A603I	65,7±1,9	28,8±1,7	54/46	5,5±1,3*	197

Tabelle 6.2.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Doppelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP-HPLC analysiert. Das Verhältnis von 8- zu 12-HETE wurde mittels SP-HPLC ermittelt. * p<0,05 verglichen mit dem Wildtyp

Mutante	5-HETE [%]	8-HETE + 12 HETE [%]	Verhältnis 8-HETE/ 12-HETE	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
F359W+A424I	0,0±0,0	100,0±0,0	97/3	0,0±0,0	212
F359W+N425M	2,7±1,4	70,9±0,4	54/46	26,4±1,0*	67
F359W+A603I	32,3±4,2	54,8±4,1	99/1	12,9±2,4*	85
A424I+N425M	3,2±1,8	96,3±2,6	77/23	0,5±0,9	242
A424I+A603I	54,6±2,3	45,4±2,3	86/14	0,0±0,0	123
N425M+A603I	8,5±0,7	81,8±1,1	39/61	9,7±0,8*	317

Tabelle 6.3.: Reaktionsspezifität der murinen 5-LOX-Tripelmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP-HPLC analysiert. Das Verhältnis von 8- zu 12-HETE wurde mittels SP-HPLC ermittelt.* $p < 0,05$ verglichen mit den Wildtyp

Mutanten	5-HETE [%]	8-HETE + 12 HETE [%]	Verhältnis 8-HETE/ 12-HETE	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
F359W+A424I+N425M	0,0±0,0	33,0±2,1	55/45	67,0±2,1*	117
F359W+A424I+A603I	11,9±1,8	88,1±1,8	100/0	0,0±0,0	398
F359W+N425M+A603I	3,9±0,9	75,0±3,1	70/30	21,0±2,7*	79
A424I+N425M+A603I	6,0±1,8	90,2±3,9	100/0	3,9±2,3*	167

Tabelle 6.4.: Reaktionsspezifität der Coffa-Mutante sowie ausgewählter Kombinationsmutanten. Die LOX-Mutanten wurden als His-Tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, über Cobalt-Sepharose aufgereinigt und mittels RP-HPLC analysiert.

Mutante	5-HETE [%]	9-HETE [%]	8-HETE + 12 HETE [%]	11-HETE [%]	15-HETE [%]	relative spezifische Aktivität [%]
Wildtyp	81,2±1,5	0,3±0,4	18,5±1,2	0,0±0,0	0,0±0,0	100
A410G	36,2±3,8	39,7±8,3	24,1±12,1	0,0±0,0	0,0±0,0	46
F359W+N425M	2,4±1,3	5,6±0,4	61,7±1,9	7,4±3,7	22,9±0,2	67
F359W+N425M+A410G	2,2±0,6	2,2±2,1	62,4±4,8	18,7±1,6	14,4±1,4	11
F359W+A424I+N425M	0,0±0,0	0,7±0,4	31,4±2,1	4,2±1,2	63,7±1,9	117
F359W+A424I+N425M+A410G	1,2±0,7	1,9±0,4	38,8±5,3	35,5±4,7	22,6±1,6	32

7 Literaturverzeichnis

- Aharony D, Stein RL (1986). Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **261**:11512–11519.
- Aleem AM, Jankun J, Dignam JD, *et al.* (2008). Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure. *J Mol Biol* **376**:193–209.
- Andre, D ,Hou KW (1932). The presence of a lipid oxidase in soybean, *Glycine soya*. *C. R. Acad. Sci.* **194**: 645-647.
- Andreou A, Brodhun F, Feussner I (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res* **48**:148–170.
- Andreou A, Feussner I (2009). Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **70**:1504–1510.
- Artenjak A, Lakota K, Frank M, *et al.* (2012). Antiphospholipid antibodies as non-traditional risk factors in atherosclerosis based cardiovascular diseases without overt autoimmunity. A critical updated review. *Autoimmun Rev* [Internet]doi:10.1016/j.autrev.2012.03.002.
- Austen KF (2008). The cysteinyl leukotrienes: where do they come from? What are they? Where are they going? *Nat Immunol* **9**:113–115.
- Borngräber S, Browner M, Gillmor S, *et al.* (1999). Shape and Specificity in Mammalian 15-Lipoxygenase Active Site. *Journal of Biological Chemistry* **274**:37345 –37350.
- Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1993). The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **260**:1482–1486.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254.
- Brash AR (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* **274**:23679 –23682.
- Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kühn H (1998). Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* **91**:64–74.
- Browner MF, Gillmor SA, Fletterick R (1998). Burying a charge. *Nat Struct Mol Biol* **5**:179.
- Cahn RS, Ingold C, Prelog V (1966). Spezifikation der molekularen Chiralität.

- Angewandte Chemie* **78**:413–447.
- Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skafren MD, Fuster V, McNamara CA (2012). Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circ Res* **110**:889–900.
- Carter GW, Young PR, Albert DH, *et al.* (1991). 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:929–937.
- Cathcart MK, Folcik VA (2000). Lipoxygenases and atherosclerosis: protection versus pathogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**:1726–1734.
- Chahinian H., Sias B., Carriere F. (2000). The C-Terminal Domain of Pancreatic Lipase Functional and Structural Analogies with C2 Domains. *Current Protein and Peptide Science* **1**:91–103.
- Chen X-S, Funk CD (2001). The N-terminal “ β -Barrel” Domain of 5-Lipoxygenase Is Essential for Nuclear Membrane Translocation. *Journal of Biological Chemistry* **276**:811 –818.
- Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W (2008). Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins* **70**:1023–1032.
- Coffa G, Brash AR (2004). A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:15579–15584.
- Corey EJ, Lansbury PT (2012). Stereochemical course of 5-lipoxygenation of arachidonate by rat basophil leukemic cell (RBL-1) and potato enzymes. *J Am Chem Soc* **105**:4093–4094.
- Denis D, Falguyret JP, Riendeau D, Abramovitz M (1991). Characterization of the activity of purified recombinant human 5-lipoxygenase in the absence and presence of leukocyte factors. *J Biol Chem* **266**:5072–5079.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W (1996). The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* **384**:39–43.
- Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I (2009). Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy* **64**:823–839.
- Eckl K-M, Juanes S de, Kurtenbach J, *et al.* (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**:1421–1428.

- Egmond MR, Vliegenthart JF, Boldingh J (1972). Stereospecificity of the hydrogen abstraction at carbon atom n-8 in the oxygenation of linoleic acid by lipoxygenases from corn germs and soya beans. *Biochem Biophys Res Commun* **48**:1055–1060.
- Epp N, Fürstenberger G, Müller K, *et al.* (2007). 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol* **177**:173–182.
- Funk CD (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**:1871–1875.
- Fürstenberger G, Epp N, Eckl K-M, *et al.* (2007). Role of epidermis-type lipoxygenases for skin barrier function and adipocyte differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**:128–134.
- George J, Afek A, Shaish A, *et al.* (2001). 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **104**:1646–1650.
- Gilbert (2011). Structural and Functional Insights of Human 5-Lipoxygenase. Louisiana State University. Available from: <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-04202011-103203/>.
- Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, *et al.* (2011). The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science* **331**:217–219.
- Gillmor SA, Villaseñor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF (1997). The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **4**:1003–1009.
- Goh C-S, Milburn D, Gerstein M (2004). Conformational changes associated with protein–protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **14**:104–109.
- Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN (2001). Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol* **158**:3–9.
- Guo Y, Zhang W, Giroux C, *et al.* (2011). Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* **286**:33832–33840.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H (2001). Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* **91**:737–743.

- Haas U, Raschperger E, Hamberg M, Samuelsson B, Tryggvason K, Haeggström JZ (2011). Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:20479–20484.
- Haeggström JZ, Funk CD (2011). Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* **111**:5866–5898.
- Hamberg M, Hamberg G (1980). On the mechanism of the oxygenation of arachidonic acid by human platelet lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **95**:1090–1097.
- Hamberg M, Samuelsson B (1974). Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**:3400–3404.
- Hammarberg T, Provost P, Persson B, Rådmark O (2000). The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* **275**:38787–38793.
- Harats D, Shaish A, George J, *et al.* (2000). Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:2100–2105.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999). PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**:335–345.
- Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, *et al.* (2000). Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* **275**:30531–30536.
- Hornung E, Walther M, Kühn H, Feussner I (1999). Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:4192–4197.
- Huang W, Erikson RL (1994). Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8960–8963.
- Ikawa H, Kamitani H, Calvo BF, Foley JF, Eling TE (1999). Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer. *Cancer Res* **59**:360–366.
- Il Lee S, Zuo X, Shureiqi I (2011). 15-Lipoxygenase-1 as a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metastasis Rev* **30**:481–491.
- IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomenclature . (2012). IUPAC tentative rules for the nomenclature of organic chemistry. Section E. Fundamental stereochemistry. *J Org Chem* **35**:2849–2867.

- Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, *et al.* (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys* **503**:161–174.
- Jansen C, Hofheinz K, Vogel R, *et al.* (2011). Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *J Biol Chem* **286**:37804–37812.
- Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Brash AR (2000). Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem* **275**:1287–1293.
- Kargman S, Vickers PJ, Evans JF (1992). A23187-induced translocation of 5-lipoxygenase in osteosarcoma cells. *J Cell Biol* **119**:1701–1709.
- Kim E, Rundhaug JE, Benavides F, Yang P, Newman RA, Fischer SM (2005). An antitumorigenic role for murine 8S-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Oncogene* **24**:1174–1187.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**:813–819.
- Krönke G, Reich N, Scholtysek C, *et al.* (2012). The 12/15-lipoxygenase pathway counteracts fibroblast activation and experimental fibrosis. *Ann Rheum Dis* **71**:1081–1087.
- Kühn H, Belkner J, Zaiss S, Fährenklempner T, Wohlfeil S (1994). Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J Exp Med* **179**:1903–1911.
- Kühn H, Borchert A (2002). Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* **33**:154–172.
- Kühn H, Heydeck D, Hugou I, Gniwotta C (1997). In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J Clin Invest* **99**:888–893.
- Kühn H, Saam J, Eibach S, Holzhütter H-G, Ivanov I, Walther M (2005). Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:93–101.
- Kühn H, Schewe T, Rapoport SM (1986). The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**:273–311.
- Kulkarni S, Das S, Funk CD, Murray D, Cho W (2002). Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **277**:13167–13174.

- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Luo M, Jones SM, Phare SM, Coffey MJ, Peters-Golden M, Brock TG (2004). Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem* **279**:41512–41520.
- Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. *Nature* **407**:233–241.
- Maccarrone M, Salucci ML, Zadelhoff G van, *et al.* (2001). Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* **40**:6819–6827.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989). Molecular cloning : a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press Available from: http://platon.serbi.ula.ve/librum/librum_ula/ver.php?ndoc=10341.
- Mastalerz L, Kumik J (2010). Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Pol Arch Med Wewn* **120**:103–108.
- McGill KA, Busse WW (1996). Zileuton. *Lancet* **348**:519–524.
- Mehrabian M, Allayee H (2003). 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **14**:447–457.
- Mellor EA, Maekawa A, Austen KF, Boyce JA (2001). Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7964–7969.
- Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L (2008). Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J* **22**:3595–3606.
- Minor W, Steczko J, Stec B, *et al.* (1996). Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* **35**:10687–10701.
- Moore K, Lovercamp K, Feng D, *et al.* (2010). Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice. *Cell Tissue Res* **340**:569–581.
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* **47**:511–517.
- Müller K, Siebert M, Heidt M, Marks F, Krieg P, Fürstenberger G (2002). Modulation of epidermal tumor development caused by targeted overexpression of epidermis-type 12S-lipoxygenase. *Cancer Res* **62**:4610–4616.

- Neau DB, Gilbert NC, Bartlett SG, Boeglin W, Brash AR, Newcomer ME (2009). The 1.85 Å structure of an 8R-lipoxygenase suggests a general model for lipoxygenase product specificity. *Biochemistry* **48**:7906–7915.
- Oldham ML, Brash AR, Newcomer ME (2005). Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality. *J Biol Chem* **280**:39545–39552.
- Oliw EH (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:313–323.
- Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, *et al.* (2007). Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* **26**:503–524.
- Porta H, Rocha-Sosa M (2001). Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology (Reading, Engl)* **147**:3199–3200.
- Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM (1997). Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* **79**:629–636.
- Puustinen T, Scheffer MM, Samuelsson B (1988). Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* **960**:261–267.
- Rådmark O (2002). Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:211–234.
- Rapoport SM, Schewe T, Thiele B, Dubiel W (1982). The role of lipoxygenase and ATP-dependent proteolysis in the maturation of the reticulocyte. *Prog Clin Biol Res* **102 pt A**:47–58.
- Reiss TF, Altman LC, Chervinsky P, *et al.* (1996). Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD₄) receptor antagonist, in patients with chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **98**:528–534.
- Riendeau D, Falgout JP, Guay J, Ueda N, Yamamoto S (1991). Pseudoperoxidase activity of 5-lipoxygenase stimulated by potent benzofuranol and N-hydroxyurea inhibitors of the lipoxygenase reaction. *Biochem J* **274 (Pt 1)**:287–292.
- Romano M (2010). Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal* **10**:1048–1064.
- Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B (1986). Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:857–861.
- Samuelsson B (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions

- and inflammation. *Science* **220**:568–575.
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**:1171–1176.
- Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM (1975). A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett* **60**:149–152.
- Schewe T, Rapoport SM, Kühn H (1986). Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**:191–272.
- Schilstra MJ, Veldink GA, Verhagen J, Vliegenthart JF (1992). Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics. *Biochemistry* **31**:7692–7699.
- Schneider C, Niisuke K, Boeglin WE, *et al.* (2007a). Enzymatic Synthesis of a Bicyclobutane Fatty Acid by a Hemoprotein–Lipoxygenase Fusion Protein from the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *PNAS* **104**:18941–18945.
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR (2007b). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* **14**:473–488.
- Schwarz K, Walther M, Anton M, Gerth C, Feussner I, Kuhn H (2001). Structural Basis for Lipoxygenase Specificity. *Journal of Biological Chemistry* **276**:773–779.
- Serhan CN, Chiang N, Dyke TE Van (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**:349–361.
- Shureiqi I, Wojno KJ, Poore JA, *et al.* (1999). Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers. *Carcinogenesis* **20**:1985–1995.
- Sloane DL, Leung R, Barnett J, Craik CS, 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**:275–282.
- Sloane DL, Leung R, Craik CS, Sigal E (1991). A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* **354**:149–152.
- Spanbroek R, Habenicht AJR (2003). The potential role of antileukotriene drugs in atherosclerosis. *Drug News Perspect* **16**:485–489.
- Steinhilber D, Fischer AS, Metzner J, *et al.* (2010). 5-lipoxygenase: underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. *Front Pharmacol* **1**:143.
- Suzuki H, Kishimoto K, Yoshimoto T, *et al.* (1994). Site-directed mutagenesis studies on

- the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* **1210**:308–316.
- Takahashi Y, Zhu H, Yoshimoto T (2005). Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **7**:425–431.
- Thunnissen MM, Nordlund P, Haeggström JZ (2001). Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat Struct Biol* **8**:131–135.
- Vogel R (2012). Rekombinante Expression von Säugetierlipoxygenasen und ortsgerechte Mutagenese der Sequenzdeterminante für die Reaktionsspezifität. Unveröffentlichte Dissertation, Charité Universitätsmedizin Berlin.
- Vogel R, Jansen C, Roffeis J, et al. (2010). Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* **285**:5369–5376.
- Walther M, Anton M, Wiedmann M, Fletterick R, Kuhn H (2002). The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. *J Biol Chem* **277**:27360–27366.
- 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. *Arch Biochem Biophys* **516**:1–9.
- Walther M, Ivanov I, Myagkova G, Kuhn H (2001). Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *Chem Biol* **8**:779–790.
- 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**:827–835.
- 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**:3717–3725.
- Wang J, John EM, Ingles SA (2008). 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase-Activating Protein Gene Polymorphisms, Dietary Linoleic Acid, and Risk for Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **17**:2748–2754.
- Wasternack C (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and

- action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**:681–697.
- Weber C, Noels H (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* **17**:1410–1422.
- Werz O, Bürkert E, Fischer L, *et al.* (2002). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J* **16**:1441–1443.
- Wessel D, Flügge UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**:141–143.
- Wittwer J, Hersberger M (2007). The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **77**:67–77.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS* **87**:4576–4579.
- Woods JW, Coffey MJ, Brock TG, Singer II, Peters-Golden M (1995). 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* **95**:2035–2046.
- Yamamoto S (1989). Mammalian lipoxygenases: molecular and catalytic properties. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **35**:219–229.
- Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N (1997). Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* **36**:23–41.
- Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, *et al.* (1990). Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:6959–6963.
- Yoshida H, Kisugi R (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* **411**:1875–1882.
- You J, Mi D, Zhou X, *et al.* (2009). A Positive Feedback between Activated Extracellularly Regulated Kinase and Cyclooxygenase/Lipoxygenase Maintains Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells. *Endocrinology* **150**:1607 – 1617.
- Yu K, Bayona W, Kallen CB, *et al.* (1995). Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* **270**:23975–23983.
- Zamyatnin AA (1984). Amino acid, peptide, and protein volume in solution. *Annu Rev*

Biophys Bioeng **13**:145–165.

Zhang YY, Hammarberg T, Radmark O, *et al.* (2000). Analysis of a nucleotide-binding site of 5-lipoxygenase by affinity labelling: binding characteristics and amino acid sequences. *Biochem J* **351 Pt 3**:697–707.

Zhao Y, Wang W, Wang Q, Zhang X, Ye L (2012). Lipid metabolism enzyme 5-LOX and its metabolite LTB4 are capable of activating transcription factor NF- κ B in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **418**:647–651.

8 Anhang 2

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Hofheinz, K., Polymarasetty, A., Adel, S, *et al.* Conversion of murine Alox5 into a 15S-lipoxygenating enzyme species by multiple mutations of sequence determinants. *FASEB-Journal*, invited submission 16.07.12

Jansen C, **Hofheinz K**, Vogel R, *et al.* (2011). Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Ala-versus-Gly concept. *J Biol Chem* **286**:37804–37812.

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. *Arch Biochem Biophys* **516**:1–9.

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

Erklärung

„Ich, Katharina Hofheinz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *"Untersuchungen zur strukturellen Basis der Reaktionsspezifität von 5-Lipoxygenasen und deren biologische Bedeutung"* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn für die freundliche Überlassung dieses spannenden Themas. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass er mich so gut betreut hat, immer mit viel Geduld meine Fragen beantwortet hat und für Ideen und Diskussionen offen war.

In der Arbeitsgruppe habe ich mich immer sehr wohl gefühlt. Dafür möchte ich mich bei allen Mitgliedern bedanken. Besonders bedanke ich mich bei:

Herrn Thomas Horn, der immer Zeit für meine Fragen hatte, mir viele Dinge und Methoden erklärt hat und mich in meiner Arbeit unterstützt hat.

Frau Monika Anton, die mit viel Geduld dafür gesorgt hat, dass meine Versuche gelangen.

Frau Dr. Astrid Borchert, die mir die Proteinfällung gezeigt hat, Herrn Dr. Christoph Ufer, der immer gute Ideen hatte, wie ich meine Versuche optimieren konnte und Frau Dr. Dagmar Heydeck, die mir bei Fragen zur HPLC zur Seite stand sowie bei Herrn Dr. Igor Ivanov, der mir die spektrophotometrische Untersuchung gezeigt hat.

Frau Sabine Stehling, die mir mit Rat und Tat bei der Proteinreinigung zur Seite stand, Frau Heike Schiebel und Frau Hannelore Stender, die mir mit vielen Tipps meine Arbeit erleichtert haben. Außerdem bei Robert Vogel, der mir viele Tipps zum Umgang mit dem Bildbearbeitungsprogramm gegeben hat.

Vor allem aber bei Herrn Dr. Matthias Walther, der mich eingearbeitet hat, für Diskussionen bereit stand und mich bei vielem unterstützt hat!

Daneben möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meiner Mutter, die mich immer unterstützt. Auch bedanke ich mich bei Katja Graul, die den Prozess des Schreibens begleitet hat und mir emotional immer zur Seite stand, sowie bei Annette Weiberg und Franziska Peter.