

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Reaktionsspezifität von ALOX15-
Orthologen niederer Vertebraten
Studies on the reaction specificity of ALOX15 orthologs from
lower vertebrates

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Alexandra Roigas

Datum der Promotion: 30.06.2024

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht in: Lipoxygenase isoforms occur in bony fish but ALOX15 orthologs may be lacking. Roigas S, Kakularam KR, Rothe M, Heydeck D, Kuhn H. International Journal of Molecular Sciences/10.10.2022.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Functional characterization of novel bony fish lipoxygenase isoforms and their possible involvement in inflammation. Roigas S, Heydeck D, Kuhn, H. International Journal of Molecular Sciences/16.12.2022.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	2
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
ZUSAMMENFASSUNG	13
ABSTRACT	15
1 EINLEITUNG	17
1.1 Definition und Vorkommen der Lipoxygenasen	17
1.2 ALOX-Klassifikationssysteme	18
1.3 Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen	19
1.4 Struktur von ALOX-Isoformen und Triadenkonzept der ALOX15-Orthologen.....	20
1.5 Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen.....	23
1.6 Konzept der Stereospezifität („A-vs.-G-Hypothese“)	24
1.7 Biologische Rolle von Lipoxygenasen	26
1.7.1 ALOX15	26
1.7.2 ALOX5	35
1.7.3 ALOX12	36
1.7.4 ALOX15B.....	37
1.7.5 ALOX12B und ALOXE3.....	37
1.7.6 Alox12e.....	39
1.8 Evolutionäre Stellung und Systematik der Knochenfische	39
1.8.1 Äußere Systematik	39
1.8.2 Innere Systematik.....	40
1.9 Bisherige Ergebnisse zum Vorkommen von ALOX-Isoformen bei Fischen	41
1.9.1 Funktionelle Untersuchungen zum Vorkommen von ALOX-Isoformen bei Fischen.....	41
1.9.2 ALOX-Isoformen beim Zebrafisch	42

1.10	Zielsetzung dieser Arbeit	43
2	MATERIAL UND METHODEN	45
2.1	Material	45
2.1.1	Chemikalien	45
2.1.2	Gele, Puffer.....	49
2.1.3	Antikörper	49
2.1.4	Vektoren und Primer.....	49
2.1.5	Geräte.....	50
2.1.6	Software.....	51
2.1.7	Materialien	51
2.1.8	Bakterienkultur.....	51
2.1.9	Zellkultur	52
2.1.10	Enzyme und Kits	52
2.2	Methoden	53
2.2.1	Identifizierung der Knochenfisch ALOX15-Sequenzen.....	53
2.2.2	Bakterielle Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen verschiedener Knochenfischspezies	56
2.2.3	Eukaryotische Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen verschiedener Knochenfischspezies	59
2.2.4	Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose	62
2.2.5	SDS-Elektrophorese und Western Blot	63
2.2.6	Arachidonsäureoxygenase-Aktivitätsassay	64
2.2.7	Produktanalyse mittels HPLC.....	65
2.2.8	Produktanalyse mittels Massenspektrometrie	67
2.2.9	Einfluss verschiedener Parameter auf die katalytische Aktivität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	68
2.2.10	Testung der Substratspezifität und der Lipoxinsynthaseaktivität	70
2.2.11	Membranoxygenierungsassay	71
2.2.12	Aktivitätsassays unter ¹⁸ O ₂ -Atmosphäre	72
2.2.13	Ortsgerichtete Mutagenese	73
2.2.14	Statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten.....	75
3	ERGEBNISSE	76
3.1	Identifizierung der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	76
3.2	Vergleich der ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit verschiedenen humanen und murinen ALOX-Isoformen	79
3.2.1	Aminosäuresequenzvergleich mit humanen und murinen ALOX-Isoformen	79

3.2.2	Vergleich der Genstruktur der ausgewählten Knochenfisch ALOX-Isoformen mit den humanen ALOX-Genen	81
3.3	Expression und Charakterisierung der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen im bakteriellen System	84
3.3.1	Expression in <i>E. coli</i>	84
3.3.2	Enzymatische Grundcharakterisierung der rekombinanten Enzyme.....	88
3.4	Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen im eukaryotischen System.....	95
3.4.1	Enzymexpression in Sf9-Insektenzellen	95
3.4.2	Nachweis der Expression der rekombinanten Fusionsproteine im Western Blot	96
3.4.3	Nachweis der Expression der rekombinanten Fusionsproteine mittels Aktivitätsassays.....	98
3.5	Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose.....	100
3.6	Detaillierte Strukturidentifizierung der AA Oxygenierungsprodukte.....	102
3.6.1	RP-HPLC-Analytik	102
3.6.2	Normalphasen-Chiralphasen-HPLC (NP/CP-HPLC).....	103
3.6.3	Massenspektrometrie	104
3.7	Weitergehende Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der rekombinanten Enzyme	106
3.7.1	Substratspezifität für verschiedene freie PUFAs	106
3.7.2	Oxygenierung komplexer Substrate	113
3.7.3	Aktivität der rekombinanten Enzyme unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen	122
3.8	Membranoxygenaseaktivität.....	124
3.9	Untersuchungen mit schweren Sauerstoffisotopen (¹⁸O₂).....	127
3.10	Ortsgerichtete Mutagenese.....	128
3.10.1	Mutageneseuntersuchungen zur Anwendbarkeit der A-vs.-G-Hypothese	128
3.10.2	Mutageneseuntersuchungen zur Anwendbarkeit des Triadenkonzepts.....	131
3.10.3	Vergleichende Untersuchungen zur spezifischen Aktivität ausgewählter Punktmutanten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	133
4	DISKUSSION.....	136
4.1	ALOX-Gene in Knochenfischen und Zuordnung der Knochenfisch ALOX-Isoformen zu humanen Isoformen.....	136
4.1.1	Verbreitung von ALOX-Genen in Knochenfischen	136
4.1.2	Zuordnung der Knochenfisch ALOX-Isoformen zu murinen und humanen Isoformen	139

4.2	Expression und Charakterisierung von Knochenfisch ALOX-Isoformen	140
4.2.1	Expression in <i>E. coli</i> und in Sf9-Zellen	140
4.2.2	Enzymatische Charakterisierung	142
4.2.3	Lipoxin- und Resolvinsynthaseaktivität von Knochenfisch ALOX-Isoformen.....	146
4.2.4	Oxygenierung von Endocannabinoiden durch Knochenfisch ALOX-Isoformen	147
4.3	Die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen folgen nicht vollumfänglich dem Triadenkonzept	148
4.4	Die Knochenfisch ALOX-Isoformen halten sich nicht vollständig an die A-vs.-G-Hypothese der Stereospezifität.....	150
4.5	Zusammenhang zwischen dem ALOX-Stoffwechsel von <i>N. furzeri</i> und den Mechanismen seiner beschleunigten Alterung	153
5	LITERATURVERZEICHNIS	157
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	175
	ANTEILSERKLÄRUNG	176
	LEBENS LAUF	177
	PUBLIKATIONS LISTE	178
	DANKSAGUNG	179
	BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS.....	180

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen	19
Abb. 2: Modell der Kristallstruktur der Kaninchen-ALOX15	20
Abb. 3: Modell der oktaedrischen Eisenligandensphäre der Kaninchen-ALOX15	21
Abb. 4: Das Triadenkonzept der ALOX15 Reaktionsspezifität.....	23
Abb. 5: Beziehung zwischen R- und S-Stereospezifität in Lipoxygenasen bei Wasserstoffabstraktion am C10	25
Abb. 6: Physiologische und pathophysiologische Prozesse mit Beteiligung der ALOX15	26
Abb. 7: Vereinfachtes Kladogramm der Wirbeltiereinteilung.....	40
Abb. 8: Phylogenetische Systematik einiger Knochenfischspezies	41
Abb. 9: Schematische Darstellung der Expression von Zielgenen in Sf9-Insektenzellen	61
Abb. 10: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur	65
Abb. 11: Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenese	74
Abb. 12: Sequenzalignment der mutmaßlichen ALOX15-Orthologe von <i>D. rerio</i> mit der humanen ALOX15.....	77
Abb. 13: Gene der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu Genen der humanen ALOX-Isoformen	82
Abb. 14: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von <i>S. formosus</i>	85
Abb. 15: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von <i>S. formosus</i> und der entsprechenden Hitzekontrolle.....	86
Abb. 16: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von <i>N. furzeri</i> und der entsprechenden Nicht-Enzymkontrolle	87
Abb. 17: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von <i>P. nyererei</i> und der entsprechenden Nicht-Enzymkontrolle	88
Abb. 18: Temperaturabhängigkeit der AA Oxygenierung der ALOX-Isoformen von Knochenfischen.....	90
Abb. 19: Arrhenius-Diagramm zur Ermittlung der Aktivierungsenergie der ALOX- Isoformen der ausgewählten Knochenfische	91

Abb. 20: Abhängigkeit der AA Oxygenierung der Knochenfisch ALOX-Isoformen vom pH-Wert.....	92
Abb. 21: Michaelis-Menten-Plots der AA Oxygenierung durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen	94
Abb. 22: Western Blot-Analysen der im Sf9-Zellsystem exprimierten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	97
Abb. 23: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierte vermeintliche ALOX15 von <i>N. furzeri</i> gebildet wurden	99
Abb. 24: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierte ALOX-Isoform aus <i>P. nyererei</i> gebildet wurden	99
Abb. 25: SDS-PAGE und Western Blot der rekombinanten ALOX-Isoformen.....	101
Abb. 26: Detaillierte RP-HPLC Analyse der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gebildet wurden	102
Abb. 27: NP/CP-HPLC-Chromatogramme der RP-HPLC gereinigten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gebildet wurden	104
Abb. 28: Analyse des dominanten AA Oxygenierungsprodukts mittels LC-MS	105
Abb. 29: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs.....	106
Abb. 30: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs bei gemischtem Substratangebot	109
Abb. 31: Analyse des dominanten EPA Oxygenierungsprodukts, das durch die vermeintliche ALOX15 von <i>P. nyererei</i> gebildet wurde	110
Abb. 32: Analyse des dominanten DHA Oxygenierungsprodukts, das durch die vermeintliche ALOX15 von <i>P. nyererei</i> gebildet wurde	112
Abb. 33: RP-HPLC Chromatogramme der Lipoxinsynthaseaktivität der vermeintlichen ALOX15-Orthologe von <i>N. furzeri</i>	114
Abb. 34: RP-HPLC Chromatogramme der Oxygenierungsprodukte ausgewählter Hydroxyfettsäuren, die durch die ALOX-Isoformen von <i>N. furzeri</i> und <i>P. nyererei</i> gebildet wurden	115
Abb. 35: Analyse der Oxygenierungsprodukte ausgewählter Hydroxyfettsäuren mittels LC-MS	116
Abb. 36: RP-HPLC Chromatogramme der Oxygenierungsprodukte ausgewählter AA-Derivate, die durch die vermeintliche ALOX15 von <i>P. nyererei</i> gebildet wurden.....	119

Abb. 37: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die AA Oxygenierung ausgewählter Knochenfisch ALOX-Isoformen	122
Abb. 38: RP-HPLC Chromatogramme der Membranoxygenaseaktivität der Kaninchen-ALOX15.....	125
Abb. 39: RP-HPLC Chromatogramme der Membranoxygenaseaktivität der vermeintlichen ALOX15 aus <i>P. nyererei</i>	126
Abb. 40: Aminosäuresequenzalignment der Coffa-Region ausgewählter Knochenfisch ALOX-Isoformen	129
Abb. 41: Reaktionsspezifität von Wildtyp und Mutanten der vermeintlichen <i>N. furzeri</i> -ALOX15.....	130
Abb. 42: Sequenzalignment der Region der Triadendeterminanten ausgewählter vermeintlicher Knochenfisch ALOX15-Orthologen.....	131
Abb. 43: Reaktionsspezifität von Wildtyp und V424I+V425M-Mutante der vermeintlichen <i>N. furzeri</i> -ALOX15.....	132
Abb. 44: Western Blot-Analysen der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	133
Abb. 45: Hypothesen zur Erklärung der stereochemischen Mechanismen der ALOX-Reaktion	152

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Identifizierte vermeintliche ALOX15-Orthologe von Knochenfischen	76
Tab. 2: Aminosäuresequenzidentitätsgrad der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische.....	78
Tab. 3: Aminosäuresequenzidentitäten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu den verschiedenen humanen ALOX-Isoformen	80
Tab. 4: Aminosäuresequenzidentitäten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu den verschiedenen ALOX-Isoformen der Maus	80
Tab. 5: Nukleotididentität der vermeintlichen ALOX15-Gene ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu Genen humaner ALOX-Isoformen	83
Tab. 6: Quantifizierung der eukaryotischen Expression der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen in Sf9-Zellen und theoretische Molekulargewichte der rekombinanten Fusionsproteine	98
Tab. 7: Vergleich unterschiedlicher Substratfettsäuren für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen	108
Tab. 8: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit komplexeren Lipidsubstraten	121
Tab. 9: Relative Membranoxygenaseaktivität ausgewählter ALOX15-Orthologen	126
Tab. 10: Einbau der Sauerstoffisotope ^{18}O und ^{16}O in die Reaktionsprodukte, wenn die AA Oxygenierung durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen von <i>N. furzeri</i> , <i>P. nyererei</i> und <i>S. formosus</i> unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt wurde	128
Tab. 11: Muster der dominanten AA Oxygenierungsprodukte [12(S)-HETE, 8(R)-HETE] der Wildtypenzyme der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische und von ausgewählten Punktmutanten.....	130
Tab. 12: Relative spezifische Aktivitäten der rekombinant exprimierten Wildtypenzyme und Punktmutanten von <i>N. furzeri</i> , <i>P. nyererei</i> und <i>S. formosus</i>	135
Tab. 13: Vorkommen von ALOX-Genen in den Genomen ausgewählter Knochenfischspezies	137

Abkürzungsverzeichnis

5-H(p)ETE	5-Hydro(pero)xyeicosa-6E,8Z,11Z,14Z-tetraensäure
8-H(p)ETE	8-Hydro(pero)xyeicosa-5Z,9E,11Z,14Z-tetraensäure
11-H(p)ETE	11-Hydro(pero)xyeicosa-5Z,8Z,12E,14Z-tetraensäure
12-H(p)ETE	12-Hydro(pero)xyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z-tetraensäure
15-H(p)ETE	15-Hydro(pero)xyeicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraensäure
5-Oxo-15-HETE	5-Oxo-15-hydroxyeicosa-6,8,11,13-tetraensäure
5(S),6(R)-DiHETE	5(S),6(R)-Dihydroxyeicosa-7E,9E,11Z,14Z-tetraensäure
5(S),15(S)-DiHETE	5(S),15(S)-Dihydroxyeicosa-6E,8Z,10Z,13E-tetraensäure
9-HODE	9-Hydroxy-10E,12Z-octadecadiensäure
13-H(p)ODE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadiensäure
12-HEPE	12-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaensäure
18-HEPE	18-Hydroxyeicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-pentaensäure
14-HDHA	14-Hydroxydocosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaensäure
ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
ADP	Adenosindiphosphat
cDNA	komplementäre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
ETYA	5,8,11,14-Eicosatetraensäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HCl	Salzsäure
HDL, oxHDL	High Density Lipoprotein, oxidiertes High Density Lipoprotein
IL4	Interleukin-4
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB-Agar/-Medium	Lysogeny Broth Agar/Medium
LDL, oxLDL	Low Density Lipoprotein, oxidiertes Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LOX/LOXen	Lipoxygenase/Lipoxygenasen
mRNA	messenger RNA

NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaOH	Natriumhydroxid
NDGA	Nordihydroguaiaretsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC-Medium	Super Optimal Broth Medium
TAE	Tris (s.u.), Acetat, EDTA (s.o.)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

Abkürzungen Aminosäuren

Aminosäure	Three letter code	One letter code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Zusammenfassung

Einleitung: Arachidonsäurelipoxygenasen (ALOX-Isoformen) sind Dioxygenasen, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu den entsprechenden Hydroperoxyfettsäurederivaten oxygenieren. Im humanen Genom gibt es sechs funktionelle ALOX-Gene (*ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *ALOX5*), die für funktionell unterschiedliche Isoenzyme kodieren. Die Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen vieler höherer Vertebraten (Säugetiere) ist gut charakterisiert, wohingegen es nur wenige Daten über das Vorhandensein von ALOX-Isoformen bei Knochenfischen gibt. Auch wurde bislang nicht untersucht, ob der oxidative Lipidstoffwechsel in kausaler Beziehung zur beschleunigten Alterung von *N. furzeri*, einem beliebten Modellorganismus in der Altersforschung, steht. Hieraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende konkrete Fragestellungen: i) Kommen ALOX-Gene in Knochenfischen weit verbreitet vor und können hier echte ALOX15-Gene nachgewiesen werden? ii) Können Knochenfisch ALOX-Isoformen rekombinant exprimiert werden und unterscheiden sich ihre katalytischen Eigenschaften von denen höherer Wirbeltiere? iii) Folgen die Knochenfisch ALOX-Isoformen den Hypothesen, die zur Erklärung der Reaktionsspezifität anderer ALOX-Isoformen entwickelt wurden? iv) Lassen sich aus dem ALOX-Stoffwechsel von *N. furzeri* Schlussfolgerungen zum Mechanismus der beschleunigten Alterung dieser Tiere ableiten?

Methodik: Zur Beantwortung dieser Fragen wurden ausgewählte ALOX-Isoformen verschiedener Knochenfische als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert und hinsichtlich ihrer protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert.

Ergebnisse: ALOX-Gene kommen in den Genomen von Knochenfischen weit verbreitet vor, wobei jedoch keines der kodierten Enzyme zweifelsfrei als ALOX15-Ortholog identifiziert werden konnte. Die Knochenfisch ALOX-Isoformen konnten rekombinant exprimiert werden, wobei sich ihre katalytischen Eigenschaften teilweise von denen höherer Wirbeltiere unterscheiden. Die Knochenfisch ALOX-Isoformen folgen weder vollumfänglich dem Triadenkonzept der ALOX15-Orthologen noch der A-vs.-G-Hypothese der Stereospezifität. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen dem ALOX-Stoffwechsel von *N. furzeri* und der beschleunigten Alterung dieser Knochenfischspezies nicht abschließend geklärt werden.

Schlussfolgerung: ALOX-Isoformen kommen bei Knochenfischen weit verbreitet vor, jedoch stimmen die durch die Datenbanken vorgenommenen Annotierungen nicht immer mit den *in vitro* Untersuchungen zur Reaktionsspezifität überein. Die Beobachtung, dass die von uns untersuchten Knochenfisch ALOX-Isoformen nicht dem Triadenkonzept folgen, welches auf alle bisher identifizierten Säugetier ALOX15-Orthologen anwendbar ist, spricht dafür, dass es sich bei diesen Proteinen eher nicht um Funktionsäquivalente der Säugetier ALOX15-Orthologen handelt.

Abstract

Introduction: Arachidonate lipoxygenases (ALOX isoforms) are dioxygenases which catalyse the oxygenation of polyunsaturated fatty acids to the corresponding hydroperoxy derivatives. The human genome involves six functional ALOX genes (*ALOX15*, *ALOX15B*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOXE3*, *ALOX5*), which encode for functional distinct isozymes. The reaction specificity of ALOX15 orthologs of higher vertebrates such as mammals has been well characterized. In contrast, little is known about the presence of ALOX isoforms in bony fish. Moreover, it has not yet been explored whether there is a causal relationship between the oxidative lipid metabolism and the accelerated aging process of *N. furzeri*, which is a popular model organism in age research. This lack of knowledge resulted in the following specific questions for the present dissertation: i) Are ALOX genes widely distributed in bony fish and can true ALOX15 genes be detected in these vertebrates? ii) Is it possible to express bony fish ALOX isoforms as functional recombinant proteins and do their catalytic properties differ from those of higher vertebrates? iii) Do the bony fish ALOX isoforms follow the existing hypotheses which explain the reaction specificity of other ALOX isoforms? iv) Is the ALOX metabolism of *N. furzeri* related to accelerated aging of this bony fish species?

Methodology: To answer these questions, selected bony fish ALOX isoforms were expressed as recombinant N-terminal his-tag fusion proteins in pro- and eucaryotic expression systems and they were characterized in respect to their protein-chemical and catalytic properties.

Results: ALOX genes occur frequently in different bony fish species. We expressed putative ALOX15 orthologs of three different bony fish species as catalytically active recombinant N-terminal his-tag fusion proteins but neither of the characterized enzymes exhibited a high degree of functional similarity with mammalian ALOX15 orthologs despite their database annotation as ALOX15. The putative bony fish ALOX15 orthologs did neither follow the Triad Concept of reaction specificity of ALOX15 orthologs nor the A-vs.-G-Hypothesis of stereospecificity. Comparison of the functional characteristics of the three putative bony fish ALOX15 orthologs did not provide any evidence for the assumption that the enzyme of *N. furzeri* is involved in the accelerated aging process of this bony fish species.

Conclusions: ALOX genes occur frequently in bony fish genomes, but the functional characteristics of the putative bony fish ALOX15 orthologs are clearly different

from those of mammalian ALOX15 isoforms. Our observation, that the putative bony fish ALOX15 orthologs do not follow the Triad Concept which is applicable for all mammalian ALOX15 orthologs tested so far strongly suggests that these enzymes may not be considered functional equivalents of mammalian ALOX15 orthologs in bony fish.

1 Einleitung

1.1 Definition und Vorkommen der Lipoxygenasen

Arachidonsäurelipoxygenasen (ALOX-Isoformen) sind Fettsäuredioxygenasen, die ein Übergangsmetallion (Eisen oder Mangan) im aktiven Zentrum enthalten (1-3). Sie katalysieren den Einbau eines Sauerstoffmoleküls in mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), die mindestens ein 1, 4-cis, cis-Pentadiensystem enthalten. Primäre Produkte dieser Reaktion sind die entsprechenden Hydroperoxyfettsäurederivate (4).

ALOX-Isoformen kommen in Pro- und Eukaryonten vor, wobei sie bei Prokaryonten bisher nur in Bakterien, nicht aber in Archaea beschrieben worden sind. Obwohl bei der Suche in den bisher sequenzierten Bakteriengenomen mehr als 60 ALOX-like Sequenzen identifiziert werden konnten, enthalten insgesamt nur weniger als 0,5 % der bisher sequenzierten bakteriellen Genome potenzielle ALOX-Gene (5). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die ALOX-Isoformen in Bakterien nur sporadisch auftreten und keine essentielle Rolle im bakteriellen Lipidstoffwechsel spielen (5). Für jene bakteriellen Lebensformen, die funktionelle ALOX-Gene in ihren Genomen enthalten, könnte die ALOX-Expression aber durchaus von biologischer Bedeutung sein. Das gilt aber nur für eine überschaubare Anzahl bakterieller Spezies. Mit wenigen Ausnahmen (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) tragen die meisten humanpathogenen Bakterien keine funktionellen Lipoxygenasegene in ihren Genomen (5). ALOX-Isoformen kommen außerdem vereinzelt in Algen (6) sowie in einigen Pilzen (7, 8) vor. In höheren Pflanzen (9) sowie im Tierreich (5) sind sie jedoch weit verbreitet.

Bei den meisten Säugetieren dienen Linolsäure (C18:Δ2, n-6), α- (C18:Δ3, n-3) und γ- (C18:Δ3, n-6) Linolensäure, Arachidonsäure (C20:Δ4, n-6), Eicosapentaensäure (C20:Δ5, n-3) und Docosahexaensäure (C22:Δ6, n-3) als wichtigste ALOX-Substrate (10). Dabei werden diese Fettsäuren in freier Form bevorzugt. Da die zellulären Konzentrationen freier Fettsäuren jedoch sehr gering sind, müssen diese für die Bildung von ALOX-Produkten aus zellulären Esterlipiden freigesetzt werden. Dies geschieht vor allem durch die Aktivierung zytosolischer Phospholipase A2 Isoformen (11).

Nachdem die primären Produkte der Lipoxygenasereaktion, die Hydroperoxyfettsäuren (HpETE), gebildet wurden, können diese durch andere Enzyme (z.B. Glutathionperoxidasen) zu einer Hydroxyfettsäure (HETE) reduziert oder zu einer großen Anzahl anderer bioaktiver Lipidmediatoren umgewandelt werden. Zu diesen Produkten zählen Leukotriene (12), Lipoxine (13), Hepoxiline (14), Eoxine (15), Resolvine

(16) und Protektine (17), denen unterschiedliche biologische Funktionen zugeschrieben wurden. Eine wichtige Rolle spielen diese sekundären ALOX-Produkte u.a. bei der Pathogenese der Entzündungsreaktion, die für alle hoch entwickelten irdischen Lebensformen von besonderer Bedeutung ist.

1.2 ALOX-Klassifikationssysteme

Die Klassifizierung von Lipoxygenasen ist ein Thema, das derzeit noch kontrovers diskutiert wird. Es haben sich bisher zwei unterschiedliche Klassifikationssysteme entwickelt (10), die derzeit parallel verwendet werden. Das führt in manchen Fällen zu Zuordnungsschwierigkeiten einzelner ALOX-Isoformen.

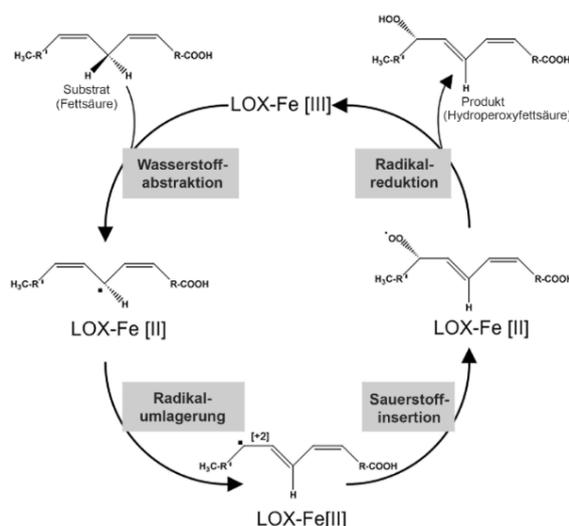
Das klassische Klassifizierungssystem basiert auf der Reaktionsspezifität der ALOX-Isoformen mit Arachidonsäure als Substrat. Dabei wird die Lipoxygenase nach dem Kohlenstoffatom des Fettsäuregerüsts benannt, an dem der Sauerstoffeinbau erfolgt. Passiert dies am 5. Kohlenstoffatom der Arachidonsäure, handelt es sich um eine 5-LOX, findet der Einbau am 15. Kohlenstoffatom statt, wird das Enzym entsprechend als 15-LOX bezeichnet. Dieses Konzept (Spezifität-basierte ALOX-Klassifizierung) ist zwar unkompliziert in der Anwendung, führt aber hinsichtlich der evolutionären Verwandtschaft der zu klassifizierenden Enzyme zu Problemen. Diese Probleme treten beispielsweise beim Vergleich der humanen 15-LOX mit der murinen 15-Lox deutlich zu Tage. Bei beiden ALOX-Isoformen handelt es sich um orthologe Enzyme, d.h. es sind funktionsäquivalente Proteine in zwei unterschiedlichen Spezies. Sie teilen einen hohen Verwandtschaftsgrad, der sich u.a. in einer > 80%igen Aminosäuresequenzhomologie widerspiegelt. Trotzdem weisen sie unterschiedliche Reaktionsspezifitäten auf und müssen deshalb nach dem Spezifitäts-basierten Klassifizierungssystem in verschiedene ALOX-Klassen eingruppiert werden. So ist die humane 15-LOX ein Arachidonsäure 15-lipoxygenierendes Enzym (18), während es sich bei ihrem murinen Enzymorthologen um ein Arachidonsäure 12-lipoxygenierendes Protein handelt (19).

Um solche Verwirrungen zu vermeiden, wurde ein zweites Klassifizierungssystem vorgeschlagen, das auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der zu klassifizierenden ALOX-Isoformen und denen der humanen Isoformen basiert (Verwandtschaft-basierte ALOX-Klassifizierung). Dieses System folgt den Regeln der Genklassifizierung und überträgt diese auf die katalytisch aktiven Enzyme. Für Proteine, die zweifelsfrei einem Gen zugeordnet werden können, wurde vorgeschlagen, das Gen und das durch dieses Gen kodierte Protein mit dem Gennamen zu bezeichnen. Um

zwischen Genen und den katalytisch aktiven Proteinen zu unterscheiden, wird das Gen kursiv geschrieben, während das kodierte Protein in normaler Schreibweise gekennzeichnet wird. Für den Menschen und andere höhere Säugetiere werden sowohl Gene als auch Proteine durch Großschreibung gekennzeichnet. Für niedere Säugetiere (Maus, Ratte) und andere Wirbeltiere wird Kleinschreibung empfohlen. So wird das Gen, das für die humane 15-LOX-1 kodiert, mit *ALOX15* gekennzeichnet, während das kodierte Enzym mit ALOX15 beschrieben wird. Die humane 5-LOX wird als ALOX5 gekennzeichnet, während das kodierende Gen *ALOX5* heißt. Das Gen, das für die Maus 5-LOX kodiert, heißt *Alox5*, während das kodierte Enzym als Alox5 bezeichnet wird. Der große Vorteil der Gen-basierten Enzymnomenklatur besteht darin, dass sowohl das Gen als auch das kodierte Protein den gleichen Namen tragen, was die Möglichkeit von Missverständnissen deutlich verringert. Um die ALOX-Isoformen von tierischen Spezies mit niedrigem Verwandtschaftsgrad zum Menschen und von Pflanzen zu klassifizieren, ist das Gen-basierte Klassifizierungskonzept jedoch nicht immer hilfreich, da beispielsweise die ALOX1 des Zebrafisches eine 41–45%ige Aminosäureidentität mit allen humanen Isoformen aufweist (20). Dadurch kann dieses Enzym des Zebrafisches nicht eindeutig einem der humanen ALOX-Isoformen zugeordnet werden.

1.3 Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen

Der Mechanismus der Lipoxygenasereaktion setzt sich aus vier aufeinanderfolgenden Elementarreaktionen zusammen (21), die in Abb. 1 hinsichtlich ihres chronologischen Ablaufs zusammengestellt sind. Dabei muss jedoch darauf



hingewiesen werden, dass bislang nicht alle der in der Abbildung aufgeführten Reaktionsintermediate strukturell eindeutig identifiziert werden konnten.

Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen [modifiziert nach Ivanov et al., 2010 (21)]. Dargestellt sind die vier Elementarreaktionen, die im Text näher erläutert werden.

1. Wasserstoffabstraktion: Während der ersten Elementarreaktion wird nach der Bindung der Substratfettsäure am aktiven

Zentrum des Enzyms ein Wasserstoffatom in Form eines Protons und eines Elektrons von einer bisallylischen Methylengruppe im Kohlenwasserstoffgerüst der Fettsäure abgespalten. Das aus dem Wasserstoffatom stammende Elektron wird vom dreiwertigen Nicht-Häm-Eisen im aktiven Zentrum der ALOX aufgenommen und dieses dadurch zu zweiwertigem Eisen reduziert.

2. Radikalumlagerung: Das bei der Wasserstoffabstraktion entstehende Kohlenstoff-zentrierte Fettsäureradikal wird umgelagert, wobei das ungepaarte radikalische Elektron rein formal betrachtet um zwei Kohlenstoffatome verschoben wird, und zwar entweder in Richtung des Methylenes ([+2]-Umlagerung) oder des Carboxylendes ([-2]-Umlagerung) der Fettsäure.

3. Sauerstoffinsertion: Der Einbau von molekularem Sauerstoff erfolgt antarafacial zur Wasserstoffabstraktion. Bezugsfläche ist dabei die Ebene der Doppelbindungen. Wird also das Wasserstoffatom, das sich über der Ebene der Doppelbindungen befindet, abgespalten, so erfolgt die Sauerstoffinsertion in die Fettsäurekette von unterhalb dieser Ebene. Dabei entsteht ein Sauerstoff-zentriertes Fettsäureperoxyradikal.

4. Radikalreduktion: Das zweiwertige Nicht-Häm-Eisen der Lipoxygenase gibt ein Elektron an das Fettsäureperoxyradikal ab, wodurch dieses zu einem Fettsäureperoxidanion reduziert und das Eisen in seinen dreiwertigen Zustand reoxidiert wird. Das entstandene Anion wird anschließend in Abhängigkeit vom bestehenden pH-Wert protoniert und es entsteht als primäres Reaktionsprodukt der Gesamtreaktion eine Hydroperoxyfettsäure.

1.4 Struktur von ALOX-Isoformen und Triadenkonzept der ALOX15-Orthologen

Die meisten ALOX-Isoformen, deren Kristallstruktur bisher aufgeklärt werden konnte, bestehen aus einer Polypeptidkette, die sich in zwei Domänen faltet (Abb. 2) (21).

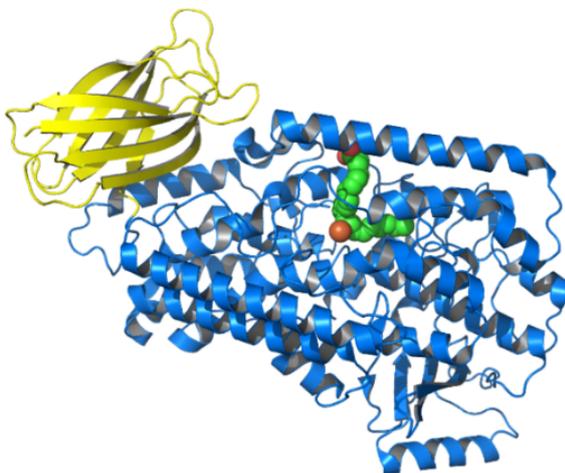
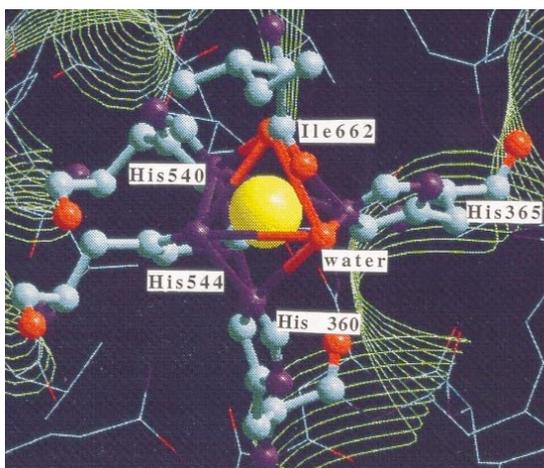


Abb. 2: Modell der Kristallstruktur der Kaninchen-ALOX15. Gelb dargestellt sind die β -Faltblattmotive der kleineren N-terminalen Domäne. Die blauen Strukturen repräsentieren die α -Helices der größeren katalytischen Domäne und orange ist das katalytische Nicht-Häm-Eisen dargestellt. Das Substrat Arachidonsäure (einmodelliert) ist grün eingefärbt. Diese Strukturmodell wurde von K.R. Kakularam auf der Basis der PDB Koordinaten 2OPM erstellt.

Bei primitiven irdischen Lebensformen kommen ALOX-Isoformen aber auch als Fusionsproteine vor, die noch zusätzliche Struktureinheiten aufweisen (22). Die kleinere N-terminale Domäne setzt sich vorrangig aus antiparallelen β -Faltblättern zusammen. Sie ist für die katalytische Funktion vieler ALOX-Isoformen nicht essentiell, scheint aber hinsichtlich des Substratumsatzes eine regulatorische Funktion zu besitzen (23, 24). Außerdem ist die N-terminale Domäne bei der Membranbindung der Enzyme beteiligt (23, 25). Die größere katalytische Domäne besteht vorrangig aus α -Helices. Wichtiger Bestandteil dieses Strukturelementes ist das Enzym-gebundene Nicht-Häm-Eisen (bzw. Mangan), das für den Katalysemechanismus essentiell ist (21). Bei einigen weniger weit entwickelten Organismen wie beispielsweise der Koralle *Plexaura homomalla* (26) liegt die ALOX als Fusionsprotein vor. Dabei ist die ALOX-Domäne mit einer anderen katalytischen Domäne verbunden, die am Sekundärstoffwechsel der Hydroperoxyfettsäuren beteiligt ist (21).

Die meisten funktionellen ALOX-Isoformen besitzen eine oktaedrische Ligandensphäre für das Nicht-Häm-Eisen. Dabei fungieren fünf hoch konservierte Aminosäuren als direkte Eisenliganden. Als sechster Eisenligand konnte ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxylion (HO^-) identifiziert werden. Drei der fünf proteinogenen Eisenliganden sowie das Wassermolekül sind in Form eines verzerrten Quadrates um das Zentralatom angeordnet und bilden die Grundfläche einer Doppelpyramide (siehe Abb. 3). In der Primärstruktur sind diese Aminosäuren (vier Histidine oder drei Histidine + 1 Asparagin bzw. Serin oder Threonin) in zwei räumlich getrennten Aminosäureclustern [(C1, *His-w-x-y-z-His*; C2, *His-x-y-z-Asn (His, Ser, Thr)*]



angeordnet (5), die in der Raumstruktur jedoch dicht bei einander liegen.

Abb. 3: Modell der oktaedrischen Eisenligandensphäre der Kaninchen-ALOX15 [modifiziert nach Kuban et al., 1998 (26)]. Drei Histidine (365, 540 und 544) sowie ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxylion (HO^-) bilden die Grundfläche einer Doppelpyramide, in deren Mitte sich das Eisenatom befindet (gelb eingefärbt). Die Pyramidenspitzen werden durch das C-terminale Isoleucin 662 sowie das Histidin 360 gebildet.

Um die Reaktionsspezifität verschiedener Säugetier ALOX15-Orthologen mit Arachidonsäure als Substrat zu erklären (15- oder 12-lipoxygenierende ALOX15-

Orthologe), wurde das Triadenkonzept entwickelt. Basis für dieses Konzept ist, dass die ALOX15-Orthologen eine nach außen offene U-förmige Substratbindungstasche besitzen, die das katalytische Nicht-Häm-Eisen enthält. In diese Tasche gleitet die Arachidonsäure mit dem Methylende voran hinein. Am Boden dieser Tasche befinden sich drei Aminosäurecluster, die aufgrund der Struktur ihrer Seitenketten die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen maßgeblich beeinflussen und als Triadendeterminanten bezeichnet werden. Das Triadenkonzept basierte lange Zeit vornehmlich auf Untersuchungen an der Kaninchen-ALOX15 (27), wurde aber in den letzten Jahren für mehr als 150 verschiedene Säugetier ALOX15-Orthologe bestätigt (28-31). Bislang konnten keine Säugetier ALOX15-Orthologen identifiziert werden, die nicht dem Triadenkonzept folgen (28, 31). Dieses Konzept erklärt zumindest teilweise auch die Reaktionsspezifität vieler ALOX12-Orthologen, kann aber nicht auf die Säugetierorthologen der ALOX15B angewendet werden (29). Für diese Enzyme spielen andere Aminosäuren eine wichtigere Rolle für die Reaktionsspezifität (32). Werden die Triadendeterminanten bei Wirbeltier ALOX5-Orthologen mutiert, können die AA 5-lipoxygenierenden Enzyme in Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Proteine umgewandelt werden (33, 34).

Für die menschliche ALOX15 und das Kaninchenorthologe konnten folgende Aminosäuren als Triadendeterminanten identifiziert werden:

- i) das Phe353 [Borngräber 1 Determinante (BG I)],
- ii) das Ile418 und Met419 [Sloane Determinanten (SL)],
- iii) das Ile593 [Borngräber 2 Determinante (BG II)].

Diese Aminosäuren besitzen sperrige Seitenketten, sodass die Arachidonsäure nur bis zu einer bestimmten Tiefe in die Substratbindungstasche hineingleiten kann. Das 13. Kohlenstoffatom befindet sich dann nah am katalytischen Nicht-Häm-Eisen, weshalb dort die Wasserstoffabstraktion erfolgt. Der molekulare Sauerstoff wird anschließend am 15. Kohlenstoffatom der Arachidonsäurekette eingebaut, sodass mit dieser Aminosäurekonstellation eine Arachidonsäure 15-lipoxygenierende ALOX15 vorliegt. Befinden sich an den Positionen der Triadendeterminanten jedoch Aminosäuren mit Seitenketten, die nicht so viel Raum einnehmen, gelangt Arachidonsäure tiefer in die Substratbindungstasche und die Wasserstoffabstraktion erfolgt am 10. Kohlenstoffatom der Arachidonsäurekette. Daraus resultiert eine 12-Lipoxygenierung der Arachidonsäure (4) (Abb. 4).

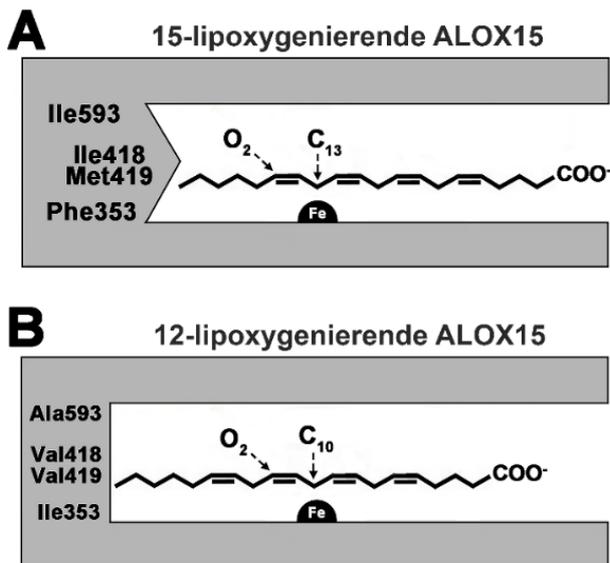


Abb. 4: Das Triadenkonzept der ALOX15 Reaktionsspezifität [modifiziert nach Kuhn et al., 2018 (4)]. Bei 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (**A**) befinden sich am Boden der Substratbindungstasche Aminosäuren mit sperrigen Seitenketten, sodass Arachidonsäure nur bis zu einer bestimmten Tiefe hineingleiten kann. Das 13. Kohlenstoffatom befindet sich dann nah am katalytischen Nicht-Häm-Eisen, sodass eine 15-Lipoxygenierung erfolgt. Bei 12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen (**B**) sind kleinere Aminosäureseitenketten an diesen Positionen lokalisiert, sodass Arachidonsäure tiefer in die Substratbindungstasche hineingleiten kann. Dadurch erfolgt die Wasserstoffabstraktion am 10. Kohlenstoffatom, woraus eine 12-Lipoxygenierung der Substratfettsäure resultiert.

Die Triadenhypothese konnte durch die Erzeugung einer großen Anzahl von Mutanten verschiedener Säugetier ALOX15-Orthologen bestätigt werden. Wenn z.B. das sperrige Phenylalanin an Stelle 353 in der Kaninchen-ALOX15 durch ein kleineres Leucin ersetzt wird, entsteht 12-H(p)ETE als Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung (35). Kehrt man diese Mutagenesestrategie um und mutiert das Leucin des Arachidonsäure 12-lipoxygenierenden Alox15-Orthologen der Ratte zu einem Phenylalanin (Leu353Phe), erhält man eine Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Alox15-Mutante (36).

1.5 Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen

Wie oben bereits beschrieben (siehe 1.4) kann ein ALOX15-Orthologes in Abhängigkeit von der Struktur seiner Substratbindungstasche als Arachidonsäure 15- oder Arachidonsäure 12-lipoxygenierendes Enzym fungieren. Bisherige Untersuchungen haben zudem einen Zusammenhang zwischen der Reaktionsspezifität des ALOX15-Orthologen einer bestimmten Säugetierspezies und der evolutionären Stellung dieser Spezies gezeigt. So sind die ALOX15-Orthologen niederer Säugetierspezies überwiegend Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme, was für Maus (19), Ratte (36), Schwein (37) und Rind (38) von verschiedenen Autoren gezeigt werden konnte. Auch niedere Primaten wie Rhesusaffen (29, 39) und Paviane (28) exprimieren Arachidonsäure 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Die evolutionär höher eingestuft Hominiden [Orang-Utans (29, 39), Schimpansen (28), Bonobos (28),

Gorillas (30) und Menschen (40)] besitzen hingegen Arachidonsäure 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Dies gilt auch für ausgestorbene Menschenarten wie *H. neanderthalensis* (41) und *H. denisovan* (42). Die ALOX15-Orthologen des Gibbons, der evolutionär zwischen dem Rhesusaffen (12-lipoxygenierend) und dem Orang-Utan (15-lipoxygenierend) steht, zeigt eine ausgeprägte duale Reaktionsspezifität. Dieses Enzym setzt Arachidonsäure zu fast gleichen Anteilen von 15- und 12-H(p)ETE um (28). Es muss an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich nicht alle Säugetier ALOX15-Orthologe (z.B. die Kaninchen-ALOX15) an das Evolutionskonzept halten. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass ca. 5 % der bislang identifizierten Säugetier ALOX15-Orthologen nicht dem Evolutionskonzept folgen (31). Als eine der möglichen Triebkräfte der evolutionären Veränderung der ALOX15-Reaktionsspezifität von Arachidonsäure 12- zu Arachidonsäure 15-lipoxygenierend wirkenden ALOX15-Orthologen wurde die Aktivität der Enzyme zur Synthese von anti-inflammatorischen Lipoxinen diskutiert. Die Arachidonsäure 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen haben *in vitro* eine mehr als fünffach höhere Lipoxinsynthaseaktivität als die Arachidonsäure 12-lipoxygenierenden Enzyme, was möglicherweise zu einer besseren Kontrolle von Entzündungsprozessen im Laufe der Primatenentwicklung beigetragen hat (28).

1.6 Konzept der Stereospezifität („A-vs.-G-Hypothese“)

Mithilfe des Triadenkonzepts (siehe 1.4) kann die Positionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen beschrieben werden. ALOX15B-Orthologe halten sich jedoch nicht an dieses Konzept. Um ein universelles Konzept der Reaktionsspezifität von Lipoxygenasen zu entwickeln, suchten Coffa und Brash am aktiven Zentrum von ALOX-Isoformen nach Unterschieden in der Aminosäuresequenz, die spezifisch für R- und S-Lipoxygenasen konserviert sind und führten im Jahr 2004 die „Alanin versus Glycin-Hypothese“ („A-vs.-G-Hypothese“) ein. Nach dieser Hypothese befindet sich eine spezifische Aminosäure im katalytischen Zentrum aller ALOX-Isoformen, die für die Stereospezifität eine wichtige Rolle spielt („Coffa-Determinante“) und die als Alanin in S-Lipoxygenasen und als Glycin in R-Lipoxygenasen konserviert zu sein scheint (43). Dieses Konzept konnte durch Mutagenesen von zwei S- und zwei R-ALOX-Isoformen bestätigt werden. So führte der Austausch des Alanins zu einem Glycin an Position 417 der murinen Alox15b [8(S)-LOX] dazu, dass aus dem Substrat Arachidonsäure überwiegend 12(R)-H(p)ETE gebildet wurde (im Verhältnis 1,8:1 mit dem Hauptprodukt

des Wildtypenzym, 8(S)-H(p)ETE). Das Hauptprodukt der Ala416Gly-Mutante der humanen ALOX15B (Wildtyp ist S-lipoxygenierend) war entsprechend der Hypothese 11(R)-H(p)ETE. Die Mutageneseexperimente der beiden R-Lipoxygenasen zeigten, dass durch den Austausch von Glycin zu Alanin auch der Wechsel von R- zu S-lipoxygenierenden Enzymen gelingt. So wandelt die Gly427Ala-Mutante der 8(R)-LOX-Domäne des Fusionsproteins von *Plexaura homomalla* Arachidonsäure fast ausschließlich zu 12(S)-H(p)ETE um. Auch die humane ALOX12B konnte durch die Mutation von Gly441Ala in ein Enzym umgewandelt werden, dass 8(S)-H(p)ETE im Verhältnis 1,4:1 mit dem Produkt des Wildtypenzym, 12(R)-H(p)ETE, bildet.

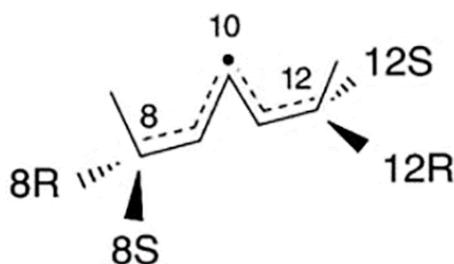


Abb. 5: Beziehung zwischen R- und S-Stereospezifität in Lipoxygenasen bei Wasserstoffabstraktion am C10 [modifiziert nach Coffa et al., 2004 (43)]. Erläuterungen siehe Text.

Diese Untersuchungen zeigten, dass ein Wechsel der Stereospezifität immer auch mit einem Wechsel der Positionsspezifität einherging, der Sauerstoffeinbau in die Substratfettsäure durch die Mutanten also überwiegend an einem anderen Kohlenstoffatom erfolgte als durch das Wildtypenzym. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Sauerstoff nach der initialen Wasserstoffabstraktion antarafacial entweder am einen oder am anderen Ende des Pentadiensystems eingebaut werden kann. Wird Wasserstoff beispielsweise am 10. Kohlenstoffatom abstrahiert, können vier verschiedene Produkte entstehen, was in Abbildung 5 verdeutlicht wird. Wenn die Substratfettsäure so positioniert wird, dass sich ihre Kohlenwasserstoffkette in der Ebene befindet, die durch die Doppelbindungen definiert wird, erfolgt die Sauerstoffinsertion bei der Bildung von 8(S)- und 12(R)-H(p)ETE von oberhalb der Ebene der Fettsäurekette. Für die Bildung von 8(R)- und 12(S)-H(p)ETE wird Sauerstoff von unterhalb dieser Ebene in das Substratmolekül eingebaut.

Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Ala zu Gly Mutation nicht bei allen in Vertebraten vorkommenden S-Lipoxygenasen dazu führt, dass überwiegend R-Oxygenierungsprodukte entstehen. So blieben für die ALOX15-Orthologen von Kaninchen, Mensch, Rhesusaffe, Orang-Utan und Maus sowie für die murine Alox5 die (S)-H(p)ETE-Isomere die Hauptoxygenierungsprodukte der Arachidonsäure, während (R)-H(p)ETE-Isomere nur 10–30 % der Gesamtprodukte ausmachten (20). Außerdem scheint die A-vs.-G-Hypothese auch primär nicht für alle

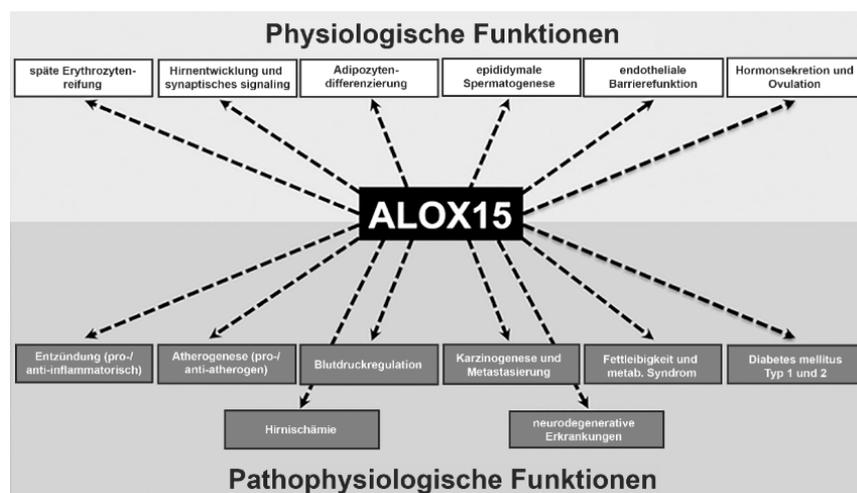
LOX-Isoformen zuzutreffen. Die Coffa-Determinante der LOX1 von *Danio rerio* (Zebrafisch) ist zwar als Glycin konserviert, das Enzym katalysiert jedoch eine exklusive Arachidonsäure 12(S)-Lipoxygenierung (20). Somit kann allein anhand der A-vs.-G-Hypothese nicht auf die Stereospezifität von ALOX-Isoformen geschlossen werden. Die Funktionsvorhersagen, die auf der Basis der A-vs.-G-Hypothese aufgestellt wurden, sollten deshalb immer experimentell überprüft werden.

1.7 Biologische Rolle von Lipoxygenasen

1.7.1 ALOX15

1.7.1.1 Physiologische Funktionen

Entsprechend der klassischen Eikosanoid-Hypothese wurde vorgeschlagen, dass die ALOX15-Orthologe, ähnlich wie die ALOX5 und die PGHS-Isoformen (COX-Isoformen), ihre biologischen Funktionen vor allem über die Synthese von bioaktiven Signalmolekülen ausüben (10). Tatsächlich haben Untersuchungen gezeigt, dass die ALOX15-Produkte in unterschiedlicher Weise biologisch aktiv sind (44). Es gibt allerdings



noch andere mögliche Mechanismen, über die ALOX15-Orthologe biologisch aktiv sein können (10):

Abb. 6: Physiologische und pathophysiologische Prozesse mit Beteiligung der ALOX15 [modifiziert nach Ivanov et al., 2015 (10)]. Erläuterungen siehe Text.

i) Säugetier ALOX15-Orthologe können mehrfach ungesättigte Fettsäuren auch dann oxygenieren, wenn diese Fettsäuren Bestandteil komplexer Lipid-Protein-Verbände (Biomembranen, Lipoproteine) sind. Damit scheinen sie eine Funktion bei der Umstrukturierung von Zellmembranen und im oxidativen Stoffwechsel von Lipoproteinen zu haben.

ii) Da die ALOX15 die Peroxidation von Lipiden katalysiert, spielt sie auch als Regulator des zellulären Redoxgleichgewichtes eine wichtige Rolle. Diese Homöostase beeinflusst in hohem Maße die Aktivität redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, sodass die ALOX15 bei der zellulären Genexpression eine regulatorische Funktion besitzt.

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die wichtigsten physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, an denen die ALOX15-Orthologe beteiligt sind und die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.7.1.1.1 Späte Erythrozytenreifung

Ein physiologischer Prozess, zu dem die ALOX15 beiträgt, ist der Abbau von Mitochondrien im Rahmen der späten Erythrozytenreifung. Während in reifen Erythrozyten kaum ALOX15 zu finden ist, produzieren Kaninchenretikulozyten große Mengen dieses Enzyms, wenn die Erythropoese durch wiederholten Blutverlust oder forcierte Hämolyse gesteigert wird (45). Anhand zweier Beobachtungen konnte auf die Rolle der ALOX15 während dieses Prozesses geschlossen werden: i) Während der *in vitro* Reifung von Retikulozyten stieg die Expression der ALOX15 an, während parallel dazu ein Abfall der Zellatmung beobachtet werden konnte (46). ii) *In vitro* verursacht die isolierte ALOX15 des Kaninchens den strukturellen Abbau von Mitochondrien, die aus Rattenleberzellen präpariert worden waren (47).

Diese Hypothese wurde durch weitere *in vitro* Studien unterstützt, die gezeigt haben, dass das isolierte Enzym nicht nur an die Membranen von Mitochondrien und anderen Zellorganellen bindet und die Membranlipide oxygeniert (48), sondern diese durch die Bildung von Membranporen auch durchlässig macht (49). Die funktionale Inaktivierung des *Alox15*-Gens bei Mäusen führte jedoch nicht zu wesentlichen Einschränkungen der Erythropoese (19), was vor allem darauf zurückzuführen sein könnte, dass es neben dem ALOX15-abhängigen Abbau der Mitochondrien noch andere Degradationsprozesse gibt (50-52). In vertiefenden Untersuchungen zur Erythropoese von *Alox15*^{-/-} Mäusen konnte kürzlich gezeigt werden, dass das hämatopoetische System dieser Tiere in der Tat funktionell eingeschränkt ist und dass eine Überexpression der humanen ALOX15 diesen Defekt aufhebt (53). Derzeit bleibt jedoch unklar, in welchem Maße der ALOX15 abhängige Mitochondrienabbau zur normalen Erythropoese beim Menschen beiträgt.

1.7.1.1.2 Hirnentwicklung und synaptisches Signaling

Obwohl die Expressionsniveaus der *Alox15* im Gehirn von erwachsenen Menschen sehr gering sind, konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym in den Gehirnen von Ratten (54) und Hunden (55) auf höherem Niveau exprimiert wird. Außerdem konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass 12-H(p)ETE

(Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung der murinen Alox15) als Mediator am Prozess der axonalen Wegfindung beteiligt ist und dass die Alox15 damit eine Rolle bei der Hirnentwicklung spielen könnte (56-59).

Die Alox15 scheint auch an der Modulation interneuronaler Kommunikationsprozesse beteiligt zu sein, die bei Langzeit-Depression (60-62) und -Potenzierung (63, 64) bedeutsam sein könnten. *Alox15* Knockout Mäuse zeigen jedoch keine auffälligen Verhaltensbeeinträchtigungen (65), was impliziert, dass der *Alox15* Knockout entweder umgangen oder durch andere Mechanismen kompensiert werden kann.

1.7.1.1.3 Adipozytendifferenzierung

In vitro Reifungsexperimente von primären Präadipozyten aus Ratten (66) zeigten erstmalig die Beteiligung von Lipoxygenasen an der Adipozytendifferenzierung. Es blieb jedoch zunächst unklar, welche der ALOX-Isoformen an diesem Prozess beteiligt waren. Untersuchungen mit dem ALOX15 Inhibitor Baicalein wiesen darauf hin, dass die Adipozytenreifung von 3T3-L1 Zellen, welche oft als zelluläres Modell für die Adipozytendifferenzierung genutzt werden (67), durch Baicalein gehemmt werden konnte (67). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass Baicalein keineswegs ein spezifischer Hemmstoff der Alox15 ist, sondern dass auch andere ALOX-Isoformen durch diese Substanz gehemmt werden (68). Außerdem besitzt Baicalein als Polyphenolderivat zumindest potenziell anti-oxidative Eigenschaften, sodass off-target Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, welche der Rolle der Alox15 bei der Adipogenese zugrunde liegen, in diesen Untersuchungen nicht geklärt werden konnten, scheint der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR- γ) bedeutsam zu sein. Dieser Transkriptionsfaktor, der durch ALOX15-Produkte aktiviert werden kann (69, 70), spielt für das regulatorische Netzwerk der Adipogenese eine wichtige Rolle (71). In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Fettsäureoxygenierungsprodukte der ALOX15 13-HODE und 15-HETE als Koaktivatoren von PPAR- γ fungieren (69, 70). Außerdem wurde berichtet, dass die zelluläre Aktivität von PPAR- γ durch Interleukin 4-abhängige Induktion der Expression der ALOX15 hochreguliert wird (69). Diese und andere Erkenntnisse deuten auf eine physiologische Rolle der ALOX15 in der PPAR- γ abhängigen Adipozytendifferenzierung hin, beweisen diese Funktion jedoch nicht.

1.7.1.1.4 *Epididymale Spermatogenese und Fruchtbarkeit*

Die Bildung von u.a. 13- und 9-HODE ließ auf das Vorhandensein einer Lipoxygenase und einer Hydroperoxidisomerase in den Mikrosomen von Rattenhoden schließen (72). Ein prominentes Kennzeichen der epididymalen Reifung von Säugetierspermien ist die von proximal nach distal entlang der Spermiengeißel stattfindende Migration und anschließende Abgabe eines tropfenförmigen Zytoplasmarests. Da die ALOX15 in diesem Zytoplasmatröpfchen nachgewiesen wurde, scheint das Enzym eine Funktion bei der Spermatogenese zu haben (73, 74). Die Spermatozoen von Alox15 defizienten Mäusen behielten im Vergleich zum Wildtyp das Zytoplasmatröpfchen im Nebenhoden, was für eine gestörte Spermienreifung spricht (74). Zusätzlich zur Spermienreifung scheint die ALOX15 auch an der Degradation der paternalen Mitochondrien nach der Oozytenfertilisation beteiligt zu sein, wobei das Enzym jedoch nicht essentiell für diesen Prozess ist (75).

1.7.1.1.5 *Endotheliale Barrierefunktion*

Untersuchungen haben gezeigt, dass die ALOX15 an der Regulation der Permeabilität des arteriellen Endothels beteiligt ist (76). So führt 15(S)-HETE (Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung durch die humane ALOX15) über eine Src- und Pyk2-abhängige Tyrosinphosphorylierung zur Dissoziation von Zonula occludens 2 Proteinen aus Tight junction Komplexen. In *ex vivo* Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Inkubation von Arachidonsäure mit Arterien aus Wildtypmäusen zu einer Zerstörung der Tight junctions führte, während dieser Effekt bei den Arterien von *Alox15* Knockout Mäusen nicht beobachtet werden konnte (76). Zudem verstärkt 15(S)-HETE auch die Phosphorylierung von Zonula occludens 1 Proteinen, wodurch diese von den Occludinen abdissoziieren und es ebenfalls zu einer gestörten Funktion der endothelialen Barriere kommt (77). Die Phosphorylierung bestimmter Tyrosine des junctionalen Adhäsionsmoleküls A sowie eine verstärkte Expression der Xanthinoxidase wurden als ein alternativer Mechanismus der ALOX15 abhängigen Störung der endothelialen Barrierefunktion diskutiert (78).

1.7.1.1.6 *Regulation von Sexualhormonexkretion und Ovulation*

In vitro Experimente konnten zeigen, dass verschiedene ALOX-Inhibitoren (NDGA, ETYA, Kaffeesäure, Esculetin) die LH-stimulierte Testosteronsynthese in isolierten Leydig-Zellen aus Rattenhoden dosisabhängig hemmen, was auf eine Beteiligung des

ALOX-Weges an der Testosteronsynthese schließen lässt (79). Obwohl diese Ergebnisse die Erkenntnisse früherer Untersuchungen bestätigen (80-82), bleiben der zugrundeliegende Mechanismus und die Frage, welche der ALOX-Isoformen daran beteiligt sein könnte, unklar.

Untersuchungen an Zellen aus der Rattenhypophyse haben zweierlei gezeigt: zum einen hemmen ALOX-Inhibitoren die Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) und von Prolaktin (83, 84), zum anderen wird die Prolaktinfreisetzung durch 15-HETE induziert, was auf die Beteiligung eines 15-lipoxygenierenden Enzyms hinweist (85, 86). Das Arachidonsäure 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe, das im Hypophysenvorderlappen des Schweins exprimiert wird, ko-lokalisiert mit LH und dem Follikel stimulierenden Hormon (FSH). Wenn primäre Zellkulturen aus diesem Organ mit 12-HpETE oder 13-HpODE inkubiert werden, kommt es zu einer vermehrten Freisetzung beider Hormone (87). Darüber hinaus scheinen ALOX15 Metabolite am Prozess der Ovulation beteiligt zu sein (88).

1.7.1.2 *Pathophysiologische Funktionen*

1.7.1.2.1 *Pro- und anti-inflammatorische Eigenschaften der ALOX15*

Die ALOX15 spielt bei Entzündungsprozessen eine Rolle, wobei die von ihr gebildeten Metabolite sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen. 15- und 12-HETE (Hauptprodukte der Oxygenierung von Arachidonsäure durch ALOX15-Orthologe) sowie 13-HODE (Hauptprodukt der Oxygenierung von Linolsäure durch ALOX15-Orthologe) zeigen in verschiedenen Entzündungsmodellen pro-inflammatorische Eigenschaften (89). So führt die intradermale Injektion von 12- oder 15-HpETE beim Kaninchen zu einer gesteigerten Exsudation von Plasma, was als pro-inflammatorische Wirkung interpretiert werden kann (90). 13-HODE (91) und 5-Oxo-15-HETE (92), ein komplexerer ALOX15-Metabolit, zeigten außerdem chemotaktische Aktivität für humane Leukozyten und eosinophile Granulozyten. Zudem kam es bei der Inkubation von humanen eosinophilen Granulozyten (enthalten reichlich ALOX15) mit Arachidonsäure zur Produktion von Eoxin C4 (93). Eoxine können als pro-inflammatorische Mediatoren die Gefäßpermeabilität erhöhen (93). Auch die Effekte von ALOX15-Metaboliten auf die arterielle Barrierefunktion (siehe 1.7.1.1.5) haben einen pro-inflammatorischen Charakter.

Die anti-inflammatorischen Effekte der ALOX15 beruhen zum Teil auf ihrer Beteiligung an der Biosynthese von Lipoxinen (13), Resolvinen (16), Protektinen (17) und

Maresinen (94), welche anti-inflammatorische bzw. pro-resolutorische Prozesse wie eine reduzierte Leukozytenmigration (95), die Normalisierung der Gefäßpermeabilität (96) sowie die Apoptose pro-inflammatorischer neutrophiler Granulozyten (97) induzieren. Diese Effekte konnten beispielsweise bei der Untersuchung von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Arthritis gezeigt werden. So führte die Inaktivierung der Alox15 in verschiedenen Arthritismodellen der Maus zu unkontrollierter Entzündung und Gewebeschaden. Mäuse ohne funktionierende Alox15 zeigten eine verstärkte Expression pro-inflammatorischer Gene sowie erniedrigte Lipoxin A4-Spiegel in der Synovia (98). 15(S)-H(p)ETE als primäres Oxygenierungsprodukt weist unter bestimmten experimentellen Bedingungen auch anti-inflammatorische Aktivitäten auf (89). So hemmt es beispielsweise *in vitro* die Migration von neutrophilen Granulozyten ins Zytokin-aktivierte Gefäßendothel.

1.7.1.2.2 *Atherogenese*

Die ALOX15 ist dazu in der Lage, LDL (99) und andere Lipoproteine (100) in deren atherogene Formen (z.B. oxLDL, oxHDL) zu oxygenieren. Dadurch könnte das Enzym die Atherogenese beschleunigen. Untersuchungen an *Alox15* Knockout Mäusen bestätigten die potenziell pro-atherogene Funktion der ALOX15 (101-103).

Andererseits deutete die Überexpression der humanen ALOX15 in unterschiedlichen Atherosklerosemodellen von Kaninchen und Maus (104-106) eher auf einen anti-atherogenen Effekt hin. Durch diese gegensätzlichen experimentellen Ergebnisse bleibt die Rolle der ALOX15 bei der Atherogenese ein kontroverses Thema. Beim Menschen ist die ALOX15 in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen nur auf niedrigem Niveau exprimiert (107, 108). Diese Daten schließen jedoch eine Beteiligung des Enzyms an der Entstehung dieser Läsionen nicht unbedingt aus. So könnte die ALOX15 an der Differenzierung von Makrophagen, welche sich durch unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem LDL zu Lipid-beladenen Schaumzellen entwickeln, beteiligt sein und damit zur frühen Atherogenese beitragen, ohne in den späten Läsionen exprimiert zu werden (10).

Die ALOX15 scheint auch Einfluss auf den Cholesteroltransport zu haben. Hier konnten ebenfalls sowohl pro- als auch anti-atherogene Effekte nachgewiesen werden. So führte eine Überexpression der Alox15 in Makrophagen der Maus (J774 Zellen) zu einer verminderten Expression des ABC-Transporters G1 und damit zu einem verminderten HDL-vermittelten Cholesterolefflux (109). In ähnlichen Untersuchungen mit

RAW Makrophagen hatte die Überexpression der ALOX15 eine vermehrte Expression von ABC-Transportern, einen erhöhten Cholesterolefflux sowie einen erhöhten reversen Cholesteroltransport zur Folge (110), was einen anti-atherogenen Effekt darstellt.

1.7.1.2.3 *Blutdruckregulation*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Arachidonsäure einen relaxierenden Effekt auf aus Kaninchen stammendes Aortengewebe hat und dass dieser Effekt durch den ALOX-Hemmer NDGA aufgehoben wurde (111). Da NDGA kein spezifischer ALOX15 Hemmstoff ist, deuten diese Daten auf eine mögliche Beteiligung einer Lipoxygenase hin, beweisen diese aber nicht. Auch die chemische Identifizierung der für diese Effekte verantwortlichen Oxygenierungsprodukte (Trihydroxyeicosanoide) kann nicht als Beweis für die Beteiligung der Alox15 gewertet werden (112), da prinzipiell alternative Biosynthesewege für diese Metabolite möglich sind.

Ob die ALOX15 *in vivo* eine Rolle bei der Blutdruckregulation spielt, wurde in einer Studie mit *Alox15* Knockout Mäusen untersucht (113). Hier zeigte sich, dass es keinen Unterschied zwischen dem systolischen Blutdruck von Wildtyp und Knockout Mäusen gab. Die Knockout Mäuse zeigten jedoch eine höhere Resistenz gegenüber einer durch L-NAME oder Salz induzierten Hypertonie. Dieser Effekt konnte in den Knockout Mäusen wieder aufgehoben werden, wenn ihnen vor der Hypertonieinduktion peritoneale Wildtyp Makrophagen intraperitoneal injiziert wurden, welche reichlich Alox15 enthalten. Der Vergleichsgruppe wurde vor der Induktion der Hypertonie dasselbe Volumen an PBS injiziert. Die Interpretation dieser Ergebnisse sollte jedoch mit Vorsicht erfolgen, da die Injektion von PBS nicht die am besten geeignete Kontrolle für die Injektion von Wildtyp Makrophagen darstellt. Die Injektion von *Alox15*^{-/-} Makrophagen wäre in diesem experimentellen Kontext ein besser geeignetes Kontrollexperiment gewesen.

1.7.1.2.4 *Karzinogenese und Metastasierung*

Die ALOX15 scheint an zahlreichen Prozessen der Karzinogenese wie Angiogenese, Entzündung und Metastasierung beteiligt zu sein und weist sowohl pro- als auch anti-karzinogene Eigenschaften auf (114). Werden HCT116 Kolonkarzinomzellen mit der ALOX15 transfiziert, kommt es zu einer Aktivierung der ERK Proteinkinase, was wiederum zu einer erhöhten Zellproliferation führt und auf eine pro-karzinogene Wirkung der ALOX15 hinweist (115). Für eine Beteiligung der ALOX15 an diesem Prozess spricht, dass der LOX-Inhibitor NDGA die Aktivierung der ERK Proteinkinase aufhebt. Dieser

Effekt ist jedoch möglicherweise nicht direkt mit einer Inhibierung der ALOX15 verbunden, da die Zellzyklusregulation redoxsensibel ist (116) und NDGA als Polyphenol Eigenschaften eines Antioxidans besitzt. Weitere Untersuchungen mit Kolonkarzinomzellen (HCT116, HT29) haben gezeigt, dass die ektopische Expression des ALOX15-Gens auch eine anti-karzinogene Wirkung über die Hemmung des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B hat (117).

1.7.1.2.5 *Adipositas und metabolisches Syndrom*

Da die ALOX15 bei der Differenzierung von Adipozyten eine Rolle spielt (siehe 1.7.1.1.3) stellt sich die Frage, ob sie auch an der Entstehung der Adipositas und des metabolischen Syndroms beteiligt ist. In Wildtypmäusen führte eine fettreiche Diät zu einer erhöhten Anzahl an Makrophagen im viszeralen Fettgewebe (118), welche die Hauptquelle der Alox15 im murinen viszeralen Fettgewebe darstellen (119). Diese Erhöhung war in *Alox15* Knockout Mäusen signifikant geringer (118). Dies wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt (119), wobei die Makrophageninfiltration hier als ein Parameter für entzündliche Prozesse gewertet wurde. Diese Erkenntnisse deuten auf eine Beteiligung der ALOX15 an der durch fettreiche Diät induzierten Fettgewebsentzündung hin, die wichtig für die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz des viszeralen Fettgewebes ist (119).

Andere Untersuchungen zeigten außerdem eine interessante Verbindung zwischen der Alox15-Expression im Fettgewebe und Entzündungsprozessen in den pankreatischen Inselzellen. So konnte ein fettgewebsspezifischer Knockdown der Alox15 die durch fettreiche Diät induzierten Entzündungsprozesse in den Pankreasinseln signifikant reduzieren, was möglicherweise ein neues Prinzip in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 darstellen könnte (120).

1.7.1.2.6 *Diabetes mellitus Typ 1 und 2*

Die Expression der ALOX15 ist sowohl in Zell- als auch in Tiermodellen des Diabetes mellitus hochreguliert (121). Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die Insulinsekretion humaner pankreatischer Inselzellen durch Konzentrationen von 12(S)-HpETE und 12-HETE im Nanomolarbereich reduziert wurde und höhere 12(S)-HETE-Konzentrationen mit einer koronaren Herzerkrankung in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind (122).

Über eine mögliche Beteiligung der ALOX15 an der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 sind momentan nur wenige Informationen verfügbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass weibliche, normalgewichtige, diabetische Mäuse, die ein geeignetes Modell für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 beim Menschen darstellen (123), fast keine diabetischen Symptome entwickeln, wenn das murine *Alox15* Gen funktionell inaktiviert wurde (124). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der Alox15 an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus hin. Mechanistisch könnten hier die Effekte der Alox15 auf die pankreatischen Inselzellen und/oder auf die Funktionalität der Makrophagen zugrunde liegen (125).

1.7.1.2.7 *Hirnschämie*

Unter ischämischen Bedingungen wird Arachidonsäure verstärkt durch die Phospholipase A2 aus den Membranlipiden von Gehirnzellen freigesetzt (126). Dabei steigt der intrazelluläre Calciumspiegel, was die Membranbindung der ALOX15 erleichtert und ihre katalytische Aktivität erhöht (127).

Das Expressionsniveau der ALOX15 ist in der Penumbra region, die als Folge einer zerebralen Ischämie entsteht, deutlich erhöht. Als Penumbra bezeichnet man die Region eines ischämischen Hirninfarktes, die den Kerninfarkt umgibt und die besonders vulnerabel für einen späteren Zelltod ist (128). Diese Veränderungen gehen mit einer Erhöhung der Expression des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) einher, was sowohl bei Schlaganfallpatienten (129) als auch im zerebralen Ischämie Modell der Maus (130) beobachtet werden konnte. Die Expression der ALOX15 ko-lokalisiert mit MDA2, einem Marker für oxidierte Lipide (129). Diese Erkenntnisse deuten auf die Beteiligung der ALOX15 an einem Signalweg hin, welcher in ischämischen Hirnregionen aktiviert wird und zum Zelltod führt.

Lipoxine und Protektine üben einen protektiven Effekt in ischämischen Hirnregionen aus. So zeigte der Lipoxin A₄-Rezeptoragonist BML-111 in einem Schlaganfallmodell in Ratten einen protektiven Effekt (131). Da Arachidonsäure 12- und 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe an der Lipoxinsynthese beteiligt sind (siehe 1.7.1.2.1), könnten auch ALOX15-Orthologe in diesen Prozess involviert sein. Ähnliches gilt für Neuroprotektin D, das den Gewebeuntergang in tierischen Schlaganfallmodellen reduziert (132). Auch an dessen Biosynthese aus DHA sind ALOX15-Orthologe mutmaßlich beteiligt (133).

1.7.1.2.8 *Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer*

Wie unter 1.7.1.1.3 beschrieben, konnten einige Metabolite der ALOX15 als Koaktivatoren von PPAR- γ identifiziert werden. Der mit diesem Transkriptionsfaktor verbundene Signalweg spielt eine Rolle im Rahmen der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der humanen multiplen Sklerose. In Mäusen ohne funktionelle Alox15 verschlimmerte sich die allergische Enzephalomyelitis, was auf eine protektive Wirkung des Enzyms bei diesem Krankheitsbild hindeutet (134). Andere Untersuchungen zeigten, dass die Gabe des ALOX15-Inhibitors Baicalein die Symptome der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis in Mäusen hemmt (135). Dabei kam es nicht zu einer Hemmung der ALOX15-Expression, sondern zu einer verminderten Bildung von ALOX15-Metaboliten sowie einer verstärkten Expression von PPAR- β/δ in der Mikroglia. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der PPAR- β/δ -Signalweg durch eine funktionelle Inaktivierung des ALOX15-Weges aktiviert wird, was protektiv auf die autoimmune Enzephalomyelitis in Mäusen wirkt und möglicherweise ein neues Konzept im Rahmen der Therapie der multiplen Sklerose darstellt (135). Für die Interpretation der Daten muss allerdings berücksichtigt werden, dass Baicalein kein spezifischer ALOX15 Hemmstoff ist (68) und dass diese Substanz aufgrund ihrer chemischen Struktur auch als Antioxidans wirkt. Deshalb könnten durchaus off-target Effekte von Baicalein zu diesem Befund beitragen.

Zur Rolle der ALOX15 in der Pathogenese des Morbus Alzheimer gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen ist die Expression der ALOX15 im Hirngewebe von Alzheimer Patienten erhöht (136) und ebenso konnten erhöhte Spiegel von 12- und 15-HETE im Liquor von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (137). Andere Studien zeigten hingegen eine verminderte ALOX15-Expression im Hippocampus von Alzheimer Patienten, die mit einer verminderten Konzentration von Neuroprotektin D1 einherging (138).

1.7.2 ALOX5

Die ALOX5 ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese pro-inflammatorischer Leukotriene (1, 139). Leukotriene fungieren als Mediatoren immunologischer Reaktionen und werden hauptsächlich in Leukozyten synthetisiert, wobei freie Arachidonsäure das Substrat darstellt (139). Die ersten beiden Reaktionen der Leukotriensynthesekaskade, nämlich die Oxygenierung der Arachidonsäure zu 5(S)-HpETE und die Umwandlung von 5(S)-HpETE zu Leukotrien A₄ (LTA₄), werden durch die ALOX5 katalysiert. Ausgehend

vom LTA₄ kann mithilfe der LTA₄-Hydrolase das Leukotrien B₄ (LTB₄) oder durch die katalytische Aktivität der Leukotrien-C₄-Synthase das Leukotrien C₄ (LTC₄) synthetisiert werden. LTC₄ stellt seinerseits das Ausgangsprodukt für die Synthese der Leukotriene D₄ und E₄ dar (1).

Die Produktion von Leukotrienen ist mit zahlreichen chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert (1). So sind sie bereits als Mediatoren bei der Entstehung von Asthma etabliert (140, 141) und Leukotrienrezeptor-Antagonisten werden in der Asthmatherapie verwendet (142). Ebenso wie die ALOX15 scheint auch die ALOX5 an der Atherogenese beteiligt zu sein, da Untersuchungen signifikant erhöhte mRNA-Level der ALOX5 und zweier weiterer Schlüsselproteine der LTB₄-Biosynthese [5-LOX-aktivierendes Protein (FLAP) und LTA₄-Hydrolase] in menschlichen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen haben (143). Das Expressionsniveau der ALOX5 in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden war deutlich höher als das der ALOX15 (107). Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass eine funktionelle Inaktivierung des *Alox5* Gens bei Mäusen (*Alox5*^{-/-}-Mäuse) nicht zu einer signifikanten Reduktion bei der Bildung atherosklerotischer Läsionen führte (144). Obwohl der Grad der Lipidablagerung in der Aortenwand bei *Alox5*^{-/-}-Mäusen ähnlich war wie bei entsprechenden Wildtypkontrolltieren, entwickelten die gentechnisch veränderten Mäuse verstärkt Aortenaneurysmen (144). Die molekularen Ursachen für diesen interessanten Phänotyp konnten bislang noch nicht aufgeklärt werden.

1.7.3 ALOX12

Die ALOX12 wird in hohen Mengen in humanen Thrombozyten exprimiert (145). Da sowohl pro- als auch anti-thrombotische Effekte dieser Lipoxygenase berichtet worden sind, ist die Funktion der ALOX12 bei der Thrombozytenregulation noch nicht eindeutig geklärt. So sind die Thrombozyten von *ALOX12*^{-/-} Mäusen sensitiver gegenüber einer ADP-induzierten Aggregation (146). Dies würde für eine die Thrombozytenaggregation herunterregulierende Wirkung der ALOX12 sprechen. Andere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass das durch die ALOX12 gebildete 12-HETE (147) und möglicherweise auch andere durch die ALOX12 gebildeten Oxylipine (148) als prothrombotische Mediatoren bei der Atherothrombose fungieren. Die Ergebnisse pharmakologischer Interventionsstudien deuten ebenfalls auf eine prothrombotische Funktion der ALOX12 hin (149, 150). Hier führte die selektive Hemmung der ALOX12 zu einer verminderten Thrombozytenaggregation, einer

selektiven Hemmung der Sekretion dichter Granula und einer Hemmung der Thrombozytenadhäsion. ALOX12 defiziente Mäuse zeigten außerdem eine verminderte Integrinaktivität (149). Zudem konnte ein regulierender Effekt der Proteinkinase C (PKC) auf die ALOX12-vermittelte Thrombozytenaktivierung gezeigt werden (150). Diese Daten bilden die Basis für die Entwicklung neuer Ansätze in der anti-thrombotischen Therapie (151). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Alox12 eine Rolle bei der epidermalen Differenzierung spielt. So haben Alox12^{-/-} Mäuse einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (152).

1.7.4 ALOX15B

Die ALOX15B wird wie die ALOX15 in humanen Makrophagen exprimiert (153). Im Gegensatz zur ALOX15, deren Expression sehr stark von den Interleukinen 4 und 13 abhängig ist (154, 155), wird die ALOX15B in diesen Zellen konstitutiv exprimiert (153). Die Funktion des Enzyms in Makrophagen ist noch nicht abschließend geklärt. Neuere Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass in humanen M2 Makrophagen vermehrt ALOX15B und ALOX5 exprimiert wurden, wenn diese über einen längeren Zeitraum mit Liganden der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 stimuliert werden. Nach zusätzlicher Stimulation mit Kalzium-Ionophor und Zugabe von AA, EPA und DHA setzten diese Zellen auch geringe Mengen an pro-resolutorischen Mediatoren wie Lipoxine und Resolvine frei (156). Daraus konnte abgeleitet werden, dass diese Stimulation zu einer vermehrten ALOX15B abhängigen Synthese von entzündungsauflösenden Lipidmediatoren führt.

In Epithelzellen, beispielsweise in den menschlichen Prostatazellen, fungiert die ALOX15B als Regulator der Zellseneszenz (157-159).

Eine neuere Arbeit, in der die Reaktion von Alox15b^{-/-} (Alox8^{-/-}) Mäusen auf eine Infektion mit dem Influenzavirus X31 im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen (Alox15b^{+/+}) untersucht wurde, hat gezeigt, dass sich die Alox15b defizienten Mäuse nach einer Influenzainfektion schlechter von dieser erholten. Dieser Effekt wurde hauptsächlich bei den älteren Mäusen (6 Monate) beobachtet, während jüngere Tiere (3 Monate) diesen Defekt offensichtlich besser kompensieren konnten (160).

1.7.5 ALOX12B und ALOXE3

Die ALOX12B und die ALOXE3 sind an der späten epidermalen Differenzierung und dabei vorrangig an der Erhaltung des Stratum corneums beteiligt, welches die

äußerste Hautschicht darstellt (161, 162). In normaler Haut von Mäusen werden fünf verschiedene ALOX-Isoformen exprimiert, aber nur die Inaktivierung der Gene der *Alox12* (152), der *Alox12b* (161) und der *Aloxe3* (162) führte zu einer Störung der Wasserbarriere der Haut. *Alox12* Knockout Mäuse sind lebensfähig und vermehren sich normal (146), was darauf hindeutet, dass entweder die Funktion der *Alox12* durch andere ALOX-Isoformen kompensiert werden kann oder, dass das Enzym für ein normales Leben verzichtbar ist. Knockout Mäuse ohne funktionelle *Alox12b* und *Aloxe3* Gene sterben jedoch aufgrund eines exzessiven Wasserverlustes wenige Stunden nach der Geburt (161, 162).

Diese Erkenntnisse scheinen auch auf den menschlichen Organismus übertragbar zu sein, da bei Patienten mit einer autosomal-rezessiven kongenitalen Ichthyosis (ARCI), bei der es zu einer massiven Schuppung der Haut kommt (163), eine hohe Heterogenität der Allele des ALOX12B-Gens festgestellt wurde. Weiterhin konnten zwei Mutationsherde im ALOXE3-Gen identifiziert werden (164). Die funktionale Charakterisierung aller identifizierten Mutationen zeigte einen vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität der Enzyme (164).

Warum die fehlerhafte Funktion der ALOX12B und der ALOXE3 beim Menschen und bei der Maus zu einer gestörten Wasserbarriere der Haut führt, wird derzeit noch diskutiert. Man geht auf molekularer Ebene (165-167) aber davon aus, dass unter normalen Bedingungen die ALOX12B die Oxygenierung Haut-spezifischer Ceramide zu den entsprechenden Hydroperoxiden katalysiert. Diese Hydroperoxide werden anschließend durch die Hydroperoxidisomeraseaktivität der ALOXE3 (168) zu sekundären Lipidperoxidationsprodukten umgewandelt, die den Hepoxilinen ähneln (14). Nach Abspaltung der oxidierten Linolsäurereste von den Ceramiden entstehen freie ω -Hydroxyceramide, die kovalent an Proteine gebunden werden und Bestandteil des cornified envelopes sind, welcher sich an der Innenseite der Zellmembran der Korneozyten befindet (169, 170). Diese Hypothese wird u.a. durch folgende experimentelle Beobachtungen gestützt (167): i) Ceramide mit oxidierten Linolsäureresten konnten in normaler muriner Haut nachgewiesen werden, während sie in der Haut von *Alox12b* Knockout Mäusen fast vollständig fehlen. ii) Die oxidierten Linolsäurereste sind chiral, was darauf hindeutet, dass sie durch die katalytische Aktivität von Enzymen und nicht durch Autoxidation der Hautceramide entstanden sind.

1.7.6 Alox12e

Zusätzlich zur Alox12b und zur Alox12c konnte bei Transkriptomuntersuchungen der menschlichen Haut eine weitere Alox-Isoform in der Epidermis von 3–6 Tage alten Mäusen identifiziert werden. Ein Klon des isolierten Transkripts wurde in HEK-293 Zellen exprimiert und die Zellhomogenate mit AA inkubiert, wobei hauptsächlich 12(S)-HETE mit einem geringen Anteil an 15-HETE gebildet wurde (171). Diese murine Alox-Isoform wird daher als Alox12e (Alox12, epidermale Alox12) bezeichnet. In situ Hybridisierung zeigte eine sehr spezifische Expression des Enzyms in differenzierten Keratinozyten der Epidermis und in bestimmten Regionen der Haarscheide und der Haarfollikel. Auch in der Konjunktiva des Augenlids und in Zellen von Meibom- und Talgdrüsen konnten hohe Expressionslevel dieses Enzyms detektiert werden (171). Zur biologischen Rolle der Alox12e, die einen hohen Grad an Aminosäureähnlichkeit mit der murinen Alox15 aufweist, sind derzeit noch keine sicheren Angaben verfügbar. Das ist vor allem auch darauf zurückzuführen, dass es für dieses Enzym noch keine Knockout Mäuse gibt.

1.8 Evolutionäre Stellung und Systematik der Knochenfische

1.8.1 Äußere Systematik

Fische gehören neben den Amphibien, Reptilien, Vögeln, Säugetieren und Rundmäulern zum Unterstamm der Wirbel (*Vertebrata*)- oder Schädeltiere (*Craniota*) (Abb. 7). Diese zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Wirbelsäule bzw. eines verknöcherten oder knorpeligen Schädels aus und sind von den Wirbellosen abzugrenzen, welche keine Wirbelsäule besitzen. Heute machen Fische fast zwei Drittel der gegenwertig lebenden Wirbeltierarten aus.

Fische gehören zur Überklasse der Kiefermäuler (*Gnathostomata*). Die derzeit lebenden Fischarten können in zwei Klassen eingeordnet werden (172):

i) Knorpelfische (*Chondrichthyes*): Zu dieser Klasse zählen Haie, Rochen und Seekatzen. Die dazugehörigen Arten machen nur etwa 4 % aller heute lebenden Fischarten aus. Im Gegensatz zu den Knochenfischen kann das knorpelige Endoskelett der Knorpelfische zwar verkalken, wird aber nie zu Knochen umgebaut.

ii) Knochenfische (*Osteichthyes/Osteognathostomata*): Die *Osteichthyes* sind die fischartigen Wirbeltiere mit Knochenskelett.

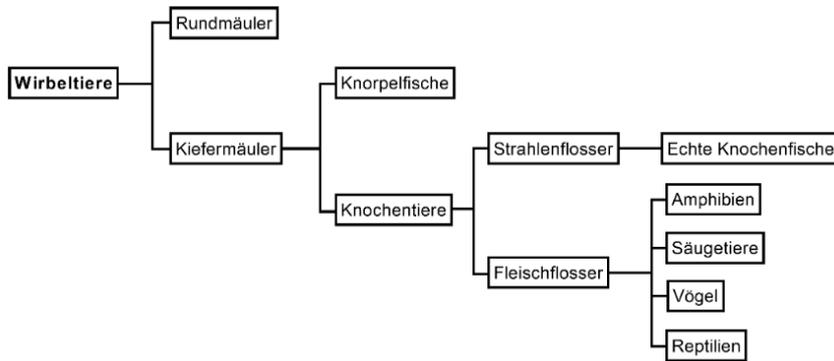


Abb. 7: Vereinfachtes Kladogramm der Wirbeltiereinteilung [modifiziert nach Benton, 2007; Fry et al., 2006; Miyashita et al., 2019; Wang et al., 2013 (173-176)].

1.8.2 Innere Systematik

Die Knochenfische können wiederum in zwei Subklassen eingeteilt werden (172).

i) Fleischflosser (*Sarcopterygii*): Diese umfassen die derzeit lebenden Reliktgruppen der Lungenfische (*Dipnoi*) und Hohlstachler (*Actinistia*). Aus der Sicht der modernen Systematik (Kladistik) gehören die Landwirbeltiere (*Tetrapoda*) ebenfalls zu den Fleischflossern.

ii) Strahlenflosser (*Actinopterygii*): Sie bilden den überwiegenden Teil der derzeit lebenden Fischfauna. Eine Teilklasse der Strahlenflosser sind die Echten Knochenfische (*Teleostei*). Zu ihnen gehören auch der Türkise Prachtgrundkärpfling (*Nothobranchius furzeri*), der Nyereres Viktoriabuntbarsch (*Pundamilia nyererei*) und der Asiatische Gabelbart (*Scleropages formosus*), von denen eine ALOX-Isoform in dieser Arbeit untersucht werden soll. Auch Burtons Maulbrüter (*Haplochromis burtoni*) und der Zebrafisch (*Danio rerio*), der häufig als Modellorganismus für das Studium der Wirbeltierembryogenese verwendet wird, gehören dieser Teilklasse der Fische an. Während *Scleropages formosus* zur Überkohorte der Knochenzünglerähnlichen zählt (siehe Abb. 8A), sind *Nothobranchius furzeri*, *Pundamilia nyererei* und *Haplochromis burtoni* Vertreter der Barschverwandten (siehe Abb. 8B). Innerhalb dieser Unterdivision gehört *Nothobranchius furzeri* zur Überordnung der Ährenfischverwandten, während *Pundamilia nyererei* und *Haplochromis burtoni* zur Ordnung der Buntbarschartigen gehören. Die Einordnung der fünf Fischarten innerhalb der Teilklasse der Echten Knochenfische ist in Abbildung 8 dargestellt.

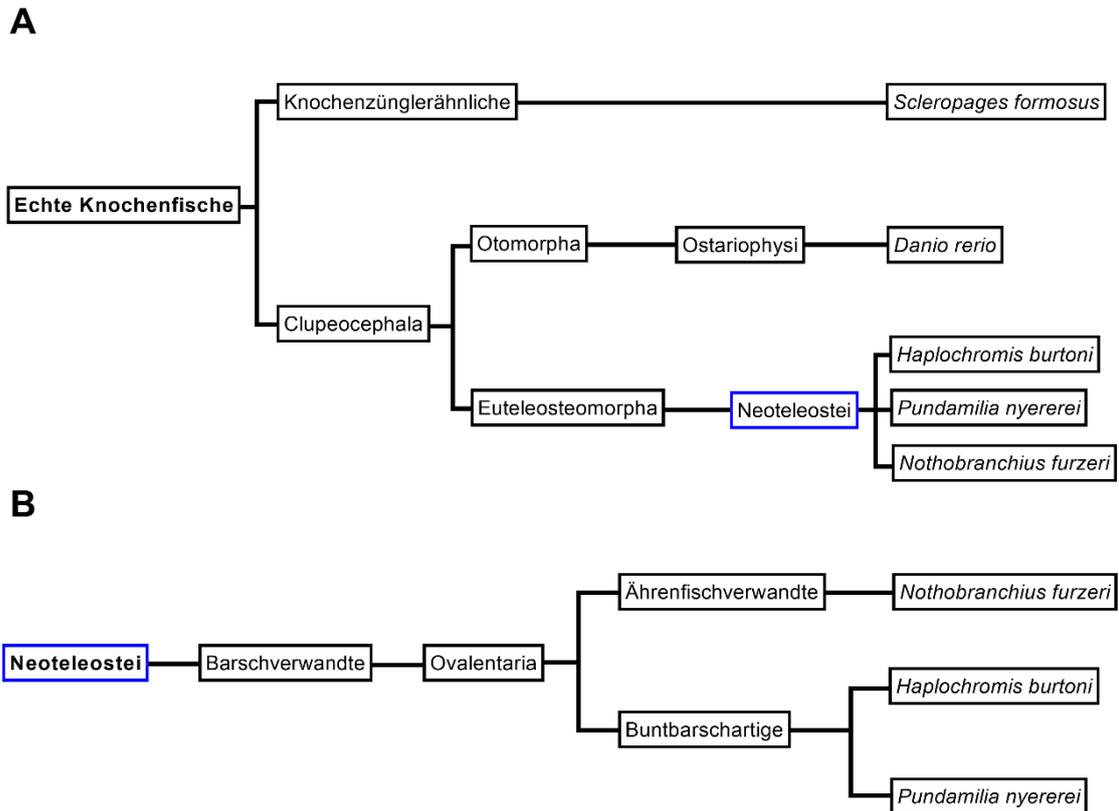


Abb. 8: Phylogenetische Systematik einiger Knochenfischspezies. **A** zeigt die Stellung von *Danio rerio*, *Haplochromis burtoni*, *Nothobranchius furzeri*, *Pundamilia nyererei* und *Scleropages formosus* in der Teilklasse der Echten Knochenfische [modifiziert nach Betancur et al., 2017 (177)]. Die Neoteleostei (Moderne Knochenfische, in blau eingefärbt) bilden eine Gruppe innerhalb der Echten Knochenfische. **B** zeigt ausgehend von den Neoteleostei (in blau eingefärbt) die Stellung von *Haplochromis burtoni*, *Nothobranchius furzeri* und *Pundamilia nyererei* innerhalb der Unterdivision der Barschverwandten [modifiziert nach Hughes et al., 2018 (178)].

1.9 Bisherige Ergebnisse zum Vorkommen von ALOX-Isoformen bei Fischen

1.9.1 Funktionelle Untersuchungen zum Vorkommen von ALOX-Isoformen bei Fischen

Vor Beginn meiner Arbeiten gab es bereits orientierende Untersuchungen zum Vorkommen von ALOX-Isoformen bei Fischen. German et al. berichteten 1986 erstmals über eine potenzielle 12-Lipoxygenase im Kiemengewebe der Süßwasserforelle, die Arachidonsäure hauptsächlich zu 12-HETE umwandelt (179). Hier wurden auch erste Untersuchungen zur Kinetik und pH-Abhängigkeit dieses Enzyms durchgeführt. Später wurden 12-HETE und 12-HEPE (12-Lipoxygenierungsprodukte von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure) in zahlreichen Organen bzw. Geweben der Regenbogenforelle gefunden (180). Auch aus der Regenbogenforelle stammende Makrophagen (181) und Thrombozyten (182) scheinen ALOX-Isoformen zu exprimieren.

Andere Untersuchungen zeigten, dass Leukozyten des Atlantischen Lachs und des Spiegelkarpfens nach Stimulation mit Kalzium-Ionophor Lipoxine bildeten, sodass auch bei diesen Fischarten auf ein Vorhandensein von ALOX-Isoformen geschlossen werden konnte (183). Auch in den Blutzellen des Kleingefleckten Katzenhais als einem Vertreter der Knorpelfische konnte die Aktivität einer ALOX-Isoform nachgewiesen werden (184).

Im Jahre 2016 wurde die cDNA-Sequenz der ALOX5 von *Larimichthys crocea* (large yellow croaker) aufgeklärt. Das Enzym wurde kloniert und seine Expressionsregulation in Abhängigkeit von der ernährungsbedingten Zufuhr von Linol- und Linolensäure untersucht (185).

Obwohl die LOX1 und die LOX2 von *D. rerio* bereits als rekombinante Proteine exprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften charakterisiert werden konnten (siehe 1.9.2), gab es keine funktionellen Informationen zu ALOX-Isoformen bei anderen Fischarten. So ist derzeit weitgehend unbekannt, wie verbreitet verschiedene ALOX-Isoformen (z.B. Alox15, Alox15b, Alox3, Alox12b, Alox5) bei Fischen vorkommen und welche Eigenschaften diese Enzyme besitzen. Aufgrund der fehlenden funktionellen Untersuchungen an Knochenfisch ALOX-Isoformen war es weiterhin bislang nicht möglich, Knochenfisch ALOX-Isoformen mit ihren Funktionsäquivalenten von Säugetieren zu vergleichen. Diese Wissenslücken sollten zumindest teilweise in der vorliegenden Arbeit geschlossen werden.

1.9.2 ALOX-Isoformen beim Zebrafisch

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) stellt einen Modellorganismus dar, der u.a. für Untersuchungen der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten häufig genutzt wird (186). Sein komplettes Genom konnte recht früh aufgeklärt werden und ein gezieltes Ausschalten bestimmter Gene war mit Hilfe der Morpholintechnologie (187) sehr leicht möglich. Bei der Untersuchung des Genoms wurden sieben LOX-Gene entdeckt (*ALOX1*, *ALOX2*, *ALOX3a-c*, *ALOX4a-b*), die für Proteine kodieren, welche die funktionell essentiellen Eisenliganden tragen (34).

Detailliertere Informationen zu den enzymatischen Eigenschaften der kodierten Enzyme gibt es bisher jedoch nur zur ALOX1 und zur ALOX2 des Zebrafisches. Es wurde angenommen, dass die ALOX1 das Zebrafisch-Orthologe der humanen und der murinen ALOX15 darstellt, obwohl der Grad der Aminosäureidentität zu beiden Enzymen eher gering ist (44 % zur humanen ALOX15, 43 % zur murinen Alox15) (34). Die *D. rerio*

ALOX1 wurde kloniert und ihre Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure als Substrat getestet. Diese Untersuchungen ergaben ein Arachidonsäure 12-lipoxygenierendes Enzym, dessen Hauptprodukt 12(S)-H(p)ETE ist (20). Damit ähnelt dieses Enzym der Maus Alox15, unterscheidet sich aber grundlegend von der humanen ALOX15. Haas et al. zeigten außerdem, dass ein Knockdown des ALOX1-Gens zu einer gestörten Embryonalentwicklung mit Deformierung von Gehirn, Augen und der Schwanzregion bei Embryonen des Zebrafischs führt (188).

Auch die *D. rerio* ALOX2 wurde bereits kloniert und hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure als 5(S)-lipoxygenierendes Enzym charakterisiert, das auch Leukotriene synthetisieren kann (34).

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Lipoxygenasestoffwechsel von Säugetieren wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. So konnte gezeigt werden, dass ALOX15-Orthologe in vielen Säugetierspezies vorkommen (31). Ähnliche Untersuchungen wurden auch für marine Säugetiere durchgeführt. Auch hier konnten bei allen untersuchten Spezies verschiedene ALOX-Isoformen identifiziert werden (189). Kürzlich wurde das Genom einer ausgestorbenen Seekuhart komplett sequenziert (190) und auch hier wurden mehrere funktionelle ALOX-Gene gefunden. Für Fische lagen bis zu Beginn meiner Arbeiten nur wenige Informationen zum Vorkommen und zur Charakterisierung von ALOX-Isoformen vor. Zwar wurden in der Vergangenheit die verschiedenen ALOX-Isoformen des Zebrafischs (*D. rerio*) charakterisiert, es fehlten jedoch Daten zu protein-chemischen und katalytischen Eigenschaften von ALOX-Isoformen anderer Knochenfische. Diese Lücke sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation teilweise geschlossen werden.

In vorbereitenden Untersuchungen haben wir die bislang publizierten Knochenfischgenome nach potenziellen ALOX-Sequenzen durchsucht, wobei für den Türkisen Prachtgrundkärpfling (*Nothobranchius furzeri*), den Nyereres Viktoriabuntbarsch (*Pundamilia nyererei*) und den Asiatischen Gabelbart (*Scleropages formosus*) komplette ALOX-Gene identifiziert werden konnten. In der inneren Knochenfischsystematik repräsentieren *N. furzeri* und *P. nyererei* die Unterdivision der Barschverwandten, während *S. formosus* der Überkohorte der Knochenzünglerähnlichen angehört (Abb. 8). *N. furzeri* ist ein beliebter Modellorganismus in der Altersforschung. Die Fische zeigen bereits nach 3 Monaten deutliche Alterungssymptome und sterben ca. 4 Monate nach Geburt. Ob der oxidative Lipidstoffwechsel in kausaler Beziehung zur

beschleunigten Alterung steht, wurde bislang nicht untersucht. Aus der geschilderten Datenlage ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende konkrete Fragestellungen.

1. Kommen ALOX-Gene in Knochenfischen weit verbreitet vor und können funktionsäquivalente Enzyme der Säugetier ALOX15-Gene bei diesen Wirbeltieren nachgewiesen werden?
2. Können Knochenfisch ALOX-Isoformen rekombinant exprimiert werden und unterscheiden sich deren katalytische Eigenschaften von denen höherer Wirbeltiere?
3. Folgen die Knochenfisch ALOX-Isoformen den Hypothesen (Triadenkonzept, A-vs.-G-Hypothese), die zur Erklärung der Reaktionsspezifität anderer ALOX-Isoformen entwickelt wurden?
4. Lassen sich aus dem ALOX-Stoffwechsel von *N. furzeri* Schlussfolgerungen zum Mechanismus der beschleunigten Alterung dieser Tiere ableiten?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden ausgewählte ALOX-Isoformen verschiedener Knochenfische als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert und hinsichtlich ihrer proteinchemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Stadt, Land	Methode
Acetonitril	Fisher Scientific GmbH (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	Aktivitätsassay, HPLC-Analytik
Agarose SERVA Tablets, 0,5 g/tablet	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland	Gelelektrophorese
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	SDS-Gelelektrophorese
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinexpression (in <i>E. coli</i> , in Sf9-Zellen)
Antifoam 204	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	Western Blot
Bradford Reagenz	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland	Bestimmung des Proteingehalts vor Western Blot
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Chloroform	Acros Organics (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	Membranoxygenierungsassay
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Aktivitätsassay, HPLC-Analytik
Ethanol (ROTIPURAN ≥ 99,8 %, p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	HPLC-Analytik
Ethylendiamin Tetraessigsäure Dinatriumsalz Lösung 0,1 mol/l in Wasser	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Proteinexpression (in <i>E. coli</i> , in Sf9-Zellen)

FastDigest Green Buffer, 10×	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen
GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in water	Biotium, Inc.; Fremont, USA	DNA-Färbung in Agarose-gelelektrophorese
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	Agarose-gelelektrophorese
Gentamycin	GIBCO Corp. (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	Proteinexpression in Sf9-Zellen
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Hexan	Fisher Scientific GmbH (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	HPLC-Analytik
HPLC-Standards: 14-HDHA 8-HETE 12-HETE 12-HEPE 14,15-DiHETE 5,12-DiHETE 8,15-DiHETE Lipoxin A Lipoxin B	Cayman Chemical; Ann Arbor, USA	HPLC-Analytik
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Membranoxygenierungsassay
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinexpression (in <i>E. coli</i> , in Sf9-Zellen)
Kaliumhydroxid Plätzchen für 40%ige Lösung	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland	Membranoxygenierungsassay
LOX-Substrate: Arachidonsäure	Cayman Chemical; Ann Arbor, USA	Aktivitätsassay

Eicosapentaensäure Docosahexaensäure Linolsäure α -Linolensäure γ -Linolensäure Anandamid 2-Arachidonylglycerol 15(R/S)-HETE 5(R/S)-HETE 18(S)-HEPE 18(R)-HEPE 5(S),15(S)-DiHETE 5(S),6(R)-DiHETE		
Methanol	Fisher Scientific GmbH (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	HPLC-Analytik, Membranoxygenierungsassay
MgSO ₄ × 7H ₂ O	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH; Düren, Deutschland	DNA-Färbung in Agarosegelelektrophorese
Natriumborhydrid	Fluka Chemie GmbH (jetzt Honeywell International Inc.); Morristown, USA	Aktivitätsassay
Ponceau S	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Western Blot
Precision Plus Protein Standards (Dual Color Prestained) Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	SDS-Elektrophorese und Western Blot
Precision Plus Protein Standards (Unstained) Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	SDS-Elektrophorese und Coomassiefärbung
ProSieve EX Running Buffer, 10×	Lonza Group AG; Basel, Schweiz	SDS-Gelelektrophorese
Protino Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland	Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose

ProTrack Loading Buffer, 4×	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland	SDS-Gelelektrophorese
Quick Coomassie Stain	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland	Coomassiefärbung nach Ni-NTA-Agarose
RAPID TRANSFER BUFFER 10×	AMRESCO Inc. (jetzt VWR International, LLC); Solon, USA	Western Blot
Reducing Agent, 20×	Fermentas (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	SDS-Gelelektrophorese
SDS Solution 10 % (w/v)	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	SDS-Gelelektrophorese
SERVALight Polaris Luminol Solution (Reagent A)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland	Western Blot
SERVALight Polaris Peroxide Solution (Reagent B)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland	Western Blot
SERVA VisiBlot Standard I Marker	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland	Western Blot
TAE-Puffer, 50×	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland	Agarose- Gelelektrophorese
TEMED	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland	SDS-Elektrophorese
Tetracyclin Hydrochlorid	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland	Proteinexpression in Sf9- Zellen
Thiamin-HCl	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Tris buffer pH 8,0 (1 M)	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland	Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
TWEEN 20	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA	Western Blot

Ultra Pure 10× Tris (0,25 M)/Glycine (1,92 M)/ SDS (1 %) Puffer	National Diagnostics; Atlanta, USA	SDS-Gelelektrophorese
HPLC grade Water (für HPLC-Laufmittel)	Fisher Scientific GmbH (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA	HPLC-Analytik
30 % Acrylamide/Bis Solution, 29:1, 500 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA	SDS-Gelelektrophorese

2.1.2 Gele, Puffer

Gele, Puffer	Zusammensetzung
DNA-Loading buffer, 6×	10 mM Tris (pH 7,6), 60 mM EDTA, 60 % Glycerin, 0,15 % OrangeG, 0,03 % Xylene Cyanol
PBS, 10×	65 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄ , 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7,4
Puffer zum Waschen des Western Blots	PBS/0,3 % TWEEN 20
Sammelgel (4 %)	5,9 ml Wasser; 2,5 ml 4× Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8); 100 µl 10 % SDS; 1,4 ml 30 % Acrylamide/Bis Solution; 100 µl 10 % Ammoniumpersulfatlösung; 20 µl TEMED
Trenngel (7,5 %)	4,8 ml Wasser; 2,5 ml 4× Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8); 100 µl 10 % SDS; 2,5 ml 30 % Acrylamide/Bis Solution; 100 µl 10 % Ammoniumpersulfatlösung; 20 µl TEMED

2.1.3 Antikörper

Anti-His-HRP	Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Deutschland
--------------	--

2.1.4 Vektoren und Primer

pET-28b(+)	Novagen (jetzt Merck KGaA); Darmstadt, Deutschland
pFastBac HT C	Invitrogen (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Carlsbad, USA
Primer	BioTeZ Berlin-Buch GmbH; Berlin, Deutschland

pUC57	General Biosystems, Inc.; Morrisville, USA
-------	--

2.1.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophoreseeinheit	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
Auto Sampler SIL-20AC	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
BioPhotometer plus	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Brutschrank	BINDER GmbH; Tuttlingen, Deutschland
Chiralpak AD-H, 250 × 4,6 mm, 5 μm Säule	Daicel Chem.; Osaka, Japan
Column Oven CTO-20AC	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
Communications Bus Module CBM-20A	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
Diode Array Detector SPD-M20A	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
EC 4/3 NUCLEODUR 100-5 C18 ec Vorsäule	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
EC 250/4 NUCLEODUR 100-5 C18 ec Säule	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
Einheit für Western Blot	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
Gel Imager (BioDocAnalyse)	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
HERAEUS FRESCO 21 Centrifuge	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
Liquid-Chromatograph LC-20AD	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
Nucleosil Normalphasen-HPLC Vorsäule, KS-System, 35 × 4,4 mm, 5 μm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
Schüttler	A. Gallenkamp and Company Limited (London); London, Großbritannien
SDS-Gelelektrophoreseeinheit	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
Stromversorgungsgerät für Elektrophoresen und Western Blot PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra GmbH; Göttingen, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX SUPER RK512 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG; Berlin, Deutschland
Ultraschallsonde Sonifier W-250D	Branson Ultrasonics (Niederlassung der Emerson)

	Technologies GmbH & Co. OHG); Dietzenbach, Deutschland
UV-Tisch	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Vakuumrotationsverdampfer (Paralaqua)	Van der Heijden Labortechnik GmbH; Dörentrup, Deutschland
Vortex VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik; Staufen im Breisgau, Deutschland
Wasserbad Fisons M	Haake Technik GmbH; Südlohn, Deutschland
Western Blot Imager LAS-1000	Fujifilm; Tokio, Japan

2.1.6 Software

Excel 2016	Microsoft Corporation; Redmond, USA
ImageJ	Open Source
LabSolutions Lcsolution	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
GraphPad Prism 9	GraphPad Software; San Diego, USA

2.1.7 Materialien

Blotting-Papier MN 218 B (150 × 200 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
Nitrocellulose Membrane (0,45 Micron, 30 cm × 3,5 m roll)	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
Säule für Nickelagarose	Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, USA

2.1.8 Bakterienkultur

E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS	Novagen (jetzt Merck KGaA); Darmstadt, Deutschland
E. coli XL-1 Blue	Stratagene California (jetzt Agilent Technologies, Inc.); San Diego, USA
Grundmedium (pro Liter)	2 g Na ₂ SO ₄ , 6,12 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 g NH ₄ Cl, 14,6 g K ₂ HPO ₄ , 3,6 g NaH ₂ PO ₄ , 1 g tri-Ammoniumcitrat, 0,24 g Trypton/Pepton, 0,48 g Hefeextrakt, 40 g Dextrin
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland

LB-Medium (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
SOC-Medium	Trypton (2 %), Hefeextrakt (0,5 %), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM), MgCl ₂ × 6 H ₂ O (10 mM), MgSO ₄ × 7 H ₂ O (10 mM), 0,4 % Glukose
Spurenelemente	50 mg CaCl ₂ × 2 H ₂ O, 9,55 mg ZnCl ₂ , 11,65 mg MnCl ₂ × 4 H ₂ O, 1,65 g FeCl ₃ × 6 H ₂ O, 10 mg CuSO ₄ , 10 mg CoCl ₂ und 10,75 ml Na ₂ -EDTA Lösung (0,5 M)

2.1.9 Zellkultur

Cellfectin® II Reagent	GIBCO Corp. (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Fetal Bovine Serum HI	GIBCO Corp. (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
Insect-X-Press Medium	Lonza Group AG; Basel, Schweiz
Luria Agar	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA
MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells	Invitrogen (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Carlsbad, USA
Sf9 cells in Sf-900™ II SFM	GIBCO Corp. (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
Stable Glutamine 200 mM (100×)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach, Deutschland
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich Corporation (jetzt Merck KGaA); St. Louis, USA
UltraPure™ Bluo-Gal	Invitrogen (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Carlsbad, USA

2.1.10 Enzyme und Kits

FastDigest DpnI	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
FastDigest <i>Hind</i> III	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA
FastDigest <i>Sal</i> I	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA

Glycoamylase (Reagent A)	BioSilta Europe GmbH; Berlin, Deutschland
NucleoBond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Deutschland
Pfu Ultra II HotStart 2× Master Mix	Agilent Technologies, Inc.; Santa Clara, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific Inc.); Waltham, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Identifizierung der Knochenfisch ALOX15-Sequenzen

Zu Beginn meiner Arbeit (Mai 2018) wurde die Proteindatenbank des NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, letzter Zugriff: 13.05.2021, 12:32 Uhr) nach ALOX15-Sequenzen von Knochenfischen durchsucht. Dabei wurden komplette ALOX15-Sequenzen in fünf verschiedenen Knochenfischarten (*Scleropages formosus*, *Nothobranchius furzeri*, *Haplochromis burtoni*, *Pundamilia nyererei*, *Danio rerio*) gefunden, bei denen die funktionell essentiellen proteinogenen Eisenliganden konserviert waren (4). Um diese Ergebnisse zu überprüfen und gegebenenfalls zu aktualisieren, wurde die Suche im April 2019 wiederholt. Anschließend wurden geeignete Sequenzen ausgewählt, um die kodierten Enzyme als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine zu exprimieren und deren katalytische Eigenschaften näher zu charakterisieren.

2.2.1.1 Datenbanksuche

Die Proteindatenbank des NCBI wurde zunächst mit den Worten „bony fishes AND lipoxygenase“ durchsucht, was 2.091 Treffer ergab. Um inkomplette Sequenzen auszuschließen, wurden die Treffer nach Anzahl der Aminosäuren gefiltert, wobei alle Sequenzen eliminiert wurden, die weniger als 400 und mehr als 750 Aminosäuren enthielten. Dadurch reduzierte sich die Anzahl der Treffer auf 1.194. Unter diesen Treffern waren sieben als Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzyme annotierte Sequenzen (XP_015813570.1, XP_005753048.1, XP_018588735.1, NP_955912.1, XP_005945486.1, XP_003966824.1, XP_019726606.1), die für unsere weiteren Untersuchungen von besonderem Interesse waren. Eine davon (NP_955912.1) war die

ALOX1 des Zebrafischs (*D. rerio*), zu der bereits funktionelle Untersuchungen vorlagen (20). Im Rahmen der früheren Experimente wurde das Enzym als rekombinantes Fusionsprotein exprimiert und hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei ergab sich, dass es sich bei dieser ALOX-Isoform um ein Arachidonsäure 12S-lipoxygenierendes Enzym handelt, obwohl es zum Zeitpunkt der Datenbankrecherche noch als AA 15-lipoxygenierendes Enzym klassifiziert war. Dieser Widerspruch deutet darauf hin, dass die Datenbankklassifizierungen, die wesentlich auf dem Vergleich der genomischen Sequenzen basieren, nicht immer mit den funktionellen Eigenschaften der Enzyme im Einklang stehen. Das könnte auch bei den anderen als Arachidonsäure 15-lipoxygenierenden ALOX-Isoformen der Knochenfische der Fall sein. Da die ALOX1 des Zebrafischs (*D. rerio*) bereits früher gut charakterisiert worden war, wurde auf eine weitergehende Untersuchung dieses Enzyms im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet. Im Rahmen der initialen Datenbanksuche mit den Schlagworten „bony fishes AND lipoxygenase“ wurde auch die LOX2 des Zebrafisches gefunden, die in früheren Arbeiten als orthologes Enzym der humanen ALOX5 identifiziert werden konnte (34).

2.2.1.2 Aminosäuresequenzvergleich mit humanen ALOX-Isoformen

Die Aminosäuresequenzen der als ALOX15 annotierten Knochenfischenzyme, welche den Molekulargewichtsfiter überstanden hatten, wurden mit Hilfe des Programms Emboss Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, letzter Zugriff: 26.04.2019, 13:52 Uhr) mit der Aminosäuresequenz der humanen ALOX15 verglichen. Mit diesem Alignment wurde überprüft, ob es größere Lücken in der Sequenz der katalytischen Domäne gab und ob die vier wichtigsten proteinogenen Liganden des katalytischen Nicht-Häm-Eisens als Histidin oder Asparagin konserviert waren (siehe 1.4). Bei zwei der identifizierten Sequenzen (XP_003966824.1, XP_019726606.1) fehlte eine größere Anzahl von Aminosäuren in der katalytischen Domäne, sodass auch diese beiden Enzyme von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Die putativen ALOX15-Sequenzen von *Nothobranchius furzeri* (XP_015813570.1), *Pundamilia nyererei* (XP_005753048.1), *Scleropages formosus* (XP_018588735.1) und *Haplochromis burtoni* (XP_005945486.1) wiesen keine relevanten Lücken in der katalytischen Domäne auf und die Eisenliganden waren als Histidin oder Asparagin konserviert. Damit kamen diese Sequenzen für eine Proteinexpression in Frage. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die ALOX15-Sequenz von *S. formosus* (XP_018588735.1)

im Mai 2019 in der Datenbank des NCBI aktualisiert wurde. Die neue Sequenz (XP_018588735.2) ist jetzt als AA 5-lipoxygenierendes Enzym annotiert. Der Eintrag zur ALOX15-Sequenz von *Haplochromis burtoni* (XP_005945486.1) wurde nachträglich aus der Datenbank gelöscht. Gleiches gilt für die Sequenz von *Takifugu rubripes* (XP_003966824.1), welche jedoch aufgrund der in der katalytischen Domäne fehlenden Aminosäuren von vornherein nicht für eine Proteinexpression infrage kam.

2.2.1.3 Einordnung in die phylogenetische Systematik der Knochenfische

Um die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von Vertretern möglichst unterschiedlicher Gruppen innerhalb der Knochenfischsystematik zu exprimieren, erfolgte zuletzt eine Einordnung der genannten Fischarten in die phylogenetische Systematik der Knochenfische (siehe 1.8). *P. nyererei* und *H. burtoni* gehören der Unterdivision der Barschverwandten an und sind Vertreter derselben Ordnung (Buntbarschartige). Da die Sequenzen mit einer 93%igen Aminosäureidentität sehr ähnlich waren, wurde nur die vermeintliche ALOX15-Isoform von *P. nyererei* zur Proteinexpression ausgewählt. *Nothobranchius furzeri* gehört ebenfalls den Barschverwandten an, vertritt jedoch eine andere Überordnung (Ährenfischverwandte), sodass die vermeintliche ALOX15-Sequenz ebenfalls exprimiert wurde.

Auch die potenzielle ALOX15-Sequenz von *S. formosus* wurde für die Expression ausgewählt, da dieser Knochenfisch nicht zu den Barschverwandten, sondern zur Überkohorte der Knochenzünglerähnlichen gehört. Damit bestätigten sich die Suchergebnisse von Mai 2018 und es wurden bis April 2019 keine neuen Sequenzen in der Proteindatenbank hinzugefügt.

N. furzeri kommt auch insofern eine besondere Bedeutung zu, als dass dieser Knochenfisch als Modellorganismus für den Alterungsprozess von Wirbeltieren diskutiert wird. So ist *N. furzeri* die Wirbeltierspezies mit der kürzesten Lebensspanne, die in Gefangenschaft gehalten werden kann (191) und der Alterungsprozess dieses Fisches weist viele Charakteristika des Alterungsprozesses von Säugetieren auf (192). Lipoxygenasen als Lipid-peroxidierende Enzyme könnten entsprechend der oxidativen Hypothese des Alterns (193) möglicherweise bedeutsam für den Alterungsprozess sein und deshalb kam der Charakterisierung dieses Enzyms zusätzliche Bedeutung zu. Sollten sich bei der Charakterisierung der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri* deutliche funktionelle Unterschiede zu den putativen ALOX15-Orthologen der normal alternden Knochenfische ergeben, könnte das als Hinweis darauf gewertet werden, dass das

N. furzeri Enzym in einem inhaltlichen Zusammenhang mit dem beschleunigten Alterungsprozess dieses Knochenfisches steht.

2.2.2 Bakterielle Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen verschiedener Knochenfischspezies

2.2.2.1 *Synthese der cDNA und Umklonierung in den Expressionsvektor pET-28b*

Die entsprechenden cDNAs der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen wurden der Datenbank NCBI entnommen und die kodierende Sequenz wurde chemisch synthetisiert (BioCat, Heidelberg, Deutschland). Die Synthese erfolgte im bakteriellen Klonierungsvektor pUC57, der ein Ampicillin-Resistenzgen enthält. Dadurch können *E. coli* Zellen, die mit diesem Plasmid transformiert worden sind, auf Ampicillin-haltigen Nährböden wachsen. Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurden die rekombinanten Klonierungsplasmide in *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert, welche auf einer LB-Agar-Platte (enthielt 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden aus den gewachsenen Bakterienkolonien zufällig vier isoliert gewachsene Bakterienkolonien ausgewählt und in 200 ml LB-Medium überführt [enthielt 200 µl Ampicillin (100 mg/ml)]. Der Ansatz wurde erneut über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen bei 4 °C und 4.000 rpm (3.000 x g) für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Zellpellet mit dem Kit für MIDI-Präparation (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert.

Um die ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Fische als rekombinante Proteine zu exprimieren, erfolgte eine Umklonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz in den bakteriellen Expressionsvektor pET-28b. Dieser Vektor enthält ein Kanamycin-Resistenzgen und eine Nukleotidsequenz, die für ein N-terminales His-tag-Peptid (sechs aufeinander folgende Histidine in der Aminosäuresequenz) kodiert. Wird die kodierende Sequenz einer Ziel-DNA in die Multikloningsequenz dieses Plasmids einkloniert, entsteht die kodierende Sequenz eines Fusionsproteins, das N-terminal der kodierenden Sequenz des Zielproteins das His-tag-Peptid und weitere Aminosäuren enthält. Das His-tag-Peptid wird später sowohl für die Proteinanreicherung mittels Ni-NTA-Agarose (siehe 2.2.4) als auch zum Nachweis des Fusionsproteins mittels Anti-His-tag-Antikörper im Western Blot (siehe 2.2.5) benötigt.

Bei der chemischen Synthese der cDNAs der vermeintlichen ALOX15-Orthologen wurden bereits Spaltstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III eingefügt,

die für die Einklonierung der kodierenden ALOX-Sequenz in das Expressionsplasmid benötigt wurden. Interne Sal I und Hind III Spaltstellen wurden, wenn nötig, durch stumme Mutationen entfernt ohne dabei die Aminosäuresequenzen der ALOX-Isoformen zu verändern. Die Spaltstellen für Sal I und Hind III sind auch in der Multikloningsequenz des Expressionsvektors vorhanden, sodass eine bequeme Einklonierung des Fusionskonstruktes möglich war.

Mittels präparativer Plasmidspaltung mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III wurden die rekombinanten Klonierungsvektoren pUC57, welche die kodierenden Sequenzen der vermutlichen Fisch ALOX15-Orthologen enthalten, gespalten. Dabei wurden die kodierenden Sequenzen der vermeintlichen ALOX15-Orthologen als lineares DNA-Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 2000 Basenpaaren freigesetzt. Diese Spaltprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Der bakterielle Expressionsvektor pET-28b (Leervektor) wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III gespalten und das dabei entstandene linearisierte Plasmid sowie das 2000 bp ALOX-Insert mittels Gel Extraction Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Anschließend wurden das linearisierte Expressionsplasmid und das 2000 bp ALOX-Insert mit Hilfe der T4 Ligase zusammengefügt und das rekombinante Expressionsplasmid in *E. coli* XL1-Blue Zellen hineintransformiert. Die transformierten Bakterienzellen wurden anschließend vermehrt, die Plasmid-DNA mittels NucleoSpin Plasmid Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) präpariert und eine Kontrollspaltung mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III wurde durchgeführt. Dadurch sollte die cDNA des His-tag-ALOX Fusionsproteins aus dem rekombinanten Expressionsplasmid herausgespalten werden, sodass bei erfolgreicher Einklonierung zwei Banden mit definiertem Molekulargewicht (2 kbp für das His-tag-ALOX Insert, 5,3 kbp für das linearisierte Expressionsplasmid) in der nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese sichtbar sein sollten. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung (Fa. Eurofins, Ebersberg, Deutschland) weniger ausgewählter rekombinanter Expressionsplasmide.

2.2.2.2 *Proteinexpression*

Die bakterielle Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der verschiedenen Fischarten erfolgte mit Hilfe von *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS Zellen. Diese Zellen enthalten ein Plasmid mit einem Chloramphenicol-Resistenzgen. Für die Transformation wurden 200–300 ng Plasmid-DNA zu 100 µl der kompetenten

Bakterienzellen gegeben und der Ansatz für 30 min im Eisbad inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 45 s bei 42 °C sowie für 2 min im Eisbad. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert und anschließend für 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. 400 µl des Überstands wurden abgenommen und das gebildete Zellpellet in den restlichen 100 µl des Überstands resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer LB-Agar-Platte [enthält Chloramphenicol (35 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml)] ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für die Vorkulturen wurden aus den gewachsenen Bakterienkolonien zufällig drei isolierte Kolonien ausgewählt. Mit sterilisierten Holzstäbchen wurden die Bakterien dieser Kolonien in jeweils 1 ml LB-Medium überführt, das vorher mit jeweils 1 µl der Selektionsantibiotika Kanamycin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (35 µg/ml) versetzt worden war. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm Schüttelfrequenz für 6 h. Danach wurden die Vorkulturen vereinigt und die Wachstumsdichte (OD600) photometrisch untersucht.

Lag die Zelldichte (optische Dichte bei 600 nm) nach einer 1:50-Verdünnung zwischen 0,1–0,15, konnte mit der Hauptkultur begonnen werden. Hierfür wurde ein Nährmedium (Grundmedium) angesetzt. Es wurden die dafür benötigten Chemikalien (siehe 2.1.8) in ca. 800 ml MilliQ Wasser gelöst und 40 g Dextrin zugegeben. Anschließend wurde das Nährmedium 15 min mit einem Magnetrührer gerührt, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Zu 50 ml des Nährmediums wurden 1 µl Spurenelemente (siehe 2.1.8), 36,95 mg MgSO₄, 5 mg Thiamin-HCL, je 50 µl der Selektionsantibiotika Kanamycin (Stammlösung von 50 mg/ml) und Chloramphenicol (Stammlösung von 35 mg/ml) und 100 µl Antifoamreagenz (1:20 Verdünnung) in einen Plastikkolben gegeben. Anschließend wurde dem kulturansatz 50 µl Reagenz A hinzugefügt. Das Reagenz A ist eine wässrige Lösung von Glycoamylase, die aus Dextrin Glukose abspaltet, die von den Bakterien als energielieferndes Substrat metabolisiert wird. Der Kolben wurde mit einem AirTop Seal verschlossen und im Schüttler bei 30 °C und 250 rpm Schüttelfrequenz über Nacht inkubiert.

Danach erfolgte eine erneute Kontrolle der Wachstumsdichte. Lag diese im Originalansatz bei über 5, wurden zur Induktion der Proteinexpression 50 µl 1M IPTG, 180 mg Booster-Mischung (60 mg Trypton/120 mg Hefeextrakt) und 75 µl Reagenz A zur Hauptkultur gegeben und diese bei 22 °C und 230 rpm Schüttelfrequenz für 24 h im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die OD600 erneut kontrolliert, die sich verdoppelt

haben sollte. Die Kultur wurde für 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 3 ml PBS mit 2 mM EDTA resuspendiert und die Bakterienzellen mit einem Sonden-Ultraschallgerät (Branson, Digital Sonifier, Danbury, USA, 4× 50%ige Amplitude über 10 sec) lysiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der dadurch entstehende Lysatüberstand konnte anschließend als Rohpräparat für Aktivitätsmessungen eingesetzt werden oder diente als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der rekombinanten ALOX-Isoformen.

2.2.3 Eukaryotische Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen verschiedener Knochenfischspezies

2.2.3.1 *Umklonierung der cDNA in den Vektor pFastBacTMHT C*

Für die eukaryotische Expression der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen musste zunächst die jeweilige cDNA in den eukaryotischen Expressionsvektor pFastBacTMHT C einkloniert werden. Dieser Vektor enthält ein Ampicillin- und ein Gentamycinresistenzgen und ebenfalls eine His-tag-Sequenz sowie Spaltstellen für die Restriktionsendonukleasen Sal I und Hind III in seiner Multicloning-site. Für die eukaryotische Expression der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen wurde die cDNA der Enzyme aus dem bakteriellen Expressionsvektor pET-28b herausgespalten und das 2 kbp Spaltfragment wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese präpariert. Gleichzeitig wurde der pFastBacTMHT C Leervektor mit diesen beiden Restriktionsendonukleasen gespalten. Danach wurden der linearisierte Vektor und das aufgereinigte Insert durch eine T4 Ligase zusammengefügt. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* XL1-Blue Zellen, der Kultivierung dieser Bakterienzellen und der Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte eine Probespaltung mit Sal I und Hind III, wobei sich ein 2 kbp großes Spaltfragment zeigen musste. Zusätzlich wurde ein ALOX-positiver Bakterienklon sequenziert.

2.2.3.2 *Herstellung des rekombinanten Bacmids*

Für die eukaryotische Expression in Sf9-Insektenzellen wurde ein rekombinantes Bacmid benötigt, das mit Hilfe des *E. coli* Stamms DH10BacTM (Kanamycin- und Tetracyclinresistenz) hergestellt werden konnte (siehe Abb. 9). Dieser Bakterienstamm enthält einen Baculovirus-Shuttle-Vektor (Bacmid), der mit dem ALOX-cDNA-Insert enthaltenden Vektor HT C rekombiniert werden kann. Durch Transfektion des

entstandenen rekombinanten Expressionsbacmids in Sf9-Zellen sollten diese die Knochenfisch ALOX-Isoformen exprimieren.

Zur Herstellung des rekombinanten Bacmids wurden zunächst 5–10 ng DNA (im Vektor HT C) zu 50 µl der *E. coli* DH10Bac™ Zellen gegeben und der Ansatz über 30 min im Eisbad inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation für 45 s in einem 42 °C warmen Wasserbad sowie eine erneute Inkubation im Eisbad für 2 min. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation im Schüttler für 4 h bei 37 °C und 180 rpm Schüttelfrequenz. Es wurden 1:10, 1:100 und 1:1.000 Verdünnungen der Bakteriensuspensionen in SOC-Medium hergestellt und jeweils 100 µl auf Luria- oder LB-Agar-Platten [enthielten Kanamycin (50 µg/ml), Tetracyclin (10 µg/ml), Gentamycin (7 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) und Bluo Gal (200 µg/ml)] ausplattiert. Die Platten wurden über 48 h bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien waren entweder blau oder weiß gefärbt, wobei nur die weißen Kolonien das Bacmid aufgenommen hatten. Es wurden fünf weiße (positive) Kolonien ausgewählt und zusammen mit einer blauen Negativkontrolle auf eine neue Agarplatte transferiert. Diese wurde für 18 h bei 37 °C inkubiert. Als Vorkultur wurde eine weiße Kolonie in 2 ml LB-Medium (mit jeweils 2 µl Kanamycin, Tetracyclin, Gentamycin) überführt und für 5 bis 6 h bei 37 °C und 180 rpm Schüttelfrequenz im Schüttler inkubiert. Die Vorkultur wurde in einer 500 ml Hauptkultur 1:400 verdünnt und diese über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Die OD600 wurde anschließend überprüft, sie sollte ≥ 2 sein.

Die Hauptkultur wurde für 20 min bei 4 °C und 4.000 rpm abzentrifugiert und das Bacmid mit dem Kit für MIDI-Präparation aufgereinigt. Mit einer Kontrollelektrophorese (über 12 h bei 23 V) wurde die Qualität des rekombinanten Bacmids überprüft. Hier sollten vier Banden sichtbar sein: eine höhermolekulare DNA-Bande, die Bacmid-DNA sowie zwei niedermolekulare Banden, die Helfer-DNA darstellen.

2.2.3.3 *Transfektion des rekombinanten Bacmids in Sf9-Zellen*

Zur Transfektion des rekombinanten Bacmids wurden drei Wells einer 6-Well Platte mit jeweils 9×10^5 Sf9-Zellen (in 2 ml Kulturmedium) ausgesät und 1 h bei 27 °C inkubiert. Dann wurden jeweils 7,5 µg des Bacmids und 21 µl Cellfectin® II Reagent zu 300 µl Insect-X-Press Medium gegeben. Der Ansatz mit dem Cellfectin® II Reagent wurde stark geschüttelt und anschließend zu dem Ansatz mit dem Bacmid gegeben. Der gesamte Transfektionsansatz wurde nun über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2,4 ml Insect-X-Press Medium zum Transfektionsansatz wurden die

Sf9-Zellen zweimal mit diesem Medium (jeweils 1 ml) gewaschen. Danach wurde je 1 ml des Ansatzes auf jedes der drei Wells gegeben und diese über 5 h bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, je 2,2 ml Insect-X-Press Medium (enthält fötales Kälberserum HI) auf die Wells gegeben und diese erneut über 96 h bei 27 °C inkubiert. Nun konnte der Überstand geerntet werden, der dem P1 Virus-Stock entspricht.

Anschließend wurde für die erste Virusamplifikation eine 50 ml Sf9-Zellkultur (2×10^6 Zellen/ml) mit 1,5–2 ml P1 Virus-Stock infiziert und so lange bei 27 °C inkubiert, bis 70–80 % der Zellen abgestorben waren (Trypanblauausschlusstest). Der Überstand dieser ersten Virusamplifikation wurde geerntet und als P2 Virus-Stock bezeichnet. Für die zweite Amplifikation wurde eine 200 ml Sf9-Zellkultur (2×10^6 Zellen/ml) mit 13 ml des P2 Virus-Stocks infiziert und wiederum so lange bei 27 °C inkubiert, bis 70–80 % der Zellen abgestorben waren (Trypanblauausschlusstest). Der Überstand dieser zweiten Virusamplifikation wurde geerntet und als P3 Virus-Stock bezeichnet. Die MOI (Anzahl Viruspartikel pro Zelle) betrug 0,5–1.

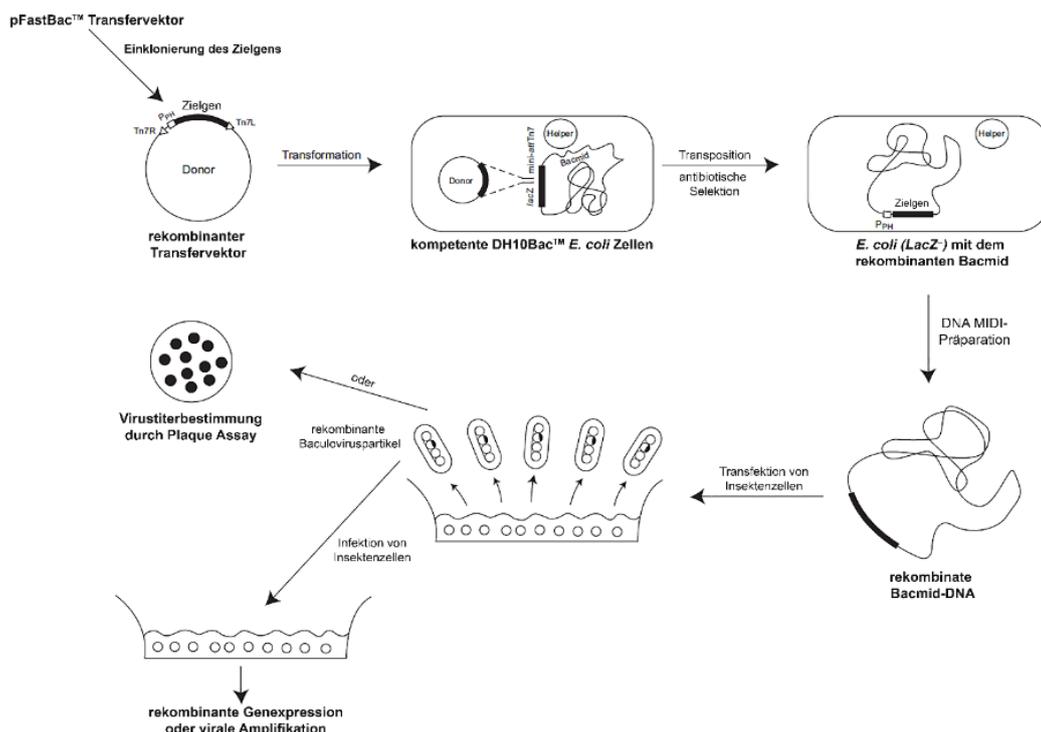


Abb. 9: Schematische Darstellung der Expression von Zielgenen in Sf9-Insektzellen (modifiziert nach https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf, letzter Zugriff am 11.11.2022, 11:53 Uhr). Das gewünschte Gen wird zunächst in den pFastBac™ Transfervektor einkloniert und dieser dann in kompetente *E. coli* Zellen transformiert, die das Bacmid enthalten. Nach Transposition produzieren die transformierten Zellen die rekombinante Bacmid-DNA, welche nach Präparation in Sf9-Insektzellen transfiziert wird. Anschließend kann das gewünschte Gen rekombinant exprimiert werden oder virale Amplifikationen zur Erhöhung des Virustiters durchgeführt werden.

Um die Knochenfisch ALOX-Isoformen als rekombinante Proteine zu exprimieren, wurde eine 50 ml Sf9-Zellkultur (2×10^6 Zellen/ml) mit 5 ml des P3 Virus-Stocks infiziert und so lange bei 27 °C inkubiert, bis 30–50 % der Zellen abgestorben waren (Trypanblauausschlusstest).

Die Expressionskultur wurde für 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 2 ml PBS mit 2 mM EDTA resuspendiert und die Sf9-Zellen mit einem Sonden-Ultraschallgerät lysiert (Branson, Digital Sonifier, Danbury, USA, 2–4× 10%ige Amplitude über 10 sec). Das Lysat wurde für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen, der die ALOX-Isoformen der jeweiligen Fischart enthielt. Die Expression von Zielgenen im Sf9-Insektenzellsystem ist in Abbildung 9 zusammenfassend dargestellt.

2.2.4 Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose

Voraussetzung für diese Art der Anreicherung der rekombinanten ALOX-Isoformen ist das Vorhandensein des Histidin-tags (siehe 2.2.2.1). Die Hexahistidinsequenz bindet mit hoher Affinität an zweiwertige Nickel-Ionen und bildet mit diesen einen Chelatkomplex. Die Nickel-Ionen sind über den Nitrilotriessigsäure (NTA)-Liganden an die Agarose-Partikel gebunden, welche die Affinitätsmatrix darstellen. Durch Waschen der Affinitätsmatrix mit Puffern, die eine Imidazolkonzentration < 25 mM haben, können Moleküle mit unspezifischer Bindung von der Nickelmatrix entfernt werden. Die Elution der rekombinanten His-tag Fusionsproteine erfolgt mit einem Puffer, der 200 mM Imidazol enthält. Dabei verdrängt das Imidazol die Hexa-His-tag Fusionsproteine von der Nickelmatrix, sodass sie von der Säule eluiert werden können.

Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographie wurden 400 µl Ni-NTA-Agarosegel in ein 5 ml Eppendorfgefäß überführt, abzentrifugiert und zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Danach wurde 1 ml Lysatüberstand zur Ni-NTA-Agarose gegeben und diese für 60 min im Über-Kopf-Schüttler unter Kühlung inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Leersäule (Fa. Bio-Rad, Hercules, USA) überführt, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Dann wurde einmal mit 500 µl 10 mM Imidazol-haltigem und zweimal mit 500 µl 25 mM Imidazol-haltigem Waschpuffer (0,1 M Tris, 300 mM NaCl, pH = 8) gewaschen. Die Elution der rekombinanten ALOX-Isoformen erfolgte fraktionsweise mit 5×200 µl 200 mM Imidazol-haltigem Elutionspuffer (0,1 M Tris, 300 mM NaCl, pH = 8) in 1,5 ml Eppendorfgefäße, die im Eisbad standen.

Um das Elutionsverhalten der rekombinanten ALOX-Isoformen zu verfolgen, wurde eine SDS-PAGE mit Aliquots der Elutionsfraktionen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 µl (in 9 µl MilliQ-Wasser) des Durchflusses und des Inputs (nicht gereinigter Lysatüberstand als Vergleich) sowie jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen 1–5 aufgetragen. Um zu prüfen, ob es sich bei den im Coomassiegel sichtbaren Proteinbanden tatsächlich um die rekombinanten ALOX-Isoformen handelt, wurde ein Western Blot durchgeführt, bei dem ein Antikörper gegen das Hexa-His-tag (1:5.000 verdünnt) zur Färbung des Western Blots verwendet wurde.

2.2.5 SDS-Elektrophorese und Western Blot

Da die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen als Fusionsproteine mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert wurden (siehe 2.2.2.1), können sie in einem Western Blot mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers spezifisch angefärbt werden. Dieser Antikörper bindet an die Hexahistidin-Sequenz der Fusionsproteine. Da die rekombinanten Lipoxygenasen im bakteriellen bzw. eukaryotischen Lysatüberstand jedoch als Gemisch mit anderen Proteinen vorliegen, muss vorher eine Proteinauftrennung nach Molekulargewichten mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgen.

Dazu wurde zunächst ein Aliquot der Lysatüberstände, das einem Gesamtprotein von ca. 100 µg entspricht, mit einem Gemisch aus 4-fach konzentriertem ProTrack Loading Buffer (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) und einem 20-fach konzentrierten Reduktionsreagenz (Fa. Fermentas, Waltham, USA) für 3 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes wurde dieser zentrifugiert und der Überstand wurde auf ein 4%iges Sammelgel aufgetragen. Danach wurde über 23 min eine Spannung von 200 V angelegt (ProSieve EX Running Buffer, 10×, Fa. Lonza Group, Basel, Schweiz) und die Proteine in einem 7,5%igen Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Kleine Proteine wandern dabei im elektrischen Feld schneller als Proteine mit hohem Molekulargewicht, sodass aus der Wanderungsstrecke in der vorgegebenen Trennzeit auf das Molekulargewicht geschlossen werden kann. Zur Eichung des Systems wurden Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht mitgeführt. Das fertig entwickelte Gel wurde anschließend für den Western Blot genutzt. Hierfür wurde eine Nitrozellulosemembran auf das fertig entwickelte Elektropherogramm gelegt und die entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zum Gel auf die Nitrozellulosemembran

übertragen (22 min bei einer Stromstärke von 400 mA, RAPID TRANSFER BUFFER 10×, Fa. AMRESCO Inc., Solon, USA). Dadurch entsteht ein 1:1 Abklatsch des Elektropherogramms auf der Nitrozellulosemembran.

Die Membran wurde dann mit Ponceau S (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) reversibel angefärbt um nachzuweisen, dass die aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran übertragen worden waren. Wenn zusätzlich zu den rekombinanten Lipoxygenasen auch ein Standardprotein aufgetragen wurde, war dieses in der Ponceaufärbung bereits sichtbar. Nachdem die Nitrozellulosemembran über 30 min mit einer Blotting-Grade Blocker-Lösung (Fa. Bio-Rad, Hercules, USA) in 1× PBS geblockt wurde (alle Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden mit einem Blockerprotein besetzt), konnte der Anti-His-tag-Antikörper in einer 1:5.000-Verdünnung mit frischer Blockerlösung auf die Membran gegeben werden. Diese wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten einige Waschvorgänge mit einem Gemisch aus 1× PBS/0,3 % TWEEN 20 sowie VE-Wasser. Anschließend wurde die Blotmembran über 5 min mit einer Luminol- und Peroxidlösung inkubiert. Der Anti-His-tag-Antikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert, die die Oxidation des Luminols durch das zugesetzte Peroxid katalysiert. Das entstehende 3-Aminophthalat-Dianion geht spontan in einen energieärmeren Zustand über und emittiert dabei Licht bei 425 nm, welches mit einem Photoimager detektiert werden kann. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zur Menge des aufgetragenen Proteins, sodass mit Hilfe des Standardproteins mit definierter Proteinmenge die Menge an aufgetragener rekombinanter Lipoxygenase errechnet werden kann.

2.2.6 Arachidonsäureoxygenase-Aktivitätsassay

Für den Aktivitätsassay wurden in Abhängigkeit von der ALOX-Konzentration im Lysat verschiedene Mengen an Lysatüberstand verwendet (1–50 µl). Als Substrat diente eine Arachidonsäurelösung mit einer Ausgangskonzentration von 165 mM, die mit PBS 1:1000 verdünnt wurde, sodass eine Substratkonzentration von 165 µM im Aktivitätsansatz erreicht wurde. Nach Zugabe des Lysatüberstandes zum Aktivitätsmessansatz (500 µl PBS mit 165 µM AA als Substrat) wurde der Ansatz für 3–10 min bei 25 °C im Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von kristallinem Natriumborhydrid (ca. 1 mg) gestoppt, wobei die entstandenen Hydroperoxyfettsäuren zu den stabilen Hydroxyverbindungen reduziert wurden. Danach wurden 45 µl Essigsäure und 455 µl Acetonitril zum Ansatz gegeben und dieser für

10 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die im Lysatüberstand enthaltenen Proteine ausgefällt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 8 °C und 12.000 rpm zentrifugiert und der proteinfreie Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Aliquots dieses Überstandes konnten direkt in die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) eingespritzt werden.

Um nachzuweisen, dass die in der RP-HPLC sichtbaren konjugierten Diene tatsächlich Produkte einer enzymatischen Reaktion waren und nicht durch nicht-enzymatische Prozesse gebildet wurden, haben wir Hitzekontrollanalysen durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100 µl Lysatüberstand über 2 min bei 95 °C inkubiert und davon eine definierte Menge für den Aktivitätsassay entnommen. Dabei wurde genauso verfahren, wie mit dem Ansatz ohne vorherige Hitzeinaktivierung.

2.2.7 Produktanalyse mittels HPLC

Um die im Überstand des Reaktionsansatzes enthaltenen ALOX-Produkte zu analysieren, wurden unterschiedliche Arten von HPLC (high performance liquid chromatography) Analysen durchgeführt.

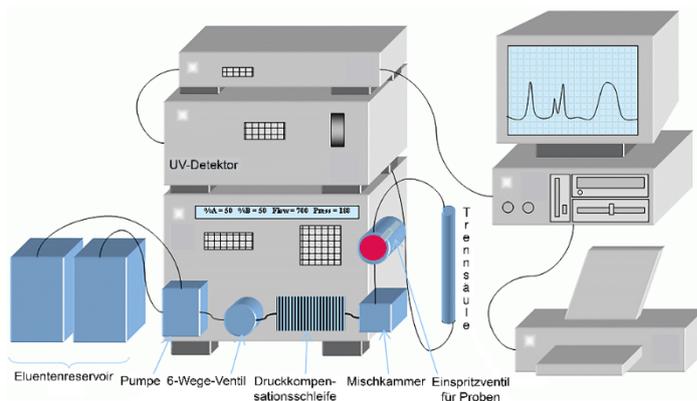


Abb. 10: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage [modifiziert nach Schumacher, 2003 (194), CC-Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/legalcode>]. Die zu analysierende Probe wird in das Einspritzventil (rot eingefärbt) injiziert und kontinuierlich mit einem Druck von 50–400 bar durch die Trennsäule gepumpt. Hier kommt es zu einer zeitlichen Auftrennung der in der Probe enthaltenen Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der in der Trennsäule enthaltenen stationären Phase. Nach der Passage der

Trennsäule wird die Intensität der Lichtabsorption der nun aufgetrennten Substanzen durch einen UV-Detektor gemessen und diese Daten an einen Computer übermittelt. Die Probe gelangt am Ende in das Eluentenreservoir.

Das Grundprinzip der HPLC (Abb. 10) besteht in der Wechselwirkung der zu untersuchenden Substanzen, die in einem Laufmittel (mobile Phase, Elutionsmittel) gelöst sind, mit der stationären Phase, die sich in einer Trennsäule befindet. Das Elutionsmittel wird mit Hilfe einer Pumpe durch die Säule befördert. Wechselwirkt eine Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt sie relativ lange auf der Säule. Bei schwacher Wechselwirkung verlässt der Analyt die HPLC-Säule schneller. Dadurch ergeben sich die unterschiedlichen Retentionszeiten der in einer Probe vorhandenen Substanzen. Am Ende der Trennsäule wird das Säuleneluat in einen UV-VIS-Detektor

geleitet, in dem die Intensität der Lichtabsorption bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden kann.

Da es sich bei den primären Lipoxygenaseprodukten (HETE- bzw. HODE-Isomere) um konjugierte Diene (Substanzen mit zwei konjugierten Doppelbindungen) handelt, die alle ein Absorptionsmaximum bei 235 nm besitzen, wurden die Chromatogramme bei dieser Wellenlänge verfolgt. Gelangen konjugierte Diene von der Säule in die Durchflusszelle des Photometers, steigt die Lichtabsorption an. Die Fläche unter den dadurch entstehenden chromatographischen Peaks ist proportional der Menge der gebildeten Lipoxygenaseprodukte, sodass durch eine Eichung der chromatographischen Skala (Einspritzen einer bekannten Menge von konjugierten Dienen) die Produktmenge in einer unbekanntem Analyseprobe quantifiziert werden kann. Durch den Vergleich der Retentionszeiten von bekannten Standardsubstanzen mit der Retentionszeit der eluierten Substanz sowie aus ihren UV-Spektren können Rückschlüsse auf die chemische Struktur dieser Substanz gezogen werden.

Zuerst erfolgte die Analyse der Reaktionsprodukte in der RP-HPLC (Umkehrphasen-HPLC). Bei dieser Chromatographie wird eine hydrophobe Matrix (Kieselgel mit angehängten hydrophoben C₁₈-Ketten) als stationäre Phase verwendet. Deshalb werden bei dieser Chromatographie hydrophobe Analyte stärker retiniert als hydrophile Substanzen. Für die Analyse wurden jeweils 300 µl der Proben injiziert und eine Flussrate der mobilen Phase von 1 ml/min eingestellt. Das Laufmittel bestand aus Acetonitril, Wasser und Essigsäure im Verhältnis (70/30/0,1, by vol.). Es wurde eine Vorsäule (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet, um Verunreinigungen von der Hauptsäule fernzuhalten. Auch die Trennsäule (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) enthält als stationäre Phase chemisch modifiziertes Kieselgel, dessen polare OH-Gruppen mit langkettigen Kohlenwasserstoffen (C₁₈) modifiziert worden waren.

Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 235 nm, da dies dem Absorptionsmaximum der konjugierten Diene der Hydroperoxyfettsäuren entspricht. Die eluierten Substanzen wurden nach dem Durchlaufen des Detektors aufgefangen und in einem zweiten Schritt in der kombinierten Normalphasen-/Chiralphasen-HPLC analysiert. Dieser Schritt ist notwendig, da mit Hilfe der RP-HPLC unter unseren Trennbedingungen nicht alle Positionsisomere der Hydroxyfettsäuren voneinander getrennt werden können. Bei der kombinierten Normalphasen-/Chiralphasen-HPLC wurde eine Trennsäule, die eine chirale stationäre

Phase enthielt (Chiralpak AD-H-Säule, 250 × 4,6 mm, 5 µm; Daicel Chem., Osaka, Japan), mit einer Vorsäule kombiniert, die mit reinem Kieselgel gefüllt war (Nucleosil Normalphasen-HPLC Vorsäule, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland; KS-System, 35 × 4,4 mm, 5 µm). Es wurde ein Laufmittel mit der Zusammensetzung Hexan/Methanol/Ethanol/Essigsäure im Verhältnis (96/3/1/0,1, by vol) bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte ebenfalls bei 235 nm. Da unter diesen chromatographischen Bedingungen die Enantiomere aller relevanten Hydroxyfettsäuren voneinander getrennt werden konnten, war es möglich, das S/R-Verhältnis der Analyten direkt aus den Flächen der Chromatogramme zu berechnen.

2.2.8 Produktanalyse mittels Massenspektrometrie

Um die chemische Struktur der Oxygenierungsprodukte der Knochenfisch ALOX-Isoformen zu identifizieren, erfolgte eine Analyse mittels Massenspektrometrie. Ein Massenspektrometer besteht prinzipiell aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. In der Ionenquelle wird die zu untersuchende Substanz ionisiert und die entstandenen Ionen anschließend dem Analysator zugeführt, in dem eine Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) erfolgt. Der Detektor registriert die entstandenen Ionen. Für die hier durchgeführten Analysen wurden Massenspektrometer verwendet, die entweder mit Gaschromatographie (GS-MS) oder Flüssigkeitschromatographie (LC-MS) gekoppelt waren. Diese beiden Chromatographieverfahren unterscheiden sich darin, dass bei der Gaschromatographie ein Inertgas wie Stickstoff oder Helium als mobile Phase verwendet wird und dass dieses Verfahren nur für verdampfbare Substanzen anwendbar ist. Bei der Flüssigkeitschromatographie hingegen dient als mobile Phase üblicherweise ein Lösungsmittelgradient.

Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die dominanten Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mittels RP-HPLC präpariert (siehe 2.2.7). Für die LC-MS wurde ein Agilent 1290 HPLC-System mit einer Doppelpumpe, einem Autosampler und einem Säulenthermostat mit einer Agilent Zorbax Eclipse plus C18, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm stationäre Phase Säule (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Die mobile Phase bestand aus einem Gradienten eines anorganischen (Wasser mit 0,1 % Methansäure) und eines organischen Anteils (Acetonitril mit 0,1 % Methansäure), wobei eine Flussrate von 0,4 ml/min verwendet wurde. Das HPLC-System war mit einem Agilent 6495 Triplequad Massenspektrometer

gekoppelt (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), das eine Elektrospray-Ionisationsquelle enthielt. Für die GC-MS wurde ein Agilent 6890 Gaschromatograph verwendet, der mit einem Agilent 5973 N Massenselektionsdetektor gekoppelt war. Der Gaschromatograph war mit einer HP-5 ms Säule (25 m × 0,25 mm, Schichtdicke von 0,25 µm) mit einer deaktivierten Vorsäule (5 m × 0,32 mm) aus Kieselglas ausgestattet. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,1 ml/min verwendet.

2.2.9 Einfluss verschiedener Parameter auf die katalytische Aktivität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen

Es gibt verschiedene Parameter, die die katalytische Aktivität von Enzymen beeinflussen. In dieser Arbeit wurden zur enzymatischen Charakterisierung der rekombinanten ALOX-Isoformen der pH-Wert der Reaktionslösung, deren Sauerstoffgehalt, die Inkubationstemperatur und die Fettsäurekonzentration variiert. Der Einfluss dieser Variation auf die Menge an gebildetem Produkt und somit auf die katalytische Aktivität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen wurde anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Für die Quantifizierung der Produktmenge anhand der Fläche im Chromatogramm ist immer das Ansetzen einer Nicht-Enzymkontrolle notwendig, die nur die jeweilige Substratlösung enthält und unter gleichen Bedingungen inkubiert wird. Die Notwendigkeit solcher Nicht-Enzymkontrollen ergibt sich vor allem aus der Tatsache, dass in der als Substrat verwendeten Arachidonsäurelösung bereits kleine Mengen an Oxidationsprodukten vorhanden sind. Die Fläche der in der Nicht-Enzymkontrolle vorhandenen Produkte wurde immer von der Fläche der durch die Enzyme gebildeten Produkte subtrahiert.

2.2.9.1 *Katalytische Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten*

Bei den vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *Nothobranchius furzeri* und *Pundamilia nyererei* wurden für diese Untersuchung die pH-Werte 6,0, 6,4, 6,8, 7,4, 8,0 und 8,8 eingestellt. Da einzelne Puffersysteme einen solch großen pH-Bereich nicht vollständig abdecken, wurden gleiche Anteile eines 50 mM Phosphatpuffers und eines 50 mM Boratpuffers gemischt und die entsprechenden pH-Werte mit 5 N HCl bzw. 5 N NaOH eingestellt. Für jeden pH-Wert wurden zwei Reaktionsansätze mit Arachidonsäure als Substrat (Endkonzentration 100 µM) hergestellt. Zu den Reaktionsansätzen wurde eine bestimmte Menge Lysatüberstand gegeben und die Ansätze für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die ALOX-Isoform von *Scleropages formosus* erfolgte

dieses Experiment mit den pH-Werten 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 und 9,0 (ebenfalls jeweils zwei Ansätze). Es wurde ein Puffersystem aus Tris und NaH_2PO_4 (je 0,1 M) genutzt und der jeweilige pH-Wert durch Zugabe von HCl und Natronlauge (je 1 N) eingestellt.

2.2.9.2 *Katalytische Aktivität unter norm- und hyperoxischen Bedingungen*

Um die Affinität der Fisch ALOX-Isoformen für molekularen Sauerstoff abzuschätzen, wurden Aktivitätsuntersuchungen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. Für diese Experimente wurden für jedes Enzym drei hyperoxische Reaktionsansätze angesetzt und die Reaktionsmischungen vor dem Reaktionsstart (Zugabe des Enzyms) mit reinem Sauerstoff equilibriert. Dadurch konnte die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsansatz ca. fünffach gesteigert werden. Bei den normoxischen Inkubationsbedingungen war der Reaktionspuffer mit Luft gesättigt (20 % Sauerstoff), was einer Sauerstoffkonzentration von ca. 160 μM entspricht.

2.2.9.3 *Katalytische Aktivität bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen*

Für diese Versuche wurde die Substratlösung (PBS und Arachidonsäure mit Endkonzentration 100 μM) in den jeweiligen Reaktionsansätzen auf eine bestimmte Temperatur abgekühlt oder erhitzt: 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C sowie 45 °C. Nach Zugabe des Lysatüberstandes erfolgte eine 3-minütige Inkubation. Die Nicht-Enzymkontrolle wurde bei 40 °C inkubiert.

2.2.9.4 *Katalytische Aktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen*

Um die Affinität der Fisch ALOX-Isoformen für Arachidonsäure zu bestimmen, wurden Aktivitätsmessungen bei unterschiedlichen Arachidonsäurekonzentrationen durchgeführt. Dabei wurden für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologe Reaktionsansätze mit einer unterschiedlichen Endkonzentration von Arachidonsäure als Substrat hergestellt (jeweils zwei Ansätze mit Enzymzugabe und eine Nicht-Enzymkontrolle pro Konzentration). Arachidonsäure lag in PBS in einer Konzentration von 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM , 80 μM und 120 μM vor. Nach Zugabe des Lysatüberstandes wurden die Reaktionsansätze bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von festem Natriumborhydrid gestoppt und die Menge der entstandenen konjugierten Diene mittels RP-HPLC quantifiziert.

2.2.10 Testung der Substratspezifität und der Lipoxinsynthaseaktivität

Für die Bestimmung der Substratspezifität wurden den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zunächst separat verschiedene Polyenfettsäuren als Substrate angeboten. So wurden Reaktionsansätze mit Arachidonsäure (5,8,11,14-Eikosatetraensäure, AA), 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (EPA), 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (DHA), Linolsäure (9,12-Oktadekadiensäure, LA) sowie α -(9,12,15-Oktadekatriensäure, ALA) und γ -Linolensäure (6,9,12-Oktadekatriensäure, GLA) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus der jeweiligen Fettsäure und 500 μ l PBS, wobei die Endkonzentration der Fettsäure immer 50 μ M betrug. Dazu wurde eine bestimmte Menge an Lysatüberstand gegeben, der das jeweilige ALOX15-Orthologe enthielt und dieses Gemisch wurde bei 25 °C für 3 min inkubiert. Für jede Fettsäure wurde auch eine Nicht-Enzymkontrolle mitgeführt. Die Reaktion wurde nach 3 min mit Natriumborhydrid gestoppt und es wurden 45 μ l Essigsäure und 455 μ l Acetonitril zum Ansatz gegeben. Dieser wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 8 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mittels RP-HPLC analysiert.

Weiterhin wurde die Substratspezifität der Knochenfisch ALOX15-Orthologen auf gleiche Art und Weise mit anderen Substraten getestet. Dies waren 2-Arachidonylglycerol, Anandamid, 15- und 5-HETE sowie 18(S)- und 18(R)-HEPE. Im Reaktionsansatz mit PBS lagen diese Substrate in einer Endkonzentration von 30 μ M vor. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 25 °C.

Mehrere humane ALOX-Isoformen sind prinzipiell in der Lage, bestimmte Substrate zu Lipoxinisomeren (LxA₄, LxB₄) umzuwandeln. Lipoxine sind endogene, anti-inflammatorische bzw. pro-resolutorische Mediatoren. Obwohl nach wie vor nicht vollständig klar ist, über welche Metabolitwege diese Mediatoren in vivo gebildet werden (13), gibt es verschiedene Möglichkeiten. Ein möglicher Reaktionsweg wäre, dass 5- oder 15-HETE bzw. 5,6- oder 14,15-DiHETE durch verschiedene ALOX-Isoformen zu 5,6,15-TriHETE (Lipoxin A) oder 5,14,15-TriHETE (Lipoxin B) oxygeniert werden. Um die Lipoxinsynthaseaktivität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze hergestellt, bei denen 5,15-DiHETE und 5,6-DiHETE als Substrate (Endkonzentration ca. 30 μ M) verwendet wurden. Nach Zugabe des Lysatüberstandes als Enzymquelle erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 25 °C. Danach wurde die Reaktion mit Natriumborhydrid gestoppt, der Ansatz mit Essigsäure angesäuert und die Proteine mit Acetonitril ausgefällt. Es erfolgte die Analyse

des proteinfreien Überstandes mittels RP-HPLC, wobei ein Laufmittel mit der Zusammensetzung Acetonitril, Wasser und Essigsäure im Verhältnis (35/65/0,1, by vol) verwendet wurde.

2.2.11 Membranoxygenierungsassay

In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass einige Lipoxygenasen, z.B. die ALOX15-Orthologen des Menschen (195) und des Kaninchens (48) sowie die AA 15-lipoxygenierende ALOX aus *Pseudomonas aeruginosa* (196), die Fähigkeit zur Oxygenierung von Biomembranen besitzen.

Um zu untersuchen, ob auch die potenziellen Knochenfisch ALOX15-Orthologen dazu in der Lage sind, wurden diese Enzyme mit Modellbiomembranen inkubiert und die Bildung konjugierter Diene in den Membranesterlipiden analysiert. Als Vergleich und Kontrolle diente die ALOX15 des Kaninchens, bei der die Fähigkeit zur Membranoxygenierung bereits früher nachgewiesen wurde (48). Bei den Modellbiomembranen handelte es sich um Vesikel von mitochondrialen Innenmembranen (submitochondriale Partikel, SMP), die aus Mitochondrien von Rinderkardiomyozyten präpariert wurden. Diese Membranen sind aufgrund ihrer Lipidzusammensetzung (viele ungesättigte Fettsäuren, wenig Cholesterol) besonders gut als Lipoxygenasesubstrate geeignet. Die Konzentration der Biomembranpräparation in der Substratstammlösung betrug 35 mg Protein/ml.

Vor der Durchführung des Experiments wurde die Menge an eingesetztem Lysatüberstand für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen und die Kaninchen ALOX15 durch Verdünnung so eingestellt, dass vergleichbare Arachidonsäureoxygenierungsaktivitäten für die Membranoxygenierung eingesetzt werden konnten. Die Membranoxygenaseaktivität wurde damit auf identische Arachidonsäureoxygenaseaktivität normiert.

Es wurden jeweils zwei unabhängige Aktivitätsansätze für jede Knochenfisch ALOX-Isoform und die Kaninchen ALOX15 durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 500 µl PBS, 20 µl der Biomembransuspension (finale Biomembranproteinkonzentration im Ansatz von 1,4 mg/ml). Zum Reaktionsstart wurde ein Aliquot der jeweiligen Enzympräparationen (17–335 µl Lysatüberstand der rekombinanten Knochenfisch ALOX-Isoformen bzw. gereinigte Kaninchen-ALOX15) zum Ansatz zugegeben. Eine Nicht-Enzymkontrolle wurde mitgeführt, bei der statt der Enzympräparationen eine äquivalente Menge an PBS dem Ansatz zugesetzt wurde. Die Reaktionsansätze wurden

über 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Natriumborhydrid gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze mit 40 µl konzentrierter Essigsäure angesäuert, geschüttelt und auf Eis gestellt. Die Membranlipide wurden dann nach Bligh-Dyer aus den Reaktionsansätzen extrahiert (197). Dazu wurden zunächst 1,25 ml Methanol zu den Ansätzen gegeben und die Mischung für 1 min geschüttelt. Anschließend wurden 625 µl Chloroform zu den Ansätzen zugegeben und noch einmal geschüttelt, wobei es nicht zu einer Phasentrennung kam. Anschließend wurden noch einmal 625 µl Chloroform und 625 µl PBS hinzugegeben und die Ansätze noch einmal 1 min geschüttelt, wobei eine milchige Suspension entstand. Anschließend wurden alle Ansätze für 10 min bei 4.000 rpm (3.000 xg) und 4 °C zentrifugiert, sodass sich zwei Phasen bildeten. Die untere Phase (Chloroformphase) enthielt die extrahierten Membranlipide. Diese Schicht wurde mit Hilfe einer Spritze abgezogen und in ein 20 ml Schliffglas (Verdampfungsgefäß) überführt. Die obere Phase der Extraktionsansätze wurde verworfen. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (bildet ein Azeotrop mit dem in der Chloroformphase enthaltenen Wasser) wurde das Lösungsmittel der unteren Phase mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers abgedampft und die zurückgebliebenen Lipide wurden in 425 µl Methanol gelöst. Die Lösung wurde kurz geschüttelt und in ein Ultraschallbad gestellt, um die Lipide möglichst vollständig von der Wand des Verdampfungsgefäßes zu lösen. Anschließend wurden 75 µl 40 % Kaliumhydroxidlösung (KOH) hinzugegeben, das Gemisch mit Argon überschichtet und die extrahierten Esterlipide wurden für 15 min in einem 60 °C warmen Wasserbad hydrolysiert. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden 75 µl Essigsäure hinzugefügt und die Proben bei maximaler Umdrehung und Raumtemperatur zentrifugiert. Die klaren Hydrolysatüberstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und hinsichtlich des Vorhandenseins konjugierter Diene mittels RP-HPLC analysiert.

2.2.12 Aktivitätsassays unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Eine Oxidation von Fettsäuren benötigt einen Elektronenakzeptor, der im Falle der klassischen Lipoxygenasereaktion wie bei vielen anderen Oxidationsreaktionen atmosphärischer Sauerstoff ist. Prinzipiell gibt es zwei mögliche Quellen für den Sauerstoff: i) atmosphärischer Sauerstoff: Die derzeitige Erdatmosphäre besteht zu ca. 20 % aus molekularem Sauerstoff, der aufgrund seiner chemischen Struktur ein idealer Elektronenakzeptor ist und maximal 4 Elektronen pro O_2 -Molekül aufnehmen kann. Bei der Dioxygenierung von Fettsäuren entstehen Fettsäurehydroperoxide, die anschließend

zu Hydroxyfettsäuren reduziert werden können. ii) Sauerstoff, der chemisch im Wasser gebunden ist. Bei bestimmten Reaktionen (Hydroxylasen) wird Sauerstoff aus dem Wasser auf Substrate übertragen.

Um zu untersuchen, über welchen Weg Sauerstoff bei der Oxygenierung von AA durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Fische eingebaut wird, wurden Experimente unter ^{18}O -Atmosphäre durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Reaktionsansätze aus PBS mit 20 μM AA zunächst durch intensives Spülen mit Argongas anaerobisiert. Dadurch wurde der Großteil des atmosphärischen $^{16}\text{O}_2$ aus den Reaktionsansätzen ausgetrieben. Die Enzympräparationen wurden auf Eis unter Argonatmosphäre gesetzt, sodass auch die $^{16}\text{O}_2$ Konzentration in den Enzympräparaten minimiert wurde. Kurz vor dem Reaktionsstart wurde der Reaktionsansatz mit $^{18}\text{O}_2$ -Gas gespült, sodass sich eine $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre über dem Reaktionsansatz bildete. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe des teilweise anaerobisierten Enzyms gestartet. Die Ansätze wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit Natriumborhydrid gestoppt. Nach Zugabe von 45 μl Essigsäure und 500 μl Ethylacetat wurden die Ansätze geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Mit einer Spritze wurde die obere Phase (enthält das Ethylacetat und die darin gelösten Arachidonsäurederivate) abgehoben und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für eine Reextraktion wurden erneut 500 μl Ethylacetat auf die ursprünglichen Ansätze gegeben, für 1 min geschüttelt, erneut zentrifugiert und die obere Phase abgehoben. Das Lösungsmittel (Ethylacetat) wurde in einer Vakuumzentrifuge verdampft, sodass nur die Arachidonsäurederivate zurückblieben. Diese wurden in 100 μl Methanol gelöst. Mittels RP-HPLC wurden die konjugierten Diene präpariert und anschließend in der kombinierten Normalphasen-Chiralphasen-HPLC analysiert. Der Einbau von ^{18}O in die AA Oxygenierungsprodukte wurde mittels Massenspektrometrie analysiert.

2.2.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des Pfu Ultra II HotStart Systems (Fa. Agilent, Santa Clara, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Das System funktioniert so, dass während der Vervielfältigung der Template-DNA in der PCR eine gezielte genetische Veränderung (Mutation von ein oder zwei Basentriplets) in den Kopien der Template-DNA erzeugt wird (siehe Abb. 11). Die Sequenzveränderung entsteht mit Hilfe von speziell konstruierten Mutageneseprimern, welche die gewünschte Mutation in ihrer Sequenz enthalten. Nach Hybridisierung werden

die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert und es entstehen die mutierten DNA-Stränge. Die ursprüngliche nicht-mutierte Template-DNA enthält methyliertes Adenin, wodurch sie durch die Restriktionsendonuklease DpnI verdaut wird. Da die neu synthetisierten DNA-Stränge nicht methyliert sind, werden sie nicht durch DpnI gespalten und können in kompetente Bakterienzellen transformiert werden.

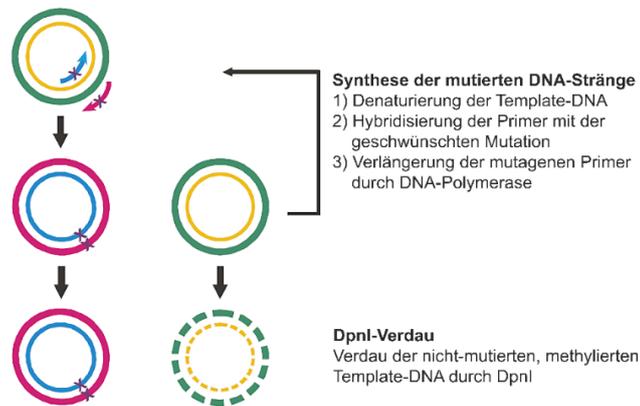


Abb. 11: Schematische Darstellung der ortsgerechten Mutagenese (modifiziert nach <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>, letzter Zugriff am 11.11.2022, 14:56 Uhr). Erläuterungen siehe Text.

Für jede der drei vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen wurden verschiedene Punktmutanten hergestellt. Dafür wurden von uns anhand der Basensequenz der jeweiligen Knochenfisch ALOX15-DNA Primer konstruiert, die die gewünschten Mutationen in ihrer Sequenz enthielten. Diese DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ, Berlin, Deutschland synthetisiert. Die Ansätze für die PCR enthielten 12,5 µl Mastermix, 100 ng Template-DNA (rekombinanter Expressionsvektor pET-28b oder pFastBacTMHT C) sowie 1 µl der beiden Mutagenese-Primer (Endkonzentration im Amplifizierungsansatz 5 µM). Diese Ansätze wurden nach dem folgenden Programm in einem Thermocycler inkubiert:

Temperatur	Zeit
95 °C	60 s
95 °C	30 s
55 °C	60 s
68 °C	10 min
10 °C	unendlich

} 17 Zyklen

Nach den PCR-Zyklen wurde 1 µl DpnI zum Ansatz gegeben und dieser über 30 min bei 37 °C und anschließend über 5 min bei 80 °C inkubiert.

Nach Transformation des PCR-Ansatzes in *E. coli* XL1-Blue Zellen sowie der Präparation der Plasmid-DNA mittels NucleoSpin Plasmid Kit (Fa. Macherey-Nagel,

Düren, Deutschland) erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-DNA zur Überprüfung der Mutagenese. War diese erfolgreich, wurde die jeweilige Mutante im pro- oder eukaryotischen System exprimiert.

2.2.14 Statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten

Die statistische Auswertung der Untersuchungen zur enzymatischen Grundcharakterisierung der rekombinanten Enzyme (3.3.2) erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 9, wobei immer zwei unabhängige Aktivitätsassays durchgeführt worden sind. Für die Untersuchungen zur Substratspezifität (3.7.1) wurden ebenfalls zwei unabhängige Aktivitätsassays durchgeführt, die jeweils zweimal gemessen worden sind. Anhand dieser vier Messwerte wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt sowie die Berechnung der p-Werte durchgeführt.

Die Aktivität der rekombinanten Enzyme unter norm- und hyperoxischen Bedingungen (3.7.3) wurde anhand von jeweils drei unabhängigen Aktivitätsassays für beide Bedingungen untersucht. Die Messwerte der Untersuchungen zur Substratspezifität (3.7.1) und der Aktivität unter norm- und hyperoxischen Bedingungen (3.7.3) wurden mithilfe des Shapiro-Wilk Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Zur Berechnung der p-Werte wurde für nicht normalverteilte Daten der ungepaarte Mann-Whitney-U-Test und für normalverteilte Daten der ungepaarte T-Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag für alle Untersuchungen bei 0,05.

Die relative Membranoxygenaseaktivität (3.8) wurde anhand von jeweils zwei unabhängigen Aktivitätsassays für die Kaninchen-ALOX15 und die Knochenfisch ALOX-Isoformen bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen

Beim Durchsuchen der Proteindatenbank des NCBI wurden komplette Sequenzen für vermeintliche ALOX15-Sequenzen bei sieben Knochenfischspezies gefunden [Tab. 1, (198)]. Die Datenbank umfasste zum Zeitpunkt der Suche 54 verschiedene Knochenfischspezies. Dass in nur sieben Spezies potenzielle ALOX15-Sequenzen gefunden werden konnten, spricht dafür, dass solche Sequenzen bei den meisten Knochenfischspezies nicht vorkommen.

Tab. 1: Identifizierte vermeintliche ALOX15-Orthologe von Knochenfischen [Roigas et al., 2022 (198)]. Aufgeführt sind jeweils Eintragsnummer und Sequenzlänge der nach der Datenbanksuche identifizierten vermeintlichen ALOX15-Sequenzen verschiedener Knochenfischspezies.

Datenbankeintrag	Spezies	Anzahl der Aminosäuren
NP_955912.1	<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	670
XP_015813570.1	<i>Nothobranchius furzeri</i> (Türkiser Prachtgrundkärpfling)	670
XP_005753048.1	<i>Pundamilia nyererei</i> (Nyereres Viktoriabuntbarsch)	670
XP_018588735.1	<i>Scleropages formosus</i> (Asiatischer Gabelbart)	668
XP_005945486.1	<i>Haplochromis burtoni</i> (Burtons Maulbrüter)	682
XP_003966824.1	<i>Takifugu rubripes</i> (Japanischer Kugelfisch)	620
XP_019726606.1	<i>Hippocampus comes</i> (Tigerschwanz-Seepferdchen)	433

Eine vermeintliche ALOX15-Sequenz ist die ALOX1 des Zebrafischs (*D. rerio*, NP_955912.1). Da zu diesem Enzym bereits umfangreiche Untersuchungen vorliegen (20), wurde diese Lipoxygenase in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, sondern für vergleichende Untersuchungen als Bezugssystem verwendet. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass dieses Enzym in der Datenbank zum Zeitpunkt unserer Suche zwar als ALOX15 annotiert war, dass aber vorhergehende funktionelle Untersuchungen am rekombinanten Enzym gezeigt hatten (20, 188), dass Arachidonsäure durch dieses Enzym zu 12(S)-HETE umgewandelt wird, wobei kaum 15-

HETE als Nebenprodukt entstand. Damit ergab sich die Frage, ob es sich bei diesem Enzym wirklich um ein Funktionsäquivalent der Säugetier ALOX15-Orthologen handelt. Die restlichen sechs vermeintlichen ALOX15-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Emboss Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, letzter Zugriff: 26.04.2019, 13:52 Uhr) zunächst mit der Sequenz der humanen ALOX15 verglichen, um Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede in der Primärstruktur der Enzyme festzustellen. In Abbildung 12 ist ein solches Alignment beispielhaft dargestellt.

Homol5_NP_001	1	MGLYRIRVSTGASLYAGSNNQVLWLVGQHGEAAL---GKRLWPARGKE	46
Danio15_NP_95	1	-MEYKVTVATGTSEYSGTNNYVYVTLIGEKGKSERTELLDNPGLDFCRGAV	49
Homol5_NP_001	47	TELKVEVPEYLGPLLFVKLRKRHLLKDDAWFCNWI SVQGPAGDEVRFPC	96
Danio15_NP_95	50	DDYIVKSDTDLGPLILVRLEKHKYFIEDNWFRCRYVKVSVPGERCCYTFPC	99
Homol5_NP_001	97	YRWVEGNGV-LSLPEGTGRVGEDPQGLFQKHREEELEERKLYRWGNWK	145
Danio15_NP_95	100	YRWLVGDCGVFVELREGTAKLSEDSLPLEMAHRQSELQERQKTYRWVAWA	149
Homol5_NP_001	146	DGLILNMAGAKLYDLPVDERFLEDKRVDFEVSLAKGLADLAIKD-SLNVL	194
Danio15_NP_95	150	PGIPKCIDAKSEADLPQDARFDNEKRSDFEGSLHYALLELSLKKLAIRFG	199
Homol5_NP_001	195	TCWKDLDDFNRIFWCGQSKLAERVRDSWKEDALFGYQFLNGANPVVLRRS	244
Danio15_NP_95	200	KSWSDLEDFRRIFWKLRSPIAEYTMHEHWKEDWFFAYQFLNGSNPRNITRL	249
Homol5_NP_001	245	AHLPARLVFPFGMEELQ---AQLEKELEGGLTFEADFSLLDGIKANVIL	290
Danio15_NP_95	250	KKVPSNFLVTDGMVQSSLIPTTTLNEELKKGNI FLVDHAILDGPANVIR	299
Homol5_NP_001	291	CSQQHLAAPLVMLKLQPDGKLLPMVIQLPRTGSPPPPLFPTDPPMAW	340
Danio15_NP_95	300	NSPQYIAAPLCLLYEHPEKGLIPAIQLE--QKPKDTPVFLPSPDPLAW	347
Homol5_NP_001	341	LLAKCWVRSSDFQLHELQS H LLRC H LMAEVIVVATMRC LPSIHPFKLII	390
Danio15_NP_95	348	LLAKMWRHAEFQVFQLLS H LLRT H LMVEVICVATLRQLPAVHPYKLLT	397
Homol5_NP_001	391	PHLRYTLEINVRARTGLVSDMGIFDQIMSTGGGGHVQLLKQAGAFITYSS	440
Danio15_NP_95	398	PHLRYTLEINCRGRTQLLSPEGIFKRVVSTGGEGLLILAQREYKVLTYRS	447
Homol5_NP_001	441	FCPPDDLADRGLLVKSSFYA QDALRLWEI IRYVEGIVSLHYKTDVAVK	490
Danio15_NP_95	448	LQPKFDLDRGVTKVGYVYRDYSLMLWDV IQNFVSGIVSILYQCDSDVQ	497
Homol5_NP_001	491	DDPELQTWCREITEIGLQGAQDRGFVPSLQARDQVCHFVTMCIFTCTGQ H	540
Danio15_NP_95	498	EDSELQAWIHVAVVEGFDVPEFGLASDMKTKEELITLLSVAIFTSTAQ H	547
Homol5_NP_001	541	ASV H LGQLDWYSWVPNAPCTMRLPPPTTKDA-TLETVMATLPNFHQASLQ	589
Danio15_NP_95	548	AAT H NGQFDWCAWVPNT PCTMRHPPPRDKDAVTMEMIMDTLPDISQSCVQ	597
Homol5_NP_001	590	MSITWQLGRRQPVMMVAVGQHEEYFSGPEPKAVLKKFREELAALDKIEEI	639
Danio15_NP_95	598	MAITWHLGRAQPDALPMGQYVEQYFTEPAALKVIDKFRKELKELEDKIMA	647
Homol5_NP_001	640	RNAKLDPYEYLRPSVVENSV I 662	
Danio15_NP_95	648	QNEGLELQYLYLCP SRMENSIT I 670	

Abb. 12: Sequenzalignment der mutmaßlichen ALOX15-Orthologe von *D. rerio* mit der humanen ALOX15. Die Aminosäuresequenzen der vermeintlichen ALOX15-Orthologen wurden aus der NCBI-Datenbank extrahiert und duale Aminosäuresequenzalignments wurden mit Hilfe des Programms Emboss Needle durchgeführt. Die konservierten proteinogenen Eisenliganden sind gekennzeichnet.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den vier übrig gebliebenen vermeintlichen ALOX15-Sequenzen von *Nothobranchius furzeri* (XP_015813570.1), *Pundamilia nyererei* (XP_005753048.1), *Scleropages formosus* (XP_018588735.1) und *Haplochromis burtoni* (XP_005945486.1) und der als Bezugssystem dienenden Sequenz von *D. rerio* (NP_955912.1) um Enzymorthologe handelt, also um Proteine mit einem gemeinsamen evolutionären Vorläufer, wurde mittels dualer Aminosäurealignments der Aminosäureidentitätsgrad zwischen den neu identifizierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Fische und der ALOX1 der Zebrafischs bestimmt (Tab. 2). Dabei zeigte sich, dass die fünf Knochenfisch-Sequenzen einen hohen Homologiegrad von 71–93 % (198) aufweisen, was für orthologe Enzyme spricht.

Tab. 2: Aminosäuresequenzidentitätsgrad der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische [Roigas et al., 2022 (198)]. Die Aminosäuresequenzen der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische wurden aus der NCBI-Datenbank extrahiert und die Aminosäuresequenzidentitäten (in %) mittels dualen Aminosäurealignments mit Hilfe des Programms Emboss Needle bestimmt.

Spezies	Aminosäureidentität (%)				
	<i>D. rerio</i>	<i>N. furzeri</i>	<i>P. nyererei</i>	<i>S. formosus</i>	<i>H. burtoni</i>
<i>D. rerio</i>	100	75	75	75	71
<i>N. furzeri</i>	75	100	86	74	81
<i>P. nyererei</i>	75	86	100	75	93
<i>S. formosus</i>	75	74	75	100	71
<i>H. burtoni</i>	71	81	93	71	100

Um die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von Vertretern möglichst unterschiedlicher Taxa innerhalb der Knochenfischsystematik zu exprimieren, wurden die vermeintlichen ALOX15-Sequenzen von *Nothobranchius furzeri* (XP_015813570.1), *Pundamilia nyererei* (XP_005753048.1), *Scleropages formosus* (XP_018588735.1) und *Haplochromis burtoni* (XP_005945486.1) in die phylogenetische Systematik der Knochenfische eingeordnet (siehe 1.8). Da *Haplochromis burtoni* und *Pundamilia nyererei* Vertreter der Barschverwandten sind, beide Spezies also zur selben Ordnung (Buntbarschartige) gehören und die Aminosäuresequenz der beiden Enzyme zu 93 % übereinstimmt (Tab. 2), wurde nur das vermeintliche ALOX15-Orthologe von *Pundamilia nyererei* für eine eingehendere Charakterisierung ausgewählt. *Nothobranchius furzeri* vertritt ebenfalls die Barschverwandten, gehört jedoch einer anderen Überordnung (Ährenfischverwandte) an, sodass auch diese vermeintliche ALOX15 näher charakterisiert wurde. Auch die ALOX15-Sequenz von *Scleropages formosus* wurde für

die Expression ausgewählt, da dieser nicht zu den Barschverwandten, sondern zur Überkohorte der Knochenzünglerähnlichen gehört.

Dem Knochenfisch *Nothobranchius furzeri* kommt hier eine besondere Bedeutung zu, da dieser Fisch als ein Modellorganismus für den Alterungsprozess von Wirbeltieren diskutiert wird. Als einjähriger Knochenfisch bewohnt er saisonale Frischwasserteiche in Südafrika und hat als Folge der Anpassung an seinen Lebensraum eine durchschnittliche Lebensspanne von nur 3 bis 7 Monaten (192). Unter laborchemischen Bedingungen existieren mehrere Stämme mit unterschiedlicher Lebensspanne (199), die teilweise bei unter 12 Wochen liegt. Dies macht *Nothobranchius furzeri* zu der Wirbeltierspezies mit der kürzesten Lebensspanne, die in Gefangenschaft gehalten werden kann [bereits 2003 von Valdesalici et al. beschrieben (191)]. Zudem ähnelt der Alterungsprozess dieses Knochenfisches dem der Säugetiere. So konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass viele der sogenannten „hallmarks of aging“, die u.a. den Alterungsprozess von Säugetieren charakterisieren (200), auch für den Alterungsprozess von *Nothobranchius furzeri* relevant sind. So wurde z.B. sowohl eine Verkürzung der Telomere in Muskel- und Hautgewebe (201) sowie eine vorzeitige mitochondriale Dysfunktion [Abfall der Anzahl der Kopien an mitochondrialer DNA (mtDNA), Herabregulation von mtDNA-assoziierten Genen, Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion (202)] in Abhängigkeit der Fische von ihrem Alter beobachtet. Neben seinem Nutzen als Alterungsmodell bietet *Nothobranchius furzeri* ebenfalls Einblicke in die Entwicklungsbiologie (Diapause in der Embryonenentwicklung) und die frühe Evolution der Geschlechtschromosomen (192).

Zusammenfassung: Komplette cDNA Sequenzen, die für vermeintliche ALOX15-Orthologe kodieren, konnten in 5 von 54 verschiedenen Knochenfischspezies identifiziert werden. Ihre Sequenzidentität variierte zwischen 71 und 93 %, sodass man davon ausgehen kann, dass es sich um orthologe Enzyme handelt. Für funktionelle Untersuchungen an den rekombinanten Enzymen wurden die Sequenzen von *N. furzeri*, *P. nyererei* und *S. formosus* ausgewählt.

3.2 Vergleich der ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit verschiedenen humanen und murinen ALOX-Isoformen

3.2.1 Aminosäuresequenzvergleich mit humanen und murinen ALOX-Isoformen

Um herauszufinden, mit welchem der humanen bzw. murinen ALOX-Isoformen die ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen die größte strukturelle Ähnlichkeit

aufweisen, wurden die Ähnlichkeitsgrade anhand von dualen Aminosäurealignments bestimmt. Dabei ergab sich (Tab. 3), dass alle ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische einen Identitätsgrad von 41–48% mit allen humanen ALOX-Isoformen aufwiesen.

Tab. 3: Aminosäuresequenzidentitäten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu den verschiedenen humanen ALOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5) [Roigas et al., 2022 (198)]. Die Aminosäuresequenzen der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische und der humanen ALOX-Isoformen wurden aus der NCBI-Datenbank extrahiert und die Aminosäuresequenzidentitäten (in %) mittels dualen Aminosäurealignments mit Hilfe des Programms Emboss Needle bestimmt.

Spezies	Aminosäureidentität zu humanen ALOX-Isoformen (%)					
	ALOX15	ALOX15B	ALOX12	ALOX12B	ALOXE3	ALOX5
<i>D. rerio</i>	44	43	46	41	40	45
<i>N. furzeri</i>	44	43	45	41	41	48
<i>P. nyererei</i>	44	43	47	41	41	47
<i>S. formosus</i>	44	43	45	42	41	47

Diese Ergebnisse zeigen, dass keine der ausgewählten Knochenfischenzyme einen besonders hohen Ähnlichkeitsgrad mit einer humanen ALOX-Isoform aufweist (198). Deshalb kann auf der Basis dieser Daten nicht geschlussfolgert werden, ob es sich bei diesen Knochenfischenzymen um Orthologe der humanen ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOX5 oder ALOXE3 handelt. Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die ausgewählten Knochenfischlipoxygenasen in der Datenbank zu Beginn meiner Arbeiten als ALOX15-Orthologe annotiert waren. Diese Zuordnung kann jedoch auf der Basis des Vergleichs der Aminosäuresequenzen der Fischenzyme nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

Tab. 4: Aminosäuresequenzidentitäten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu den verschiedenen ALOX-Isoformen der Maus (Alox15, Alox15b, Alox12, Alox12b, Alox3, Alox5, Alox12e) [Roigas et al., 2022 (198)]. Die Aminosäuresequenzen der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische und der murinen ALOX-Isoformen wurden aus der NCBI-Datenbank extrahiert und die Aminosäuresequenzidentitäten (in %) mittels dualen Aminosäurealignments mit Hilfe des Programms Emboss Needle bestimmt.

Spezies	Aminosäureidentität zu murinen ALOX-Isoformen (%)						
	Alox15	Alox15b	Alox12	Alox12b	Alox3	Alox5	Alox12e
<i>D. rerio</i>	43	41	46	39	40	44	42
<i>N. furzeri</i>	44	42	46	40	42	46	42
<i>P. nyererei</i>	44	42	48	40	43	46	44
<i>S. formosus</i>	43	41	47	40	41	46	43

In weiterführenden Experimenten wurde ein ähnlicher Vergleich der Aminosäuresequenzidentitäten zwischen den ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen und den verschiedenen murinen Alox-Isoformen durchgeführt. Auch hier ergaben sich Aminosäuresequenzidentitätsgrade zwischen 40–48 % (Tab. 4). Auch auf der Basis dieser Sequenzdaten können die ausgewählten Knochenfischlipoxygenasen nicht eindeutig einer murinen ALOX-Isoform zugeordnet werden.

Zusammenfassung: Die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zeigen keine hohen Aminosäuresequenzidentitäten mit den ALOX15-Isoformen von Mensch und Maus. Eine eindeutige Zuordnung der Fischenzyme zu humanen bzw. murinen ALOX-Isoformen ist deshalb nicht möglich. Dafür müssten Genanalysen und funktionelle Untersuchungen an rekombinanten Enzymen durchgeführt werden.

3.2.2 Vergleich der Genstruktur der ausgewählten Knochenfisch ALOX-Isoformen mit den humanen ALOX-Genen

Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird ausschließlich durch die exonischen Nukleotidsequenzen der Gene bestimmt. Um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Proteinen herzustellen, reicht aber in vielen Fällen ein Vergleich der exonischen Nukleotidsequenzen nicht aus. Deshalb ist es ratsam, zu diesem Zweck auch die intronischen Gensequenzen einschließlich der 5'- und 3'-flankierenden Genabschnitte und die Exon-Intron-Struktur der Gene miteinander zu vergleichen. Deshalb wurden im Folgenden die Nukleotidsequenzen und die Exon-Intron-Strukturen (Abb. 13) der drei ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Gene mit den Genen der humanen ALOX-Isoformen verglichen.

Betrachtet man die Größen der untersuchten ALOX-Gene, kann man feststellen, dass die humanen ALOX-Gene (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3) eine Größe zwischen 10–23 kbp aufweisen. In diesem Bereich liegen auch die Gengrößen der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen. Lediglich das Gen, welches für die humane ALOX5 kodiert, ist deutlich größer (72 kbp) als die anderen humanen ALOX-Gene und kann somit als Differenzierungsmerkmal herangezogen werden. Der simple Größenvergleich der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Gene mit den humanen ALOX-Genen deutet darauf hin, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Enzyme keine Enzymorthologe der humanen ALOX5 sind.

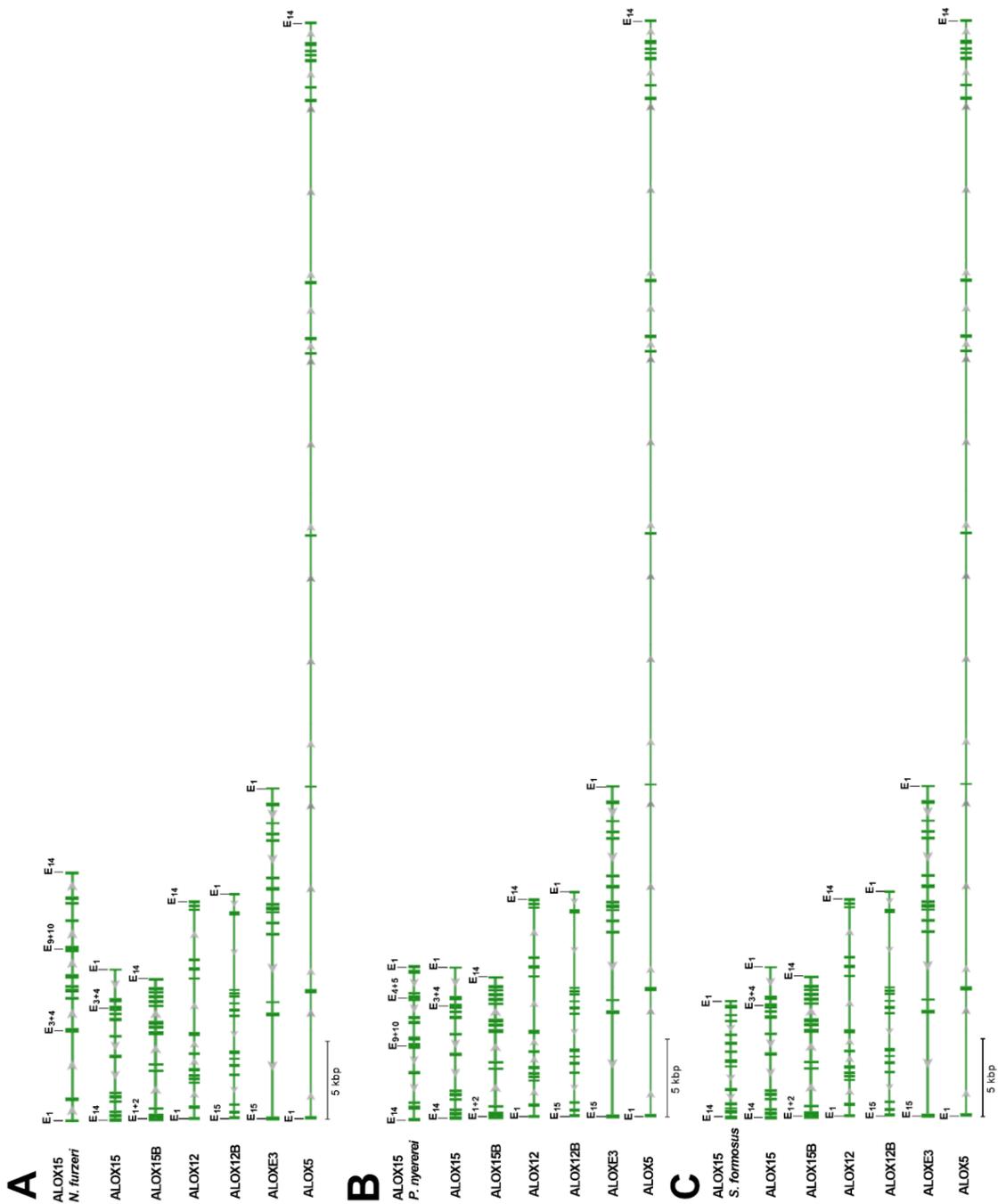


Abb. 13: Gene der vermeintlichen ALOX15-Orthologen ausgewählter Knochenfischspezies im Vergleich zu Genen der humanen ALOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5) [Roigas et al., 2022 (198)]. Dargestellt ist die Exon-Intron-Struktur der humanen Gene im Vergleich zur vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri* (A), zur vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* (B) und zur vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus* (C). Die jeweiligen Exon-Intron-Strukturen wurden der GenDatenbank des NCBI entnommen. Die Darstellung der Gene erfolgt vom Start- bis zum Stoppcodon. Die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des ersten und letzten Exons wurden nicht berücksichtigt.

Außerdem konnten in den Genomen der hier untersuchten Knochenfische eindeutige spezifische ALOX5-Gene nachgewiesen werden (Gen IDs: 107375698, 102207629, 108921027). Dadurch konnte auf der Basis der Genstrukturen eindeutig

ausgeschlossen werden, dass es sich bei den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen um ALOX5-Orthologe handelt. Dazu bedurfte es keiner funktionellen Untersuchungen an den rekombinanten Enzymen.

Beim Vergleich der Exon-Intron-Zusammensetzung der Gene, die für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische kodieren, konnte festgestellt werden, dass alle diese Gene aus 14 Exons und 13 Introns bestehen (Abb. 12). Das trifft auch für die meisten humanen ALOX-Gene (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX5) zu. Nur die Gene für die ALOX12B und die ALOXE3 enthalten 15 Exons und 14 Introns. Diese Daten deuten darauf hin, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen näher mit den humanen ALOX15, ALOX15B bzw. ALOX12 verwandt sein sollten als mit der ALOX12B und der ALOXE3 (198).

Schlussendlich wurden die Nukleotidsequenzidentitätsgrade der Gene, die für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen kodieren, mit den Gensequenzen verglichen, die für die humanen ALOX-Isoformen kodieren. Diese Daten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Nukleotidsequenzidentitäten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zur humanen ALOX5 sind mit durchschnittlich 18 % relativ gering, was nicht auf eine enge Verwandtschaft dieser Enzyme hindeutet. Den höchsten durchschnittlichen Identitätsgrad weisen die Gene der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zu den humanen ALOX12-, ALOX12B- und ALOXE3-Genen auf. Da die Gene der humanen ALOX12B und ALOXE3 aber 15 Exons enthalten, die Gene der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen aber nur 14 Exons aufweisen, scheinen die Gene der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen am engsten mit dem Gen der humanen ALOX12 verwandt zu sein (198).

Tab. 5: Nukleotididentität der vermeintlichen ALOX15-Gene ausgewählter Knochenfischarten im Vergleich zu Genen humaner ALOX-Isoformen (ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5) [Roigas et al., 2022 (198)]. Erläuterungen siehe Text.

Spezies	Nukleotididentität zu humanen ALOX-Isoformen (%)					
	ALOX15	ALOX15B	ALOX12	ALOX12B	ALOXE3	ALOX5
<i>D. rerio</i>	32	31	38	37	43	20
<i>N. furzeri</i>	22	22	35	34	36	22
<i>P. nyererei</i>	37	36	40	39	35	16
<i>S. formosus</i>	39	39	38	39	33	15
Durchschnitt	33	32	38	37	37	18

Einschränkend muss bei der Interpretation der Daten allerdings gesagt werden, dass die Unterschiede in den Nukleotidsequenzidentitäten von humaner ALOX15,

humaner ALOX15B und humaner ALOX12 auf der einen Seite und den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen auf der anderen so gering sind, dass eine endgültige Abschätzung des Verwandtschaftsgrades auch auf der Basis der Genstrukturen nicht sehr fundiert erscheint. Um die getroffene Vorhersage (die ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen sind orthologe Enzyme der humanen ALOX12) zu untermauern bzw. zu widerlegen, müssen funktionelle Daten zu den entsprechenden Enzymen gesammelt werden. Da eine Reinigung der nativen Enzyme aus den verschiedenen Fischarten aufgrund der geringen Expressionsniveaus wenig aussichtsreich erscheint, müssen die Enzyme rekombinant exprimiert werden. Die für die rekombinante Expression nötigen Arbeitsschritte und die funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Enzyme werden in den folgenden Kapiteln der vorliegenden Arbeit näher beschrieben.

Zusammenfassung: Weder anhand der genomischen Nukleotidsequenzidentitäten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Gene, der Gengrößen noch anhand der Exon-Intron-Zusammensetzung der Gene lassen sich die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zweifelsfrei einer humanen ALOX-Isoform zuordnen. Die vorhandenen Sequenzdaten weisen jedoch darauf hin, dass es sich dabei am ehesten um Orthologe der humanen ALOX12 handeln könnte.

3.3 Expression und Charakterisierung der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen im bakteriellen System

3.3.1 Expression in *E. coli*

Um die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfischarten hinsichtlich ihrer enzymatischen und protein-chemischen Eigenschaften näher charakterisieren zu können, erfolgte zunächst eine heterologe Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*. Dazu wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank entnommen und die Nukleotidsequenz durch Einfügen stummer Mutationen für eine bakterielle Expression optimiert. Anschließend wurde die optimierte Nukleotidsequenz chemisch synthetisiert und in den bakteriellen Klonierungsvektor pUC57 durch die Firma BioCat einkloniert. Die zirkuläre Plasmid-DNA wurde in *E. coli* vervielfältigt, das ALOX-Insert herausgeschnitten und in den bakteriellen Expressionsvektor (pET-28b) einkloniert. Dieser prokaryotische Expressionsvektor enthält eine Nukleotidsequenz, die für ein N-terminales His-tag-Peptid kodiert, sodass bei Einklonierung der kodierenden Sequenz der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-

Orthologen in die Multicloningsequenz des Vektors die kodierende Sequenz eines Fusionsproteins entsteht, das N-terminal der kodierenden Sequenz des vermeintlichen ALOX15-Orthologen ein Hexa-his-tag-Peptid enthält. Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit dem rekombinanten Expressionsplasmid transformiert und die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG initiiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit Ultraschall lysiert und das gebildete Lysat zentrifugiert, sodass der Lysatüberstand als Enzymquelle genutzt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Enzyme exprimiert wurden und ob diese katalytisch aktiv waren, erfolgte eine Inkubation mit Arachidonsäure, wobei die gebildeten Oxygenierungsprodukte anschließend vergleichend zur Nicht-Enzymkontrolle mittels RP-HPLC quantifiziert wurden.

Vergleicht man das Profil der AA Oxygenierungsprodukte der Nicht-Enzymkontrolle mit dem der Inkubation, bei der das vermeintliche rekombinant exprimierte ALOX15-Orthologe von *S. formosus* als Enzym verwendet wurde (Abb. 14), kann geschlussfolgert werden, dass bei der Nicht-Enzymkontrolle nur geringe Mengen an 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE nachweisbar waren (Panel A). Im Gegensatz dazu konnten im Inkubationsansatz, bei dem die rekombinante vermeintliche ALOX15 des *S. formosus* als Enzym verwendet wurde, große Mengen an 12-HETE nachgewiesen werden (Panel B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die vermeintliche ALOX15 von *S. formosus* in *E. coli* exprimiert werden konnte und dass es sich bei diesem Enzym um ein AA 12-lipoxygenierendes Protein handelt.

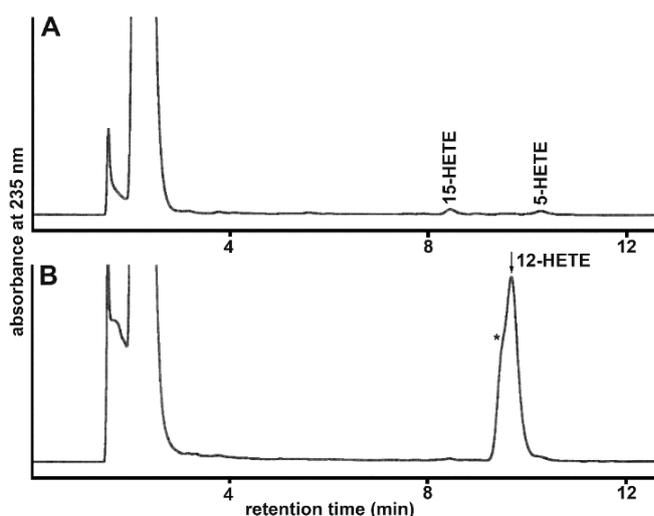
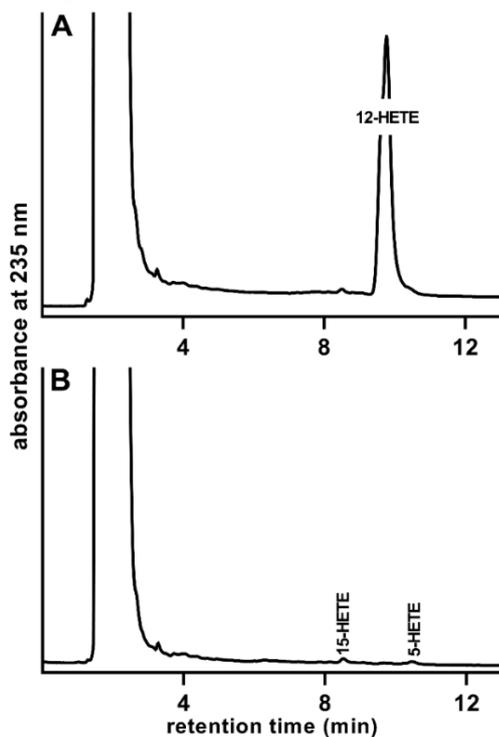


Abb. 14: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus*. Der Lysatüberstand (50 μ l) der rekombinanten Expression der vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus* wurde im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 10 min inkubiert und die dabei entstandenen primären ALOX-Produkte (konjugierte Diene) wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. **A)** Nicht-Enzymkontrolle, **B)** Lysatüberstand. Für beide Chromatogramme wurde die Y-Achse auf die Höhe des 12-HETE Peaks der Inkubation mit dem Lysatüberstand normiert. Ein repräsentatives Chromatogramm (4 unabhängige Expressionsversuche) ist gezeigt.

Interessanter Weise weist der 12-HETE Peak eine leichte Frontschulter (*) auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass der 12-HETE Peak nicht homogen ist, sondern dass sich darunter mehrere Produkte verbergen, deren Mengen jedoch verglichen mit dem 12-HETE deutlich geringer zu sein scheinen. Dafür gibt es mehrere Erklärungen, von denen hier zwei kurz erläutert werden sollen. i) Die Reduktion der bei der ALOX-Reaktion gebildeten Hydroperoxyfettsäuren war nicht vollständig, sodass neben dem Hauptprodukt 12-HETE auch noch geringe Mengen an 12-HpETE im Ansatz vorhanden waren. Da diese beiden Oxygenierungsprodukte der AA unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen nicht vollständig voneinander getrennt werden, könnte die Frontschulter auf 12-HpETE zurückzuführen sein. ii) Unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen werden 12-HETE und 8-HETE nicht vollständig voneinander getrennt. Deshalb könnte es sich bei der Frontschulter auch um geringe Mengen des Nebenprodukts 8-HETE handeln. Genauere Untersuchungen zu diesem



Problem wurden im Rahmen der Strukturidentifizierung der ALOX-Produkte durchgeführt (siehe 3.5).

Abb. 15: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus* und der entsprechenden Hitzekontrolle [Nach Abb. 2, Roigas et al., 2022 (203)]. Der Lysatüberstand (50 μ l) der rekombinanten Expression der vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus* wurde im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 3 min inkubiert und die dabei entstandenen ALOX-Produkte (konjugierte Diene) wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. **A)** nativer Lysatüberstand, **B)** Hitze-inaktivierter Lysatüberstand (2 min Inkubation des Lysatüberstandes bei 95 °C). Für beide Chromatogramme wurde die Y-Achse auf die Höhe des 12-HETE Peaks der Inkubation mit dem nativen Lysatüberstand normiert. Die Messung der AA-Aktivität des Hitze-inaktivierten Lysatüberstandes im Vergleich zum nativen Lysatüberstand wurde nur einmal durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die identifizierten AA Oxygenierungsprodukte enzymatischen Ursprungs waren, erfolgte eine Hitzekontrolle. Dabei wurde der als Enzymquelle verwendete bakterielle Lysatüberstand für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die dabei stattfindende Hitzedenaturierung der Proteine führt zu einem Aktivitätsverlust der vermeintlichen ALOX15, sodass die Produktbildung nicht mehr nachweisbar sein sollte. Diese Schlussfolgerung konnte experimentell bestätigt werden (Abb. 15B) (203). Somit

konnte nachgewiesen werden, dass die 12-HETE Bildung das Resultat einer enzymatischen Reaktion war. Nicht-enzymatische Oxygenierungsprozesse konnten damit als Ursache für die 12-HETE Bildung ausgeschlossen werden.

Vergleicht man das RP-HPLC Chromatogramm der Nicht-Enzymkontrolle (Abb. 16A) mit dem Inkubationsansatz, bei dem der Lysatüberstand der bakteriellen Expression der vermeintlichen ALOX15 des *N. furzeri* eingesetzt wurde, wird deutlich, dass auch hier die Bildung von 12-HETE durch das Enzym nachweisbar war (Abb. 16). Allerdings waren die gebildeten 12-HETE Mengen deutlich geringer als beim Enzym aus *S. formosus* (Abb. 14B).

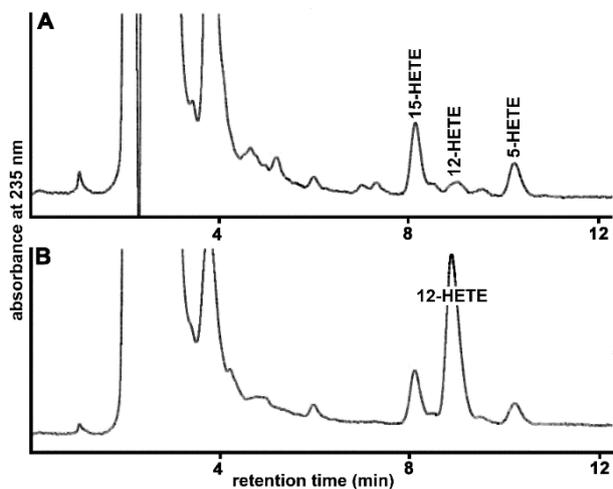


Abb. 16: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri* und der entsprechenden Nicht-Enzymkontrolle. Der Lysatüberstand (50 μ l) der Expression der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri* wurde im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 10 min inkubiert und die dabei entstandenen ALOX-Produkte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. **A)** Nicht-Enzymkontrolle, **B)** nativer Lysatüberstand. Für beide Chromatogramme wurde die Y-Achse auf die Höhe des 12-HETE Peaks der Inkubation mit dem nativen Lysatüberstand normiert. Ein repräsentatives Chromatogramm (4 unabhängige Expressionsversuche) ist gezeigt.

Deshalb musste die y-Achse des Chromatogramms stärker gespreizt werden, wodurch die Autoxidationsprodukte der AA Oxygenierung, die bereits in der AA-Substratlösung vorhanden waren (Abb. 16A), deutlicher hervortraten. Trotzdem war der 12-HETE Peak bei der Inkubation mit dem Lysatüberstand (Abb. 16B) deutlich größer als bei der Nicht-Enzymkontrolle (Abb. 16A).

Ähnliche Chromatogramme wurden erhalten, wenn der bakterielle Lysatüberstand der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* zur AA Oxygenierung eingesetzt wurde. Auch hier war 12-HETE das dominante AA Oxygenierungsprodukt, aber auch hier waren die gebildeten Produktmengen eher gering (Abb. 17).

Fasst man die Ergebnisse zur Expression der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische in *E. coli* zusammen und setzt voraus, dass sich die spezifischen katalytischen Aktivitäten der drei Enzyme nicht wesentlich voneinander unterscheiden sollten, kann geschlussfolgert werden, dass das vermeintliche ALOX15-Orthologe von *S. formosus* in *E. coli* auf hohem Niveau exprimiert wird. Im Gegensatz dazu waren die Expressionshöhen der entsprechenden Enzyme von *N. furzeri* und

P. nyererei deutlich geringer. Die bakteriell exprimierten Enzyme der letztgenannten Knochenfischarten können damit zwar für einfache Experimente zur Enzymcharakterisierung verwendet werden. Für die Beschreibung komplexerer Enzymeigenschaften, wie z.B. die Membranoxygenaseaktivitäten sind diese geringen Enzymmengen jedoch nicht ausreichend. Dafür werden größere Enzymmengen benötigt, die mit dem verwendeten bakteriellen Expressionssystem offensichtlich nicht erreicht werden können.

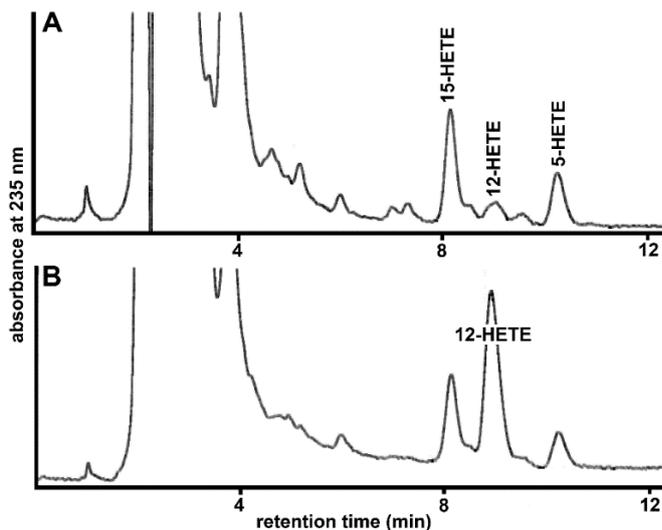


Abb. 17: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* und der entsprechenden Nicht-Enzymkontrolle. Der Lysatüberstand (50 μ l) der Expression der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* wurde im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 10 min inkubiert und die dabei entstandenen ALOX-Produkte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. **A)** Nicht-Enzymkontrolle, **B)** nativer Lysatüberstand. Für beide Chromatogramme wurde die Y-Achse auf die Höhe des 12-HETE Peaks der Inkubation mit dem nativen Lysatüberstand normiert. Ein repräsentatives Chromatogramm (6 unabhängige Expressionsversuche) ist gezeigt.

Zusammenfassung: Die drei vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische konnten als katalytisch aktive rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden. Allerdings waren die Expressionshöhen der Enzyme aus *N. furzeri* und *P. nyererei* verglichen mit anderen ALOX-Isoformen zu gering, um eine tiefgreifende Charakterisierung ihrer katalytischen Eigenschaften durchzuführen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit versucht, diese Enzyme in Sf9-Insektenzellen zu exprimieren.

3.3.2 Enzymatische Grundcharakterisierung der rekombinanten Enzyme

3.3.2.1 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymaktivität

Obwohl die Expressionsniveaus der ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* relativ gering waren, eigneten sich die rekombinanten Enzympräparationen für die Bestimmung einfacher Enzymeigenschaften, wie Temperaturabhängigkeit, pH-Abhängigkeit oder K_M -Wert Bestimmungen.

Die Temperaturabhängigkeit einer enzymatischen Reaktion ergibt sich aus mindestens zwei gegenläufigen Prozessen: i) Entsprechend der Stoßtheorie laufen die

meisten chemischen Reaktionen bei höheren Temperaturen mit erhöhten Reaktionsgeschwindigkeiten ab. Die RGT-Regel (auch Van't Hoff'sche Regel genannt) besagt, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion in etwa verdoppelt bzw. verdreifacht, wenn die Temperatur um 10 K erhöht wird. Der sogenannte Q_{10} -Wert vieler chemischer Reaktionen, also der Wert für die Beschleunigung der Reaktion bei einer Erhöhung der Temperatur um 10 K, liegt damit zwischen 2 und 3. Diese Regel gilt prinzipiell auch für Enzym-katalysierte Reaktionen, wobei hierbei eine wichtige Einschränkung besteht. ii) Da Enzyme Eiweiße sind und sich die Struktur von Eiweißen bei Temperaturerhöhungen über 40 °C in den meisten Fällen deutlich verändert (Hitzenaturierung), sinkt die katalytische Effizienz dieser Biokatalysatoren bei höheren Temperaturen. Dadurch kommt es bei Temperaturen von über 40 °C bei vielen enzymatischen Reaktionen zu einem Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit. Thermophile Organismen besitzen häufig Enzyme, die hitzestabil sind. Diese Proteine zeigen selbst bei Temperaturen von bis zu 90 °C nur geringe Anzeichen einer Hitzenaturierung. Bei Enzymen von homoiothermen Organismen (Organismen mit konstanter Körpertemperatur) liegen die Temperaturoptima der Enzyme häufig (aber nicht immer) in der Nähe der konstant gehaltenen Körpertemperatur. Da Knochenfische überwiegend die Temperatur ihrer Umgebung annehmen (poikilotherme Organismen) und diese relativ großen Schwankungen unterliegen kann, könnten sich die Temperaturoptima der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische von denen der Säugetiere (Mensch, Maus) deutlich unterscheiden.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Fettsäureoxygenierung durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische experimentell zu untersuchen, wurden Aliquots der Lysatüberstände für 3 Minuten bei Temperaturen im Bereich von 5 bis 45 °C mit Arachidonsäure inkubiert und die Menge an gebildeten AA Oxygenierungsprodukten mittels RP-HPLC analysiert. Mit dieser Versuchsstrategie konnte für jedes Enzym diejenige Temperatur ermittelt werden, bei der das Enzym die größte Menge an Reaktionsprodukten in der definierten Reaktionszeit bildete, also die höchste katalytische Aktivität aufwies. Für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *S. formosus* beträgt diese Temperatur 30 °C, während sie für die vermeintliche *P. nyererei*-ALOX15 bei 20 °C liegt (Abb. 18) (203).

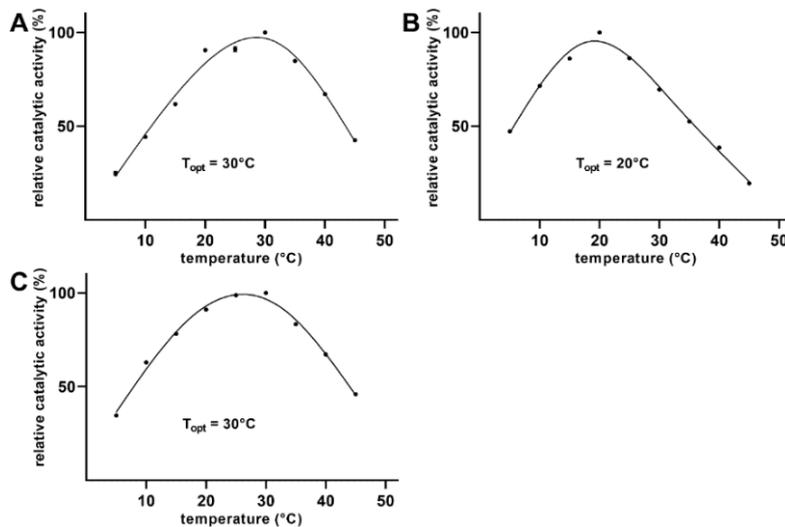


Abb. 18: Temperaturabhängigkeit der AA Oxygenierung der ALOX-Isoformen von Knochenfischen [Nach Abb. 4, Roigas et al., 2022 (203)]. Der Lysatüberstand der Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der drei ausgewählten Knochenfische wurde bei verschiedenen Temperaturen im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 3 min inkubiert und die dabei entstandenen primären ALOX-Produkte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. Die AA Oxygenaseaktivität beim Temperaturoptimum wurde 100 % gesetzt und die relativen AA

Oxygenase-Aktivitäten bei den anderen Temperaturen wurden berechnet. Bei jeder Temperatur wurden zwei unabhängige Messungen vorgenommen. Die Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert sind so gering, dass sie in der Abbildung hinter den Mittelwertsymbolen nicht erkennbar sind. **A)** *N. furzeri*, **B)** *P. nyererei*, **C)** *S. formosus*.

Aus der Temperaturabhängigkeit einer chemischen Reaktion lässt sich nach der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie berechnen.

$$k = A \times e^{-E_a/RT}$$

Dabei steht k für die Geschwindigkeitskonstante der chemischen Reaktion, E_a für die Aktivierungsenergie ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$) und R für die allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$). T ist die absolute Temperatur, angegeben in Grad Kelvin (K). A ist der präexponentielle oder Frequenzfaktor, der sich aus der Stoßtheorie ergibt. Stellt man die Formel nach der Aktivierungsenergie um, kann man aus dem Anstieg der Geraden des Arrhenius-Diagramms (Auftragung von $\ln v$ gegen den Kehrwert der absoluten Temperatur) den numerischen Wert der Aktivierungsenergie graphisch ermitteln. Dabei muss allerdings darauf geachtet werden, dass für die Ermittlung der Aktivierungsenergie nur die Reaktionstemperaturen verwendet werden dürfen, bei denen die Hitzedenaturierung der Enzyme vernachlässigt werden kann. Dies war lediglich im Temperaturbereich zwischen 5 und 20 °C der Fall. In Abb. 19 sind die Arrhenius-Diagramme für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische dargestellt. Alle drei Enzyme folgten der Arrhenius-Gleichung mit Korrelationskoeffizienten (R^2) von $>0,9$ (R^2 für *N. furzeri* = 0,9859, R^2 für *P. nyererei* = 0,9451, R^2 für *S. formosus* = 0,9080). Folgende Aktivierungsenergien wurden dabei errechnet: 57 kJ/mol für die vermeintliche ALOX15 von *N. furzeri*, 33 kJ/mol für die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* und 42 kJ/mol für die vermeintliche ALOX15 von

S. formosus (203). Diese Werte sind größer als die Aktivierungsenergien, die für die Sojabohnen-LOX1 (204) sowie für die quasi-LOX Aktivität von Hämoglobin (205) ermittelt wurden. Die für die ALOX-Isoform von *Pseudomonas aeruginosa* (206) bestimmte Aktivierungsenergie von 33,8 kJ/mol ist vergleichbar mit der der ALOX-Isoform von *P. nyererei*, während die rekombinant exprimierte ALOX15 des Gorillas (30) eine ähnlich hohe Aktivierungsenergie (53,6 kJ/mol) wie die ALOX-Isoform von *N. furzeri* aufweist.

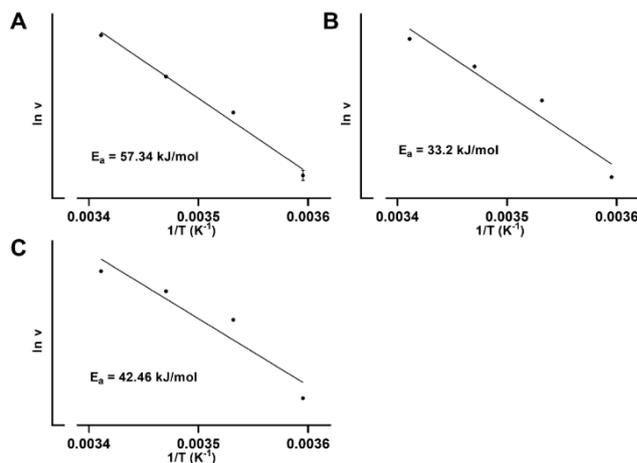


Abb. 19: Arrhenius-Diagramm zur Ermittlung der Aktivierungsenergie der ALOX-Isoformen der ausgewählten Knochenfische [Nach Abb. 5, Roigas et al., 2022 (203)]. Die Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivitäten der Enzyme wurde wie in Abb. 18 beschrieben bestimmt. Die numerischen Aktivitätswerte im Temperaturbereich zwischen 5 und 20 °C wurden für das Arrhenius-Diagramm verwendet. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Doppelbestimmung, sodass die Aktivierungsenergie für jedes Enzym auf der Basis von 8 Messwerten berechnet wurde. Die Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert sind so gering, dass sie in der

Abbildung hinter den Mittelwertsymbolen nicht erkennbar sind. **A)** *N. furzeri*, **B)** *P. nyererei*, **C)** *S. formosus*.

Zusammenfassung: Für die rekombinanten Proteine aller vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische konnten die Temperaturoptima und die Aktivierungsenergien der AA Oxygenierung bestimmt werden. Die berechneten Aktivierungsenergien lagen im Bereich der entsprechenden Werte anderer ALOX-Isoformen.

3.3.2.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Auch der pH-Wert wirkt sich auf die katalytische Aktivität von ALOX-Isoformen aus. Dabei muss beachtet werden, dass Veränderungen im pH-Wert zum einen die Struktur der Enzyme verändern können, zum anderen sich aber auch auf den physikochemischen Zustand des Substrates auswirken. Dies ist besonders für Enzyme relevant, deren Substrate schlecht wasserlösliche Lipide darstellen.

Veränderungen im pH-Wert beeinflussen den Dissoziationszustand der funktionellen Gruppen von Aminosäuren und führen letztlich dazu, dass bestimmte Bindungen (vor allem Ionenbeziehungen und Wasserstoffbrückenbindungen) umgelagert werden, wobei sich subtile Veränderungen in der Enzymstruktur ergeben können. Diese Strukturveränderungen können sich in Aktivitätsänderungen niederschlagen. Bei pH-

Veränderungen um den Neutralpunkt (pH = 7,0) verändert sich vor allem der Dissoziationszustand der Aminosäure His, da der pKa-Wert der Imidazolgruppe bei 6,0 liegt. Das bedeutet, dass bei einem pH-Wert von 6,0 die Imidazolgruppe zur Hälfte protoniert (positiv geladen) und zur anderen Hälfte nicht-protoniert (ungeladen) vorliegt. Steigt der pH-Wert auf 7,0 an, so liegen protoniertes Imidazol und nicht-protoniertes Imidazol in einem Verhältnis von 1:9 vor. Da die Imidazolgruppe des His in Abhängigkeit von ihrem Dissoziationsgrad bei der Ausbildung von Ionenbeziehungen und Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein kann, ist sein Dissoziationsgrad von großer struktureller Bedeutung.

Für den Aktivitätstest von Lipoxygenasen wirken sich Veränderungen im pH-Wert auch auf den Dissoziationsgrad der Carboxylgruppe der Substratfettsäuren aus. Diese kann in Abhängigkeit vom pH-Wert entweder als negativ geladene COO⁻-Gruppe oder als ungeladene COOH-Gruppe vorliegen. Damit verändert sich in Abhängigkeit vom pH-Wert zum einen die Wasserlöslichkeit der Substratfettsäure, zum anderen aber auch die Bindungsstärke des Substrates am aktiven Zentrum des Enzyms. Welchen relativen Anteil diese beiden Prozesse an den zu messenden Aktivitätsveränderungen der Enzyme haben, lässt sich jedoch nur schwer abschätzen.

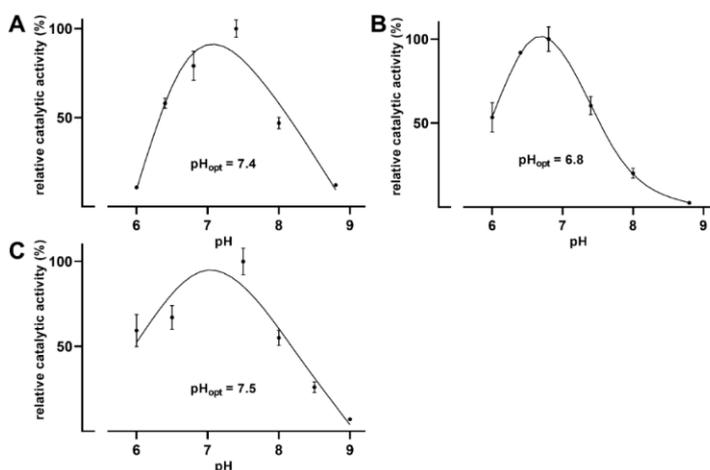


Abb. 20: Abhängigkeit der AA Oxygenierung der Knochenfisch ALOX-Isoformen vom pH-Wert [Nach Abb. 6, Roigas et al., 2022 (203)]. Der Lysatüberstand der Expression der Knochenfisch ALOX-Isoformen wurde bei verschiedenen pH-Werten im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 3 min inkubiert und die dabei entstandenen ALOX-Produkte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. Die AA Oxygenaseaktivität beim pH-Optimum wurde 100% gesetzt. Bei jedem pH-Wert wurden 2 unabhängige Messungen vorgenommen. **A)** *N. furzeri*, **B)** *P. nyererei*, **C)** *S. formosus*.

Um die pH-Abhängigkeit der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische zu untersuchen, wurden die ALOX-Präparationen (Lysatüberstände der bakteriellen Expression) bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 6,0 bis 9,0 für 3 Minuten mit Arachidonsäure inkubiert und die Menge an gebildeten Produkten mittels RP-HPLC analysiert. Ähnlich wie bei den Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit konnte für jedes Enzym derjenige pH-Wert ermittelt werden,

bei dem die größte Produktmenge gebildet wurde (pH-Optimum). Dieser Wert liegt für alle ausgewählten Enzyme im nahen physiologischen Bereich (7,4 für die vermeintliche ALOX15 von *N. furzeri*, 6,8 für die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei*, 7,5 für die vermeintliche ALOX15 von *S. formosus* (Abb. 20) (203). Dieses Verhalten ist vergleichbar mit dem anderer ALOX-Isoformen, wie dem der humanen ALOX15, für die ein pH-Optimum von 7,0 bestimmt werden konnte (195).

Zusammenfassung: Für die rekombinanten Proteine aller vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische konnte derjenige pH-Wert ermittelt werden, bei dem die höchsten katalytischen Aktivitäten nachweisbar waren. Die pH-Optima aller ausgewählten Enzyme liegen im nahen physiologischen Bereich.

3.3.2.3 *Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität*

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer katalytischen Reaktion ist von der Substratkonzentration abhängig, wobei fast immer Sättigungskinetiken beobachtet werden. Das bedeutet, dass bei geringen Substratkonzentrationen eine erhöhte Substratkonzentration zu einem deutlicheren Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit führt als das vergleichsweise bei hohen Substratkonzentrationen der Fall ist. Dieses Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass bei geringen Substratkonzentrationen das Enzym noch nicht mit Substrat gesättigt ist. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führt dazu, dass mehr Substrat für die Enzymbindung zur Verfügung steht und dass dadurch das Substrat effektiver umgesetzt werden kann. Bei hohen Substratkonzentrationen ist das Enzym jedoch zunehmend mit Substrat gesättigt, sodass eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr zur Erhöhung des Sättigungsgrades des Enzyms führt. Dadurch kann auch bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr Substrat ans Enzym gebunden werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt damit auch bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration im Messansatz unbeeinflusst. Die Reaktionsgeschwindigkeit, die bei maximaler Substratsättigung eines Enzyms (bei einer definierten Enzymkonzentration) erreicht werden kann, nennt man Maximalgeschwindigkeit (V_{max}). Die Substratkonzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht wird, bezeichnet man als Michaelis-Menten-Konstante (K_M -Wert). Dieser Wert ist ein Maß für die Substrataffinität eines Enzyms und gibt an, bei welcher Substratkonzentration die Hälfte des vorhandenen Enzyms mit Substrat gesättigt vorliegt. Ist dieser Wert hoch, besitzt das Enzym eine niedrige Substrataffinität. Ist dieser Wert niedrig, bindet das Enzym das Substrat mit hoher Affinität.

Um die Substrataffinitäten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische zu quantifizieren, wurden die Lysatüberstände der rekombinant exprimierten Enzyme für 3 Minuten mit Arachidonsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen (Konzentrationsbereich zwischen 5 und 120 μM) inkubiert und die Menge der gebildeten Produkte mittels RP-HPLC quantifiziert. Die K_M -Werte für das Fettsäuresubstrat Arachidonsäure wurden aus den gemessenen Aktivitätsdaten mittels nicht linearer Regressionsanalyse der Michaelis-Menten-Diagramme (Abb. 21) berechnet.

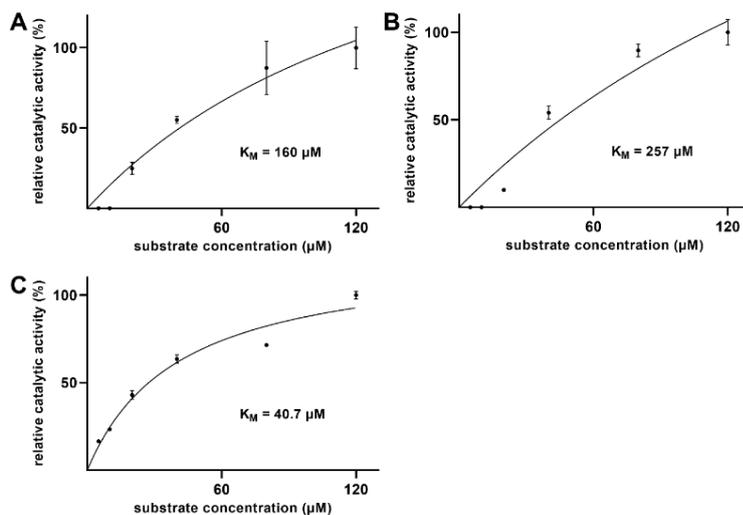


Abb. 21: Michaelis-Menten-Plots der AA Oxygenierung durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen. Der Lysatüberstand der Expression der Knochenfisch ALOX-Isoformen wurde bei verschiedenen AA-Konzentrationen (5–120 μM) im AA Oxygenase-Aktivitätsassay (Material und Methoden) für 3 min inkubiert. Die gebildeten ALOX-Produkte wurden mittels RP-HPLC quantifiziert. Bei jeder Substratkonzentration wurden zwei voneinander unabhängige Messungen vorgenommen. Bei einigen Messungen sind die Fehlerbalken so klein, dass sie hinter den Mittelwertsymbolen nicht erkennbar sind. Der Mittelwert der AA

Oxygenaseaktivität bei der höchsten Substratkonzentration wurde 100% gesetzt. **A)** *N. furzeri*, **B)** *P. nyererei*, **C)** *S. formosus*.

Die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* weisen K_M -Werte auf (160 μM für das Enzym aus *N. furzeri* und 257 μM für das Enzym aus *P. nyererei*), die höher als 100 μM waren. Verglichen mit anderen ALOX-Isoformen zeichnen sich diese Enzyme damit durch eine geringe Bindungsaffinität für AA aus. So weist die rekombinant exprimierte humane ALOX15 einen K_M -Wert von nur 12 μM für AA auf (195). Allerdings wurde zur kinetischen Charakterisierung dieses Enzyms 0,2 % Natriumcholat als Lösungsvermittler für das Substrat verwendet, was bei den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen nicht der Fall war. Auch die native ALOX15 des Kaninchens weist einen deutlich geringeren K_M -Wert für LA unter Zugabe von 0,2 % Natriumcholat auf (207). Im Gegensatz dazu wurde für die rekombinante ALOX15 des Gorillas ohne Zugabe von Detergenzien ein K_M -Wert von 130 μM bestimmt (30), der somit mehr im Bereich der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen lag.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die in unseren Experimenten eingesetzten AA-Konzentrationen (120 μM) nicht ausreichen, um Sättigungsbedingungen für diese Enzyme zu erreichen. Die vermeintliche ALOX15 von *S. formosus* zeigte einen deutlich niedrigeren K_M -Wert ($K_M = 40,7 \mu\text{M}$), sodass die Substrataffinität dieses Enzyms deutlich höher lag, als die der anderen beiden Enzyme.

Zusammenfassung: Die K_M -Werte der Enzyme aus *N. furzeri* und *P. nyererei* lagen deutlich über den Werten, die für verschiedene Säugetier ALOX15-Orthologe bestimmt wurden und diese Daten deuten auf eine vergleichsweise geringe Affinität der entsprechenden Enzyme zur AA hin. Die Affinität des Enzyms aus *S. formosus* zur AA ist jedoch deutlich höher, was sich in einem niedrigeren K_M -Wert widerspiegelt.

3.4 Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen im eukaryotischen System

3.4.1 Enzymexpression in Sf9-Insektenzellen

Da die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* nur auf geringem Niveau in *E. coli* exprimiert wurden und dieses Expressionsniveau nicht für eine umfassendere Charakterisierung der Enzyme ausreichte, erfolgte eine Expression im eukaryotischen Sf9-Zellsystem (198). Hierfür war zunächst die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus-Shuttle-Vektors (Bacmid) erforderlich, der sowohl in *E. coli* als auch in Insektenzellen amplifiziert werden kann. Um solche Bacmide herzustellen, wurden die kodierenden Sequenzen der N-terminalen His-tag Fusionsproteine der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen in den pFastBacTMHT C Transfervektor inkloniert. Anschließend wurde dieser rekombinante Transfervektor in kompetente *E. coli* Zellen transformiert, die ein Leerbacmid enthalten. Die transformierten Zellen produzierten dabei das rekombinante Bacmid, welches anschließend in Sf9-Zellen (immortalisierte Insekten-Zelllinie von *Spodoptera frugiperda*) transfiziert werden konnte.

Nach zwei Virusamplifikationen in Sf9-Zellen erfolgte dann die Expression der ALOX15-Orthologen als N-terminale His-tag Fusionsproteine. Die Sf9-Zellen wurden mittels Ultraschall lysiert und das Lysat zentrifugiert, sodass der Überstand als Enzymquelle genutzt werden konnte. Dieser wurde wie nach bakterieller Expression mit Arachidonsäure inkubiert, um die katalytische Aktivität der rekombinanten Enzyme im Vergleich zu einer Nicht-Enzymkontrolle zu überprüfen. Es erfolgte gleichermaßen die Analyse der Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC (siehe 3.4.3).

Um das Expressionsniveau der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde auch die *S. formosus*-ALOX15, die im *E. coli* System bereits auf hohem Niveau exprimiert wurde, in Sf9-Zellen exprimiert. AA Oxygenase-Aktivitätsassays zeigten, dass das eukaryotisch exprimierte Enzym katalytisch aktiv war. Entsprechende Chromatogramme sind hier nicht dargestellt, da diese Enzympräparation nicht für Untersuchungen zur enzymatischen und proteinchemischen Charakterisierung genutzt wurde, sondern nur für den Vergleich der Expressionsniveaus im Sf9-Zellsystem. Auch für die Expression einiger Enzymmutanten wurde dieses eukaryotische Expressionssystem verwendet.

3.4.2 Nachweis der Expression der rekombinanten Fusionsproteine im Western Blot

Um herauszufinden, ob die rekombinanten His-tag Fusionsproteine in Sf9-Zellen exprimiert wurden und um das Expressionsniveau zu quantifizieren, wurde zunächst versucht, die im Lysatüberstand der Insektenzellen vorhandenen Fusionsproteine mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers im Western Blot nachzuweisen. Dazu wurde ein kommerzieller Anti-His-tag-Antikörper verwendet, der spezifisch an die Polyhistidin-Sequenz der rekombinanten Fusionsproteine bindet. Der Antikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert, die ein angebotenes Substrat in ein fluoreszierendes Produkt umwandelt. Dieses Produkt emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm, was mit einem Photoimager quantifiziert werden kann. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei proportional zur Menge des aufgetragenen ALOX-Proteins, sodass mit Hilfe eines gereinigten Referenzproteins (N-terminales His-tag Fusionsprotein der ALOX aus *Myxococcus fulvus*) die Menge an aufgetragener rekombinanter Knochenfisch-ALOX15 abgeschätzt werden kann. Unter Berücksichtigung des Auftragsvolumens und des Verdünnungsfaktors kann aus diesen Daten die Menge an ALOX-Fusionsprotein ermittelt werden, die in 1L Expressionskultur exprimiert wurde.

In Abbildung 22 ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt. In Panel A wird gezeigt, dass bei der Auftragung von 500 ng Protein der gereinigten ALOX-Isoform aus *M. fulvus* eine einzelne immunreaktive Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa sichtbar ist (lane 1). Dieser Molekulargewichtsbereich entspricht dem Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins. Wurden 250 ng dieses Referenzproteins aufgetragen, war eine ähnliche immunreaktive Bande nachweisbar, deren Intensität jedoch deutlich geringer war (lane 2). Durch diese Eichprozedur war es möglich, den Gehalt an His-tag Fusionsprotein im Lysatüberstand einer unbekannt

Analyseprobe abzuschätzen. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Reaktivität des Anti-His-tag Antikörpers mit dem His-tag der *M. fulvus* ALOX ähnlich ist, wie mit dem His-tag der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen. Da diese Ähnlichkeit zwar erwartet werden kann, aber nur schwer überprüfbar ist, müssen diese Abschätzungen der Expressionsniveaus mit Vorsicht interpretiert werden.

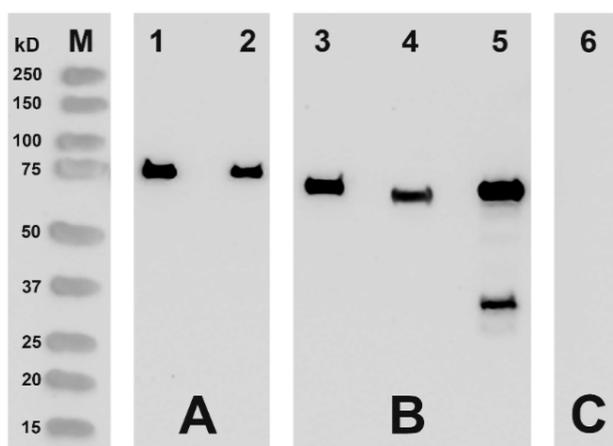


Abb. 22: Western Blot-Analysen der im Sf9-Zellsystem exprimierten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen [Roigas et al., 2022 (198)]. Für diese Analysen wurden Aliquots der Lysatüberstände der Sf9 Expressionsansätze aufgetragen und die rekombinanten His-tag Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers spezifisch angefärbt. M = Molekulargewichtsmarker **A)** Eichung des Analysesystems: Zu diesem Zweck wurden bekannte Mengen (lane 1 - 500 ng, lane 2 - 250 ng) des gereinigten N-terminalen Fusionsproteins der ALOX-Isoform von *M. fulvus* aufgetragen. **B)** Analyse der Expression der Knochenfisch ALOX-Isoformen: lane 3 -

Lysatüberstand der vermeintlichen *N. furzeri*-ALOX15 (100 µg Gesamtlisatprotein in 4,4 µl), lane 4 - Lysatüberstand der vermeintlichen *P. nyererei*-ALOX15 (100 µg Gesamtlisatprotein in 9,5 µl), lane 5 - Lysatüberstand der vermeintlichen *S. formosus*-ALOX15 (99 µg Gesamtlisatprotein in 11 µl). **C)** Lysatüberstand (100 µg Gesamtlisatprotein in 4 µl) einer Kontrolleexpression mit einem Leerbacmid (lane 6).

In Abbildung 22B wurden jeweils 100 µg Gesamtlisatprotein der Lysatüberstände der rekombinanten Expression (Sf9-Zellen) der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* (lane 3), *P. nyererei* (lane 4) und *S. formosus* (lane 5) aufgetragen. Aus dieser Abbildung ist zu ersehen, dass in den Lysatüberständen aller drei Expressionsansätze signifikante Mengen eines His-tag Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa nachgewiesen werden konnten. Diese Daten deuten darauf hin, dass alle drei vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische in diesem eukaryotischen Expressionssystem gut exprimiert werden konnten (198).

In Abbildung 22C (lane 6) wurde ein Aliquot eines Lysatüberstandes aufgetragen, bei dem die Sf9-Zellen mit einem nicht-rekombinanten Bacmid transfiziert worden waren. In diesem Kontrolleexperiment konnte wie erwartet keine immunreaktive Bande nachgewiesen werden. Aus der quantitativen Auswertung der Bandenintensitäten konnte geschlussfolgert werden, dass die vermeintliche ALOX15 aus *N. furzeri* mit 4,7 mg ALOX-Protein pro Liter Fermentationsansatz am besten exprimiert wurde. Für die anderen ALOX-Isoformen wurden geringere Expressionshöhen beobachtet (198).

Interessanter Weise unterschieden sich die experimentell bestimmten Molekulargewichte der rekombinanten Proteine geringfügig voneinander. Das rekombinante Fusionsprotein von *P. nyererei* (lane 4) wandert in der SDS-PAGE etwas weiter als die Fusionsproteine der anderen beiden Knochenfische und diese Daten deuten auf ein etwas geringeres Molekulargewicht dieser ALOX-Isoform hin. Ein Vergleich der theoretischen Molekulargewichte der drei Fusionsproteine zeigte jedoch erwartungsgemäß keine deutlichen Molekulargewichtsunterschiede (Tab. 6).

Tab. 6: Quantifizierung der eukaryotischen Expression der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen in Sf9-Zellen und theoretische Molekulargewichte der rekombinanten Fusionsproteine [Roigas et al., 2022 (198)]. Aus der Quantifizierung des obigen Western Blots konnte errechnet werden, welche Menge an rekombinanten Fusionsproteinen sich in einem bestimmten Volumen an Lysatüberstand befindet. Diese wurde dann auf 1 L Expressionskultur hochgerechnet.

Spezies	LOX-Protein (mg)/L Expressionskultur	theoretische Molekulargewichte der rekombinanten Fusionsproteine (kDa)
<i>N. furzeri</i>	4,7	81,12
<i>P. nyererei</i>	1,2	81,25
<i>S. formosus</i>	2,8	80,85

Obwohl in der SDS-PAGE Proteine vor allem nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, kommt es nicht selten vor, dass Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht geringgradig unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen. Das kann z.B. auf einen unterschiedlichen Grad der SDS-Beladung der denaturierten Proteine zurückzuführen sein.

Zusammenfassung: Die ausgewählten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische wurden in Sf9-Zellen als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine exprimiert, wobei Expressionsniveaus zwischen 1,2 und 4,7 mg Fusionsprotein pro Liter Suspensionskultur erreicht wurden.

3.4.3 Nachweis der Expression der rekombinanten Fusionsproteine mittels

Aktivitätsassays

Aus den Western Blot-Analysen konnte geschlussfolgert werden, dass alle vermeintlichen ALOX15-Fusionsproteine in Sf9-Zellen gut exprimiert wurden. Es blieb aber unklar, ob es sich dabei um katalytisch aktive Enzyme oder um denaturierte Proteine handelt, deren katalytische Aktivitäten während der Expression verloren gegangen waren. Um diese Frage zu beantworten, wurden *in vitro* Aktivitätsassays mit den Lysatüberständen als Enzymquelle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden wie bei den

Aktivitätsassays der bakteriell exprimierten ALOX-Isoformen verschiedene Mengen des Lysatüberstandes der Sf9-Zellen in 0,5 ml PBS mit 165 μ M Arachidonsäure für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten ALOX-Produkte mittels RP-HPLC analysiert. Aus den Chromatogrammen, die in Abbildung 23 und 24 dargestellt sind, ist erkennbar, dass während der Inkubation des eukaryotisch exprimierten Enzyms von *N. furzeri* (Abb. 23) und *P. nyererei* (Abb. 24) 12-HETE als dominantes Oxygenierungsprodukt gebildet wurde (203).

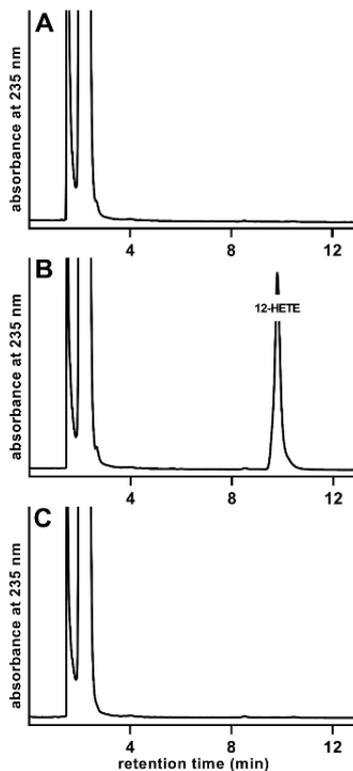
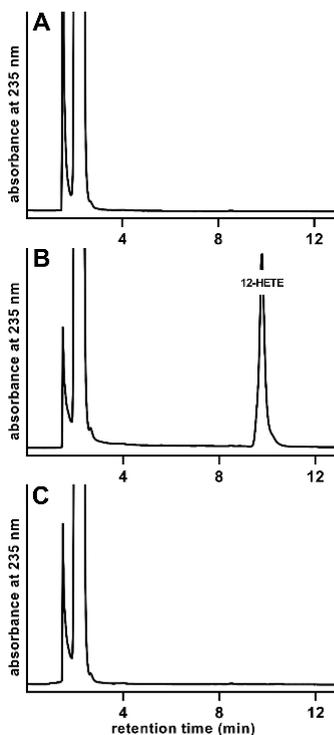


Abb. 23: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierte vermeintliche ALOX15 von *N. furzeri* gebildet wurden [Nach Abb. 2, Roigas et al., 2022 (203)]. **A)** Nicht-Enzymkontrolle: Hierbei wurde dem Aktivitätsassay 10 μ l PBS anstatt 10 μ l Lysatüberstand zugesetzt. **B)** Produktbildung nach Zugabe von 10 μ l des 1:10 verdünnten Lysatüberstandes der eukaryotischen Expression der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri*. **C)** Hitzekontrolle: Hierbei wurden dem Aktivitätsassay 10 μ l eines Hitze-inaktivierten (2 min bei 95 °C) Lysatüberstandes zugesetzt. Dabei wurde ähnlich wie bei der Nicht-Enzymkontrolle (Abb. 23A) kein 12-HETE gebildet.

Im Gegensatz dazu war dieses Produkt weder bei den Nicht-Enzymkontrollen (Zusatz von PBS anstatt des Lysatüberstandes zum Aktivitätsassay, Abb. 23A + 24A) noch bei den Hitzekontrollen (Zusatz von Hitze-



inaktiviertem Lysatüberstand zum Aktivitätsassay, Abb. 23C + 24C) nachweisbar (203). Die in Abbildung 23 + 24 dargestellten Chromatogramme belegen, dass die in Sf9-Zellen exprimierten ALOX-Isoformen aus *N. furzeri* und *P. nyererei* katalytisch aktiv waren und dass das Hauptprodukt der AA Oxygenierung durch diese Enzyme 12-HETE ist. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, die in vorherigen Experimenten mit den in *E. coli* exprimierten Enzymen erhalten wurden (Abb. 16 + 17).

Abb. 24: RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierte ALOX-Isoform aus *P. nyererei* gebildet wurden [Nach Abb. 2, Roigas et al., 2022 (203)]. **A)** Nicht-Enzymkontrolle: Hierbei wurde dem Aktivitätsassay 5 μ l PBS zugesetzt. **B)** Produktbildung nach Zugabe von 5 μ l des Lysatüberstandes der eukaryotischen Expression der ALOX-Isoform von *P. nyererei*. **C)** Hitzekontrolle: Hierbei wurden dem Aktivitätsassay 5 μ l eines Hitze-inaktivierten (2 min bei 95 °C) Lysatüberstandes zugesetzt. Dabei wurde ähnlich wie bei der Nicht-Enzymkontrolle (Abb. 24A) kein 12-HETE gebildet.

Eine genauere Analyse der Form des 12-HETE Peaks beider Analysen deutete jedoch auch hier darauf hin, dass die 12-HETE Peaks unsymmetrisch und damit inhomogen aussahen. So konnte vor allem beim 12-HETE Peak der *N. furzeri* Inkubation eine Frontschulter beobachtet werden. Beim 12-HETE Peak, der bei der Inkubation der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* entstanden war, konnte diese Frontschulter ebenfalls gelegentlich nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass neben 12-HETE noch andere HETE-Isomere gebildet wurden, die in dem verwendeten chromatographischen System nicht sicher vom 12-HETE abzutrennen waren. Um die chemische Identität dieser Reaktionsprodukte und deren relativen Anteil an der Gesamtproduktbildung zu ermitteln, musste eine detailliertere Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgen. Diese Analysen werden im Kapitel 3.6 der vorliegenden Arbeit genauer beschrieben.

Zusammenfassung: Die ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* werden als katalytisch aktive Proteine in Sf9-Zellen exprimiert und 12-HETE konnte als Hauptprodukt der AA Oxygenierung nachgewiesen werden.

3.5 Proteinanreicherung mit Ni-NTA-Agarose

Um zu versuchen, die rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen der Knochenfische zu konzentrieren und gleichzeitig aufzureinigen, wurde zunächst eine Affinitätschromatographie der His-tag Fusionsproteine an Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Dazu wurden sowohl die rekombinanten Knochenfisch ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei*, die im Sf9-Zellsystem exprimiert wurden (siehe 3.4.1), als auch das Enzym aus *S. formosus*, welches in *E. coli* exprimiert wurde, eingesetzt. Voraussetzung für diese Art der Proteinanreicherung ist das Vorhandensein des Hexahistidin-tags. Dieses Strukturmotiv bindet mit hoher Affinität an zweiwertige Nickel-Ionen, welche über einen NTA-Spacer an Agarosepartikel gekoppelt sind (siehe 2.2.4). Mittels eines Puffers mit einer Imidazolkonzentration von 200 mM können die rekombinanten His-tag Fusionsproteine in konsekutiven Elutionsfraktionen (E1-E5) von der chromatographischen Matrix eluiert werden. Anschließend wurden Aliquots der Elutionsfraktionen in der SDS-PAGE analysiert. Dabei konnte für jedes Enzym mittels Coomassie-Färbung eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa identifiziert werden (Abb. 25A, B und C). Da die Proteinfärbung durch Coomassie unspezifisch ist (alle Proteine werden mit dieser Methode angefärbt), sollte mittels Anti-

His-tag-Antikörper im Western Blot überprüft werden, ob es sich bei den dominanten Proteinbanden in den Elutionsfraktionen um die rekombinanten His-tag Fusionsproteine der ALOX15-Isoformen handelt.

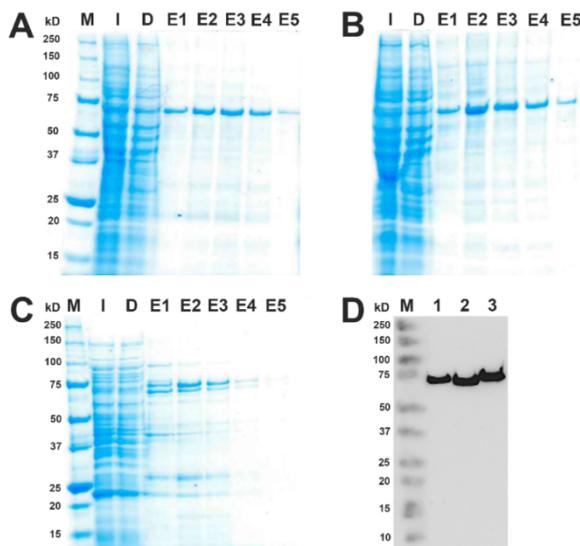


Abb. 25: SDS-PAGE und Western Blot der rekombinanten ALOX-Isoformen [Nach Abb. 1, Roigas et al., 2022 (203)]. Die Knochenfisch ALOX-Isoformen wurden als rekombinante His-tag Fusionsproteine exprimiert und die Lysatüberstände wurden zur Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule eingesetzt. **A)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der ALOX-Isoform von *N. furzeri*, die im Sf9-Zellsystem exprimiert wurde. **B)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der ALOX-Isoform von *P. nyererei*, die im Sf9-Zellsystem exprimiert wurde. **C)** SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der ALOX-Isoform von *S. formosus*, die in *E. coli* exprimiert wurde. (M = Molekulargewichtsmarker, I = Input (Lysatüberstand der Sf9- bzw. *E. coli*-Zellhomogenate), D = Durchfluss der Affinitätschromatographie, E1-5 = konsekutive Elutionsfraktionen), **D)** Western Blot-Analysen der Elutionsfraktionen E2 der angereicherten

rekombinanten Knochenfisch ALOX-Isoformen (M = Marker, 1 = E2 der vermeintlichen *N. furzeri*-ALOX15, 2 = E2 der vermeintlichen *P. nyererei*-ALOX15, 3 = E2 der vermeintlichen *S. formosus*-ALOX15).

Aus Abbildung 25D kann geschlussfolgert werden, dass die dominanten Proteinbanden der Elutionsfraktionen immunreaktiv waren. Deshalb handelt es sich bei den angereicherten Proteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit um die rekombinanten Fusionsproteine der Knochenfisch ALOX-Isoformen. Um diese Schlussfolgerung zu untermauern und um zu testen, ob die rekombinant exprimierten Enzyme katalytisch aktiv waren, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt. Dabei wurden Aliquots der Elutionsfraktionen im Standardaktivitätsassay (siehe Material und Methoden) für 10 Minuten mit 165 μ M Arachidonsäure inkubiert und die Bildung der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte wurde mittels RP-HPLC quantifiziert. Leider mussten wir bei diesen Messungen feststellen, dass alle Enzyme während der Affinitätschromatographie ihre katalytische Aktivität verloren hatten. Deshalb musste die Charakterisierung ihrer katalytischen Eigenschaften mit ungereinigten Enzympräparaten durchgeführt werden (203). Die molekularen Ursachen der Enzyminaktivierung während der Affinitätschromatographie wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es wäre denkbar, dass während der Elutionsprozedur mit den hohen Imidazolkonzentrationen das katalytisch aktive Nicht-Häm-Eisen der Lipoxygenasen aus

dem Enzym eluiert wurde, was eine katalytische Inaktivität des rekombinanten Proteins induziert hätte.

Zusammenfassung: Die als N-terminale His-tag Fusionsproteine exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische wurden mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose konzentriert und aufgereinigt. Leider verloren die Enzyme dabei ihre katalytische Aktivität und deshalb wurde die Enzymcharakterisierung mit ungereinigten Enzympräparaten durchgeführt.

3.6 Detaillierte Strukturidentifizierung der AA Oxygenierungsprodukte

3.6.1 RP-HPLC-Analytik

Die RP-HPLC Analysen der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die in *E. coli* und in Sf9-Zellen rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gebildet wurden, ergaben, dass während der AA Oxygenierung konjugierte Diene entstanden sind, die in der RP-HPLC mit einem authentischen Standard von 12-HETE koeluierten (Abb. 26).

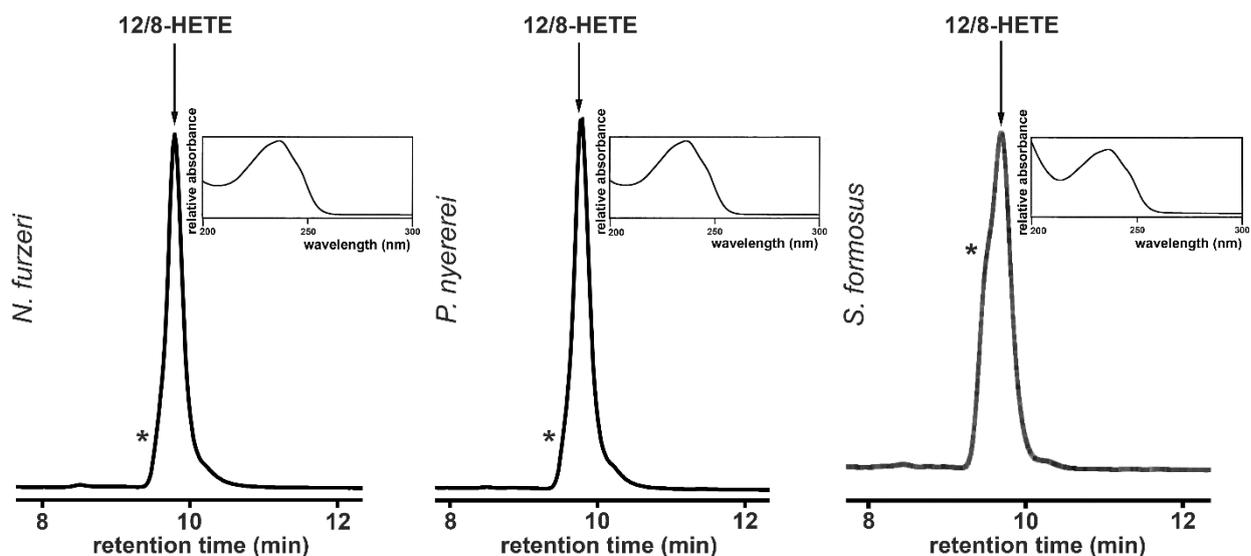


Abb. 26: Detaillierte RP-HPLC Analyse der AA Oxygenierungsprodukte, die durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gebildet wurden. Partielle RP-HPLC Chromatogramme der AA Oxygenierungsprodukte werden gezeigt. Das für konjugierte Diene typische UV-Spektrum ist als Inset eingefügt. Die bei der detaillierten Analyse (Spreizung der Zeitachse) sichtbar werdende Frontschulter ist mit * gekennzeichnet.

Leider wurden unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen 12-HETE und 8-HETE nicht gut getrennt, sodass es sich bei den entstandenen Produkten auch um eine Mischung von 8-HETE und 12-HETE handeln könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst die RP-HPLC Peaks genauer analysiert. Dabei fiel auf,

dass alle Peaks eine mehr oder weniger ausgeprägte Frontschulter aufwiesen (Abb. 26). Bei den vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* war diese Frontschulter (gekennzeichnet mit *) relativ subtil. Beim Produkt, das durch die vermeintliche ALOX15 von *S. formosus* gebildet wurde, war die Frontschulter sehr deutlich ausgeprägt. Diese Frontschulter deutet darauf hin, dass der HPLC-Peak nicht homogen zu sein scheint, sondern dass sich mehrere Produkte mit ähnlichen Affinitäten zur chromatographischen Matrix darunter verbergen. So könnte es möglich sein, dass bei der AA Oxygenierung durch die verschiedenen Knochenfisch ALOX-Isoformen sowohl 12- als auch 8-HETE gebildet wurden.

Zusammenfassung: Die durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen gebildeten Produktpeaks zeigen in der RP-HPLC eine unterschiedlich stark ausgeprägte Inhomogenität, welche durch die Bildung eines Nebenprodukts, möglicherweise 8-HETE, zustande kommt.

3.6.2 Normalphasen-Chiralphasen-HPLC (NP/CP-HPLC)

Um eine bessere Trennung von 12-HETE und 8-HETE zu erreichen, wurden weiterführende HPLC Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der in der RP-HPLC sichtbare Peak der konjugierten Diene aufgefangen und nach Verdampfung des Lösungsmittels mittels NP/CP-HPLC analysiert. Bei dieser Art der HPLC werden nicht nur 12-HETE und 8-HETE verlässlich voneinander getrennt, sondern es ist auch möglich, die Enantiomeren von 12- und 8-HETE separat voneinander zu quantifizieren. Um das chromatographische System zu eichen und die Retentionszeiten der einzelnen HETE-Isomeren zu bestimmen, wurden initial authentische Standards von 12(S)-HETE, 12(R)-HETE, 8(S)-HETE und 8(R)-HETE analysiert.

Aus Abbildung 27A ist ersichtlich, dass bei dieser Analyse 4 verschiedene konjugierte Diene nachgewiesen werden konnten, die anhand von Einzelinjektionen als 12(R)-HETE, 8(R)-HETE, 12(S)-HETE und 8(S)-HETE identifiziert wurden. Wurden die Reaktionsprodukte der verschiedenen Knochenfischspezies unter identischen chromatographischen Bedingungen analysiert, konnte festgestellt werden, dass die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* Arachidonsäure zu 12(S)-HETE und 8(R)-HETE in einem Verhältnis von ca. 4:1 umgesetzt haben. Wurde das Enzym von *S. formosus* für die Reaktion verwendet, entstand eine 6:4-Mischung von 12(S)- und 8(R)-HETE (198). Diese Daten deuten darauf hin, dass die vermeintlichen

ALOX15-Orthologen der Knochenfische duale Reaktionsspezifitäten aufweisen, wobei 12(S)-HETE und 8(R)-HETE die Hauptprodukte darstellen.

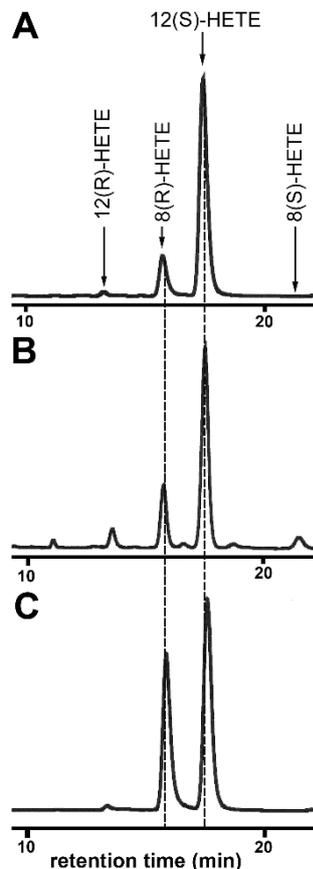


Abb. 27: NP/CP-HPLC-Chromatogramme der RP-HPLC gereinigten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte, die durch die rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gebildet wurden [Roigas et al., 2022 (198)]. Die konjugierten Diene, die während der AA Oxygenierung durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische entstanden sind, wurden mittels RP-HPLC präpariert und anschließend mittels NP/CP-HPLC analysiert. **A)** Analyse der durch RP-HPLC gereinigten Reaktionsprodukte des rekombinant exprimierten Enzyms von *N. furzeri*. **B)** Analyse der durch RP-HPLC gereinigten Reaktionsprodukte des rekombinant exprimierten Enzyms von *P. nyererei*. **C)** Analyse der RP-HPLC gereinigten Reaktionsprodukte des rekombinant exprimierten Enzyms von *S. formosus*.

Die dualen Reaktionsspezifitäten der Knochenfisch ALOX-Isoformen unterschieden sich von der dualen Spezifität der Säugetier ALOX15-Orthologen vor allem dadurch, dass die Bildung von 12(S)- und 8(R)-HETE durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen eine Wasserstoffabstraktion vom C10 der AA beinhaltet. Im Gegensatz dazu verläuft die Bildung von 15(S)-HETE und 12(S)-HETE durch die Säugetier ALOX15-Orthologen über eine Wasserstoffabstraktion von zwei unterschiedlichen bisallylischen Kohlenstoffatomen [C10 für 12(S)-HETE Bildung, C13 für 15(S)-HETE Bildung].

Zusammenfassung: Die rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische oxygenieren AA zu 12(S)- und 8(R)-HETE. Bei *N. furzeri* und *P. nyererei* geschieht das in einem Verhältnis von ca. 8:2, bei *S. formosus* in einem Verhältnis von ca. 6:4.

3.6.3 Massenspektrometrie

Chromatographische Verfahren zählen zu den Analysemethoden, bei denen auf die chemische Struktur eines Analyten durch den Vergleich seiner Bindungsaffinität zu einer chromatographischen Matrix im Vergleich mit einem authentischen Standard geschlossen wird. Um unabhängige Informationen zur chemischen Struktur des dominanten AA Oxygenierungsprodukts der Knochenfisch ALOX-Isoformen (12-HETE) zu erhalten, erfolgte eine zusätzliche Analyse dieser Produkte mittels Massenspektrometrie, die mit einer Flüssigkeitschromatographie gekoppelt war (LC-MS).

Die Strukturidentifizierung mittels Massenspektrometrie erfolgt so, dass die zu analysierende Substanz nach der Ionisierung fragmentiert wird. So ergeben sich substanzspezifische Fragmentierungsmuster, die mit den Fragmentierungsmustern von authentischen Standards verglichen werden können. In Abbildung 28 ist ein beispielhaftes Totalionenchromatogramm der durch die vermeintliche ALOX15 von *N. furzeri* gebildeten AA Oxygenierungsprodukte dargestellt, welches die Summe der Intensitäten aller massenspektrometrischen Peaks zeigt, die zum selben Scan gehören. Bei 16,5 min konnte in der LC ein Peak mit hoher Intensität detektiert werden. Das zu diesem Zeitpunkt erfasste Massenspektrum ist als Inset links eingefügt, welches die Ionenpeaks mit ihrem jeweiligen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) zeigt. Der Peak mit einem Masse/Ladungsverhältnis von m/z 319 stellt den Molekülionenpeak dar, welcher dem Molekulargewicht der analysierten Substanz, hier 12-HETE, entspricht. Der Peak mit einer Masse von m/z 301 ergibt sich aus der Abspaltung von Wasser vom Molekülionenpeak. Subtrahiert man von diesem Fragmentation CO_2 , erhält man den Ionenpeak mit der Masse m/z 257. Der Ionenpeak mit der Masse m/z 179 entspricht einem Fragment, das durch α -Spaltung von 12-HETE entstanden ist. Dieses Fragment ist beweisend dafür, dass es sich bei der analysierten Substanz um 12-HETE handelt, da die α -Spaltung am 12. Kohlenstoffatom erfolgte und an dieser Stelle also der Einbau von molekularem Sauerstoff in AA erfolgt sein muss.

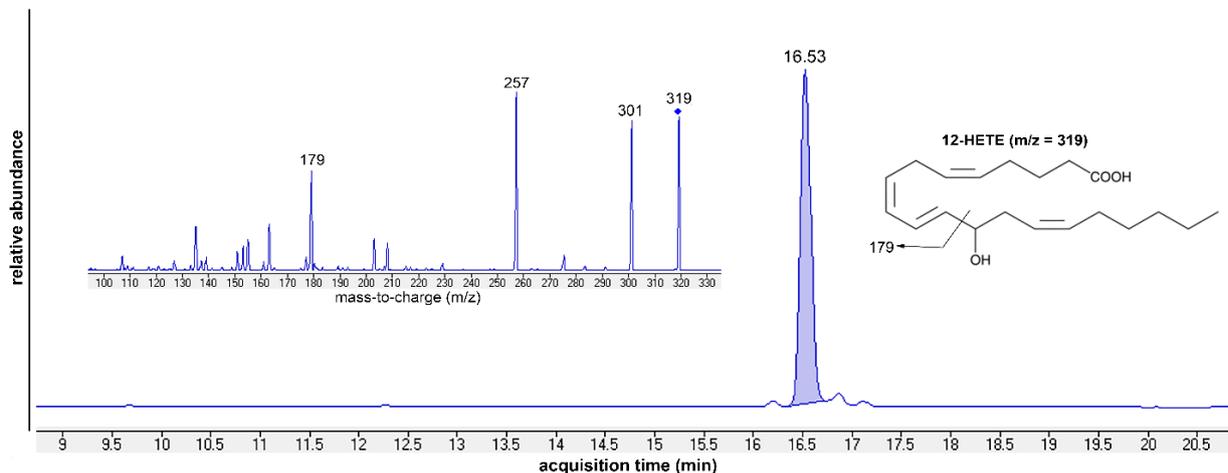


Abb. 28: Analyse des dominanten AA Oxygenierungsprodukts mittels LC-MS [Roigas et al., 2022 (198)]. Das Hauptprodukt, das während der AA Oxygenierung durch das vermeintliche ALOX15-Orthologe von *N. furzeri* gebildet wurde, wurde mittels LC-MS (siehe Material und Methoden) analysiert. Das Massenspektrum des Peaks bei einer Retentionszeit von 16,53 min (links) und die Molekülstruktur von 12-HETE mit einer möglichen α -Spaltung (rechts) sind als Insets eingefügt.

Zusammenfassung: Die massenspektrometrische Analyse des dominanten AA Oxygenierungsprodukts der Knochenfisch ALOX-Isoformen bestätigte, dass es sich hierbei um 12-HETE handelt.

3.7 Weitergehende Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der rekombinanten Enzyme

3.7.1 Substratspezifität für verschiedene freie PUFAs

3.7.1.1 Präferentielle Oxygenierung bestimmter PUFAs

In den meisten Säugetierzellen sind Linolsäure (LA), Arachidonsäure (AA), α -ALA) und γ -Linolensäure (GLA), 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure (EPA) und 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-Docosahexaensäure (DHA) die am häufigsten vorkommenden Polyenfettsäuren (10). Um zu untersuchen, wie gut diese PUFAs als Substrat für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen fungieren, wurden die Enzyme mit jeder Fettsäure einzeln für 3 Minuten inkubiert und die Menge an gebildeten Reaktionsprodukten mittels RP-HPLC analysiert. Die Endkonzentration der Fettsäuren im Reaktionsansatz betrug immer 50 μ M. Der für diese Untersuchungen eingesetzte Lysatüberstand der vermeintlichen *S. formosus*-ALOX15 stammte aus *E. coli*, während für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* Sf9-Zelllysatüberstände verwendet wurden.

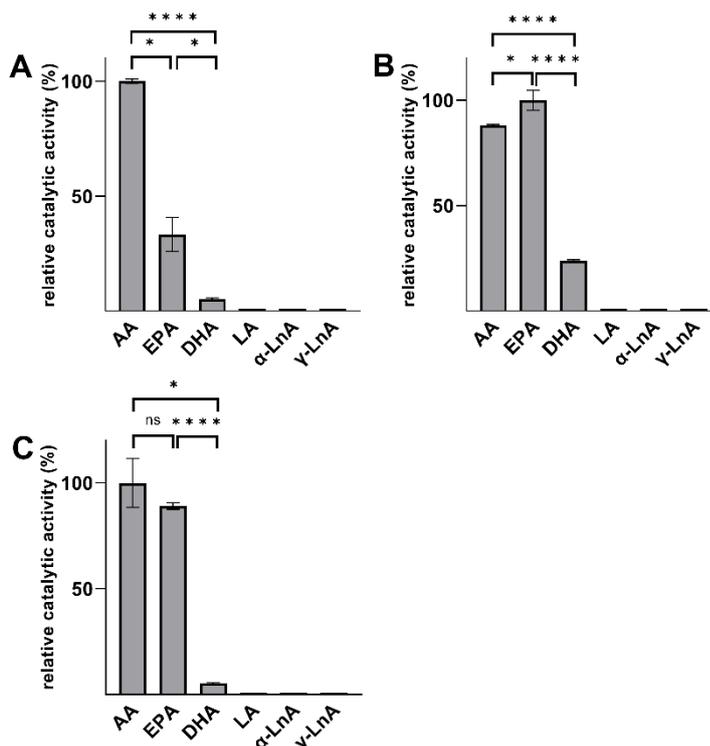


Abb. 29: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs [Roigas et al., 2022 (198)]. In diesem Experiment wurden die einzelnen Fettsäuren voneinander getrennt als Substrate angeboten (Substratkonzentration 50 μ M). Für jedes Substrat wurden 4 Messungen durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ermittelt. Es wurde immer der Mittelwert der relativen katalytischen Aktivität des am besten oxygenierten Substrats 100 % gesetzt (für *N. furzeri* und *S. formosus* AA, für *P. nyererei* EPA). Da LA, ALA und GLA kaum metabolisiert wurden, ist für die graphische Darstellung die relative katalytische Aktivität mit 1 % angegeben. Die erhaltenen Daten wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-U-Test oder dem T-Test statistisch ausgewertet. **A)** *N. furzeri*, **B)** *P. nyererei*, **C)** *S. formosus*.

Die Analyse der erhaltenen RP-HPLC Daten zeigte, dass Linolsäure sowie α - und γ -Linolensäure durch alle vermeintlichen ALOX15-Isoformen kaum oxygeniert wurden. Auch 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-Docosahexaensäure scheint ein eher schlechtes Substrat zu sein, während Arachidonsäure und 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure als gute Substrate akzeptiert wurden (Abb. 29) (198). Für die vermeintliche ALOX15 aus *N. furzeri* stellt AA im Gegensatz zu EPA und DHA ein deutlich besseres Substrat dar und diese Beobachtung ist auch statistisch signifikant (AA vs. EPA: $p \leq 0,05$, ungepaarter Mann-Whitney-U-Test; AA vs. DHA: $p \leq 0,0001$, ungepaarter T-Test).

Diese Daten deuten darauf hin, dass Substratfettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen bevorzugt oxygeniert werden, während C18 und C22 Fettsäuren offenbar keine guten Substrate darstellen. Darin unterscheiden sich die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische von den ALOX15-Orthologen fast aller bislang untersuchten Säugetierspezies. Die unterschiedlichen Substratspezifitäten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen einerseits und der meisten Säugetier ALOX15-Orthologen andererseits deuten darauf hin, dass es sich bei den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen nicht um funktionsäquivalente Enzyme der Säugetier ALOX15-Orthologen handelt, sondern dass diese Enzyme funktionell näher mit anderen Säugetier ALOX-Isoformen (z.B. ALOX12 oder ALOX15B) verwandt zu sein scheinen.

Wird die humane ALOX12 als Modellenzym für Säugetier ALOX12-Orthologe mit einem Gemisch aus AA (C20 Fettsäure), EPA (C20 Fettsäure) und DHA (C22 Fettsäure) inkubiert, in dem die Fettsäuren in gleicher Konzentration vorliegen, bilden die DHA Oxygenierungsprodukte den größten Anteil an enzymatisch gebildeten Produkten (ca. 50 %). Der Anteil der EPA Oxygenierungsprodukte beträgt ca. 35 % und den restlichen Anteil bilden die AA Oxygenierungsprodukte (208). Die humane ALOX12 bevorzugt also die C22 Fettsäure, während diese für die Knochenfisch ALOX-Isoformen kein gutes Substrat darstellt. Eine Ausnahme bildet die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei*. Hier konnte auch die Bildung von DHA Oxygenierungsprodukten nachgewiesen werden (Abb. 29B). Dabei handelte es sich vor allem um 14-HDHA (siehe 3.7.1.3.2).

Diese Daten sprechen eher gegen die Vermutung, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen Funktionsäquivalente der humanen ALOX12 sind. Vergleicht man die Substratspezifitäten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit der Maus Alox12, lässt sich bisher nur sagen, dass das Mausenzym AA ausschließlich zu 12-HETE oxygeniert und dass Linolsäure ein deutlich schlechteres Substrat für diese ALOX-Isoform darstellt (209). Ein ähnliches Ergebnis wurde hier für

die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen erhalten (Abb. 29). Somit kann allein auf der Basis des Vergleichs der bisher verfügbaren Daten zur Fettsäuresubstratspezifität der Enzyme nicht zwingend geschlussfolgert werden, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologe Funktionsäquivalente der humanen bzw. murinen ALOX12 sind.

In Tabelle 7 ist der relative Anteil der beiden Produkte, die hauptsächlich bei der Inkubation der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit AA, EPA und DHA entstehen, dargestellt. Bei der Inkubation mit AA und EPA erfolgt die Wasserstoffabstraktion am C10 der Fettsäure, wodurch der molekulare Sauerstoff entweder am C12 oder C8 eingebaut wird (es werden 12- und 8-HETE/HEPE gebildet). Analog erfolgt bei der Inkubation mit DHA die Wasserstoffabstraktion am C12 der Fettsäure und die Sauerstoffinsertion am C14 oder C10, wodurch hauptsächlich 14- oder 10-HDHA gebildet werden.

Tab. 7: Vergleich unterschiedlicher Substratfettsäuren für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen. Bei der Inkubation der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit unterschiedlichen Substratfettsäuren konnte entsprechend ihrer dualen Reaktionsspezifität die Bildung von zwei Hauptprodukten beobachtet werden. Für die Erstellung der Tabelle wurden die Flächeneinheiten der beiden Produkte aus den SP-HPLC Chromatogrammen abgelesen und addiert sowie der Anteil in % berechnet.

Spezies	AA		EPA		DHA	
	12-HETE	8-HETE	12-HEPE	8-HEPE	14-HDHA	10-HDHA
<i>N. furzeri</i>	70%	30%	76%	24%	56%	44%
<i>P. nyererei</i>	80%	20%	86%	14%	54%	46%
<i>S. formosus</i>	56%	44%	67%	33%	60%	40%

Zusammenfassung: C20-PUFAs (AA, EPA) stellen die besten Substrate für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische dar, während C18- und C22-PUFAs kaum oxygeniert werden. Nur in den Aktivitätsassays der vermeintlichen *P. nyererei*-ALOX15 konnten relevante Mengen an DHA Oxygenierungsprodukten nachgewiesen werden.

3.7.1.2 Präferentielle Oxygenierung bestimmter PUFAs bei gemischtem Substratangebot

In den oben besprochenen Experimenten wurden die Substratfettsäuren einzeln zu den Inkubationsansätzen zugegeben. Im Folgenden (Abb. 30) sollte ergänzend untersucht werden, welche der Substratfettsäuren bevorzugt oxygeniert wird, wenn die Fettsäuresubstrate in gleichen Konzentrationen im Reaktionsansatz vorliegen. Um den

Versuch zu vereinfachen, bestand das Gemisch nur aus den PUFAs, die im vorigen Versuch oxygeniert wurden. Dabei wurde jede der drei Fettsäuren in einer Endkonzentration von 16,7 μM angeboten, sodass sich eine Endkonzentration an Fettsäure im Aktivitätsansatz von ca. 50 μM ergab.

Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure gegenüber Arachidonsäure bevorzugen, während Docosahexaensäure fast gar nicht umgesetzt wurde (Abb. 30) (198). Diese Daten bestätigen die Beobachtung der Experimente mit den getrennt zugesetzten PUFAs, die gezeigt haben, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen C20-PUFAs bevorzugt oxygenieren. Für alle Enzyme konnten signifikante Unterschiede zwischen AA und EPA festgestellt werden (*N. furzeri* und *S. formosus*: $p \leq 0,05$, ungepaarter Mann-Whitney-U-Test; *P. nyererei*: $p \leq 0,001$, ungepaarter T-Test).

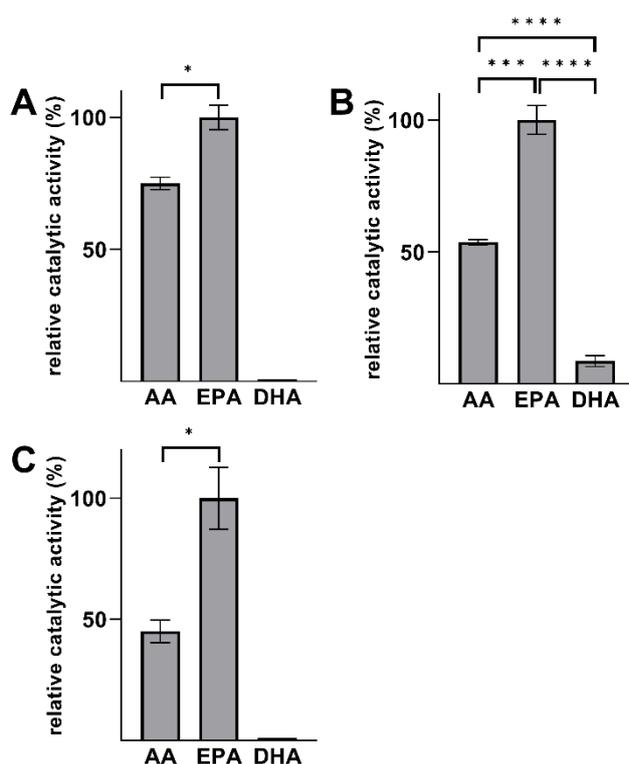


Abb. 30: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit ausgewählten PUFAs bei gemischtem Substratangebot [Roigas et al., 2022 (198)]. In diesem Experiment wurden AA, EPA und DHA als Substratmischung angeboten. Die Endkonzentration jeder Fettsäure im Inkubationsansatz betrug dabei 16,7 μM . Es wurden 4 Messungen durchgeführt und Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Der Mittelwert der relativen katalytischen Aktivität mit EPA als Substrat wurde 100 % gesetzt. Da DHA durch die ALOX-Isoformen von *N. furzeri* und *S. formosus* kaum enzymatisch umgesetzt wurde, ist die relative katalytische Aktivität hier mit 1 % angegeben. Die erhaltenen Daten wurden mit dem ungepaarten Mann-Whitney-U-Test oder dem T-Test statistisch ausgewertet. **A)** Relative katalytische Aktivitäten der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri*. **B)** Relative katalytische Aktivitäten der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei*. **C)** Relative katalytische Aktivitäten der vermeintlichen ALOX15 von *S. formosus*.

Zusammenfassung: Bei gemischtem Substratangebot wird von den vermeintlichen Knochenfisch ALOX-Isoformen EPA als Substrat präferiert. In den Aktivitätsassays der vermeintlichen *P. nyererei*-ALOX15 konnten wieder geringe Mengen an DHA Oxygenierungsprodukten nachgewiesen werden, was die Beobachtung der Experimente mit den getrennt zugesetzten PUFAs bestätigt.

3.7.1.3 Identifizierung der Oxygenierungsprodukte verschiedener PUFAs

3.7.1.3.1 Identifizierung der EPA Oxygenierungsprodukte

Die Identifizierung der dominanten Oxygenierungsprodukte von Arachidonsäure [12(S)- und 8(R)-HETE] konnte mit einer Kombination verschiedener HPLC-Arten (RP-HPLC, NP/CP-HPLC) relativ einfach durchgeführt werden. Hauptursache dafür war, dass für alle theoretisch möglichen HETE-Isomeren (5-HETE, 8-HETE, 9-HETE, 11-HETE, 12-HETE, 15-HETE) authentische Standards als Razemate (S/R-Mischungen) kommerziell verfügbar waren. Das war jedoch nicht für alle möglichen Oxygenierungsprodukte von EPA und DHA der Fall, sodass die Reaktionsprodukte mittels RP-HPLC isoliert und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert werden mussten.

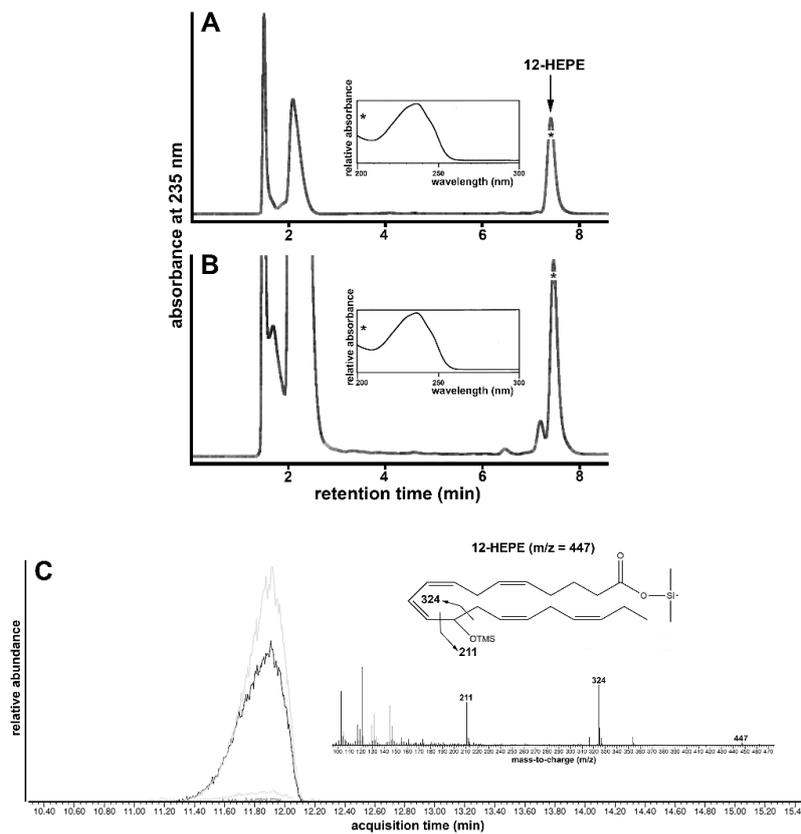


Abb. 31: Analyse des dominanten EPA Oxygenierungsprodukts, das durch die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* gebildet wurde. Der Lysatüberstand des Sf9-Zellhomogenats der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei* wurde mit EPA für 3 min inkubiert. Ein authentischer Standard von 12-HEPE und das dominante Oxygenierungsprodukt wurden anschließend mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert und das dominante konjugierte Dien mittels GC-MS (Material und Methoden) analysiert. **A)** Authentischer Standard von 12-HEPE mit UV-Spektrum (Inset). **B)** Produktmuster nach Zugabe von 5 µl des Lysatüberstandes der eukaryotischen Expression der ALOX-Isoform von *P. nyererei* (UV-Spektrum als Inset eingefügt). Die UV-Spektren wurden zu den mit * gekennzeichneten Zeiten aufgenommen. **C)**

Totalionenchromatogramm des dominanten EPA Oxygenierungsprodukts. Als Insets sind die Molekülstruktur von 12-HEPE mit möglichen α -Spaltungen (oben) und das Massenspektrum bei 11,9 min (unten) eingefügt. Graue Kurve: Fragmentation mit $m/z = 324$, schwarze Kurve: Fragmentation mit $m/z = 211$.

Zu diesem Zweck wurde zunächst für jedes Enzym ein Inkubationsansatz mit EPA angesetzt und die dabei entstandenen konjugierten Diene wurden mittels RP-HPLC analysiert. Dabei konnte die Bildung eines Hauptprodukts nachgewiesen werden,

welches unter unseren chromatographischen Bedingungen mit einer Retentionszeit von 7,5 min eluierte (Abb. 31B). Ein käuflicher authentischer Standard von 12(\pm)-HEPE zeigte die gleiche Retentionszeit (Abb. 31A). Da aber die Retentionszeiten der anderen HEPE-Isomeren in unserem chromatographischen System nicht bekannt waren, konnte auf der Basis der RP-HPLC Daten nicht zweifelsfrei auf die chemische Identität des dominanten Oxygenierungsprodukts geschlossen werden. Um weitere analytische Daten zu den dominanten Oxygenierungsprodukten zu erhalten, wurden die entstandenen konjugierten Diene mittels RP-HPLC präpariert, derivatisiert (Bildung der Trimethylsilylderivate) und anschließend mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht.

In Abbildung 31C ist das Totalionenchromatogramm des dominanten EPA Oxygenierungsprodukts dargestellt. Bei 11,9 min konnten hohe Ionenintensitäten detektiert werden. Das zu diesem Zeitpunkt erfasste Massenspektrum (unteres Inset in Abb. 31C) zeigt mehrere Ionenpeaks mit hoher Intensität, wovon zwei (m/z 211 und m/z 324) Fragmenten zugeordnet werden konnten, die bei der α -Spaltung von 12-HEPE entstehen. Somit hat die massenspektrometrische Analyse bestätigt, dass es sich bei dem durch die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* gebildeten EPA Oxygenierungsprodukt tatsächlich um 12-HEPE handelt (203). Für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der anderen Knochenfische wurden entsprechende GC/MS-Analysen nicht durchgeführt. Da aber die Hauptprodukte der EPA Oxygenierung aller drei vermeintlichen ALOX15 Knochenfischorthologen in der RP-HPLC kochromatographierten, kann mit hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass 12-HEPE auch das Hauptprodukt der anderen vermeintlichen ALOX15-Orthologen ist.

Zusammenfassung: Die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen oxygenieren EPA erwartungsgemäß dominant zu 12-HEPE.

3.7.1.3.2 Identifizierung der DHA Oxygenierungsprodukte

In den Aktivitätsassays der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *P. nyererei* konnten geringe Mengen an DHA Oxygenierungsprodukten nachgewiesen werden (siehe 3.7.1.1 und 3.7.1.2). In der RP-HPLC Analytik konnte ein Hauptprodukt identifiziert werden, welches unter unseren chromatographischen Bedingungen bei einer Retentionszeit von ungefähr 9 min eluiert und das UV-Spektrum eines konjugierten Diens aufweist (Abb. 32A). Ein authentischer Standard von 14(\pm)-HDHA zeigte eine ähnliche Retentionszeit (Abb. 32B). Koinjizierte man Standard und das dominante DHA

Oxygenierungsprodukt der ALOX-Isoform von *P. nyererei*, konnte ein homogener Hauptpeak beobachtet werden (Abb. 32C). Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Retentionszeit des Koinjektionspeaks (Abb. 32C) geringfügig größer war, als bei den isolierten Analysen (Abb. 32 A+B). Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Analyse der Koinjektion der Lösungsmittelfluss geringfügig abfiel, sodass sich die beobachtete Retentionszeitdifferenz ergab.

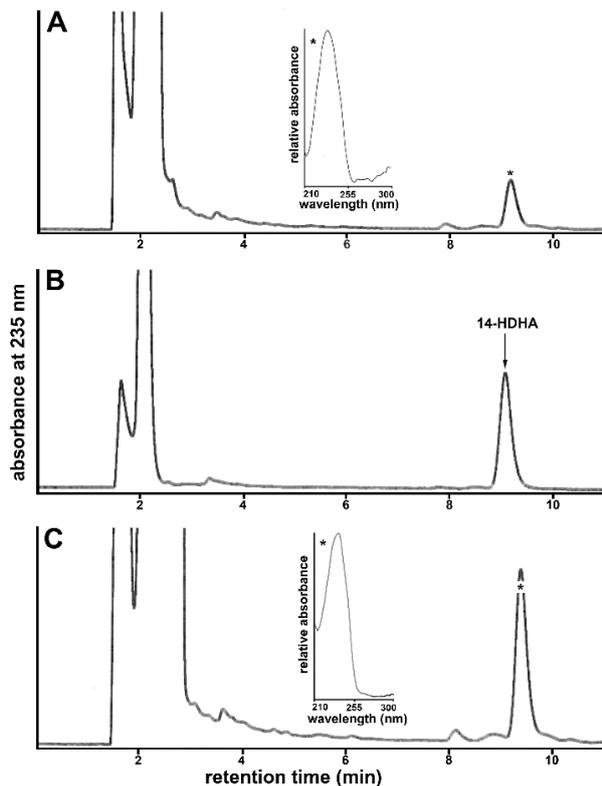


Abb. 32: Analyse des dominanten DHA Oxygenierungsprodukts, das durch die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* gebildet wurde. Der Lysatüberstand des Sf9-Zellhomogenats der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei* wurde mit DHA für 3 min inkubiert. Ein authentischer Standard von 14-HDHA und das dominante Oxygenierungsprodukt wurden anschließend mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert. **A)** Produktmuster nach Zugabe von 5 µl des Lysatüberstandes der eukaryotischen Expression der ALOX-Isoform von *P. nyererei* (UV-Spektrum als Inset eingefügt). **B)** Authentischer Standard von 14-HDHA. **C)** Koinjektion von Standard und DHA Aktivitätsassay der ALOX-Isoform von *P. nyererei* mit UV-Spektrum (Inset). Die UV-Spektren wurden zu den mit * gekennzeichneten Zeiten aufgenommen.

Das in der RP-HPLC präparierte Oxygenierungsprodukt wurde anschließend mittels LC-MS untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei dem durch die vermeintliche *P. nyererei*-ALOX15 gebildeten DHA Oxygenierungsprodukt hauptsächlich um 14-HDHA handelt (38 % aller in der LC-MS identifizierten DHA-Isomere) (203). Wenn DHA durch die ALOX-Isoform von *P. nyererei* zu 14-HDHA oxygeniert wird, besteht der wahrscheinlichste Oxygenierungsmechanismus darin, dass die Substratfettsäure mit dem Methylende voran in die Substratbindungstasche gleitet, die Wasserstoffabstraktion am 12. Kohlenstoffatom erfolgt und nach der [+2]-Radikalumlagerung die Sauerstoffinsertion am 14. Kohlenstoffatom stattfindet. Damit liegt derselbe Mechanismus wie bei der 12-Lipoxygenierung von AA vor. Es konnten jedoch noch zwei weitere Oxygenierungsprodukte in der LC-MS identifiziert werden, die zu fast gleichen Anteilen durch die ALOX-Isoform von *P. nyererei* gebildet wurden. Dies sind 16-HDHA und 10-HDHA (203), die jeweils 28 bzw. 24 % der in der LC-MS identifizierten HDHA-Isomere

ausmachen. Diese Oxygenierungsprodukte entstehen durch initiale Wasserstoffabstraktion am C18 (16-HDHA) und am C12 (10-HDHA), wobei es bei beiden Produkten zu einer [-2]-Radikalumlagerung kommt. Damit wird anschließend Sauerstoff am 16. bzw. 10. Kohlenstoffatom eingeführt. Das Substrat DHA sollte dabei invertiert (mit der Karboxylgruppe voran) in der Substratbindungstasche binden.

Zusammenfassung: Die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* oxygeniert DHA dominant zu 14-HDHA. Der Reaktionsmechanismus entspricht dabei dem der 12-Lipoxygenierung von AA.

3.7.2 Oxygenierung komplexer Substrate

3.7.2.1 *Strukturidentifizierung der Oxygenierungsprodukte ausgewählter Hydroxyfettsäuren*

Die ALOX15-Orthologen von Säugetieren bevorzugen freie PUFAs als Substrate, können aber auch modifizierte PUFAs (z.B. HETE- und HEPE-Isomere) und komplexere PUFA-enhaltende Lipide (z.B. Anandamid, 2-Arachidonylglycerol) oxygenieren (210, 211).

Um zu untersuchen, ob die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen auch zur Oxygenierung von HETE-Derivaten in der Lage sind, wurden die Lysatüberstände der Enzympräparationen für 10 Minuten in 0,5 ml PBS inkubiert, wobei die Inkubationsansätze jeweils 30 μ M der verschiedenen Substrate enthielten. Nach Reduktion der primären Oxidationsprodukte zu den entsprechenden Hydroxyderivaten wurden diese mittels RP-HPLC quantifiziert. Hydroxyfettsäuren (5-HETE, 15-HETE, 5,6-DiHETE, 5,15-DiHETE, 18-HEPE) stellen potenzielle Substrate für die Biosynthese anti-inflammatorischer und pro-resolutorischer Eikosanoide, wie Lipoxine (13, 212) und Resolvine (16, 17) dar. Alle diese Verbindungen besitzen mindestens eine bisallylständige Methylengruppe und können damit durch verschiedene ALOX-Isoformen zu Folgeprodukten [z.B. 5,6,15-TriHETE (LxA₄) oder 5,14,15-TriHETE (LxB₄)] oxygeniert werden. 18-HEPE ist ein Hydroxyderivat von EPA, das im menschlichen Blut in großen Mengen nachgewiesen wurde (213). Bisher ist allerdings der metabolische Ursprung dieser Hydroxyfettsäure noch ungeklärt. Wenn dieses Substrat durch ALOX-Isoformen (z.B. ALOX15, ALOX15B, ALOX12) oxygeniert wird, könnten dabei pro-resolutorische Resolvine gebildet werden.

Zunächst wurden 5(R/S)-HETE, 15(R/S)-HETE, 5,6-DiHETE und 5,15-DiHETE als Substrate für die in Sf9-Zellen rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen von *N. furzeri*

und *P. nyererei* und für die in *E. coli* rekombinant exprimierte ALOX-Isoform von *S. formosus* getestet. Dazu wurden diese Substrate in PBS mit dem Sf9- oder Bakterienzellysätüberstand inkubiert und die gebildeten Produkte anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Leider konnte mit den Substraten 5,6-DiHETE und 5,15-DiHETE bei keinem der rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen eine signifikante Lipoxinbildung beobachtet werden.

Abbildung 33B zeigt ein Beispielchromatogramm der Lipoxinsyntheseaktivität der vermeintlichen ALOX15-Orthologen aus *N. furzeri*. In dem Bereich, in dem die LxA₄ und LxB₄ Standards eluieren (Abb. 33A), konnten für die vermeintliche *N. furzeri*-ALOX15 keine Produktpeaks identifiziert werden.

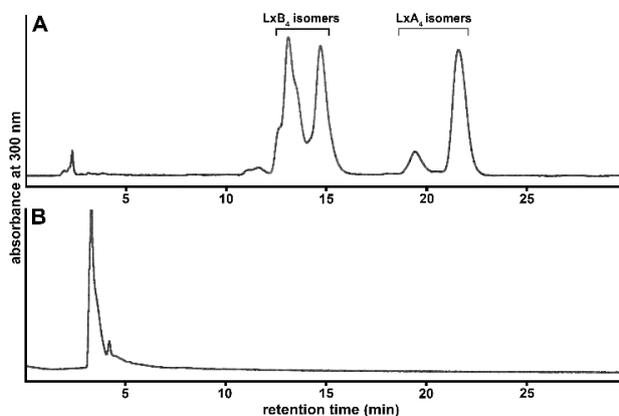


Abb. 33: RP-HPLC Chromatogramme der Lipoxinsyntheseaktivität der vermeintlichen ALOX15-Orthologe von *N. furzeri*. Der Lysatüberstand des Sf9-Zellhomogenats der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *N. furzeri* wurde mit 5(S),6(R)-DiHETE für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Produkte mittels RP-HPLC (Material und Methoden) analysiert. Die Chromatogramme wurden bei 300 nm verfolgt. **A)** Authentische Standards von LxA₄ und LxB₄-Isomeren. **B)** Produkte der 5(S),6(R)-HETE Oxygenierung durch die ALOX-Isoform von *N. furzeri*.

Ähnliche Experimente, bei denen die 18-HEPE Enantiomere als Substrate verwendet wurden, zeigten, dass weder 18(S)- noch 18(R)-HEPE durch die rekombinanten ALOX-Isoformen zu Resolvinen umgesetzt wurden. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die rekombinanten Knochenfisch ALOX-Isoformen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine Lipoxinsynthese- und keine Resolvinsynthese-Aktivität aufweisen, wenn die oben spezifizierten Substrate angeboten werden.

Die Inkubationsansätze mit den Substraten 5(R/S)-HETE und 15(R/S)-HETE wurden nicht auf die Bildung von Lipoxinen überprüft, aber auf die Bildung von DiHETE-Isomeren, welche ihrerseits als Substrate für die Lipoxinsynthese fungieren können. Auf der Basis der Reaktionsspezifität der getesteten Enzyme mit AA als Substrat konnte vermutet werden, dass das dominante Oxygenierungsprodukt von 5-HETE 5,12-DiHETE sein sollte. Durch ähnliche Überlegungen konnte für die Oxygenierung von 15-HETE 8,15-DiHETE als dominantes Oxygenierungsprodukt vorausgesagt werden, wobei das

15-HETE als Substrat invers am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden werden sollte. Für die Strukturidentifizierung wurden die dominanten Oxygenierungsprodukte zunächst mittels RP-HPLC analysiert. Da wir in den 5-HETE-Ansätzen 5,12-DiHETE als dominantes Oxygenierungsprodukt vermuteten, erfolgte zunächst ein Vergleich der Retentionszeiten des dominanten 5-HETE Oxygenierungsprodukts (Abb. 34A+B) und eines Standards von 5(S),12(S)-DiHETE (Daten nicht gezeigt). Da 5(S),12(S)-DiHETE ein konjugiertes Trien als Chromophor enthält, welches ein Absorptionsmaximum bei 268 nm aufweist, wurden die Chromatogramme bei 270 nm verfolgt.

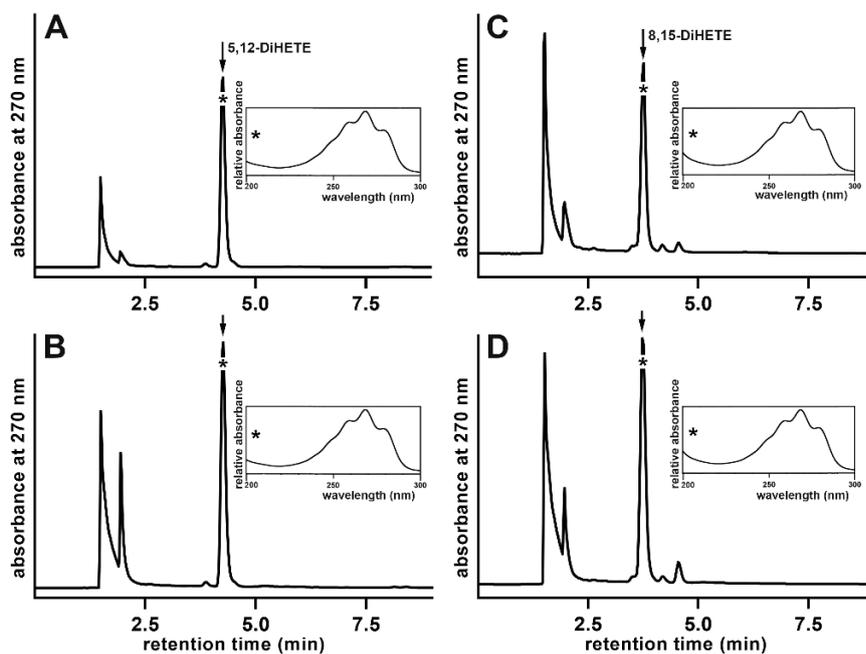


Abb. 34: RP-HPLC Chromatogramme der Oxygenierungsprodukte ausgewählter Hydroxyfettsäuren, die durch die ALOX-Isoformen von *N. furzeri* und *P. nyerelei* gebildet wurden [Nach Abb. 8, Roigas et al., 2022 (203)]. Die Lysatüberstände der Sf9-Zellhomogenate der rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen von *N. furzeri* und *P. nyerelei* wurden mit ausgewählten Hydroxyfettsäuren für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die dominanten Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert. In den Chromatogrammen ist das

UV-Spektrum des dominanten Oxygenierungsprodukts als Inset eingefügt. **A)** Produktbildung bei Inkubation von 5-HETE mit der rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologe von *N. furzeri*. **B)** Produktbildung bei Inkubation von 5-HETE mit der rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologe von *P. nyerelei*. **C)** Produktbildung bei Inkubation von 15-HETE mit der rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologe von *N. furzeri*. **D)** Produktbildung bei Inkubation von 15-HETE mit der rekombinant exprimierten vermeintlichen ALOX15-Orthologe von *P. nyerelei*.

Bei den RP-HPLC Analysen konnte festgestellt werden, dass das Produkt der 5-HETE Oxygenierung durch die drei Enzyme eine ähnliche Retentionszeit wie der authentische Standard von 5(S),12(S)-DiHETE aufweist. Auch der Vergleich der Retentionszeit des dominanten 15-HETE Oxygenierungsprodukts (Abb. 34C+D) mit der des authentischen Standards von 8,15-DiHETE (Daten nicht gezeigt) ergab eine hohe Übereinstimmung der Retentionszeiten. Aus diesen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass 5-HETE durch die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen zu 5,12-DiHETE umgewandelt wurde (203). Diese Enzyme oxygenierten 15-HETE zu 8,15-DiHETE (203). Um diese Schlussfolgerungen zu unterstützen, wurden die dominanten

Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC präpariert und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels mit Hilfe der LC-MS analysiert.

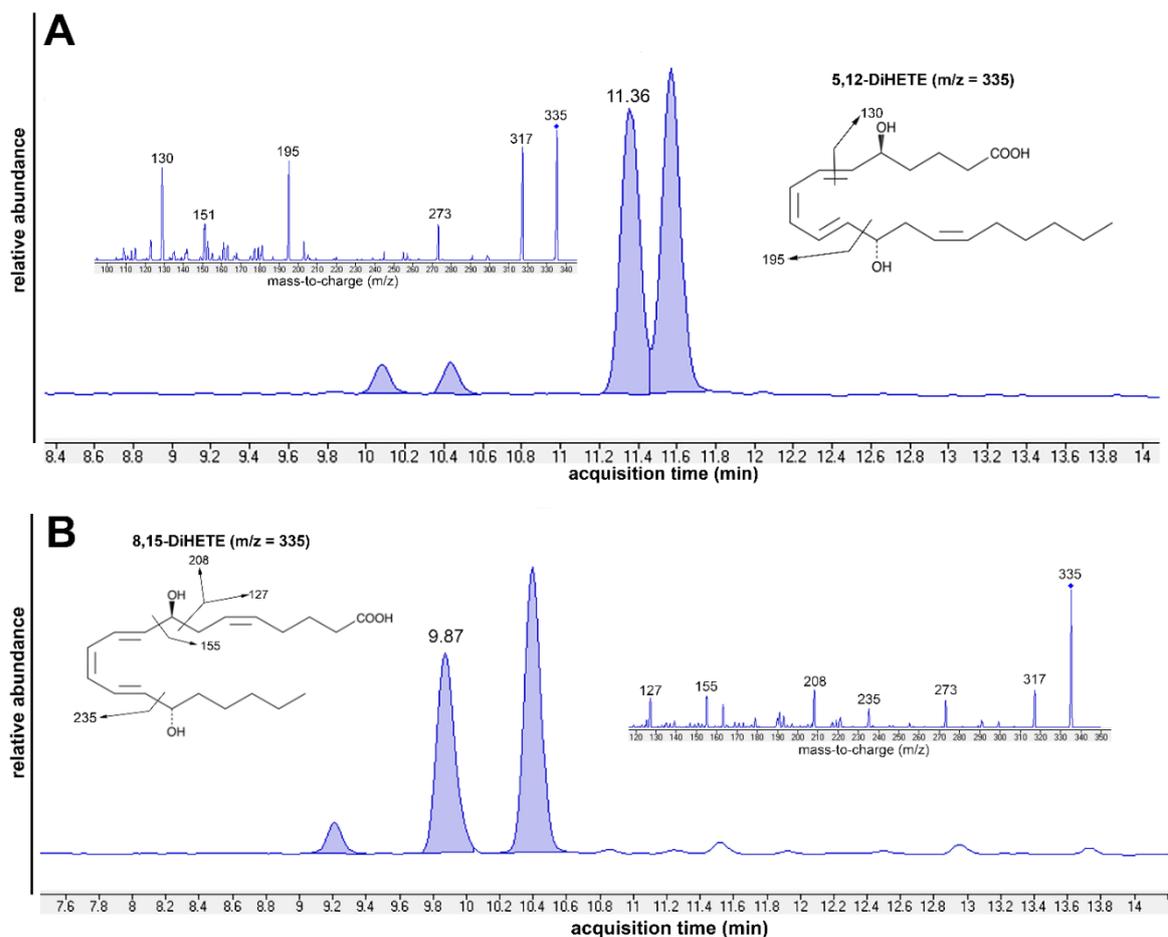


Abb. 35: Analyse der Oxygenierungsprodukte ausgewählter Hydroxyfettsäuren mittels LC-MS. Die konjugierten Triene, die während der Oxygenierung ausgewählter Hydroxyfettsäuren durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische entstanden sind, wurden mittels RP-HPLC (siehe Material und Methoden) präpariert und anschließend mittels LC-MS analysiert (siehe Material und Methoden). **A)** Totalionenchromatogramm der Oxygenierungsprodukte von 5-HETE. Das Massenspektrum des bei 11,4 min eluierenden Produkts entspricht dem von 5(S),12(S)-DiHETE und ist als Inset (links) eingefügt. Rechts sind verschiedene Fragmentierungen von 5,12-DiHETE als Inset eingefügt. **B)** Totalionenchromatogramm der Oxygenierungsprodukte von 15-HETE. Das Massenspektrum des bei 9,9 min eluierenden Produkts entspricht dem von 8(S),15(S)-DiHETE und ist als Inset (rechts) eingefügt. Links sind verschiedene Fragmentierungen von 8,15-DiHETE als Inset eingefügt.

Abbildung 35 zeigt die Totalionenchromatogramme der dominanten Oxygenierungsprodukte von 5(R/S)-HETE (Panel A) und 15(R/S)-HETE (Panel B). Die als Inset eingefügten Massenspektren zeigen verschiedene Massenpeaks, die Ionen zugeordnet werden können, welche bei der Fragmentierung von 5,12-DiHETE und 8,15-DiHETE entstanden sind. Für beide Produkte konnten Fragmentionen identifiziert werden, die auf eine α -Spaltung zurückzuführen sind. Diese Fragmentionen beweisen, dass es sich bei den analysierten Hydroxyfettsäuren tatsächlich um 5,12- und 8,15-DiHETE handelt. Die Massenionen bei m/z 335 entsprechen den einfach ionisierten

Molekulargewichtslonen. Für die Bildung der Ionen bei m/z 317 wurde vom Molekulargewichtslon Wasser (-18) abgespalten. Der Massepeak bei m/z 273 ist auf eine Kohlendioxidabspaltung (-44) vom Masselon bei 317 zurückzuführen.

Das in Panel A bei 11,36 min aufgezeichnete Massenspektrum entspricht dem eines authentischen Standards von 5(S),12(S)-DiHETE. Bei unseren Analysen konnte jedoch ein ähnlich hoher Peak mit identischem Massenspektrum (Daten nicht gezeigt) detektiert werden, welcher bei einer Retentionszeit von 11,6 min eluiert (Abb. 35A). Da das Razemat von 5-HETE als Substrat eingesetzt wurde, ist die plausibelste Erklärung, dass die Knochenfisch ALOX-Isoformen stereoselektiv eine 12(S)-Lipoxygenierung beider optischen 5-HETE Isomere [5(R)-HETE und 5(S)-HETE] katalysieren, wobei weder das 5(S)-HETE noch das 5(R)-HETE Isomer bevorzugt wird. Es entstehen fast gleiche Mengen an 5(S),12(S)-DiHETE und 5(R),12(S)-DiHETE.

Ähnliche Überlegungen gelten für die 15(R/S)-HETE Oxygenierungsprodukte. Hier entspricht das bei 9,87 min aufgezeichnete Massenspektrum (Panel B) dem eines authentischen Standards von 8(S),15(S)-DiHETE. Bei 10,4 min konnte ein Peak mit geringgradig höherer Intensität (Abb. 35B) und identischem Massenspektrum (Daten nicht gezeigt) detektiert werden. Da 15-HETE den vermeintlichen Knochenfisch ALOX-Isoformen ebenfalls als Razemat [15(R/S)-HETE] angeboten wurde, handelt es sich bei diesem Oxygenierungsprodukt am wahrscheinlichsten um 8(S),15(R)-DiHETE.

Zusammenfassung: Die rekombinanten Knochenfisch ALOX-Isoformen weisen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine Lipoxinsynthase- und keine Resolvinsynthase-Aktivität auf. Wie auf der Basis der Reaktionsspezifität mit AA vermutet, oxygenieren sie 5(R/S)-HETE zu 5(R/S),12(S)-DiHETE. Für die Oxygenierung von 15(R/S)-HETE konnten 8(S),15(R/S)-DiHETE als Oxygenierungsprodukte identifiziert werden.

3.7.2.2 *Strukturidentifizierung der Oxygenierungsprodukte von Anandamid und 2-Arachidonylglycerol*

Anandamid und 2-Arachidonylglycerol sind Derivate der AA (Anandamid ist ein Ethanolamin-Derivat, 2-Arachidonylglycerol ein Ester aus AA und Glycerol), die zu den Endocannabinoiden gehören. Endocannabinoide binden *in vivo* an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf hohem Niveau im zentralen und peripheren Nervensystem von Wirbeltieren exprimiert werden (214, 215). Sie sind an der Regulation

einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt, u.a. an der Fertilitätsregulation, dem sexuellen Verhalten (216), der Schwangerschaft (217, 218), der Schmerzwahrnehmung (219) und von Immunreaktionen (220). Endocannabinoide scheinen auch bei Knochenfischen eine Rolle zu spielen, so z.B. bei der Regulation des zentralen und peripheren gonadotropen Systems (221, 222). Im Zebrafisch (*D. rerio*) moduliert Anandamid das Wachstum und den Lipidmetabolismus (223) und es konnte die Expression von Enzymen nachgewiesen werden, die an der Endocannabinoidsynthese und dem Abbau dieser Botenstoffe beteiligt sind. So konnte die Expression der Diacylglycerollipase α , die ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von 2-Arachidonylglycerol darstellt, im ZNS des Zebrafischs gezeigt werden (224). Ebenfalls wurde die Expression der Fettsäureamid-Hydrolase, die am Abbau von Anandamid beteiligt ist, in der Retina von *D. rerio* nachgewiesen (225). In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Anandamid und 2-Arachidonylglycerol durch ALOX-Isoformen von Säugetieren oxygeniert werden können und dass es dadurch zu einer Veränderung der biologischen Funktionen dieser Mediatoren kommt (226-229). Um zu erforschen, ob die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen ebenfalls zur Oxygenierung dieser Substrate fähig sind, wurden diese Verbindungen mit den rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen *in vitro* inkubiert und die dabei entstandenen Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC analysiert.

Abbildung 36B zeigt beispielhaft die Produktbildung nach Inkubation von Anandamid mit einem Aliquot des Sf9-Zelllysatüberstands der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei*. Es ist ein Hauptpeak mit einer Retentionszeit von ca. 5 min erkennbar, der in der entsprechenden Nichtenzym-Kontrolle (Abb. 36A) fehlt. Das UV-Spektrum dieses Produkts (Inset) zeigt ein Absorptionsmaximum bei 235 nm und entspricht damit dem UV-Spektrum eines konjugierten Diens. Ähnliche Chromatogramme wurden für die rekombinante ALOX-Isoform von *N. furzeri* erhalten (Daten nicht gezeigt).

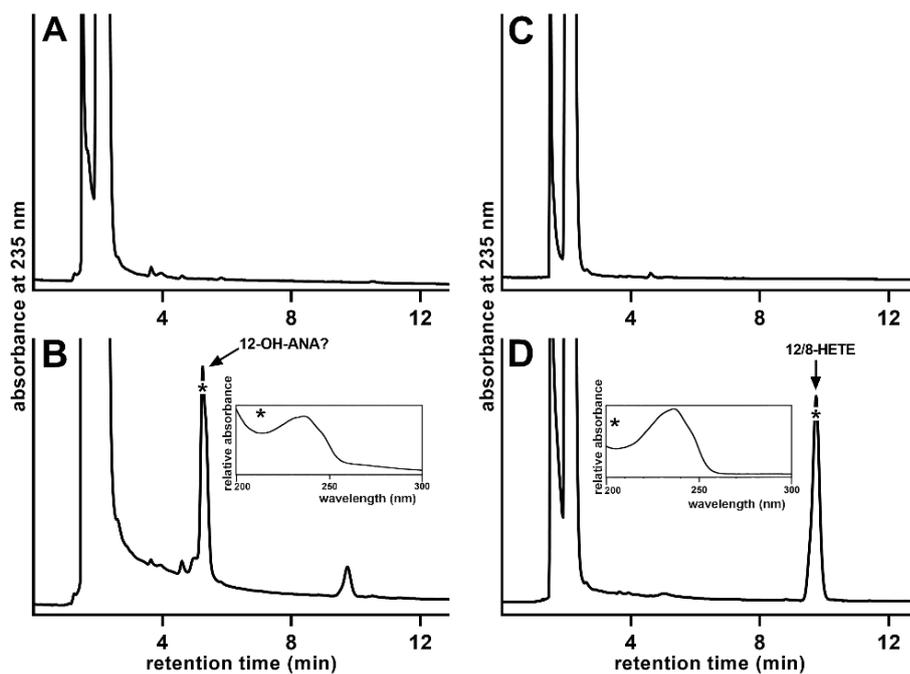


Abb. 36: RP-HPLC Chromatogramme der Oxygenierungsprodukte ausgewählter AA-Derivate, die durch die vermeintliche ALOX15 von *P. nyererei* gebildet wurden.

Der Lysatüberstand des Sf9-Zellhomogenats der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei* wurde mit Anandamid und 2-Arachidonylglycerol für 10 min inkubiert und dominante Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert. Die y-Achsen der Chromatogramme der

Nicht-Enzymkontrollen (A, C) wurden auf die Chromatogramme der Enzyminkubationen (B, D) normiert. Die UV-Spektren der Oxygenierungsprodukte wurden zu den mit * gekennzeichneten Zeiten aufgenommen. **A)** Nicht-Enzymkontrolle: Hierbei wurden zu PBS und Anandamid anstelle von 25 µl Lysatüberstand 25 µl PBS zugesetzt. **B)** Produktbildung nach Inkubation von Anandamid mit 25 µl Lysatüberstand der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei* (Inset: UV-Spektrum des dominanten Oxygenierungsprodukts). **C)** Nicht-Enzymkontrolle: Hierbei wurden zu PBS und 2-Arachidonylglycerol anstelle von 25 µl Lysatüberstand 25 µl PBS zugesetzt. **D)** Produktbildung nach Inkubation von 2-Arachidonylglycerol mit 25 µl Lysatüberstand der rekombinant exprimierten ALOX-Isoform von *P. nyererei* (Inset: UV-Spektrum des dominanten Oxygenierungsprodukts).

Da es sich bei allen Knochenfisch ALOX-Isoformen um hauptsächlich AA 12-lipoxygenierende Enzyme handelt, stellt 12-OH-ANA ein mögliches Oxygenierungsprodukt dar. Um weitere Informationen zur chemischen Struktur dieses Produkts zu erhalten, wurde das dominante Oxygenierungsprodukt mittels RP-HPLC präpariert und anschließend mittels LC-MS analysiert. Leider konnte anhand der Fragmentierungsmuster keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei diesem Produkt um 12-HETE-ANA, 15-HETE-ANA oder ein anderes Positionsisomer handelt. Im Massenspektrum konnten keine eindeutigen α -Fragmentationen nachgewiesen werden.

Auch bei der Inkubation von 2-Arachidonylglycerol mit der vermeintlichen ALOX15 von *P. nyererei* konnte die Bildung von Oxygenierungsprodukten beobachtet werden (Abb. 36D). Diese eluieren in der RP-HPLC Analyse bei ca. 10 min und weisen ebenfalls das UV-Spektrum eines konjugierten Diens auf. Aufgrund der Reaktionsspezifität der Knochenfisch ALOX-Isoformen mit AA stellt 12-HETE-2-AG ein mögliches Produkt dar.

Vorherige Untersuchungen mit der humanen ALOX12 haben jedoch gezeigt, dass 12-HETE-AG deutlich früher in der RP-HPLC eluiert (211) als das in unseren Experimenten durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen gebildete Produkt. Daher handelt es sich bei dem in unserem System nachgewiesenen Oxygenierungsprodukt eher nicht um ein oxygeniertes 2-AG Derivat, sondern um ein freies HETE-Isomer, dass hinsichtlich seiner Retentionszeit 12- oder 8-HETE (oder eine Mischung aus beiden Isomeren) sein könnte. Ähnliche Chromatogramme wurden für die rekombinante ALOX-Isoform von *N. furzeri* erhalten (Daten nicht gezeigt).

Der wahrscheinlichste Mechanismus, der die Bildung freier HETE-Isomere erklärt, ist das Vorhandensein von 2-AG-hydrolysierenden Enzymen in unserer nicht gereinigten Enzympräparation. Diese hydrolysieren entweder zuerst die Esterbindung zwischen Glycerol und AA, wodurch die nun freie AA durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen oxygeniert werden kann. Alternativ könnte auch 2-AG zuerst durch die ALOX-Isoform oxygeniert und anschließend das Oxygenierungsprodukt hydrolysiert werden. Auf der Basis der hier gezeigten Daten kann deshalb nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob 2-AG ein geeignetes Substrat für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische ist. Dazu müssten die Enzyme gereinigt werden, um 2-AG hydrolysierende Enzyme abzutrennen.

Zusammenfassung: Für die ALOX-Isoformen von *N. furzeri* und *P. nyererei* stellt ANA ein gutes Substrat dar. Mittels HPLC und LC-MS konnte ein ANA-Oxygenierungsprodukt nachgewiesen werden, dessen genaue Struktur jedoch nicht aufgeklärt werden konnte. Zur Oxygenierungseffizienz von 2-AG konnten keine abschließenden Aussagen gemacht werden.

3.7.2.3 *Vergleichende Untersuchungen zur Oxygenierungseffizienz verschiedener komplexer Substrate*

Um herauszufinden, welche der ausgewählten komplexen Substrate [5(R/S)-HETE, 15(R/S)-HETE, 5(S),6(R)-DiHETE, 5(S),15(S)-DiHETE, 18(S)-HEPE, 18(R)-HEPE, ANA] als gute bzw. weniger gute Substrate fungieren, wurden die Enzyme mit den entsprechenden Substraten unter identischen experimentellen Bedingungen (Substratkonzentration von 30 μ M) in 0,5 ml PBS inkubiert und anschließend die Menge der gebildeten Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC analysiert. Anhand der gebildeten Oxygenierungsprodukte wurde die Effizienz des Substratumsatzes abgeschätzt.

Vergleicht man die relativen Oxygenierungsaktivitäten aller getesteten Lipidsubstrate mit der AA Oxygenierungsaktivität der rekombinanten Knochenfisch ALOX-Isoformen, stellt man fest, dass 5(S),15(S)- und 5(S),6(R)-DiHETE sowie die beiden 18-HEPE Isomere [18(S)- und 18(R)-HEPE] gemessen an der Bildung von Lipoxin- bzw. Resolvinderivaten keine guten Substrate darstellen (Tab. 8) (203). Auch die relative Oxygenierungsaktivität von ANA liegt für alle ALOX-Isoformen deutlich unter der von AA. Interessanter Weise werden 5(R/S)-HETE und 15(R/S)-HETE durch alle Knochenfisch ALOX-Isoformen vergleichbar gut oder sogar besser oxygeniert als AA (203). Für die ALOX-Orthologen von Kaninchen (230) und Mensch (195) konnte hingegen gezeigt werden, dass HETE-Isomere deutlich schlechtere Substrate als AA darstellen.

Tab. 8: Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit komplexeren Lipidsubstraten [Roigas et al., 2022 (203)]. Die Substratspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit verschiedenen komplexeren Lipidsubstraten wurde wie im Methodenteil beschrieben getestet. Vergleichsgröße war die AA Oxygenase-Aktivität bei gleicher Menge an eingesetztem Lysatüberstand und gleicher Substratkonzentration (30 µM), welche 100 % gesetzt wurde. Anhand dieser Vergleichsgröße wurden die relativen Oxygenierungsaktivitäten der verschiedenen Lipidsubstrate berechnet. Für Lipidsubstrate, die kaum enzymatisch umgesetzt wurden (es konnte in den entsprechenden RP-HPLC Chromatogrammen kein Produktpeak identifiziert werden), ist die relative Oxygenierungsaktivität mit 1 % angegeben.

Spezies	relative Oxygenierungsaktivität (%)			Hauptprodukte
	N.	P.	S.	
	<i>furzeri</i>	<i>nyererei</i>	<i>formosus</i>	
AA	100	100	100	
5(R/S)-HETE	209,9	242,6	393,3	5,12-DiHETE
15(R/S)-HETE	78,2	202,4	508,3	8,15-DiHETE
ANA	18,5	34,9	7,7	HETE-ANA
18(S)-HEPE	9,5	20,9	1,0	n.i.
18(R)-HEPE	3,7	4,8	1,0	n.i.
5(S),15(S)- DiHETE	1,0	1,0	1,0	n.i.
5(S),6(R)- DiHETE	1,0	1,0	1,0	n.i.

Zusammenfassung: Die relative Oxygenierungsaktivität der meisten getesteten komplexeren Lipidsubstrate liegt für alle Knochenfisch ALOX-Isoformen deutlich unter der Oxygenierungsaktivität von AA. 5(R/S)- und 15(R/S)-HETE werden jedoch vergleichbar gut oder sogar besser als AA oxygeniert.

3.7.3 Aktivität der rekombinanten Enzyme unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen

Lipoxygenasen sind Enzyme, die atmosphärischen Sauerstoff als zweites Substrat verwenden. Für verschiedene ALOX-Isoformen von Säugetieren konnte gezeigt werden, dass die Affinität dieser Enzyme zum Sauerstoff sehr hoch ist, da K_M -Werte im Bereich von 10–26 μM bestimmt werden konnten (231). Für das AA 15-lipoxygenierende Enzym aus *P. aeruginosa* gilt das jedoch nicht. Mit einem K_M -Wert für Sauerstoff von 400 μM liegt die Sauerstoffaffinität dieses Enzyms deutlich unter der aller bisher gemessenen Säugetier ALOX-Isoformen (232).

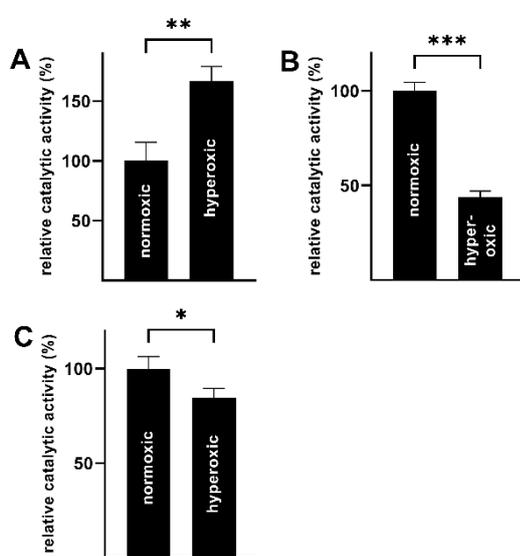


Abb. 37: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die AA Oxygenierung ausgewählter Knochenfisch ALOX-Isoformen [Nach Abb. 7, Roigas et al., 2022 (203)]. Die Lysatüberstände der rekombinanten Expression wurden für Messungen der AA Oxygenase-Aktivität (Material und Methoden) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden mit Luft (Normoxie) bzw. Sauerstoffgas (Hyperoxie) equilibriert. Nach 3 min wurde die Inkubation gestoppt und die Menge der gebildeten AA Oxygenierungsprodukte wurde mittels RP-HPLC quantifiziert. Unter beiden Reaktionsbedingungen wurden 3 unabhängige Reaktionsansätze ($n=3$) durchgeführt und Mittelwert \pm Standardabweichung wurden bestimmt. Der Mittelwert der relativen katalytischen Aktivität unter normoxischen Bedingungen wurde 100 % gesetzt. Die erhaltenen Daten wurden mit dem ungepaarten T-Test statistisch ausgewertet. **A)** Vermeintliche *N. furzeri*-ALOX15. **B)** Vermeintliche *P. nyererei*-ALOX15. **C)** Vermeintliche *S. formosus*-ALOX15.

Um abzuschätzen, ob sich die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der ausgewählten Knochenfische hinsichtlich ihrer Sauerstoffaffinität eher wie die Säugetier ALOX-Isoformen oder die *P. aeruginosa* ALOX verhalten, wurden vergleichende Messungen mit allen rekombinant exprimierten Enzymen durchgeführt. Das für diese Untersuchungen eingesetzte Zellhomogenat der vermeintlichen *S. formosus*-ALOX15 stammt aus *E. coli*, während für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* Sf9-Zellhomogenate verwendet wurden. Die Messungen wurden unter normoxischen (Reaktionspuffer ist Luft-gesättigt, Sauerstoffkonzentration von ca. 160 μM) und hyperoxischen (Reaktionspuffer ist Sauerstoff-gesättigt, Sauerstoffkonzentration von ca. 800 μM) Bedingungen durchgeführt. Sollte es sich bei diesen ALOX-Isoformen um Enzyme mit geringer Sauerstoffaffinität handeln, konnte erwartet werden, dass die AA Oxygenaseaktivitäten in den hyperoxischen

Reaktionsansätzen deutlich über denen liegen sollten, die unter normoxischen Bedingungen gemessen werden. Um diese Informationen zu erhalten, wurden die Enzyme über 3 Minuten mit AA unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen inkubiert und die Menge an gebildeten Produkten mittels RP-HPLC analysiert.

Die Auswertung des Experiments zeigte für die rekombinant exprimierten Enzyme von *P. nyererei* und *S. formosus* keine deutliche Erhöhung der Produktmenge im hyperoxischen Reaktionsansatz. Für das Enzym aus *S. formosus* beobachteten wir eine leichte Erniedrigung der katalytischen Aktivität unter hyperoxischen Bedingungen (Abb. 37C), wobei der Unterschied auch statistisch signifikant war ($p \leq 0,05$, ungepaarter T-Test). Auch für das Enzym aus *P. nyererei* war die katalytische Aktivität unter hyperoxischen Bedingungen etwas geringer, wobei auch hier der Unterschied statistisch signifikant war (Abb. 37B, $p \leq 0,001$, ungepaarter T-Test).

Diese Daten deuten darauf hin, dass sich die Sauerstoffaffinität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen eher wie die entsprechenden Affinitäten der Säugetier ALOX15-Orthologen verhält (203). Der leichte Rückgang der katalytischen Aktivität unter hyperoxischen Bedingungen könnte auf eine mögliche Sauerstofftoxizität für die Enzyme zurückzuführen sein. Einige proteinogene Aminosäuren (z.B. Cys, Met, Trp) sind oxidationsempfindlich und können bei erhöhten Sauerstoffkonzentrationen oxidiert werden. Wenn es sich bei diesen Aminosäuren um Bestandteile des aktiven Zentrums handelt, könnte eine solche Aminosäureoxidation zu einem teilweisen Verlust der katalytischen Aktivität führen.

Die Analyse der gebildeten Produktmengen zeigte, dass die vermeintliche ALOX15 von *N. furzeri* unter hyperoxischen Bedingungen eine ca. 50 % höhere katalytische Aktivität aufweist (Abb. 37A), wobei der Unterschied zwischen den Reaktionsbedingungen statistisch signifikant war ($p \leq 0,01$, ungepaarter T-Test). Da die Sauerstoffkonzentration in den hyperoxischen Reaktionsansätzen ca. 5-mal höher ist als in den normoxischen Proben, kann geschlussfolgert werden, dass eine Verfünffachung der Sauerstoffkonzentration nur eine 50%ige Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hatte. Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass auch dieses Enzym bereits unter normoxischen Bedingungen nahe am Sättigungsbereich für Sauerstoff arbeitet.

Zusammenfassung: Die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der untersuchten Knochenfische besitzen eine hohe Affinität für Sauerstoff, wobei keine exakte Bestimmung des K_M -Wertes für Sauerstoff durchgeführt wurde.

3.8 Membranoxygenaseaktivität

In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass viele Säugetier ALOX15-Orthologen [Mensch (195), Schwein (233), Kaninchen (48)] die Fähigkeit zur Oxygenierung von Biomembranen besitzen. Um zu untersuchen, ob die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische auch eine Membranoxygenaseaktivität aufweisen, wurden die Knochenfischenzyme sowie die Kaninchen-ALOX15 als Positivkontrolle für 15 Minuten mit Modellbiomembranen [submitochondriale Partikel (SMP)] inkubiert und die dabei entstandenen Produkte wurden mittels RP-HPLC analysiert. Bei den verwendeten SMPs handelt es sich um Vesikel der Innenmembran von Rinderherzmitochondrien. Vor der Durchführung des Experiments wurden die Mengen des eingesetzten Lysatüberstandes für die Knochenfisch ALOX-Isoformen und die Kaninchen-ALOX15 anhand ihrer Arachidonsäureoxygenaseaktivität so angepasst, dass eine vergleichbar hohe Arachidonsäureoxygenaseaktivität eingestellt wurde.

Inkubiert man Lipoxygenasen mit Biomembranen, wird ein Teil der in den Membranen enthaltenen Polyenfettsäuren, die überwiegend in den Membranphospholipiden vorkommen, oxygeniert. Extrahiert man die Membranlipide und hydrolysiert die Esterlipide, können die bei dieser Reaktion gebildeten oxygenierten PUFAs in der RP-HPLC bei einer Wellenlänge von 235 nm quantifiziert werden. Gleichzeitig können im gleichen chromatographischen Lauf die bei der alkalischen Hydrolyse freigesetzten PUFAs (hauptsächlich Arachidonsäure und Linolsäure) bei einer Wellenlänge von 210 nm quantifiziert werden. Setzt man die Summe aus oxygenierten PUFAs und nicht-oxygenierten PUFAs 100 %, kann der prozentuale Anteil der oxygenierten PUFAs ermittelt werden. Dieser Wert kann als geeignetes Maß für die Membranoxygenaseaktivität von ALOX-Isoformen verwendet werden. Er liegt bei unbehandelten Biomembranen deutlich unter 0,1 %.

Dieser Wert gibt an, dass in den unbehandelten Modellmembranen von 1000 PUFA-Resten höchstens einer als oxygeniertes Derivat vorliegt (NEK). Nach der Inkubation der Modellmembranen mit der Kaninchen-ALOX15 stieg der Oxygenierungsgrad der Membranlipide auf 5,6 % an, was einer Verfünzigfachung des Oxygenierungsgrades gleichkommt. Unter diesen Bedingungen lagen also mehr als 5 % der Membranlipide als oxygenierte Derivate vor. Da die oxygenierten Membranlipide sich in der Lipiddoppelschicht der Membran nicht gleichmäßig verteilen, sondern hydrophile Cluster bilden, kommt es dazu, dass die Barrierefunktion der Membranen beeinträchtigt

wird. Solche funktionellen Beeinträchtigungen wurden bereits bei Oxygenierungsgraden von 1–2 % beobachtet (234).

Ein Beispielchromatogramm, welches die Bildung der Oxygenierungsprodukte durch die Kaninchen-ALOX15 demonstriert, ist in Abbildung 38 dargestellt. Wurde das Chromatogramm bei 235 nm (Absorptionsmaximum der konjugierten Diene der oxygenierten PUFAs) verfolgt, konnten die PUFA-Oxygenierungsprodukte nachgewiesen werden (Panel A). Diese wurden unter unseren Analysebedingungen mit einer Retentionszeit von ca. 8 Minuten eluiert und sind durch das typische UV-Spektrum der konjugierten Diene (Inset) gekennzeichnet. Leider konnten unter den angewandten analytischen Bedingungen die zu erwartenden dominanten Oxygenierungsprodukte 13-HODE und 15-HETE nicht voneinander getrennt werden. Eine solche Trennung war jedoch für die Beantwortung der Frage, ob Biomembranen als Substrat für die ALOX-Isoformen fungieren, primär nicht bedeutsam. Die Elution der nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren wurde bei 210 nm (Panel B) verfolgt. Dabei konnten zwei dominante PUFA-Peaks identifiziert werden, die über ihre Retentionszeiten als Arachidonsäure und Linolsäure identifiziert werden konnten.

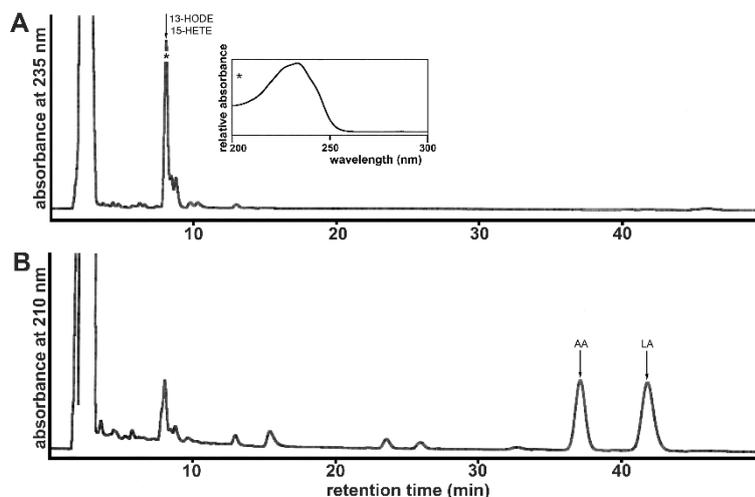


Abb. 38: RP-HPLC Chromatogramme der Membranoxygenaseaktivität der Kaninchen-ALOX15 [Roigas et al., 2022 (198)]. Das gereinigte Enzym wurde mit den Modellmembranen (1,4 mg Membranprotein/ ml PBS) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Hydroperoxyderivate wurden mit NaBH₄ reduziert, die Membranlipide wurden extrahiert und die Esterlipide wurden unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Die bei der Hydrolyse entstandenen freien Fettsäurederivate wurden mittels RP-HPLC analysiert. **A)** Chromatogramm bei 235 nm zur Detektion der konjugierten Diene

(oxygenierte PUFAs) und typisches UV-Spektrum der konjugierten Diene (Inset), **B)** Chromatogramm bei 210 nm zur Detektion der verseiften nicht-oxygenierten PUFAs. Das UV-Spektrum wurde zu der mit * gekennzeichneten Zeit aufgenommen.

Abbildung 39 zeigt die Membranoxygenaseaktivität des vermeintlichen ALOX15-Orthologs aus *P. nyererei*. Auch hier ist bei 235 nm ein Peak erkennbar, der durch ein charakteristisches UV-Spektrum konjugierter Diene (Inset) ausgezeichnet ist. Dieser Peak ist aber deutlich kleiner als bei den Experimenten mit der Kaninchen-ALOX15 (Abb. 38).

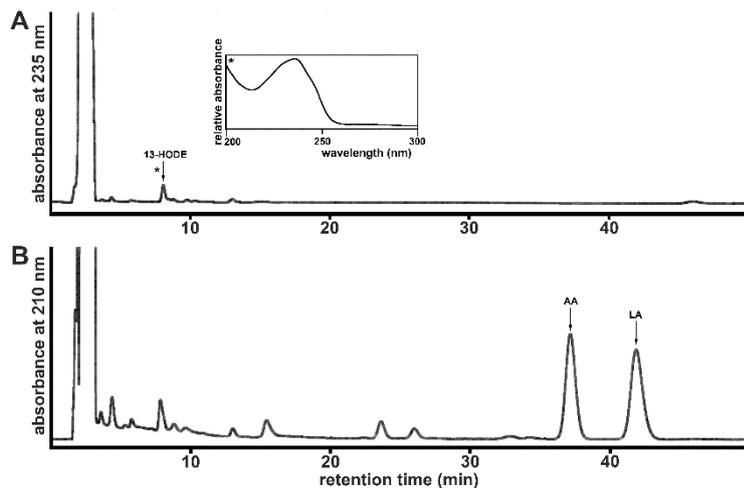


Abb. 39: RP-HPLC Chromatogramme der Membranoxygenaseaktivität der vermeintlichen ALOX15 aus *P. nyererei*. Zur Quantifizierung der Membranoxygenaseaktivität wurde das Enzym mit den Modellmembranen (1,4 mg Membranprotein/ ml PBS) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Hydroperoxyderivate wurden mit NaBH₄ reduziert, die Membranlipide wurden extrahiert und die Esterlipide wurden unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Die bei der Hydrolyse entstandenen freien Fettsäuren wurden mittels RP-HPLC analysiert. **A)** Chromatogramm bei

235 nm zur Detektion der konjugierten Diene (oxygenierte PUFAs) und typisches UV-Spektrum der konjugierten Diene (Inset). **B)** Chromatogramm bei 210 nm zur Detektion der freien nicht-oxygenierten PUFAs. Das UV-Spektrum wurde zu der mit * gekennzeichneten Zeit aufgenommen.

Unter den getesteten Knochenfisch ALOX-Isoformen weist das Enzym aus *P. nyererei* jedoch die höchste Membranoxygenaseaktivität auf (Tab. 9). Im Vergleich zur Kaninchen-ALOX15 sind die beobachteten Membranoxygenierungsaktivitäten für die ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* jedoch deutlich geringer, obwohl die AA-Oxygenierungsaktivitäten der verwendeten Enzyme durch Verdünnung zu Beginn des Versuchs synchronisiert wurden (die für *P. nyererei* nachgewiesene Membranoxygenaseaktivität macht weniger als 5 % der Aktivität des Kaninchenenzym aus). Somit lagen die quantifizierten Oxygenierungsgrade der Membranlipide für *N. furzeri* und *P. nyererei* nahe der Nichtenzym-Kontrolle (NEK), während die *S. formosus*-ALOX15 keine Membranoxygenierungsaktivität aufwies (Tab. 9) (198).

Tab. 9: Relative Membranoxygenaseaktivität ausgewählter ALOX15-Orthologen [Roigas et al., 2022 (198)]. Die Membranoxygenaseaktivität wurde wie im Methodenteil beschrieben quantifiziert. Als Kontrolle und Vergleich diente die ALOX15 des Kaninchens. Die Summe aus oxygenierten und nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren für jede Inkubation wurde 100 % gesetzt und der relative Anteil (%) der oxygenierten Fettsäuren wurde errechnet.

Spezies	Anteil der oxygenierten Polyenfettsäuren in den Membranlipiden (%)
NEK	0,05 ± 0,03
Kaninchen	5,6 ± 0,33
<i>N. furzeri</i>	0,04 ± 0,01
<i>P. nyererei</i>	0,21 ± 0,2
<i>S. formosus</i>	0

Zusammenfassung: Die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische weisen im Vergleich zur Kaninchen-ALOX15 eine sehr geringe (< 5 %) Membranoxygenaseaktivität auf, wenn diese katalytischen Aktivitäten auf identische Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten normiert wurden.

3.9 Untersuchungen mit schweren Sauerstoffisotopen ($^{18}\text{O}_2$)

Bei der Lipoxigenasereaktion wird atmosphärischer Sauerstoff in das Substratfettsäuremolekül eingebaut. Um dies experimentell nachzuweisen, wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Arachidonsäureoxygenierung unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt wurde. Dazu wurden sowohl die rekombinanten Knochenfisch ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei*, die im Sf9-Zellsystem exprimiert wurden, als auch das Enzym aus *S. formosus*, welches aus *E. coli* stammte, eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Reaktionspuffer, der 20 μM Arachidonsäure als Substrat enthielt, durch intensives Spülen mit Argongas anaerobisiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit $^{18}\text{O}_2$ -Gas equilibriert und die Reaktion durch Zugabe von teilweise anaerobisiertem Enzym (Inkubation der Enzympräparation für 30 min auf Eis unter Argonatmosphäre) gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 min durch Zugabe von NaBH_4 gestoppt, die entstandenen Produkte (HETE-Isomere) wurden mittels RP-HPLC präpariert und in der Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden die relativen Intensitäten der Massenspektren bei m/z 319 (entspricht dem Molekulargewicht von HETE-Isomeren mit einem ^{16}O -Atom in der OH-Gruppe) und bei m/z 321 (entspricht dem Molekulargewicht von HETE-Isomeren mit einem ^{18}O -Atom in der OH-Gruppe) miteinander verglichen. Zu Vergleichszwecken wurden identische Experimente durchgeführt, bei denen die Reaktionsmischung nach dem Spülen mit Argongas mit $^{16}\text{O}_2$ Gas equilibriert wurde.

Die Analysen, die in Tabelle 10 zusammengefasst sind, zeigten, dass bei den Umsätzen, die unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt wurden, dominant ein Atom ^{18}O in die Produkte eingebaut wurde. Dies war sowohl für das Hauptprodukt 12-HETE als auch für das Nebenprodukt 8-HETE der Fall. Bei beiden Produkten konnte ein geringer Einbau (ca. 10 %) von ^{16}O nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann vor allem dadurch erklärt werden, dass zum Einen bei der Anaerobisierung der Reaktionsmischung (Spülen mit Argongas) der Luftsauerstoff ($^{16}\text{O}_2$) nicht vollständig aus der Reaktionsmischung ausgetrieben wurde. Zum Anderen ist es wahrscheinlich, dass bei der Lagerung der Enzympräparation unter Argonatmosphäre nicht der komplette Luftsauerstoff aus der

Enzympräparation entfernt wurde. Leider war es nicht möglich, den Luftsauerstoff aus der Enzympräparation effektiver zu entfernen, da bei einer Spülung der Enzympräparation mit Argongas oder bei einer Sekurierung der Enzympräparation das Enzym komplett inaktiviert wurde. Deshalb konnten mit entsprechend behandelten Enzympräparationen keine verlässlichen in vitro Aktivitätsmessungen durchgeführt werden.

Tab. 10: Einbau der Sauerstoffisotope ^{18}O und ^{16}O in die Reaktionsprodukte, wenn die AA Oxygenierung durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen von *N. furzeri*, *P. nyererei* und *S. formosus* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt wurde [Roigas et al., 2022 (198)]. AA Oxygenase-Aktivitätsassays wurden wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die dominanten Reaktionsprodukte (Summe von 12-HETE und 8-HETE) wurden mittels RP-HPLC (siehe Material und Methoden) präpariert und anschließend mittels LC-MS (siehe Material und Methoden) analysiert. Aus den Intensitäten der Molekulargewichtionen (m/z 319 für ^{16}O -Einbau, m/z 321 für ^{18}O -Einbau) wurde der prozentuale Anteil des Einbaus der beiden Sauerstoffisotope in beiden Hauptprodukten errechnet.

Spezies	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Einbau unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre			
	12-HETE		8-HETE	
	^{18}O (%)	^{16}O (%)	^{18}O (%)	^{16}O (%)
<i>N. furzeri</i>	90,8	9,2	87,0	13,0
<i>P. nyererei</i>	89,9	10,1	90,3	9,7
<i>S. formosus</i>	91,8	8,2	89,0	11,0

Zusammenfassung: Wurde die Arachidonsäureoxygenierung durch die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri*, *P. nyererei* und *S. formosus* unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt, ergab sich, dass dominant ^{18}O in die Hauptoxygenierungsprodukte eingebaut wurde.

3.10 Ortsgerichtete Mutagenese

3.10.1 Mutageneseuntersuchungen zur Anwendbarkeit der A-vs.-G-Hypothese

Wie unter 3.6.2 beschrieben, konnte 12(S)-HETE für alle vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische als Hauptprodukt identifiziert werden. Das entsprechende Produktenantiomer 12(R)-HETE wurde nur in Spuren nachgewiesen, was für eine hohe Reaktionsspezifität der ALOX-Isoformen spricht. Allerdings wurden bei allen drei getesteten Knochenfisch ALOX-Isoformen zusätzlich kleine Mengen an 8(R)-HETE gefunden. Hier war das entsprechende Produktenantiomer [8(S)-HETE] ebenfalls nur in geringen Mengen nachweisbar. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der drei Knochenfischenzyme miteinander, stellt man fest, dass bei allen Enzymen und auch bei der ALOX1 des Zebrafischs die Coffa-Determinante (siehe 1.6) durch ein Glycin repräsentiert wird (Abb. 40).

Danio15 NP 955912.1	QVFQLLSHLLRTHLMVEVICVATLRQLPAVHPIYKLLTPHLRYTLEINCRGRTQLLSPEG	419
Sclero15 XP 018588735.1	QVFQVLSHLLRTHLVIEVFCVATLRQLPAVHPIYKLLTPHLRYTLEINCRGRTQLISSNG	417
Notho15_XP_015813570.1	QVFQLLSHLLRTHLVVEVFCVATLRQLPAVHPIYKLLAPHLRYTLEINCRGRTQLISANG	419
Punda15 XP 005753048.1	QVFQLLSHLLRTHLVVEVFCVATLRQLPAVHPIYKLLAPHLRYTLEINCRGRTQLISANG	419

Abb. 40: Aminosäuresequenzalignment der Coffa-Region ausgewählter Knochenfisch ALOX-Isoformen [Roigas et al., 2022 (198)]. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Coffa-Region der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *D. rerio*, *S. formosus*, *N. furzeri* und *P. nyererei*. Die Coffa-Determinante (Glycin) ist blau markiert, das zur Coffa-Determinante N-terminal benachbarte Arginin ist grün markiert.

Nach der A-vs.-G-Hypothese müsste es sich bei diesen Enzymen um dominante R-Lipoxygenasen handeln. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe Abb. 27). Damit scheinen sich die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen ähnlich wie die Zebrafisch-ALOX1 (20) nicht an die A-vs.-G-Hypothese zu halten. Da aber bei der Arachidonsäureoxygenierung der hier charakterisierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische auch 8(R)-HETE als Nebenprodukt gebildet wurde, haben wir versucht, durch ortsgerichtete Mutagenesen die Reaktionsspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen dahingehend zu verändern, dass der 8(R)-HETE Anteil reduziert wird. Bei diesen Experimenten wurden zwei komplementäre Mutagenesestrategien verfolgt:

i) Das Glycin (Coffa-Determinante) an Position 410 bzw. 408 wurde durch ein Alanin ersetzt. Diese Strategie entspricht 1:1 der A-vs.-G-Hypothese und sollte zu einer weiteren Erhöhung des Anteils von 12(S)-HETE an der Produktmischung führen. Diese Experimente waren vor allem für das vermeintliche ALOX15-Orthologe von *S. formosus* interessant, da hier der relative Anteil von 8(R)-HETE an der Produktmischung fast 40 % betrug (Abb. 27).

ii) Das zur Coffa-Determinante N-terminal benachbarte positiv geladene Arginin an Position 409 bzw. 407, das bei den Knochenfisch ALOX-Isoformen hoch konserviert zu sein scheint, wurde durch ein neutrales Isoleucin ersetzt. Dadurch wurde eine positive Ladung entfernt, was für die Substratbindung am aktiven Zentrum der Enzyme bedeutsam sein könnte.

In Abbildung 41 sind RP-HPLC Chromatogramme für ausgewählte Mutanten der vermeintlichen ALOX15 von *N. furzeri* zusammengestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass der Gly410Ala Austausch zu einer Halbierung der 8(R)-HETE Bildung führt. Entsprechend stieg der Anteil von 12(S)-HETE an der Produktbildung auf über 80% an.

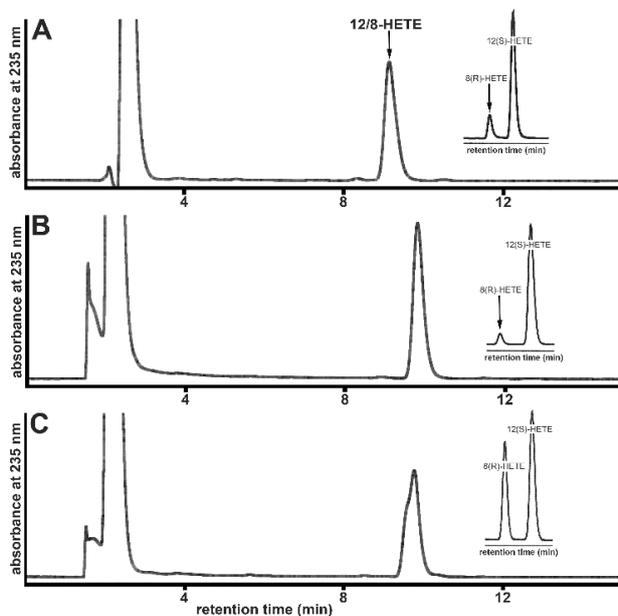


Abb. 41: Reaktionsspezifität von Wildtyp und Mutanten der vermeintlichen *N. furzeri*-ALOX15 [Nach Abb. 8, Roigas et al., 2022 (198)]. Das Wildtypenzym, dessen Gly410Ala- und Arg409Ile-Mutanten wurden in Sf9-Zellen exprimiert und für Aktivitätsassays (Material und Methoden) eingesetzt. Die dominanten Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert (Hauptchromatogramme) und anschließend durch NP/CP-HPLC (Insets) weiter analysiert. **A)** Wildtypenzym. **B)** Gly410Ala-Mutante. **C)** Arg409Ile-Mutante.

Ein noch drastischerer Anstieg der 12(S)-HETE Bildung konnte für Gly410Ala Mutanten der ALOX-Isoformen aus *P. nyererei* und *S. formosus* beobachtet

werden. Die Gly410Ala Mutanten der beiden Enzyme wandelten AA ausschließlich zu 12(S)-HETE um (Tab. 11). Der Anteil von 8(R)-HETE an der Gesamtproduktmischung ging von 21 % bzw. 43 % auf Null zurück (Tab. 11). Ein Arg409Ile Austausch induzierte eine gegenläufige Veränderung im Produktmuster. Bei dieser Enzymmutante kam es für das vermeintliche ALOX15-Orthologe von *N. furzeri* zu einem deutlichen Anstieg der 8(R)-HETE Bildung, sodass 12(S)-HETE und 8(R)-HETE in vergleichbaren Mengen gebildet wurden (Abb. 41C). Ähnliche Veränderungen in der Reaktionsspezifität wurden auch für die vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *P. nyererei* und *S. formosus* beobachtet (Tab. 11). Damit ist die A-vs.-G-Hypothese teilweise auf die ausgewählten Knochenfisch ALOX-Isoformen anwendbar (198).

Tab. 11: Muster der dominanten AA Oxygenierungsprodukte [12(S)-HETE, 8(R)-HETE] der Wildtypenzyme der vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische und von ausgewählten Punktmutanten [Roigas et al., 2022 (198)]. Die Wildtypenzyme und die spezifizierten Punktmutanten wurden als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine in Sf9-Zellen (*N. furzeri* WT, Gly410Ala- und Arg409Ile-Mutante, *P. nyererei* WT, Gly410Ala- und Arg409Ile-Mutante) oder *E. coli* (*S. formosus* WT, Gly408Ala- und Arg407Ile-Mutante) exprimiert und die erhaltenen Zellysate überstände wurden anschließend für Aktivitätsassays (siehe Material und Methoden) eingesetzt. Die dominanten Oxygenierungsprodukte (siehe Abb. 41) wurden mittels RP-HPLC präpariert und anschließend durch NP/CP-HPLC weiter analysiert.

Spezies	8(R):12(S)-Verhältnis (%)		
	Wildtyp	Mutante Gly → Ala	Mutante Arg → Ile
<i>N. furzeri</i>	15:85	7:93	40:60
<i>P. nyererei</i>	21:79	0:100	41:59
<i>S. formosus</i>	43:57	0:100	51:49

Zusammenfassung: Die vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische halten sich nur teilweise an die A-vs.-G-Hypothese, da sie ein Gly als Coffa-Determinante tragen, aber vorwiegend 12(S)-HETE bilden. Ein Gly410(408)Ala Austausch führt zu einer starken Reduktion der 8(R)-HETE Bildung, was konsistent mit der A-vs.-G-Hypothese ist. Ein Arg409(407)Ile Austausch führt zu einer deutlichen Erhöhung des 8(R)-HETE Anteils.

3.10.2 Mutageneseuntersuchungen zur Anwendbarkeit des Triadenkonzepts

Das Triadenkonzept (siehe 1.4) wurde entwickelt, um die Reaktionsspezifität verschiedener Säugetier ALOX15-Orthologen mit AA als Substrat zu erklären (15- oder 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe). Es beruht darauf, dass die Triadendeterminanten 15-lipoxygenierender ALOX15-Orthologen durch Aminosäuren mit sperrigen Seitenketten repräsentiert werden, wodurch das Substrat AA nur bis zu einer bestimmten Tiefe in die Substratbindungstasche gleiten kann und der Einbau des molekularen Sauerstoffs somit am 15. Kohlenstoffatom der AA erfolgt. Für die humane ALOX15 konnten folgende Aminosäuren als Triadendeterminanten identifiziert werden: Phe353 (Borngräber 1), Ile418 und Met419 (Sloane Determinanten) und Ile593 (Borngräber 2). Schaut man sich die Triadendeterminanten der ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen an, stellt man fest, dass die Sloane Determinanten nicht durch ein Isoleucin und ein Methionin, sondern durch zwei Valine repräsentiert werden, die deutlich kleinere Seitenketten tragen (Abb. 42). Diese Daten würden rein formal zu den erhaltenen Ergebnissen passen, dass es sich bei diesen ALOX-Isoformen um AA 12-lipoxygenierende Enzyme handelt (Abb. 26).

Danio15_NP_955912.1	IFKRVVSTGGEGLLILAQREYKVLTYRSLQPKDFLDLDRGVTKVKGYVYRDYSLMLWDVIO	479
Sclero15_XP_018588735.1	IFKRVVSTGGEGLLVLAQKEYKVLTYRSLQPSVDFHERGVTKLKGIFYKEDSMMLWDAIH	477
Notho15_XP_015813570.1	IFKRVVSTGGDGLLILAQREYKVLTYRSLQPHYDFSDRGVSQLPNFYFYREHSLMLWEAVH	479
Punda15_XP_005753048.1	IFKRVVSTGGDGLLILAQREYKVLTYRSIQPLYDFCDRGVSQLPNFYFYKDHSMLLWEAIIH	479

Abb. 42: Sequenzalignment der Region der Triadendeterminanten ausgewählter vermeintlicher Knochenfisch ALOX15-Orthologen [Roigas et al., 2022 (198)]. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Region, in der sich die Triadendeterminanten der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *D. rerio*, *S. formosus*, *N. furzeri* und *P. nyererei* befinden. Die Sloane Determinanten (Valin und Valin) sind gelb markiert.

Sollten sich die Knochenfischenzyme tatsächlich an das Triadenkonzept halten, sollte ein Austausch der beiden kleinen Valine durch das Ile+Met Motiv, das bei den meisten AA 15-lipoxygenierenden Säugetier ALOX15-Isoformen an dieser Stelle anzutreffen ist, zu einer Änderung der Reaktionsspezifität in Richtung vermehrten

Bildung von 15-HETE führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir durch ortsgerichtete Mutagenesen die Valine an Position 422(424) und 423(425) durch das Ile+Met Motiv ersetzt. Dabei wurde festgestellt, dass die erzeugten Doppelmutanten für alle Knochenfisch ALOX-Isoformen zwar katalytisch aktiv waren, dass aber keine Veränderungen in der Reaktionsspezifität der AA Oxygenierung beobachtet werden konnten.

Ein Beispielchromatogramm für die ALOX-Isoform aus *N. furzeri* ist in Abbildung 43 gezeigt. Ähnliche Chromatogramme wurden für die ALOX-Isoformen aus *P. nyererei* und *S. formosus* erhalten (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass das Triadenkonzept auf die ausgewählten ALOX-Isoformen der Knochenfische nicht anwendbar ist (198). Da dieses Konzept auf alle bisher untersuchten Säugetier ALOX15-Orthologen anwendbar ist (31), kann daraus geschlussfolgert werden, dass es sich bei den ALOX-Isoformen der Knochenfische nicht um orthologe Enzyme der Säugetier ALOX15-Orthologen handelt.

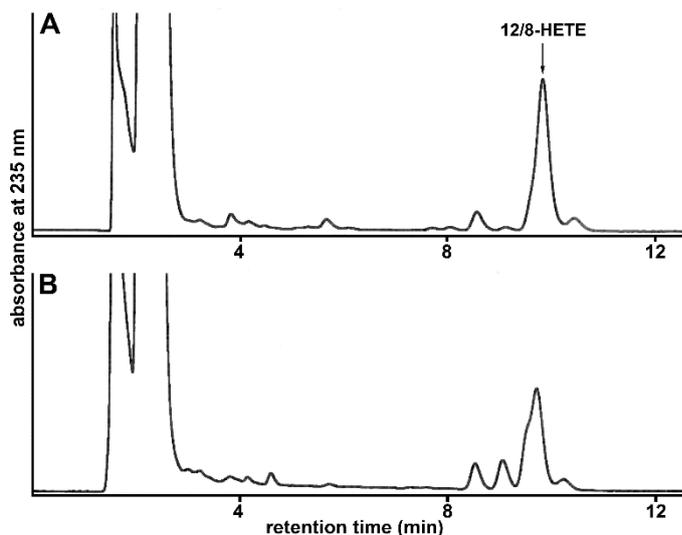


Abb. 43: Reaktionsspezifität von Wildtyp und V424I+V425M-Mutante der vermeintlichen *N. furzeri*-ALOX15 [Roigas et al., 2022 (198)]. Das Wildtypenzym und dessen V424I+V425M-Mutante wurden in Sf9-Zellen exprimiert und für Aktivitätsassays (Material und Methoden) eingesetzt. Die dominanten Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC (Material und Methoden) präpariert. **A)** Wildtypenzym. **B)** Val424Ile+Val425Met-Mutante.

Die Borngräber 1 Determinante wird bei den verschiedenen Knochenfisch ALOX-Isoformen, wie bei der humanen ALOX15, durch ein Phe357/359 repräsentiert. Daher haben wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Mutationen dieser Triadendeterminante verzichtet.

Zusammenfassung: Die Sloane Determinanten sind für die Reaktionsspezifität der Knochenfisch ALOX-Isoformen nicht bedeutsam. Der Einbau großer Aminosäuren an den Sloane Determinanten verändert die Reaktionsspezifität der Enzyme nicht. Damit lässt sich das Triadenkonzept nicht auf die Knochenfisch ALOX-Isoformen anwenden.

3.10.3 Vergleichende Untersuchungen zur spezifischen Aktivität ausgewählter

Punktmutanten der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen

Mutageneseuntersuchungen können irreführend sein, da manche Punktmutanten nur mangelhaft exprimiert werden und damit die katalytische Aktivität in den Lysatüberständen deutlich geringer ausfällt. Das hätte auch Auswirkungen auf die Interpretation der Produktspezifität der rekombinanten Enzyme. Sind die Enzymaktivitäten in den Lysatüberständen gering, machen sich bei der Produktanalyse Autoxidationsprodukte, die bereits im angebotenen Fettsäuresubstrat vorhanden sind oder während der Inkubation entstehen, deutlich stärker bemerkbar, was zu Fehlinterpretationen der Produktspezifität führen würde. Sollten rekombinante Enzyme nur auf einem niedrigen Niveau exprimiert werden, dürfen diese Ergebnisse aber nicht dahingehend interpretiert werden, dass sich die spezifischen Aktivitäten der mutierten Enzyme von den Wildtypenzymen unterscheiden. Um die spezifische Aktivität der durch ortsgenetzte Mutagenese erzeugten Punktmutanten der Knochenfisch ALOX-Isoformen vergleichend abschätzen zu können, wurde versucht, die Mengen der in den Lysatüberständen vorhandenen Fusionsproteine mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers im Western Blot zu quantifizieren (Abb. 44) und die ermittelten ALOX-Proteinmengen dann ins Verhältnis zu den gemessenen ALOX-Aktivitäten zu setzen. Dafür wurden zunächst jeweils 7,5 µl des Lysatüberstandes zur SDS-PAGE aufgetragen.

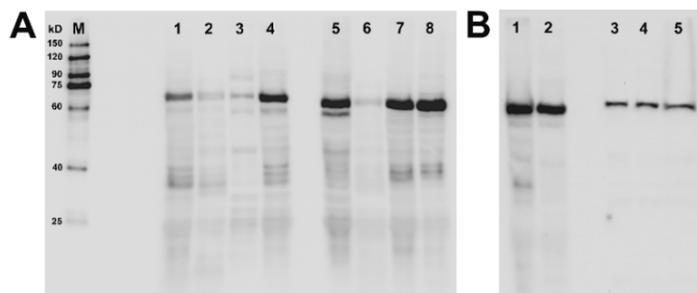


Abb. 44: Western Blot-Analysen der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen. Für diese Analysen wurden Aliquots der Lysatüberstände der Expressionsansätze aufgetragen und die rekombinanten His-tag Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines Anti-His-tag-Antikörpers spezifisch angefärbt. **A)** M = Molekulargewichtsmarker, lane 1 = *N. furzeri* Wildtyp (101 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5

µl), lane 2 = *N. furzeri* G410A-Mutante (54 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 3 = *N. furzeri* R409I-Mutante (36 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 4 = *N. furzeri* V424I + V425M-Mutante (54 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 5 = *P. nyererei* Wildtyp (113 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 6 = *P. nyererei* G410A-Mutante (54 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 7 = *P. nyererei* R409I-Mutante (101 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 8 = *P. nyererei* V424I + V425M-Mutante (62 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl). Für beide Knochenfischspezies wurden Aliquots des Lysatüberstandes aus der Expression im Sf9-Zellsystem aufgetragen. **B)** lane 1 = *S. formosus* Wildtyp (64 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 2 = *S. formosus* V422I + V423M-Mutante (83 µg Gesamtlysatsprotein in 7,5 µl), lane 3 = *S. formosus* Wildtyp (27 µg Gesamtlysatsprotein in 3,75 µl), lane 4 = *S. formosus* G408A-Mutante (32 µg Gesamtlysatsprotein in 3,75 µl), lane 5 = *S. formosus* R407I-Mutante (114 µg Gesamtlysatsprotein in 3,75 µl). Die in lane 1 und 2 aufgetragenen Aliquots stammen aus der Expression der vermeintlichen *S. formosus*-ALOX15 im Sf9-Zellsystem. Die in lane 3-5 aufgetragenen Aliquots stammen aus der bakteriellen Expression des Enzyms. Hier wurden 7,5 µl des 1:2 mit PBS verdünnten Lysatüberstandes aufgetragen.

Aus Abbildung 44 ist ersichtlich, dass in den Lysatüberständen aller Expressionsansätze ein His-tag Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa nachgewiesen werden konnte. Anhand der Bandenintensitäten lässt sich ableiten, wie gut (oder schlecht) die jeweilige Punktmutante im Vergleich zum Wildtypenzym in den rekombinanten Expressionssystemen exprimiert wurde.

Nach Eichung des Western Blots mit einer bekannten Menge der His-tag-ALOX aus *M. fulvus* konnte aus den Bandenintensitäten darauf geschlossen werden, wie viel ng ALOX-Protein sich in den 7,5 µl des aufgetragenen Lysatüberstandes befand. Diese Bezugsgröße (Menge an ALOX-Protein pro definiertem Volumen Lysatüberstand) wird für die spätere Abschätzung der spezifischen Enzymaktivität benötigt.

Um die relativen spezifischen Enzymaktivitäten der exprimierten ALOX-Varianten einschätzen zu können, wurde als zweites Maß die katalytische Aktivität der Enzympräparate bestimmt. Dazu wurde die Menge an konjugierten Dienen im Standardaktivitätsassay bestimmt und auf die Menge des ALOX-Proteins normiert. Anschließend wurde die katalytische Aktivität des Wildtypenzyms 100 % gesetzt und die relativen spezifischen Aktivitäten der anderen ALOX-Varianten berechnet (Tab. 12).

Es sollte an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass es sich bei diesem methodischen Vorgehen nicht um eine exakte Quantifizierung der spezifischen katalytischen Aktivitäten handelt. Deshalb waren z.B. exakte Berechnungen der molekularen Umsatzraten mit diesem Vorgehen nicht möglich. Um solche kinetischen Konstanten zu ermitteln, hätten die Enzyme zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden müssen, was uns, wie unter 3.5 beschrieben, nicht gelang.

Aus Tabelle 12 ist ersichtlich, dass die G410A-Mutanten von *N. furzeri* und *P. nyererei* eine (bei *P. nyererei* sogar 5fach) höhere spezifische Aktivität besitzen als das jeweilige Wildtypenzym. Im Gegensatz dazu beträgt die spezifische Aktivität der G408A-Mutante von *S. formosus* nur knapp ein Fünftel der Wildtypaktivität. Die spezifischen Aktivitäten der Arg-zu-Ile-Mutanten sind zwar deutlich reduziert (Restaktivitäten von 4-20 % im Vergleich zu den Wildtypenzymen). Trotzdem zeigen die Veränderungen in der Reaktionsspezifität einen hoch spezifischen Charakter. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Fettsäureoxygenierung auch bei den Mutanten vollständig durch das Enzym kontrolliert wird. Bei der Mutation der Sloane-Determinanten kam es hingegen zu einem starken Abfall der relativen spezifischen Aktivitäten (0,8-2 % Restaktivitäten im Vergleich zum Wildtypenzym).

Tab. 12: Relative spezifische Aktivitäten der rekombinant exprimierten Wildtypenzyme und Punktmutanten von *N. furzeri*, *P. nysererei* und *S. formosus*. Erläuterungen siehe Text. * Expression in Sf9-Zellen, # Expression in *E. coli*.

Spezies	Enzymvariante	Relative spezifische Aktivität (%)
<i>N. furzeri</i>	Wildtyp*	100,0
	G410A*	128,3
	R409I*	21,9
	V424I+V425M*	1,9
<i>P. nysererei</i>	Wildtyp*	100,0
	G410A*	524,2
	R409I*	10,5
	V424I+V425M*	1,5
<i>S. formosus</i>	Wildtyp*	100,0
	V422I+V423M*	0,8
	Wildtyp#	100,0
	G408A#	18,9
	R407I#	4,2

Zusammenfassung: Die spezifischen katalytischen Aktivitäten der hergestellten Mutanten unterschieden sich von entsprechenden Wildtypenzymen. Für einige G-zu-A Mutanten konnten höhere spezifische Aktivitäten (gain-of-function mutations) beobachtet werden. Bei den R-zu-I Mutanten sank die spezifische Aktivität deutlich ab, wobei das Produktmuster hoch spezifisch blieb.

4 Diskussion

4.1 ALOX-Gene in Knochenfischen und Zuordnung der Knochenfisch ALOX-Isoformen zu humanen Isoformen

4.1.1 Verbreitung von ALOX-Genen in Knochenfischen

In vorbereitenden Untersuchungen haben wir die Datenbanken (Protein- und Gendatenbanken des NCBI) nach potenziellen ALOX-Sequenzen durchsucht (siehe 2.2.1.1). Die Proteindatenbank umfasste zum Zeitpunkt der Suche 54 verschiedene Knochenfischspezies und es konnten bei einem Großteil der Spezies verschiedene ALOX-Sequenzen gefunden werden (u.a. ALOX15B, ALOX12, ALOX5, ALOXE3). Die identifizierten ALOX-Sequenzen einiger ausgewählter Knochenfischspezies sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Bei diesen Sequenzen waren die proteinogenen Eisenliganden hoch konserviert, was dafürspricht, dass es sich um katalytisch aktive Proteine handelt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ALOX-Isoformen in Knochenfischen weit verbreitet vorkommen. Unter den in der Proteindatenbank gelandeten Treffern waren jedoch nur sieben als ALOX15 annotierte Sequenzen, was dafürspricht, dass ALOX15-Orthologe im Gegensatz zu anderen Isoformen (z.B. ALOX15B, ALOX12, ALOX5, ALOXE3) bei Knochenfischen deutlich weniger verbreitet sind. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die ALOX1 des Zebrafisches (*D. rerio*), welche zum Zeitpunkt der initialen Datenbanksuche als ALOX15 annotiert war, seit Mai 2021 als Arachidonsäure 12S-lipoxygenierendes Enzym bezeichnet wird. Diese Aktualisierung des Datenbankeintrags musste vor allem deshalb durchgeführt werden, weil funktionelle Untersuchungen zu diesem Enzym gezeigt hatten, dass dieses Protein AA zu 12S-HETE umwandelt und sich weder an das Triaden-Konzept noch an das A-vs.-G-Konzept hält (20).

Um die Frage zu beantworten, ob echte ALOX15-Gene bei Knochenfischen nachgewiesen werden können, haben wir uns die Annotierung der für die identifizierten vermeintlichen ALOX15-Orthologen kodierenden Gene angeschaut und sind hier auf einige Widersprüche gestoßen. So kodiert das entsprechende Gen von *N. furzeri* (ID: 107384708) nach der Annotierung durch das NCBI für ein Arachidonsäure 15-lipoxygenierendes Enzym, während es nach der Annotierung durch Ensembl als *alox12* bezeichnet wird. Gleiches gilt für das entsprechende Gen von *P. nyererei* (ID: 102199447).

Tab. 13: Vorkommen von ALOX-Genen in den Genomen ausgewählter Knochenfischspezies. Die ALOX-Gene ausgewählter Knochenfischspezies wurden aus der Gendatenbank des NCBI extrahiert. Zur Identifizierung der proteinogenen Eisenliganden wurden die dazugehörigen Aminosäuresequenzen mittels dualen Alignments mit Hilfe des Programms Emboss Needle mit der Aminosäuresequenz der entsprechenden humanen ALOX-Isoform verglichen.

Spezies	LOX-Gen	Gen ID	Protein	Größe (Aminosäuren)	Eisenliganden
Mensch	ALOX12	239	NP_000688.2	663	H360+H365 H540+N544+I663
	ALOX5	240	NP_000689.1	674	H368+H373 H551+N555+I674
	ALOXE3	59344	NP_001159432.1	843	H540+H545 H720+N724+I843
	ALOX15B	247	NP_001132.2	676	H373+H378 H553+S557+I676
Atlantischer Lachs	alox12	106608934	XP_014062649.1	670	H367+H372 H547+N551+I670
	alox5a	100194803	NP_001133304.1	674	H368+H373 H551+N555+V674
	si:dkey-17e16.9, hydroperoxide isomerase ALOXE3	106607999	XP_014061064.1	669	H367+H372 H546+N550+I669
Regenbogenforelle	alox12	110500350	XP_021433348.2	670	H367+H372 H547+N551+I670
	alox5	110502637	XP_036816206.1	674	H368+H373 H551+N555+V674
	LOC110534564, hydroperoxide isomerase ALOXE3	110534564	XP_036789706.1	671	H368+H373 H548+N552+I671
Medaka	alox12	101174953	XP_004080050.2	739	H436+H441 H616+N620+I739
	alox5a	101160835	XP_004077181.1	673	H367+H372 H550+N554+V673
Atlantischer Hering	alox12	105889668	XP_012671030.2	669	H366+H371 H546+N550+I669
	alox5a	105909748	XP_012693864.1	674	H368+H373 H551+N555+V674
	si:dkey-17e16.9, hydroperoxide isomerase ALOXE3	105910728	XP_031430649.1	668	H365+H370 H545+N549+M668
Hecht	alox12	105027651	XP_010898127.2	669	H366+H371 H546+N550+I669
	alox5a	105010608	XP_010868315.1	674	H368+H373 H551+N555+V674
	LOC105029908, hydroperoxide isomerase ALOXE3	105029908	XP_034143865.1	632	H321+H326 H504+N508+L632
	LOC105029901, alox15B	105029901	XP_010901767.1	669	H367+H372 H546+N550+I669
Große Bernsteinmakrele	alox12	111223569	XP_022603483.1	669	H366+H371 H546+N550+I669
	alox5a	111235185	XP_022619245.1	674	H368+H373 H551+N555+V674

Für *S. formosus* ist die Annotierung insofern widersprüchlich, als dass das Gen (ID: 108922837), welches für die aktualisierte ALOX-Sequenz (XP_018588735.2, siehe 2.2.1.2) kodiert, nach der Annotierung durch Ensembl als *alox12* bezeichnet wird, dieses Protein jedoch in der Datenbank des NCBI als ALOX5 annotiert ist. Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der ALOX-Isoform aus *S. formosus* wissen wir aber, dass es sich um ein vorrangig 12S-lipoxygenierendes Enzym handelt, wodurch die Annotierung des Gens als *alox12* plausibler erscheint.

Für den Zebrafisch (*D. rerio*) ist das entsprechende Gen (ID: 322732) derzeit einheitlich als *alox12* annotiert. Auch die für die nachträglich aus der NCBI-Proteindatenbank gelöschten ALOX15-Sequenzen von *H. burtoni* und *T. rubripes* kodierenden Gene (IDs: 102289271, 101070898) sind als *alox12* annotiert und es wurden für diese Knochenfischspezies neue Einträge für 12S-lipoxygenierende Enzyme zur Datenbank hinzugefügt (XP_042069301.1, XP_029696807.1, XP_029696806.1, April 2022).

Aus diesen teils widersprüchlichen Annotierungen der Knochenfischlipoxygenasen in den verschiedenen Datenbanken, aus den kürzlich vorgenommenen Annotierungsveränderungen und aus den derzeit verfügbaren funktionellen Daten zu diesen Enzymen muss geschlussfolgert werden, dass die Datenbankannotierungen, die sich wesentlich auf Sequenzvergleiche stützen, nicht immer mit den ermittelten Funktionsdaten der verschiedenen ALOX-Isoformen in Übereinstimmung zu bringen sind. Es ist durchaus möglich, dass eine bei der Genomsequenzierung neu entdeckte ALOX-Isoform fälschlicherweise als ALOX15 annotiert wird, spätere funktionelle Untersuchungen jedoch darauf hinweisen, dass dieses Enzym funktionell eher als ALOX12 klassifiziert werden muss. Deshalb sollten Datenbankannotierungen in Abwesenheit von Funktionsdaten immer mit Vorsicht interpretiert werden.

Zusammenfassend führten unsere Datenbanksuche und unsere Experimente zur funktionellen Charakterisierung von Knochenfisch ALOX-Isoformen zu zwei wesentlichen Schlussfolgerungen: i) ALOX-Gene kommen in den Genomen von Knochenfischen wie auch in landlebenden und marinen Säugetieren weit verbreitet vor. ii) Bisher konnte keines dieser ALOX-Gene zweifelsfrei als ALOX15-Ortholog identifiziert werden. Diese Schlussfolgerung wird durch kürzliche Untersuchungen zum Vorkommen von ALOX15-Orthologen bei Ursäugetieren (*Prototheria*) unterstützt. In den derzeit sequenzierten

Prototheria Genomen konnten zwar auch ALOX-Gene nachgewiesen werden (31). Keines dieser Gene scheint jedoch für eine echte ALOX15 zu kodieren. Im Gegensatz dazu konnten in Metatheria echte ALOX15-Orthologen nachgewiesen werden (31). Sollten sich diese vorläufigen Ergebnisse bestätigen, muss davon ausgegangen werden, dass ALOX15-Orthologe im Rahmen der Prototheria-Metatheria Transition evolutionär eingeführt wurden. Diese Schlussfolgerung würde bedeuten, dass die Einführung von ALOX15-Orthologen ein evolutionär junges Ereignis zu sein scheint und dass die meisten irdischen Lebewesen auch ohne ALOX15 auskommen.

Diese Ergebnisse bedeuten jedoch nicht, dass ALOX15-Orthologen in irdischen Lebewesen, die unterhalb der *Metatheria* einzuordnen sind, niemals vorkommen. Ein vereinzelt Vorkommen ist durchaus möglich. Der Verbreitungsgrad von ALOX15-Orthologen scheint aber bei irdischen Lebewesen, die unterhalb der *Metatheria* einzuordnen sind, deutlich geringer zu sein als bei *Eutheria*. Für andere ALOX-Isoformen (z.B. ALOX5, ALOX12, ALOX12B) ist die Situation grundlegend anders. Orthologe dieser menschlichen Enzyme konnten in den Genomen der derzeit sequenzierten Knochenfische weit verbreitet nachgewiesen werden.

4.1.2 Zuordnung der Knochenfisch ALOX-Isoformen zu murinen und humanen Isoformen

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Knochenfisch ALOX-Isoformen mit denen der humanen und murinen ALOX-Isoformen erlaubte aufgrund der geringen Aminosäureidentität (39–48 %) keine eindeutige Zuordnung zu einer der humanen oder murinen ALOX-Isoformen. Da aber eine Zuordnung der Knochenfischlipoxygenasen zu einer der humanen ALOX-Isoformen für die Evolution von Lipoxygenasen von großem Interesse war, erfolgte ein Vergleich der Größe sowie der Exon-Intron-Struktur der drei ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Gene mit den Genen der humanen ALOX-Isoformen. Durch simplen Größenvergleich der Gene ließ sich ausschließen, dass die Zielgene für ein Ortholog der humanen ALOX5 kodieren. Außerdem konnten in den Genomen der hier untersuchten Knochenfische eindeutige ALOX5-Gene nachgewiesen werden (Gen IDs: 107375698, 102207629, 108921027). Die Größen der anderen humanen ALOX-Gene waren denen der Knochenfischgene ähnlich, es konnten jedoch Unterschiede in der Exon-Intron Organisation identifiziert werden. Zusammengefasst wiesen die genomischen Strukturdaten darauf hin, dass die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen am nächsten mit der humanen ALOX15, ALOX15B bzw. ALOX12

verwandt sein sollten. Um eine genauere Zuordnung zu erreichen, wurden die Nukleotidsequenzidentitätsgrade der Gene, die für die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen kodieren, mit den Gensequenzen verglichen, die für die humanen ALOX-Isoformen kodieren. Von den drei humanen ALOX-Genen, die die vorherigen Filterschritte überstanden hatten, wies das Gen der humanen ALOX12 den höchsten durchschnittlichen Identitätsgrad zu den Genen der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen auf (Tabelle 5). Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die Unterschiede in den Nukleotidsequenzidentitäten von humaner ALOX15, ALOX15B und ALOX12 auf der einen Seite und den vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen auf der anderen so gering sind, dass eine endgültige Abschätzung des Verwandtschaftsgrades auch auf der Basis der Genstrukturen nicht sehr fundiert erscheint (Tabelle 5). Um die getroffene Vorhersage, dass die ausgewählten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen funktionsäquivalente Enzyme der humanen ALOX12 sind, zu untermauern bzw. zu widerlegen, sollten in dieser Arbeit funktionelle Daten zu den Knochenfischenzymen gesammelt werden.

4.2 Expression und Charakterisierung von Knochenfisch ALOX-Isoformen

4.2.1 Expression in *E. coli* und in Sf9-Zellen

Um die verschiedenen Fragestellungen dieser Arbeit zu beantworten, wurden die Wildtypenzyme von *N. furzeri*, *P. nyererei* und *S. formosus* sowie drei verschiedene Enzymmutanten als rekombinante His-tag Fusionsproteine in pro- und/oder eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert.

Für die heterologe Expression im prokaryotischen System (*E. coli*) wurden die aus der Datenbank entnommenen cDNA-Sequenzen in einen bakteriellen Expressionsvektor inkloniert, welcher eine Nukleotidsequenz für ein N-terminales Hexa-His-tag-Peptid enthält. Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit dem rekombinanten Expressionsplasmid transformiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation der rekombinanten Enzyme mit AA und anschließender HPLC-Analyse der gebildeten Oxygenierungsprodukte. Die Analyse der RP-HPLC Chromatogramme zeigte, dass das Wildtypenzym aus *S. formosus* mit hoher Aktivität exprimiert wurde, während die Wildtypenzyme von *N. furzeri* und *P. nyererei* nur mit geringen Aktivitäten im Lysatüberstand nachweisbar waren. Auf der Basis der Aktivitätsassays war es jedoch nicht möglich zu entscheiden, ob die Expressionshöhen der rekombinanten Proteine unterschiedlich waren oder ob der Unterschied auf differentielle spezifische Aktivitäten

der verschiedenen Enzyme zurückzuführen ist. Um die Expressionshöhen der drei vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen direkt zu quantifizieren, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei konnte keine immunreaktive Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 70-75 kDa im Lysatüberstand der ALOX-Expression von *N. furzeri* und *P. nyererei* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war bei der Expression des *S. formosus* Enzyms eine immunreaktive Bande im Western Blot sichtbar. Diese Daten belegen, dass die vermeintliche ALOX15 von *S. formosus* in *E. coli* zufriedenstellend exprimiert wurde, während das für die beiden anderen Enzyme nicht der Fall war. Die Ursachen für die geringgradige Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Expressionsniveaus der drei Enzyme könnte darin bestehen, dass bei den schwach exprimierten Enzymen Triplets in der cDNA vorkommen, die in *E. coli* nur unzureichend exprimiert werden. Obwohl die cDNA-Sequenzen vor den Expressionsversuchen hinsichtlich ihrer Exprimierbarkeit in *E. coli* optimiert wurden, gelingt es nicht immer, solche Triplets durch stumme Mutationen vollständig zu eliminieren. Ein weiterer Erklärungsansatz für das geringe Expressionsniveau der vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* könnte darin bestehen, dass die Enzyme zwar gut exprimiert werden, dass es aber kotranslational zu einer Fehlfaltung der Proteine kommt. Fehlerhaft bzw. unvollständig gefaltete Proteine können intrazellulär zu sogenannten „inclusion bodies“ aggregieren und sind häufig katalytisch inaktiv. Inclusion bodies werden bei der Zentrifugation der Zellhomogenate abzentrifugiert und erscheinen damit nicht im Lysatüberstand, der für die Aktivitätsassays und die Western Blots verwendet wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Western Blot-Analysen der Lysatpellets nach His-tag Fusionsproteinen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten jedoch keine signifikanten Mengen an His-tag Fusionsproteinen in den Zelltrümmern nachgewiesen werden. Das im Lysatüberstand erhaltene niedrige Expressionsniveau der beiden vermeintlichen ALOX15-Orthologen von *N. furzeri* und *P. nyererei* reichte jedoch aus, um eine Grundcharakterisierung der rekombinanten Enzyme durchzuführen.

Für die Beschreibung komplexerer Enzymeigenschaften, wie z.B. die Membranoxygenaseaktivitäten, war das niedrige Expressionsniveau der rekombinanten Enzyme nicht ausreichend. Deshalb erfolgte zusätzlich eine Expression der rekombinanten Proteine in Sf9-Insektenzellen. Hierfür musste zunächst ein

rekombinanter Baculovirus-Shuttle-Vektor (Bacmid) hergestellt werden, der die kodierenden Sequenzen der N-terminalen His-tag Fusionsproteine enthielt. Dieser Shuttle Vektor wurde dann in die Sf9-Zellen transfiziert, was zur Entstehung von rekombinanten Baculoviren führte. Mit diesen rekombinanten Viren, welche die genetische Information zur Expression der vermeintlichen ALOX15-Orthologen trugen, wurden Sf9-Zellen infiziert, die dann die rekombinanten Proteine exprimieren sollten. Die Aktivitätsmessung erfolgte wie bei den bakteriell exprimierten Enzymen unter Verwendung von Sf9-Zelllysatüberständen. HPLC-Analysen der AA Oxygenierungsprodukte (Abb. 23 + 24) und Western Blot-Analysen (Abb. 22) haben gezeigt, dass die Wildtypenzyme von *N. furzeri* und *P. nyererei* in Sf9-Zellen auf hohem Niveau exprimiert werden konnten. Insektenzellen haben im Vergleich zu *E. coli* den Vorteil, dass sie einen Großteil der posttranslationalen Proteinmodifikationen durchführen, wodurch die meisten Zielproteine korrekt gefaltet und katalytisch aktiv exprimiert werden können.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass alle Wildtypenzyme und alle Enzymmutanten erfolgreich als rekombinante N-terminale His-tag Fusionsproteine in pro- und/oder eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert werden konnten, obwohl die Expressionsniveaus für verschiedene Enzymvarianten durchaus unterschiedlich waren.

4.2.2 Enzymatische Charakterisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte u.a. untersucht werden, inwiefern sich die katalytischen Eigenschaften der rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen von denen höherer Wirbeltiere unterscheiden. Dazu wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt, in denen die Konzentration des Substrats Arachidonsäure, die Inkubationstemperatur sowie der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt der Substratlösung variiert wurden. Die K_M -Werte für die Arachidonsäureoxygenierung lagen im Bereich von 41 bis 257 μM für die getesteten Knochenfisch ALOX-Isoformen. Damit liegen sie deutlich über den K_M -Werten, die für die rekombinant exprimierte humane ALOX15 (195) für Arachidonsäure und die native ALOX15 des Kaninchens (207) für Linolsäure bestimmt werden konnten. Allerdings wurde zur kinetischen Charakterisierung dieser beiden Enzyme 0,2 % Natriumcholat als Lösungsvermittler verwendet, was die Verfügbarkeit des Substrates für das Enzym erhöht. Dies war bei den Knochenfisch ALOX-Isoformen nicht der Fall. Im Gegensatz dazu wurden für die ALOX15-Orthologen des Gorillas (30) und von *P. aeruginosa* (206) ähnliche K_M -Werte

für Arachidonsäure ohne die Zugabe von Detergenzien bestimmt. Die teils sehr hohen K_M -Werte der Knochenfisch ALOX-Isoformen deuten darauf hin, dass die in unseren Experimenten eingesetzten Arachidonsäurekonzentrationen (120 μM) nicht ausreichen, um Sättigungsbedingungen für diese Enzyme zu erreichen.

Da Knochenfische überwiegend poikilotherme Organismen sind, also die Temperatur ihrer Umgebung annehmen, könnten sich die Temperaturoptima der rekombinant exprimierten ALOX-Isoformen von denen der Säugetiere (homoiotherme Organismen) unterscheiden. Unsere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Temperaturoptima der Arachidonsäureoxygenierung durch die Knochenfisch ALOX-Isoformen bei 20 und 30 °C liegen, also in einem ähnlichen Bereich wie die von Säugetier ALOX-Isoformen wie dem Gorilla und dem Opossum (30). Die für die Arachidonsäureoxygenierung errechneten Aktivierungsenergien sind zwar höher als die für die Sojabohnen-LOX1 (204) sowie für die quasi-LOX Aktivität von Hämoglobin (205), aber vergleichbar zu den bestimmten Werten von *P. aeruginosa* (206) und der rekombinant exprimierten ALOX15 des Gorillas (30). Auch die für die Knochenfisch ALOX-Isoformen bestimmten pH-Optima sind vergleichbar mit denen anderer ALOX-Isoformen wie der rekombinant exprimierten humanen ALOX15 (195) und liegen im nahen physiologischen Bereich.

Die Affinität zu molekularem Sauerstoff als Substrat ist für Säugetier ALOX-Isoformen sehr hoch, was sich in K_M -Werten im Bereich von 10–26 μM (231) widerspiegelt. Für das Arachidonsäure 15-lipoxygenierende Enzym aus *P. aeruginosa* gilt das jedoch nicht. Mit einem K_M -Wert für Sauerstoff von 400 μM liegt die Sauerstoffaffinität dieses Enzyms deutlich unter der aller bisher gemessenen Säugetier ALOX-Isoformen (232). Es sollte an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, dass die bestimmten K_M -Werte für Sauerstoff nicht für die Enzyme, sondern für die Enzym-Fettsäure-Komplexe gelten. Nach der derzeitigen Theorie zur Lipoxigenasereaktion (Abb. 1) können diese Enzyme keinen Sauerstoff binden. Obwohl bereits eine große Anzahl von Kristallstrukturen für verschiedene ALOX-Isoformen vorliegt, ist es bislang noch nicht gelungen, einen Sauerstoffbindungsort an den Enzymen zu beschreiben. Deshalb geht man derzeit davon aus, dass das Fettsäureradikal, welches in der ersten Elementarreaktion des katalytischen Zyklus entsteht, als Sauerstoffbindungsort fungiert. Da Fettsäureradikale eine hohe Sauerstoffaffinität besitzen, erklären sich die niedrigen Sauerstoff- K_M -Werte der meisten ALOX-Isoformen. Bei der ALOX-Isoform von *P. aeruginosa*, die einen hohen Sauerstoff- K_M -Wert aufweist, scheint die

Sauerstoffdiffusion innerhalb des Enzymproteins sterisch behindert zu sein, sodass der atmosphärische Sauerstoff das in der Substratbindungstasche gebundene Fettsäureradikal nicht so leicht erreichen kann (232). Mutageneseuntersuchungen an einer bestimmten Stelle des Sauerstoffdiffusionswegs erleichterten die Sauerstoffdiffusion innerhalb des Enzymproteins, was zu einer deutlichen Senkung des Sauerstoff- K_M -Wertes führte (232).

Um die Sauerstoffaffinität der rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen abzuschätzen, wurden Aktivitätsmessungen unter normoxischen (Sauerstoffkonzentration im Reaktionspuffer von ca. 160 μM) und hyperoxischen (Sauerstoffkonzentration im Reaktionspuffer von ca. 800 μM) Bedingungen durchgeführt. Sollte es sich bei diesen ALOX-Isoformen um Enzyme mit geringer Sauerstoffaffinität handeln, konnte erwartet werden, dass die Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten im hyperoxischen Reaktionsansatz deutlich über denen liegen sollten, die unter normoxischen Bedingungen gemessen werden. Für die ALOX-Isoformen aus *P. nyererei* und *S. formosus* konnten wir einen Abfall der Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten unter hyperoxischen Bedingungen beobachten, was durch die toxische Wirkung des Sauerstoffs (Oxidation proteinogener Aminosäuren im katalytischen Zentrum) zurückzuführen sein könnte. Die Arachidonsäureoxygenaseaktivität der ALOX-Isoform aus *N. furzeri* stieg unter hyperoxischen Bedingungen um ca. 50 % an. Da die Sauerstoffkonzentration unter diesen Bedingungen jedoch ca. 5-mal höher war als unter normoxischen Bedingungen, kann geschlussfolgert werden, dass dieses Enzym bereits unter normoxischen Bedingungen nahe am Sättigungsbereich für Sauerstoff arbeitet. Zusammenfassend kann deshalb geschlussfolgert werden, dass sich alle getesteten Knochenfisch ALOX-Isoformen hinsichtlich ihrer Sauerstoffaffinität eher wie die Säugetier ALOX-Isoformen verhalten.

Die Fähigkeit zur Oxygenierung von Membranesterlipiden wurde als erstes für die Kaninchen-ALOX15 (48) beschrieben und später konnte diese Eigenschaft auch für die ALOX15-Orthologen anderer Säugetiere (36, 195, 233) nachgewiesen werden. Auch die ALOX15-Orthologen von marinen Säugetieren besitzen eine Membranoxygenaseaktivität, diese ist jedoch im Vergleich zu ihrer Fettsäureoxygenaseaktivität 10fach niedriger (189). Ob ALOX-Isoformen von Knochenfischen ebenfalls in der Lage sind, Membran-gebundene PUFAs zu oxygenieren, ist bisher nicht untersucht worden. Um diese Frage zu beantworten, wurden die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen mit Modellbiomembranen

[submitochondriale Partikel (SMP)] inkubiert und der prozentuale Anteil der oxygenierten PUFAs ermittelt, welcher als geeignetes Maß für die Membranoxygenaseaktivität von ALOX-Isoformen herangezogen werden kann. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die ALOX-Isoformen aus *N. furzeri* und *P. nyererei* im Vergleich zur Kaninchen-ALOX15 eine sehr geringe (< 5 %) Membranoxygenaseaktivität aufweisen, wenn diese Aktivitäten auf identische Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten normiert wurden. Die ALOX-Isoform aus *S. formosus* zeigte keine Membranoxygenaseaktivität. Da alle bisher getesteten ALOX15-Orthologen Membran-gebundene PUFAs oxygenieren können, deutet die fehlende Membranoxygenaseaktivität der hier charakterisierten vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen darauf hin, dass es sich bei diesen Enzymen nicht um klassische ALOX15-Orthologe handelt.

Mit wenigen Ausnahmen akzeptieren ALOX15-Orthologe fast alle in Säugetierzellen vorkommenden Polyenfettsäuren als Substrate. Das gilt vor allem für die dominant vorkommenden n-6 (LA, AA, GLA) und n-3 (ALA, EPA, DHA) PUFAs. So sind Arachidonsäure und Linolsäure gute Substrate für die rekombinant exprimierte humane ALOX15, wobei Linolsäure das bessere Substrat darstellt (K_M -Wert von 3 μM für LA vs. 12 μM für AA) (195). Auch für die ALOX15-Orthologen anderer Säugetiere wie Kaninchen (207), Gorilla (30) und Spitzhörnchen (235) stellen C18-PUFAs sehr gute Substrate dar, welche auch gegenüber anderen Fettsäuren (C20- und C22-PUFAs) bevorzugt oxygeniert werden. Um zu testen, ob die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen eine ähnliche Substratspezifität wie die Säugetier ALOX15-Orthologen aufweisen, wurden die rekombinant exprimierten Proteine mit verschiedenen Fettsäuren (einzeln bzw. in einer Mischung) inkubiert und die gebildeten Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC quantifiziert. Unsere Untersuchungen ergaben, dass sich die Substratspezifitäten der getesteten Knochenfisch ALOX-Isoformen deutlich von denen der Säugetier ALOX15-Orthologen unterscheiden. So präferieren alle getesteten Enzyme sowohl bei getrenntem als auch bei gemischtem Substratangebot C20-PUFAs (AA, EPA), während C18-PUFAs (LA, ALA, GLA) kaum oxygeniert werden. Auch DHA als C22-PUFA wird in relevanten Mengen nur durch die ALOX-Isoform aus *P. nyererei* metabolisiert. Ein solch deutlicher Unterschied in den Substratspezifitäten deutet darauf hin, dass es sich bei den Knochenfisch ALOX-Isoformen nicht um ALOX15-Orthologe handelt, sondern dass diese Enzyme funktionell näher mit anderen Säugetier ALOX-Isoformen (z.B. ALOX12 oder ALOX15B) verwandt sein sollten. Aber auch eine Zuordnung zu anderen Säugetier ALOX-Isoformen ist anhand der Substratspezifität nicht

sicher möglich. So bevorzugt die humane ALOX12, die Arachidonsäure wie die Knochenfisch ALOX-Isoformen hauptsächlich zu 12(S)-HETE oxygeniert, Docosahexaensäure als Substrat, wenn diese in einem Gemisch mit Arachidonsäure und Eicosapentaensäure angeboten wird (208). Zwischen ihrem murinen Orthologen, der Alox12, und den Knochenfisch ALOX-Isoformen besteht aber insofern eine Ähnlichkeit, als dass diese Linolsäure als C18-PUFA ebenfalls nur schlecht metabolisiert (209).

4.2.3 Lipoxin- und Resolvinsynthaseaktivität von Knochenfisch ALOX-Isoformen

Lipoxine [5,6,15-TriHETE (Lipoxin A) und 5,14,15-TriHETE (Lipoxin B)] sind anti-inflammatorische bzw. pro-resolutorische Mediatoren, die *in vivo* hauptsächlich auf zwei möglichen Wegen synthetisiert werden können (13): i) über den ALOX5/ALOX15-Weg oder über den ALOX5/ALOX12-Weg. Der ALOX5/ALOX15-Weg kann entweder durch die ALOX5 oder die ALOX15 initiiert werden. Wird er durch die ALOX5 initiiert, metabolisiert diese Arachidonsäure über die Bildung von 5-HpETE zu Leukotrien A₄ (LTA₄), welches durch die ALOX15 zu einem 5S,6S,Epoxy-15S-Hydroxytetraen Intermediat metabolisiert wird. Dieses kann dann zu Lipoxin A₄ oder B₄ hydrolysiert werden. Wird der Weg durch die ALOX15 initiiert, oxygeniert dieses Enzym Arachidonsäure zu 15(S)-HpETE, welches zu 15(S)-HETE reduziert wird. 15(S)-HpETE und 15(S)-HETE können dann durch die ALOX5 zum 5S,6S,Epoxy-15S-Hydroxytetraen Intermediat metabolisiert werden, welches wiederum zu Lipoxin A₄ oder B₄ hydrolysiert werden kann (212). Humane polymorphkernige Neutrophile (PMNs) gelten als zelluläre Modelle für diesen Lipoxinbiosyntheseweg (236), da in diesen Zellen sowohl die ALOX15 als auch die ALOX5 exprimiert werden. Der ALOX5/ALOX12-Weg beginnt ebenfalls mit der Synthese von LTA₄ aus Arachidonsäure durch die ALOX5. LTA₄ kann dann durch die ALOX12 zu Lipoxin A₄ oder B₄ metabolisiert werden (237). Dieser Syntheseweg wurde initial in gemischten Inkubationen aus PMNs und Thrombozyten charakterisiert (238-240).

Inkubiert man die 15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Mensch, Kaninchen und Orang-Utan mit 5(S)-HETE oder 5(S),6(R/S)-DiHETE, werden dabei Lipoxine synthetisiert (28). Um zu untersuchen, ob auch die Knochenfisch ALOX-Isoformen zur Synthese von Lipoxinen in der Lage sind, wurden diese mit 5(S),15(S)- und 5(S),6(R)-DiHETE inkubiert und die gebildeten Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC quantifiziert. Wir konnten jedoch in den entsprechenden Chromatogrammen keine den Lipoxinisomeren entsprechenden Peaks identifizieren, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen keine

bzw. nur eine sehr geringe Lipoxinsynthaseaktivität aufweisen. Allerdings kam es bei der Inkubation der Enzyme mit 5(R/S)- und 15(R/S)-HETE zu einer vermehrten Bildung von Oxygenierungsprodukten, die wir als 5,12- und 8,15-DiHETE identifizieren konnten (siehe 3.7.2.1). Die relative Oxygenierungsaktivität der Knochenfisch ALOX-Isoformen mit 5(R/S)- und 15(R/S)-HETE war vergleichbar mit der von Arachidonsäure oder sogar höher.

18-HEPE ist ein Hydroxyderivat von EPA, das im menschlichen Blut in großen Mengen nachgewiesen wurde (213). Es kann außerdem durch die humane ALOX5, ALOX15B und ALOX12 zu pro-resolutorischen Resolvinen metabolisiert werden (210). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen mit 18(R/S)-HEPE inkubiert, um ihre Fähigkeit zur Resolvinsynthese zu untersuchen. Es konnte jedoch nur für die ALOX-Isoformen aus *N. furzeri* und *P. nyererei* die Bildung einer geringen Menge von Oxygenierungsprodukten beobachtet werden, wobei es sich jedoch nicht um Resolvine handelt. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen keine bzw. nur eine geringe Resolvinsynthaseaktivität besitzen, wenn 18(R/S)-HEPE als Substrat angeboten wird.

4.2.4 Oxygenierung von Endocannabinoiden durch Knochenfisch ALOX-Isoformen

Endocannabinoide, wie Anandamid und 2-Arachidonylglycerol, binden *in vivo* an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf hohem Niveau im zentralen und peripheren Nervensystem von Wirbeltieren exprimiert werden (214, 215). Sie sind u.a. an der Fertilitätsregulation, dem sexuellen Verhalten (216) und der Schmerzwahrnehmung (219) beteiligt und scheinen auch bei Knochenfischen eine Rolle zu spielen, so z.B. bei der Regulation des zentralen und peripheren gonadotropen Systems (221, 222).

In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Anandamid und 2-Arachidonylglycerol durch die humane ALOX15, ALOX15B und ALOX12 effizienter oxygeniert werden als Arachidonsäure (211). Durch die Oxygenierung kommt es zudem zu einer Veränderung der biologischen Funktionen dieser Mediatoren (226-229). Auch die ALOX15-Orthologen von Schwein und Kaninchen sowie die Sojabohnen-LOX1 oxygenieren Anandamid zu spezifischen Oxygenierungsprodukten, wobei die Reaktionsraten denen der Arachidonsäureoxygenierung entsprachen (227). Die chemische Struktur der Oxidationsprodukte konnte aufgeklärt werden und es zeigte sich, dass die Enzyme für die Oxygenierung von Anandamid dieselbe Reaktionsspezifität

aufwiesen wie für Arachidonsäure. Für die murine Alox12 stellen Endocannabinoide jedoch schlechtere Substrate als Arachidonsäure dar (211). Um zu untersuchen, wie sich die Knochenfisch ALOX-Isoformen hinsichtlich der Oxygenierung von Endocannabinoiden verhalten, wurden Anandamid und 2-Arachidonylglycerol *in vitro* mit den rekombinant exprimierten Enzymen inkubiert und die dabei entstandenen Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC analysiert. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass Anandamid zwar von den Knochenfisch ALOX-Isoformen oxygeniert wird, jedoch in deutlich geringerem Maße als Arachidonsäure. Da die Umsatzraten so gering waren, konnten wir die chemische Struktur der gebildeten Oxygenierungsprodukte leider nicht aufklären. Wenn man aber davon ausgeht, dass auch die Knochenfisch ALOX-Isoformen ihre Reaktionsspezifität bei der Oxygenierung von Anandamid beibehalten, wäre 12-HETE-ANA das wahrscheinlichste Oxygenierungsprodukt. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen sich hinsichtlich der Anandamidoxygenierung eher wie die murine Alox12 und nicht wie die humane ALOX15 verhalten.

4.3 Die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen folgen nicht vollumfänglich dem Triadenkonzept

Das Triadenkonzept besagt, dass sich am Boden der U-förmigen Substratbindungstasche von ALOX15-Orthologen drei Aminosäurecluster [Borngräber 1 (241), Sloane (242) und Borngräber 2 (27)] befinden, die als Triadendeterminanten die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen maßgeblich beeinflussen. Je kleiner die Seitenketten dieser Aminosäuren sind, desto tiefer kann Arachidonsäure in die Substratbindungstasche hineingleiten, wodurch eine 12-Lipoxygenierung begünstigt wird. Das Triadenkonzept wurde in den letzten Jahren für viele Säugetier ALOX15-Orthologe bestätigt (28-30) und es konnten bislang keine Säugetier ALOX15-Orthologen identifiziert werden, die diesem Konzept nicht folgen (28, 31). Das Triadenkonzept ist teilweise auf ALOX12-Orthologe anwendbar. Es erklärt jedoch nicht die Reaktionsspezifität von ALOX15B-Orthologen (29).

Die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen tragen als Triadendeterminanten ein Phe-357/359 (BG I), Val-422/424 und Val-423/425 (SL) sowie ein Ile-598/600 (BG II), sodass man auf der Basis dieses Konzeptes eine AA 12-Lipoxygenierung durch diese Enzyme postulieren kann. Diese Vorhersage konnten wir in unseren funktionellen Untersuchungen bestätigen. Geht man davon aus, dass es sich bei

den Knochenfisch ALOX-Isoformen um ALOX15-Orthologe handelt, würde eine 12-Lipoxygenierung auch mit der Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen vereinbar sein. Diese besagt, dass die ALOX15-Orthologen von Hominiden AA 15-lipoxygenierende Enzyme sind, während die ALOX15-Orthologen anderer Säugetierspezies AA 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe exprimieren. Da Knochenfische in der Evolution unterhalb der Hominiden einzugruppiert sind, ist eine AA 12-Lipoxygenierung mit der Evolutionshypothese gut vereinbar.

Sollten sich die Knochenfischenzyme vollständig an das Triadenkonzept halten, sollte ein Austausch der beiden kleinen Valine (Sloane Determinanten) durch das Isoleucin+Methionin Motiv, das bei den meisten Arachidonsäure 15-lipoxygenierenden Säugetier ALOX15-Isoformen an dieser Stelle anzutreffen ist, zu einer Änderung der Reaktionsspezifität in Richtung einer vermehrten Bildung von 15-HETE führen. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe 3.10.2). Auch bei der Zebrafisch LOX1, die an der Position der Triadendeterminanten die gleichen Aminosäuren (Val-Val-Motiv) (243) trägt, sowie bei dem bereits untersuchten Enzym der Weichkoralle *Gersemia fruticosa* (244) führten Mutationen an den Triadendeterminanten nur zu geringfügigen Veränderungen der Reaktionsspezifität. Bei der ALOX-Isoform der Weichkoralle konnte die größte Veränderung durch Mutation der Borngräber 2 Determinante (Val609Trp) erreicht werden. Um zu überprüfen, ob die Borngräber Determinanten 1 und 2 die Reaktionsspezifität der Knochenfisch ALOX-Isoformen maßgeblich beeinflussen, müssten noch Untersuchungen an entsprechenden Mutanten, z.B. Phe357(359)Trp, Ile598(600)Phe oder Ile598(600)Trp durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann jedoch geschlossen werden, dass die Reaktionsspezifität der vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologen mit dem Triadenkonzept erklärt werden kann und dass diese Enzyme der Evolutionshypothese der ALOX15 entsprechen. Mutationen der SL-Determinanten führen jedoch nicht zu einer gravierenden Veränderung der Reaktionsspezifität, sodass das Triadenkonzept auf diese Enzyme nicht vollständig anwendbar ist. Die Schlussfolgerung, dass das Triadenkonzept auf die vermeintlichen Knochenfisch ALOX15-Orthologe nur teilweise anwendbar ist, könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei diesen Enzymen als auch bei der ALOX1 des Zebrafischs und der Weichkoralle (243) um phylogenetisch ältere Enzyme handelt, für die die Konzepte der Reaktionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen nicht gelten. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den vermeintlichen ALOX15-Orthologen der Knochenfische gar nicht um Funktionsäquivalente der Säugetier

ALOX15-Isoformen handelt. Da das Triadenkonzept zur Erklärung der Reaktionsspezifität von Säugetier ALOX15-Orthologen erarbeitet wurde, müssen sich andere ALOX-Isoformen nicht an dieses Konzept halten. Im Gegenteil, wenn das Triadenkonzept nicht vollumfänglich die Reaktionsspezifität einer neu entdeckten ALOX-Isoform erklärt, ist das ein Hinweis darauf, dass es sich bei diesem Enzym nicht um ein Funktionsäquivalent der Säugetier ALOX15-Orthologen handelt.

4.4 Die Knochenfisch ALOX-Isoformen halten sich nicht vollständig an die A-vs.-G-Hypothese der Stereospezifität

Zur Erklärung der stereospezifischen Mechanismen der Lipoxygenasereaktion führten Coffa und Brash im Jahr 2004 die „Alanin-versus-Glycin-Hypothese“ („A-vs.-G-Hypothese“) ein, nach der eine spezifische Aminosäure im katalytischen Zentrum der ALOX-Isoformen („Coffa-Determinante“) ausschlaggebend für die Stereospezifität der Enzyme ist. Diese Aminosäure ist als Alanin in S-Lipoxygenasen und als Glycin in R-Lipoxygenasen konserviert (43). Die A-vs.-G-Hypothese konnte durch Mutagenesen von verschiedenen S- und R-ALOX-Isoformen bestätigt werden, bei denen ein Austausch der Coffa-Determinante in den mutierten Enzymen dazu führte, dass die gebildeten Oxygenierungsprodukte überwiegend in der jeweils anderen Konfiguration als die durch das Wildtypenzym gebildeten Produkte vorlagen. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Ala-zu-Gly Mutationen bei einigen in Vertebraten vorkommenden S-Lipoxygenasen (ALOX15-Orthologe von Kaninchen, Mensch, Rhesusaffe, Orang-Utan und Maus sowie murine Alox5) nicht dazu führte, dass überwiegend (R)-H(p)HETE-Isomere gebildet wurden, sondern dass diese lediglich einen Anteil von 10–30 % der Gesamtprodukte ausmachten (20). Einige LOX-Isoformen, wie die LOX1 des Zebrafisches (*D. rerio*) und das Enzym aus dem prokaryotischen Cyanobakterium *Nostoc* sp. 7120 widersprechen sogar vollständig der A-vs.-G-Hypothese. So trägt das Zebrafischenzym ein Glycin als Coffa-Determinante, oxygeniert Arachidonsäure aber exklusiv zu 12(S)-HETE (20). Um zu untersuchen, ob Veränderungen der Seitenkettengeometrie an der Position der Coffa-Determinante die stereochemischen Eigenschaften der Produkte beeinflussen, wurden verschiedene Mutanten der Zebrafisch LOX1 erzeugt. Ein Austausch des Glycins an Position 410 zu einem Alanin führte zu keiner Veränderung des Produktmusters (20). Leider führte der Einbau von Leucin und Phenylalanin an dieser Stelle zur katalytischen Inaktivität der Mutanten (20). Um auch den Einfluss benachbarter Aminosäuren zu untersuchen, wurden Doppelmutanten

(Cys408Ser/Arg409Ile und Thr412Ala/Gln413Val) mit weniger sperrigen Aminosäureseitenketten erzeugt, wodurch eine 12(R)-Lipoxygenierung begünstigt werden sollte. Leider waren auch diese Mutanten katalytisch inaktiv (20).

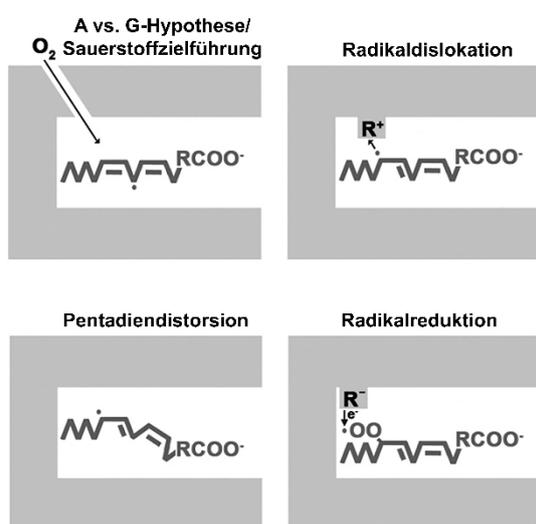
Die LOX-Isoform aus *Nostoc* sp. 7120 oxygeniert Linolsäure zu 9(R)-H(p)ODE, trägt als Coffa-Determinante jedoch ein Alanin (245). Der Austausch zu einem weniger sperrigen Glycin führte zu keiner wesentlichen Veränderung des Produktmusters. Der Einbau von Aminosäuren mit noch größeren Seitenketten (Valin und Isoleucin) führte jedoch zur Bildung von überwiegend 13(S)-H(p)ODE, wobei der Anteil dieses Oxygenierungsprodukts mit zunehmendem Volumen der Aminosäureseitenketten anstieg.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen verhalten sich ähnlich wie die Zebrafisch LOX1, da sie ein Glycin als Coffa-Determinante tragen (sie müssten also nach der A-vs.-G-Hypothese R-LOXen sein), Arachidonsäure jedoch hauptsächlich zu 12(S)-HETE oxygenieren. Der Austausch von Glycin gegen Alanin führte jedoch bei allen getesteten Enzymen zu einer deutlichen Reduktion des Anteils an 8(R)-HETE (siehe 3.10.1). Dieser Effekt ist bei der ALOX-Isoform aus *S. formosus* am deutlichsten zu sehen, hier konnte der 8(R)-HETE-Anteil von 43 % beim Wildtypenzym auf 0 % bei der Mutante reduziert werden. Die Mutation des zur Coffa-Determinante N-terminal benachbarten positiv geladenen Arginins zu einem neutralen Isoleucin hatte einen gegenläufigen Effekt und führte dazu, dass 12(S)- und 8(R)-HETE zu fast gleichen Anteilen durch alle Knochenfisch ALOX-Isoformen gebildet wurden.

Die molekularen Mechanismen, auf denen die funktionellen Konsequenzen eines A-zu-G Austausches beruhen, werden derzeit noch diskutiert. Der ursprüngliche Erklärungsansatz von Coffa und Brash (43) beruhte auf der Annahme, dass molekularer Sauerstoff durch die Lipoxygenase zielgerichtet zu einem bestimmten Kohlenstoffatom des Kohlenstoff-zentrierten Fettsäureradikals transportiert wird (Hypothese der Sauerstoffzielführung). Dabei ging man davon aus, dass die im Vergleich zu Glycin voluminösere Seitenkette des Alanins die Sauerstoffpenetration zum C11 des Kohlenstoff-zentrierten Fettsäureradikals blockiert, was eine 11(R)-Oxygenierung verhindern würde. Im Gegensatz dazu erlaubt die kleinere Seitenkette des Glycins eine Oxygenierung an der 11(R)-Position. Dieser Ansatz wurde später anhand von strukturellen Daten der 8(R)-LOX aus *Plexaura homomalla* präzisiert (246). Ob der durch einen Ala-zu-Gly Austausch induzierte Raumgewinn tatsächlich ausreicht, um die

Sauerstoffdiffusion innerhalb des ALOX-Proteins so dramatisch zu verändern, kann derzeit nicht abschließend eingeschätzt werden.

Die Hypothese der Sauerstoffzielführung bzw. die A-vs.-G-Hypothese sind jedoch nicht die einzigen Ansätze zur Erklärung der stereochemischen Mechanismen der Lipoxygenasereaktion. Bisher wurde das durch die initiale Wasserstoffabstraktion entstehende Kohlenstoff-zentrierte Fettsäureradikal als planares radikalische Pentadiensystem gesehen, in welchem die Elektronendichte überall gleich ist. Wenn die Elektronendichte jedoch an einer bestimmten Position innerhalb des Pentadiensystems höher ist, könnte dies dazu führen, dass die Sauerstoffinsertion nicht für alle



Kohlenstoffatome statistisch gleich wahrscheinlich ist, sondern an einem Kohlenstoffatom wahrscheinlicher wird als an den anderen. Um eine solche Ungleichverteilung der Elektronendichte im Pentadiensystem zu erreichen, gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

Abb. 45: Hypothesen zur Erklärung der stereochemischen Mechanismen der ALOX-Reaktion [modifiziert nach Jansen et al., 2011 (20)]. Erläuterungen siehe Text.

i) Hypothese der Radikaldislokation: Die Lipoxygenase besitzt eine Aminosäure, die im Bereich des Pentadiensystems das radikalische Elektron aufgrund einer positiven Ladung anzieht und die Elektronendichte somit an einem der Kohlenstoffatome erhöht. Leider konnten derartige Aminosäuren bisher nicht eindeutig identifiziert werden. ii) Hypothese der Pentadiendistorsion: Das planare symmetrische radikalische Pentadiensystem liegt in der Substratbindungstasche strukturell deformiert vor. Dadurch könnte sich ein räumlich asymmetrisch ausgerichtetes Radikal bilden (247), in dem die Elektronendichte an einer bestimmten Position [z.B. die 15(S)-Position] höher ist und damit die Sauerstoffinsertion an dieser Position begünstigt wird. iii) Asymmetrische Reduktion der Peroxyradikals: Wenn die Oxygenierung des Kohlenstoff-zentrierten Fettsäureradikals reversibel ist (248), könnte diese willkürlich geschehen. Wenn die anschließende Reduktion des Sauerstoff-zentrierten Fettsäureperoxyradikals jedoch stereoselektiv erfolgt, könnte sich ein stereospezifisches Produktmuster ergeben. Diese

möglichen Hypothesen zur Erklärung der stereochemischen Mechanismen der Lipoxygenasereaktion sind in Abb. 45 zusammengefasst.

Auch die Ausrichtung der Substratfettsäure in der Substratbindungstasche (Carboxyl- oder Methyl-Ende voran) sowie der Zugangsweg zu dieser scheinen für die stereoselektive Oxygenierung eine Rolle zu spielen (249). Welche der Hypothesen die Stereochemie der ALOX-Isoformen dominiert, ist derzeit noch unklar. Möglicherweise handelt es sich auch um ein Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen, welches für die stark ausgeprägte Reaktionsspezifität eines Großteils der ALOX-Isoformen verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die rekombinant exprimierten Knochenfisch ALOX-Isoformen ähnlich wie die Zebrafisch LOX1 verhalten, da sie mit einem Glycin als Coffa-Determinante hauptsächlich 12(S)-lipoxygenierende Enzyme sind. Im Gegensatz zur Zebrafisch LOX1 führte ein Gly410(408)Ala Austausch jedoch zu einer starken Reduktion der 8(R)-HETE Bildung, was konsistent mit der A-vs.-G-Hypothese ist. Die durch den Arg409(407)Ile Austausch herbeigeführte Erhöhung des 8(R)-HETE Anteils kann möglicherweise durch das Fehlen der positiven Ladung des Arginins im katalytischen Zentrum zurückgeführt werden.

4.5 Zusammenhang zwischen dem ALOX-Stoffwechsel von *N. furzeri* und den Mechanismen seiner beschleunigten Alterung

Der einjährige Knochenfisch *Nothobranchius furzeri* (Türkiser Prachtgrundkärpfling) bewohnt saisonale Frischwasserteiche in Südafrika und hat als Folge der Anpassung an seinen Lebensraum eine durchschnittliche Lebensspanne von nur 3 bis 7 Monaten (192). Unter laborchemischen Bedingungen existieren mehrere Stämme mit unterschiedlicher Lebensspanne (199). Bei einigen Stämmen wurden Lebensspannen von weniger als 12 Wochen nachgewiesen, was *N. furzeri* zu der Wirbeltierspezies mit der kürzesten Lebensspanne macht, die in Gefangenschaft gehalten werden kann [bereits 2003 von Valdesalici et al. beschrieben (191)]. Zudem weist *N. furzeri* ein rasches Wachstum und eine frühe sexuelle Reifung auf (250). Aufgrund dieser funktionellen Besonderheiten, durch die Etablierung gentechnischer Modifizierungsmethoden (251-254) und durch die Veröffentlichung eines Referenzgenoms für *N. furzeri* (255, 256), hat sich diese Knochenfischspezies in den letzten Jahren zu einem Modellorganismus entwickelt, in dem Prozesse der Wirbeltieralterung gut untersucht werden können.

Um den Prozess des Alterns, welcher definiert ist als der kontinuierliche und irreversible physiologische Verfall, dem die meisten Organismen unterliegen, besser zu charakterisieren, erfolgte kürzlich eine Untergliederung dieses Prozesses in neun Kategorien, die sogenannten „biological hallmarks of aging“ (200). Zu diesen zählen Telomerverkürzung, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz (Wachstumsstopp von Wirbeltierzellen nach einer bestimmten Anzahl von Mitosen), Verlust der Proteostase, epigenetische Veränderungen, veränderte interzelluläre Kommunikation, Verbrauch von Stammzellen, genomische Instabilität und ein dereguliertes Messen der von den Zellen benötigten Nährstoffe („deregulated nutrient sensing“). Untersuchungen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass viele der hallmarks of aging auch für den Alterungsprozess von *N. furzeri* relevant sind.

So konnte die Telomerverkürzung in Muskel- und Hautgewebe nachgewiesen werden, indem Gewebeproben von 5 und 21 Wochen alten Tieren miteinander verglichen wurden (201). Interessanter Weise ähnelte die Länge der Telomere von *N. furzeri* eher der von humanen Telomeren (257) als der Länge von murinen Telomeren (258). Murine Telomere sind deutlich größer als ihre humanen Strukturäquivalente. Wurden junge mit alten Kärpflingen verglichen, konnte eine zelluläre Seneszenz sowie ein Anstieg an Alterungsmarkern [Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase und Lipofuszin (259) sowie die Zellzyklusinhibitoren p21 und p16 (260)] in den älteren Tieren beobachtet werden. Obwohl es keine direkten Studien zum Verlust der Proteostase gibt, sprechen die alterungsassoziierte Hochregulation von Translation und ribosomalen Prozessen sowie die erhöhte Expression von Genen, die für lysosomale Proteine kodieren (255, 261, 262) für dieses Alterungscharakteristikum in *N. furzeri*. Epigenetische Veränderungen zeigen sich durch eine erhöhte Expression von Genen, die für Proteine der Polycomb-Körper (sind an der Stilllegung einzelner DNA-Abschnitte beteiligt) kodieren und einer Hochregulation von H3K27me3 (epigenetische Modifikation des Histons H3) (261). Die vermehrte Expression von Genen, die für Komponenten verschiedener Signalwege wie der Interaktion von Zytokin-Zytokin-Rezeptoren und des JAK-STAT-Signalwegs kodieren (262) deutet auf eine veränderte interzelluläre Kommunikation in alternden Kärpflingen hin. Andere Untersuchungen beschrieben einen altersabhängigen Rückgang der adulten Neurogenese (263), was auf einen Verbrauch neuronaler Stammzellen schließen lässt.

Auch die mitochondriale Dysfunktion scheint beim Alterungsprozess von *N. furzeri* eine Rolle zu spielen. So konnten zwar keine altersbedingten Deletionen von mitochondrialer DNA (mtDNA) nachgewiesen werden, welche typisch für Säugetiere sind

(264). Jedoch wurden ein Abfall der Anzahl der Kopien an mtDNA sowie eine Herabregulation der Expression von mtDNA-assoziierten Genen beobachtet (202). Außerdem konnten Veränderungen in der Zusammensetzung mitochondrialer Membranen in Abhängigkeit vom Alter der Kärpflinge beobachtet werden (265). So konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung mitochondrialer Membranphospholipide während des Lebenszyklus von *N. furzeri* verändert. Der Anteil aller Phospholipide und der Anteil der Phosphatidylcholine verringerte sich, während sich der Anteil der Phosphatidylserine, Cardiolipine und Phosphatidylethanolamine erhöhte. Diese Veränderungen waren vor allem im Altersabschnitt zwischen 2,5 - 5 Monaten zu beobachten. Dies ist der Zeitraum, in dem die Tiere ihr Gewicht verdoppelten. Auch die Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Phospholipidklassen wies signifikante altersabhängige Veränderungen auf. So erhöhte sich die Menge an gesättigten Fettsäuren in allen Phospholipidklassen, während ein signifikanter Abfall an einfach ungesättigten Fettsäuren gemessen werden konnte. Diese Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide können als ein Effekt von oxidativem Stress angesehen werden. Auf diese Weise könnte eine Schädigung mitochondrialer Lipide während der ersten Monate des Lebenszyklus von *N. furzeri* ein Hauptfaktor für den altersabhängigen Funktionsverlust von Mitochondrien sein, welcher u.a. für die kurze Lebensspanne dieser Knochenfischspezies verantwortlich sein könnte. Interessanterweise waren die ermittelten Peroxidationsindices der untersuchten Phospholipidklassen in *Nothobranchius furzeri* signifikant niedriger als die Werte, die für *Nothobranchius rachovii* berichtet wurden. Dieser *Nothobranchius* Stamm zeigt eine doppelt so lange Lebensspanne wie *N. furzeri*. Diese Daten würden den Ergebnissen vergleichender Studien widersprechen, die darauf hinweisen, dass Tierspezies mit einer kurzen Lebensspanne mehr ungesättigte Membranen besitzen als Spezies mit einer längeren Lebenserwartung (266, 267). Diese Erkenntnisse sollten jedoch mit Vorsicht interpretiert werden und Studien an anderen *Nothobranchius* Stämmen sind notwendig, um einordnen zu können, ob (oder nicht) es sich bei *N. furzeri* um einen Ausreißer innerhalb dieser Gattung handelt. Inwieweit ALOX-Isoformen als Lipid-peroxidierende Enzyme an den Prozessen des mitochondrialen Funktionsverlustes in *N. furzeri* beteiligt sind, ist bisher noch nicht untersucht worden. Die im Rahmen dieser Arbeit an Vesikeln von mitochondrialen Innenmembranen (SMP) durchgeführten Untersuchungen zur Membranoxygenierung wiesen jedoch darauf hin, dass die rekombinant exprimierte ALOX-Isoform von *N. furzeri* nur eine sehr geringe Kapazität zur Membranoxygenierung

besitzt (siehe 3.8). Somit kann der Zusammenhang zwischen dem ALOX-Stoffwechsel von *N. furzeri* und der beschleunigten Alterung dieser Knochenfischspezies im Rahmen dieser Arbeit nicht wirklich geklärt werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical reviews*. 2011;111(10):5866-98.
2. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1851(4):308-30.
3. Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem*. 1999;274(34):23679-82.
4. Kuhn H, Humeniuk L, Kozlov N, Roigas S, Adel S, Heydeck D. The evolutionary hypothesis of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs. *Prog Lipid Res*. 2018;72:55-74.
5. Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*. 2015;57:13-39.
6. Liu QY, Reith ME. Isolation of a gametophyte-specific cDNA encoding a lipoxygenase from the red alga *Porphyra purpurea*. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3(4):206-9.
7. Kuribayashi T, Kaise H, Uno C, Hara T, Hayakawa T, Joh T. Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J Agric Food Chem*. 2002;50(5):1247-53.
8. Su C, Oliw EH. Manganese lipoxygenase. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1998;273(21):13072-9.
9. Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*. 2002;53:275-97.
10. Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*. 2015;573(1):1-32.
11. Mancini AD, Di Battista JA. The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammation. *Inflamm Res*. 2011;60(12):1083-92.
12. Savari S, Vinnakota K, Zhang Y, Sjölander A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(4):968-77.
13. Romano M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:1048-64.
14. Pace-Asciak CR. The hepxilins and some analogues: a review of their biology. *Br J Pharmacol*. 2009;158(4):972-81.
15. Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM, Gielicz A, Mowinckel P, Lødrup Carlsen KC, Carlsen KH, Szczeklik A. Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):859-67.e9.
16. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(6):664-76.
17. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chemical reviews*. 2011;111(10):5922-43.
18. Sloane DL, Dixon RA, Craik CS, Sigal E. Expression of cloned human 15-lipoxygenase in eukaryotic and prokaryotic systems. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1991;21a:25-8.
19. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and

- diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1996;271(39):24055-62.
20. Jansen C, Hofheinz K, Vogel R, Roffeis J, Anton M, Reddanna P, Kuhn H, Walther M. Stereocontrol of arachidonic acid oxygenation by vertebrate lipoxygenases: newly cloned zebrafish lipoxygenase 1 does not follow the Al-versus-Gly concept. *J Biol Chem.* 2011;286(43):37804-12.
 21. Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(2):161-74.
 22. Teder T, Löhelaid H, Boeglin WE, Calcutt WM, Brash AR, Samel N. A Catalase-related Hemoprotein in Coral Is Specialized for Synthesis of Short-chain Aldehydes: DISCOVERY OF P450-TYPE HYDROPEROXIDE LYASE ACTIVITY IN A CATALASE. *J Biol Chem.* 2015;290(32):19823-32.
 23. Walther M, Anton M, Wiedmann M, Fletterick R, Kuhn H. The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. *J Biol Chem.* 2002;277(30):27360-6.
 24. Romanov S, Wiesner R, Myagkova G, Kuhn H, Ivanov I. Affinity labeling of the rabbit 12/15-lipoxygenase using azido derivatives of arachidonic acid. *Biochemistry.* 2006;45(11):3554-62.
 25. May C, Höhne M, Gnau P, Schwennesen K, Kindl H. The N-terminal beta-barrel structure of lipid body lipoxygenase mediates its binding to liposomes and lipid bodies. *Eur J Biochem.* 2000;267(4):1100-9.
 26. Koljak R, Boutaud O, Shieh BH, Samel N, Brash AR. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science.* 1997;277(5334):1994-6.
 27. Borngräber S, Browner M, Gillmor S, Gerth C, Anton M, Fletterick R, Kühn H. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem.* 1999;274(52):37345-50.
 28. Adel S, Karst F, Gonzalez-Lafont A, Pekarova M, Saura P, Masgrau L, Lluch JM, Stehling S, Horn T, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(30):E4266-75.
 29. Vogel R, Jansen C, Roffeis J, Reddanna P, Forsell P, Claesson HE, Kuhn H, Walther M. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem.* 2010;285(8):5369-76.
 30. Kozlov N, Humeniuk L, Ufer C, Ivanov I, Golovanov A, Stehling S, Heydeck D, Kuhn H. Functional characterization of novel ALOX15 orthologs representing key steps in mammalian evolution supports the Evolutionary Hypothesis of reaction specificity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864(3):372-85.
 31. Heydeck D, Reisch F, Schäfer M, Kakularam KR, Roigas SA, Stehling S, Püschel GP, Kuhn H. The Reaction Specificity of Mammalian ALOX15 Orthologs is Changed During Late Primate Evolution and These Alterations Might Offer Evolutionary Advantages for Hominidae. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:871585.
 32. Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Brash AR. Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000;275(2):1287-93.
 33. Schwarz K, Walther M, Anton M, Gerth C, Feussner I, Kuhn H. Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase

- to a 15-lipoxygenating enzyme species by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(1):773-9.
34. Adel S, Heydeck D, Kuhn H, Ufer C. The lipoxygenase pathway in zebrafish. Expression and characterization of zebrafish ALOX5 and comparison with its human ortholog. *Biochimica et biophysica acta.* 2016;1861(1):1-11.
 35. Borngraber S, Kuban RJ, Anton M, Kuhn H. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol.* 1996;264(5):1145-53.
 36. Pekarova M, Kuhn H, Bezakova L, Ufer C, Heydeck D. Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation. *Arch Biochem Biophys.* 2015;571:50-7.
 37. Yoshimoto T, Suzuki H, Yamamoto S, Takai T, Yokoyama C, Tanabe T. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2142-6.
 38. De Marzo N, Sloane DL, Dicharry S, Highland E, Sigal E. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am J Physiol.* 1992;262(2 Pt 1):L198-207.
 39. Johannesson M, Backman L, Claesson HE, Forsell PK. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 2010;82(2-3):121-9.
 40. Sloane DL, Leung R, Barnett J, Craik CS, Sigal E. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Eng.* 1995;8(3):275-82.
 41. Chaitidis P, Adel S, Anton M, Heydeck D, Kuhn H, Horn T. Lipoxygenase pathways in *Homo neanderthalensis*: functional comparison with *Homo sapiens* isoforms. *J Lipid Res.* 2013;54(5):1397-409.
 42. Adel S, Kakularam KR, Horn T, Reddanna P, Kuhn H, Heydeck D. Leukotriene signaling in the extinct human subspecies *Homo denisovan* and *Homo neanderthalensis*. Structural and functional comparison with *Homo sapiens*. *Arch Biochem Biophys.* 2015;565:17-24.
 43. Coffa G, Brash AR. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15579-84.
 44. Kühn H. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog Lipid Res.* 1996;35(3):203-26.
 45. Rapoport SM, Schewe T. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochimica et biophysica acta.* 1986;864(3-4):471-95.
 46. Höhne M, Bayer D, Prehn S, Schewe T, Rapoport SM. In vitro maturation of rabbit reticulocytes. III. Response of lipoxygenase. *Biomed Biochim Acta.* 1983;42(9):1129-34.
 47. Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport S. Degradation of mitochondria by cytosolic factors in reticulocytes. *Acta Biol Med Ger.* 1977;36(3-4):363-72.
 48. Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem.* 1990;265(30):18351-61.
 49. van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature.* 1998;395(6700):392-5.

50. Gronowicz G, Swift H, Steck TL. Maturation of the reticulocyte in vitro. *J Cell Sci.* 1984;71:177-97.
51. Kent G, Minick OT, Volini FI, Orfei E. Autophagic vacuoles in human red cells. *Am J Pathol.* 1966;48(5):831-57.
52. Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, Mankelow TJ, Betin VM, Trakarnsanga K, Massey EJ, Parsons SF, Anstee DJ, Lane JD. The ins and outs of human reticulocyte maturation: autophagy and the endosome/exosome pathway. *Autophagy.* 2012;8(7):1150-1.
53. Rademacher M, Kuhn H, Borchert A. Systemic deficiency of mouse arachidonate 15-lipoxygenase induces defective erythropoiesis and transgenic expression of the human enzyme rescues this phenotype. *Faseb j.* 2020;34(11):14318-35.
54. WATANABE T, MEDINA JF, HAEGGSTRÖM JZ, RÅDMARK O, SAMUELSSON B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *European Journal of Biochemistry.* 1993;212(2):605-12.
55. Nishiyama M, Okamoto H, Watanabe T, Hori T, Hada T, Ueda N, Yamamoto S, Tsukamoto H, Watanabe K, Kirino T. Localization of Arachidonate 12-Lipoxygenase in Canine Brain Tissues. *Journal of Neurochemistry.* 1992;58(4):1395-400.
56. de la Houssaye BA, Mikule K, Nikolic D, Pfenninger KH. Thrombin-Induced Growth Cone Collapse: Involvement of Phospholipase A₂ and Eicosanoid Generation. *The Journal of Neuroscience.* 1999;19(24):10843-55.
57. Ross S, Essary B, de la Houssaye BA, Pan Z, Mikule K, Mubarak O, Pfenninger KH. Thrombin causes pseudopod detachment via a pathway involving cytosolic phospholipase A₂ and 12/15-lipoxygenase products. *Cell Growth Differ.* 2000;11(1):19-30.
58. Mikule K, Gatlin JC, de la Houssaye BA, Pfenninger KH. Growth Cone Collapse Induced by Semaphorin 3A Requires 12/15-Lipoxygenase. *The Journal of Neuroscience.* 2002;22(12):4932-41.
59. Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Hong K. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature.* 2003;423(6943):990-5.
60. Normandin M, Gagné J, Bernard J, Élie R, Miceli D, Baudry M, Massicotte G. Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Research.* 1996;730(1):40-6.
61. Feinmark SJ, Begum R, Tsvetkov E, Goussakov I, Funk CD, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. 12-Lipoxygenase Metabolites of Arachidonic Acid Mediate Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression at Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *The Journal of Neuroscience.* 2003;23(36):11427-35.
62. DeCostanzo AJ, Voloshyna I, Rosen ZB, Feinmark SJ, Siegelbaum SA. 12-Lipoxygenase regulates hippocampal long-term potentiation by modulating L-type Ca²⁺ channels. *J Neurosci.* 2010;30(5):1822-31.
63. Piomelli D, Shapiro E, Feinmark S, Schwartz J. Metabolites of arachidonic acid in the nervous system of Aplysia: possible mediators of synaptic modulation. *The Journal of Neuroscience.* 1987;7(11):3675-86.
64. Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum S, Kandel E, Schwartz J, Belardetti F. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. *Nature.* 1987;328(6125):38-43.

65. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-Lipoxygenase Expression in Peritoneal Macrophages: ENHANCED UTILIZATION OF THE 5-LIPOXYGENASE PATHWAY AND DIMINISHED OXIDATION OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN*. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(39):24055-62.
66. Shillabeer G, Kumar V, Tibbo E, Lau DCW. Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation. *Metabolism*. 1998;47(4):461-6.
67. Madsen L, Petersen RK, Sørensen MB, Jørgensen C, Hallenborg P, Pridal L, Fleckner J, Amri EZ, Krieg P, Furstenberger G, Berge RK, Kristiansen K. Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process. *Biochem J*. 2003;375(Pt 3):539-49.
68. Kakularam KR, Karst F, Polamarasetty A, Ivanov I, Heydeck D, Kuhn H. Paralog- and ortholog-specificity of inhibitors of human and mouse lipoxygenase-isoforms. *Biomed Pharmacother*. 2022;145:112434.
69. Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*. 1999;400(6742):378-82.
70. Shappell SB, Gupta RA, Manning S, Whitehead R, Boeglin WE, Schneider C, Case T, Price J, Jack GS, Wheeler TM, Matusik RJ, Brash AR, Dubois RN. 15S-Hydroxyeicosatetraenoic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and inhibits proliferation in PC3 prostate carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001;61(2):497-503.
71. Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2014;25(6):293-302.
72. Grossman S, Shahin I, Sredni B. Rat testis lipoxygenase-like enzyme characterization of products from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1979;572(2):293-7.
73. Fischer KA, Van Leyen K, Lovercamp KW, Manandhar G, Sutovsky M, Feng D, Safranski T, Sutovsky P. 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction*. 2005;130(2):213-22.
74. Moore K, Lovercamp K, Feng D, Antelman J, Sutovsky M, Manandhar G, van Leyen K, Safranski T, Sutovsky P. Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice. *Cell and Tissue Research*. 2010;340(3):569-81.
75. Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004;8(1):24-33.
76. Kundumani-Sridharan V, Dyukova E, Hansen DE, Rao GN. 12/15-Lipoxygenase Mediates High-fat Diet-induced Endothelial Tight Junction Disruption and Monocyte Transmigration: A NEW ROLE FOR 15(S)-HYDROXYEICOSATETRAENOIC ACID IN ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(22):15830-42.
77. Chattopadhyay R, Dyukova E, Singh NK, Ohba M, Mobley JA, Rao GN. Vascular Endothelial Tight Junctions and Barrier Function Are Disrupted by 15(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Partly via Protein Kinase C ϵ -mediated Zona Occludens-1 Phosphorylation at Threonine 770/772*. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(6):3148-63.

78. Chattopadhyay R, Tinnikov A, Dyukova E, Singh NK, Kotla S, Mobley JA, Rao GN. 12/15-Lipoxygenase-dependent ROS production is required for diet-induced endothelial barrier dysfunction. *Journal of Lipid Research*. 2015;56(3):562-77.
79. Mele PG, Dada LA, Paz C, Neuman I, Cymeryng CB, Mendez CF, Finkielstein CV, Maciel FC, Podestá EJ. Involvement of arachidonic acid and the lipoxygenase pathway in mediating luteinizing hormone-induced testosterone synthesis in rat leydig cells. *Endocrine Research*. 1997;23(1-2):15-26.
80. COOKE BA, DIX CJ, HABBERFIELD AD, SULLIVAN MHF. Control of Steroidogenesis in Leydig Cells: Roles of Ca²⁺ and Lipoxygenase Products in LH and LHRH Agonist Action. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1984;438(1):269-82.
81. Dix CJ, Habberfield AD, Sullivan MHF, Cooke BA. Inhibition of steroid production in Leydig cells by non-steroidal anti-inflammatory and related compounds: evidence for the involvement of lipoxygenase products in steroidogenesis. *Biochemical Journal*. 1984;219(2):529-37.
82. DIX CJ, HABBERFIELD AD, SULLIVAN MHF, COOKE BA. Evidence for the involvement of lipoxygenase products in steroidogenesis. *Biochemical Society Transactions*. 1985;13(1):60-3.
83. Conte D, Falaschi P, Proietti A, D'Urso R, Citarella F, Nordio M, Romanelli F, Maggi R, Motta M, Isidori A. Role of Arachidonate Metabolism on the in vitro Release of Luteinizing Hormone and Prolactin from the Anterior Pituitary Gland: Possible Involvement of Lipoxygenase Pathway. *Neuroendocrinology*. 1986;43(3):428-34.
84. Kiesel L, Przylipek A, Rabe T, Przylipek M, Runnebaum B. Arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites stimulate prolactin release in superfused pituitary cells. *Human Reproduction*. 1987;2(4):281-5.
85. Rabier M, Chavis C, Crastes de Paulet A, Damon M. 15-Lipoxygenase Products Stimulate Prolactin Secretion from a Cloned Strain of Rat Pituitary Cells. *Neuroendocrinology*. 1988;47(4):323-8.
86. Rabier M, Chavis C, de Paulet AC, Damon M. Arachidonic acid metabolism in a cloned strain of rat pituitary tumor cells: Correlation between 15 hydroxyicosatetraenoic acid release and the prolactin secretory process. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*. 1987;27(1):27-42.
87. Ikawa H, Yamamoto K, Takahashi Y, Ueda N, Hayashi Y, Yamamoto S, Ishimura K, Irahara M, Aono T. Arachidonate 12-lipoxygenase in porcine anterior pituitary cells: its localization and possible function in gonadotrophs. *Journal of Endocrinology*. 1996;148(1):33-41.
88. Downey BR, Mootoo JE, Doyle SE. A role for lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in porcine ovulation. *Animal Reproduction Science*. 1998;49(4):269-79.
89. Kühn H. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(peroxy)-5Z,8Z,11Z,13E-icosatetraenoic acid and 13-hydro(peroxy)-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Progress in Lipid Research*. 1996;35(3):203-26.
90. Higgs GA, Salmon JA, Spayne JA. The inflammatory effects of hydroperoxy and hydroxy acid products of arachidonate lipoxygenase in rabbit skin. *Br J Pharmacol*. 1981;74(2):429-33.
91. Henricks PAJ, Engels F, van der Vliet H, Nijkamp FP. 9-and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and human polymorphonuclear leukocytes. *Prostaglandins*. 1991;41(1):21-7.

92. Schwenk U, Morita E, Engel R, Schröder JM. Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic acid as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(18):12482-8.
93. Feltenmark S, Gautam N, Brunnström A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Björkholm M, Claesson HE. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(2):680-5.
94. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park CK, Xu ZZ, Ji RR, Zhu M, Petasis NA. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *Faseb j*. 2012;26(4):1755-65.
95. Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, Serhan CN. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol*. 2003;170(5):2688-94.
96. Ereso AQ, Cureton EL, Cripps MW, Sadjadi J, Dua MM, Curran B, Victorino GP. Lipoxin a(4) attenuates microvascular fluid leak during inflammation. *J Surg Res*. 2009;156(2):183-8.
97. El Kebir D, Filep JG. Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β 2 Integrins. *Front Immunol*. 2013;4:60.
98. Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J, Baenckler HW, van den Berg W, Voll RE, Kühn H, Joosten LA, Schett G. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*. 2009;183(5):3383-9.
99. Belkner J, Stender H, Kühn H. The Rabbit 15-Lipoxygenase Preferentially Oxygenates LDL Cholesterol Esters, and This Reaction Does Not Require Vitamin E*. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(36):23225-32.
100. Pirillo A, Uboldi P, Kuhn H, Catapano AL. 15-Lipoxygenase-mediated modification of high-density lipoproteins impairs SR-BI- and ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006;1761(3):292-300.
101. Cyrus T, Praticò D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*. 2001;103(18):2277-82.
102. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest*. 1999;103(11):1597-604.
103. George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D. 12/15-Lipoxygenase Gene Disruption Attenuates Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Circulation*. 2001;104(14):1646-50.
104. Shen J, Herderick E, Cornhill JF, Zsigmond E, Kim HS, Kühn H, Guevara NV, Chan L. Macrophage-mediated 15-lipoxygenase expression protects against atherosclerosis development. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(10):2201-8.
105. Trebus F, Heydeck D, Schimke I, Gerth C, Kühn H. Transient experimental anemia in cholesterol-fed rabbits induces systemic overexpression of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase and protects from aortic lipid deposition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2002;67(6):419-28.

106. Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *The FASEB Journal*. 2008;22(10):3595-606.
107. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):1238-43.
108. Gertow K, Nobili E, Folkersen L, Newman JW, Pedersen TL, Ekstrand J, Swedenborg J, Kühn H, Wheelock CE, Hansson GK, Hedin U, Haeggström JZ, Gabrielsen A. 12- and 15-lipoxygenases in human carotid atherosclerotic lesions: Associations with cerebrovascular symptoms. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):411-6.
109. Nagelin MH, Srinivasan S, Lee J, Nadler JL, Hedrick CC. 12/15-Lipoxygenase activity increases the degradation of macrophage ATP-binding cassette transporter G1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(10):1811-9.
110. Weibel GL, Joshi MR, Alexander ET, Zhu P, Blair IA, Rothblat GH. Overexpression of human 15(S)-lipoxygenase-1 in RAW macrophages leads to increased cholesterol mobilization and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(6):837-42.
111. Pfister SL, Campbell WB. Arachidonic acid- and acetylcholine-induced relaxations of rabbit aorta. *Hypertension*. 1992;20(5):682-9.
112. Pfister SL, Spitzbarth N, Nithipatikom K, Edgmond WS, Falck JR, Campbell WB. Identification of the 11,14,15- and 11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-derived Relaxing Factors of Rabbit Aorta*. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(47):30879-87.
113. Kriska T, Cepura C, Magier D, Siangjong L, Gauthier KM, Campbell WB. Mice lacking macrophage 12/15-lipoxygenase are resistant to experimental hypertension. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012;302(11):H2428-H38.
114. Klil-Drori AJ, Ariel A. 15-Lipoxygenases in cancer: a double-edged sword? *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;106:16-22.
115. Yoshinaga M, Buchanan FG, DuBois RN. 15-LOX-1 inhibits p21 (Cip/WAF 1) expression by enhancing MEK-ERK1/2 signaling in colon carcinoma cells. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2004;73(1):111-22.
116. Chiu J, Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*. 2012;22(11):592-601.
117. Cimen I, Astarci E, Banerjee S. 15-lipoxygenase-1 exerts its tumor suppressive role by inhibiting nuclear factor-kappa B via activation of PPAR gamma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112(9):2490-501.
118. Nunemaker CS, Chen M, Pei H, Kimble SD, Keller SR, Carter JD, Yang Z, Smith KM, Wu R, Bevard MH, Garmey JC, Nadler JL. 12-Lipoxygenase-knockout mice are resistant to inflammatory effects of obesity induced by western diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008;295(5):E1065-E75.
119. Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI. 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2009;4(9):e7250.
120. Cole BK, Morris MA, Grzesik WJ, Leone KA, Nadler JL. Adipose tissue-specific deletion of 12/15-lipoxygenase protects mice from the consequences of a high-fat diet. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:851798.

121. Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK, Nadler JL. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research*. 2011;50(1):115-31.
122. Zhang HJ, Sun CH, Kuang HY, Jiang XY, Liu HL, Hua WF, Liu ZJ, Zhou H, Sui H, Qi R. 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid levels link to coronary artery disease in Type 2 diabetic patients. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(6):385-9.
123. Zafiriou M-P, Zelarayan LC, Noack C, Renger A, Nigam S, Siafaka-Kapadai A. Hepoxilin A3 protects β -cells from apoptosis in contrast to its precursor, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811(6):361-9.
124. McDuffie M, Maybee NA, Keller SR, Stevens BK, Garmey JC, Morris MA, Kropf E, Rival C, Ma K, Carter JD, Tersey SA, Nunemaker CS, Nadler JL. Nonobese Diabetic (NOD) Mice Congenic for a Targeted Deletion of 12/15-Lipoxygenase Are Protected From Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 2008;57(1):199-208.
125. Green-Mitchell SM, Tersey SA, Cole BK, Ma K, Kuhn NS, Cunningham TD, Maybee NA, Chakrabarti SK, McDuffie M, Taylor-Fishwick DA, Mirmira RG, Nadler JL, Morris MA. Deletion of 12/15-lipoxygenase alters macrophage and islet function in NOD-Alox15(null) mice, leading to protection against type 1 diabetes development. *PLoS One*. 2013;8(2):e56763.
126. van Leyen K. Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12(2):191-9.
127. Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kühn H. Membrane Translocation of 15-Lipoxygenase in Hematopoietic Cells Is Calcium-Dependent and Activates the Oxygenase Activity of the Enzyme. *Blood*. 1998;91(1):64-74.
128. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37(12):3014-8.
129. Yigitkanli K, Pekcec A, Karatas H, Pallast S, Mandeville E, Joshi N, Smirnova N, Gazaryan I, Ratan RR, Witztum JL, Montaner J, Holman TR, Lo EH, van Leyen K. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Annals of Neurology*. 2013;73(1):129-35.
130. Pallast S, Arai K, Pekcec A, Yigitkanli K, Yu Z, Wang X, Lo EH, van Leyen K. Increased Nuclear Apoptosis-Inducing Factor after Transient Focal Ischemia: A 12/15-Lipoxygenase-dependent Organelle Damage Pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010;30(6):1157-67.
131. Hawkins KE, DeMars KM, Singh J, Yang C, Cho HS, Frankowski JC, Doré S, Candelario-Jalil E. Neurovascular protection by post-ischemic intravenous injections of the lipoxin A4 receptor agonist, BML-111, in a rat model of ischemic stroke. *Journal of Neurochemistry*. 2014;129(1):130-42.
132. Bazan NG. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *Journal of Lipid Research*. 2009;50:S400-S5.
133. Tsai WC, Kalyanaraman C, Yamaguchi A, Holinstat M, Jacobson MP, Holman TR. In Vitro Biosynthetic Pathway Investigations of Neuroprotectin D1 (NPD1) and Protectin DX (PDX) by Human 12-Lipoxygenase, 15-Lipoxygenase-1, and 15-Lipoxygenase-2. *Biochemistry*. 2021;60(22):1741-54.
134. Emerson MR, LeVine SM. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Research*. 2004;1021(1):140-5.

135. Xu J, Zhang Y, Xiao Y, Ma S, Liu Q, Dang S, Jin M, Shi Y, Wan B, Zhang Y. Inhibition of 12/15-lipoxygenase by baicalein induces microglia PPAR β/δ : a potential therapeutic role for CNS autoimmune disease. *Cell Death & Disease*. 2013;4(4):e569-e.
136. Praticò D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, Trojanowski JQ, Lee VMY. 12/15-Lipoxygenase Is Increased in Alzheimer's Disease: Possible Involvement in Brain Oxidative Stress. *The American Journal of Pathology*. 2004;164(5):1655-62.
137. Yao Y, Clark CM, Trojanowski JQ, Lee VMY, Praticò D. Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*. 2005;58(4):623-6.
138. Lukiw WJ, Cui J-G, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(10):2774-83.
139. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(7):332-41.
140. Dahlén SE, Hansson G, Hedqvist P, Björck T, Granström E, Dahlén B. Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C4, D4, and E4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(6):1712-6.
141. Dahlén SE, Hedqvist P, Hammarström S, Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*. 1980;288(5790):484-6.
142. Dahlén SE. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):40-56.
143. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggström JZ. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8161-6.
144. Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*. 1994;372(6502):179-82.
145. Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(9):3400-4.
146. Johnson EN, Brass LF, Funk CD. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):3100-5.
147. Katoh A, Ikeda H, Murohara T, Haramaki N, Ito H, Imaizumi T. Platelet-derived 12-hydroxyeicosatetraenoic acid plays an important role in mediating canine coronary thrombosis by regulating platelet glycoprotein IIb/IIIa activation. *Circulation*. 1998;98(25):2891-8.
148. Tourdot BE, Ahmed I, Holinstat M. The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes. *Front Pharmacol*. 2014;4:176.
149. Yeung J, Apopa PL, Vesci J, Stolla M, Rai G, Simeonov A, Jadhav A, Fernandez-Perez P, Maloney DJ, Boutaud O, Holman TR, Holinstat M. 12-lipoxygenase activity plays an important role in PAR4 and GPVI-mediated platelet reactivity. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):569-81.
150. Yeung J, Apopa PL, Vesci J, Kenyon V, Rai G, Jadhav A, Simeonov A, Holman TR, Maloney DJ, Boutaud O, Holinstat M. Protein kinase C regulation of 12-

- lipoxygenase-mediated human platelet activation. *Mol Pharmacol*. 2012;81(3):420-30.
151. Yeung J, Holinstat M. 12-lipoxygenase: a potential target for novel anti-platelet therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011;9(3):154-64.
 152. Johnson EN, Nanney LB, Virmani J, Lawson JA, Funk CD. Basal transepidermal water loss is increased in platelet-type 12-lipoxygenase deficient mice. *J Invest Dermatol*. 1999;112(6):861-5.
 153. Snodgrass RG, Brüne B. Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages. *Front Pharmacol*. 2019;10:719.
 154. Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):217-21.
 155. Czimmerer Z, Varga T, Poliska S, Nemet I, Szanto A, Nagy L. Identification of novel markers of alternative activation and potential endogenous PPAR γ ligand production mechanisms in human IL-4 stimulated differentiating macrophages. *Immunobiology*. 2012;217(12):1301-14.
 156. Ebert R, Cumbana R, Lehmann C, Kutzner L, Toewe A, Ferreirós N, Parnham MJ, Schebb NH, Steinhilber D, Kahnt AS. Long-term stimulation of toll-like receptor-2 and -4 upregulates 5-LO and 15-LO-2 expression thereby inducing a lipid mediator shift in human monocyte-derived macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(9):158702.
 157. Schweiger D, Fürstenberger G, Krieg P. Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. *J Lipid Res*. 2007;48(3):553-64.
 158. Tang DG, Bhatia B, Tang S, Schneider-Broussard R. 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2007;82(1-4):135-46.
 159. Suraneni MV, Schneider-Broussard R, Moore JR, Davis TC, Maldonado CJ, Li H, Newman RA, Kusewitt D, Hu J, Yang P, Tang DG. Transgenic expression of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) in mouse prostate leads to hyperplasia and cell senescence. *Oncogene*. 2010;29(30):4261-75.
 160. Alfardan R, Guo C, Toth LA, Nie D. Impaired Recovery from Influenza A/X-31(H3N2) Infection in Mice with 8-Lipoxygenase Deficiency. *Med Sci (Basel)*. 2019;7(4).
 161. Epp N, Fürstenberger G, Müller K, de Juanes S, Leitges M, Hausser I, Thieme F, Liebisch G, Schmitz G, Krieg P. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol*. 2007;177(1):173-82.
 162. Krieg P, Rosenberger S, de Juanes S, Latzko S, Hou J, Dick A, Kloz U, van der Hoeven F, Hausser I, Esposito I, Rauh M, Schneider H. Alox3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):172-80.
 163. Akiyama M. Harlequin ichthyosis and other autosomal recessive congenital ichthyoses: the underlying genetic defects and pathomechanisms. *J Dermatol Sci*. 2006;42(2):83-9.
 164. Eckl KM, de Juanes S, Kurtenbach J, Nätebus M, Lugassy J, Oji V, Traupe H, Preil ML, Martínez F, Smolle J, Harel A, Krieg P, Sprecher E, Hennies HC. Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. *J Invest Dermatol*. 2009;129(6):1421-8.

165. Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(3):390-400.
166. Zheng Y, Yin H, Boeglin WE, Elias PM, Crumrine D, Beier DR, Brash AR. Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J Biol Chem*. 2011;286(27):24046-56.
167. Muñoz-Garcia A, Thomas CP, Keeney DS, Zheng Y, Brash AR. The importance of the lipoxygenase-hepoxilin pathway in the mammalian epidermal barrier. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(3):401-8.
168. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Marnett LJ, Brash AR. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(16):9162-7.
169. Kypriotou M, Huber M, Hohl D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Exp Dermatol*. 2012;21(9):643-9.
170. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(4):328-40.
171. Funk CD, Keeney DS, Oliw EH, Boeglin WE, Brash AR. Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23338-44.
172. Westheide W, Rieger R. *Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere*. first ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2003.
173. Benton M. *Paläontologie der Wirbeltiere*. 3rd ed. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil; 2007.
174. Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SF, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Ignjatovic V, Summerhayes R, Kochva E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. 2006;439(7076):584-8.
175. Miyashita T, Coates MI, Farrar R, Larson P, Manning PL, Wogelius RA, Edwards NP, Anné J, Bergmann U, Palmer AR, Currie PJ. Hagfish from the Cretaceous Tethys Sea and a reconciliation of the morphological-molecular conflict in early vertebrate phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(6):2146-51.
176. Wang Z, Pascual-Anaya J, Zadissa A, Li W, Niimura Y, Huang Z, Li C, White S, Xiong Z, Fang D, Wang B, Ming Y, Chen Y, Zheng Y, Kuraku S, Pignatelli M, Herrero J, Beal K, Nozawa M, Li Q, Wang J, Zhang H, Yu L, Shigenobu S, Wang J, Liu J, Flicek P, Searle S, Wang J, Kuratani S, Yin Y, Aken B, Zhang G, Irie N. The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nat Genet*. 2013;45(6):701-6.
177. Betancur RR, Wiley EO, Arratia G, Acero A, Bailly N, Miya M, Lecointre G, Ortí G. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol Biol*. 2017;17(1):162.
178. Hughes LC, Ortí G, Huang Y, Sun Y, Baldwin CC, Thompson AW, Arcila D, Betancur RR, Li C, Becker L, Bellora N, Zhao X, Li X, Wang M, Fang C, Xie B, Zhou Z, Huang H, Chen S, Venkatesh B, Shi Q. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(24):6249-54.
179. German JB, Bruckner GG, Kinsella JE. Lipoxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Biochimica et biophysica acta*. 1986;875(1):12-20.

180. Knight J, Holland JW, Bowden LA, Halliday K, Rowley AF. Eicosanoid generating capacities of different tissues from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Lipids*. 1995;30(5):451-8.
181. Pettitt TR, Rowley AF, Secombes CJ. Lipoxins are major lipoxygenase products of rainbow trout macrophages. *FEBS Lett*. 1989;259(1):168-70.
182. Hill DJ, Griffiths DH, Rowley AF. Trout thrombocytes contain 12- but not 5-lipoxygenase activity. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1437(1):63-70.
183. Rowley AF. Lipoxin formation in fish leucocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1084(3):303-6.
184. Pettitt TR, Rowley AF. Fatty acid composition and lipoxygenase metabolism in blood cells of the lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. 1991;99(3):647-52.
185. Wang T, Zuo R, Mai K, Xu W, Ai Q. Molecular cloning and functional characterization of arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5), and its expression in response to the ratio of linolenic acid to linoleic acid in diets of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2016;201:21-8.
186. Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol*. 1997;75(5):479-85.
187. Flynt AS, Rao M, Patton JG. Blocking Zebrafish MicroRNAs with Morpholinos. *Methods Mol Biol*. 2017;1565:59-78.
188. Haas U, Raschperger E, Hamberg M, Samuelsson B, Tryggvason K, Haeggström JZ. Targeted knock-down of a structurally atypical zebrafish 12S-lipoxygenase leads to severe impairment of embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51):20479-84.
189. Reisch F, Kakularam KR, Stehling S, Heydeck D, Kuhn H. Eicosanoid biosynthesis in marine mammals. *Febs j*. 2021;288(4):1387-406.
190. Le Duc D, Velluva A, Cassatt-Johnstone M, Olsen RA, Baleka S, Lin CC, Lemke JR, Southon JR, Burdin A, Wang MS, Grunewald S, Rosendahl W, Joger U, Rutschmann S, Hildebrandt TB, Fritsch G, Estes JA, Kelso J, Dalén L, Hofreiter M, Shapiro B, Schöneberg T. Genomic basis for skin phenotype and cold adaptation in the extinct Steller's sea cow. *Sci Adv*. 2022;8(5):eabl6496.
191. Valdesalici S, Cellerino A. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;270(suppl_2):S189-S91.
192. Platzer M, Englert C. *Nothobranchius furzeri*: A Model for Aging Research and More. *Trends Genet*. 2016;32(9):543-52.
193. Sohal RS, Orr WC. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):539-55.
194. Schumacher C. Setup of a HPLC Device. Berlin, 2003 <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:HPLC.gif>. Accessed November 11, 2022.
195. Kuhn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, Bursztyn-Pettegrew H, Chan H, Sigal E. Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochimica et biophysica acta*. 1993;1169(1):80-9.
196. Banthiya S, Pekárová M, Kuhn H, Heydeck D. Secreted lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* exhibits biomembrane oxygenase activity and induces hemolysis in human red blood cells. *Arch Biochem Biophys*. 2015;584:116-24.
197. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959;37(8):911-7.

198. Roigas S, Kakularam KR, Rothe M, Heydeck D, Kuhn H. Lipoxygenase isoforms occur in bony fish but ALOX15 orthologs may be lacking. *International Journal of Molecular Sciences*. 10 October 2022.
199. Tozzini ET, Dorn A, Ng'oma E, Polačik M, Blažek R, Reichwald K, Petzold A, Watters B, Reichard M, Cellerino A. Parallel evolution of senescence in annual fishes in response to extrinsic mortality. *BMC Evol Biol*. 2013;13:77.
200. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
201. Hartmann N, Reichwald K, Lechel A, Graf M, Kirschner J, Dorn A, Terzibasi E, Wellner J, Platzer M, Rudolph KL, Cellerino A, Englert C. Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech Ageing Dev*. 2009;130(5):290-6.
202. Hartmann N, Reichwald K, Wittig I, Dröse S, Schmeisser S, Lück C, Hahn C, Graf M, Gausmann U, Terzibasi E, Cellerino A, Ristow M, Brandt U, Platzer M, Englert C. Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging cell*. 2011;10(5):824-31.
203. Roigas S, Heydeck D, Kuhn H. Functional Characterization of Novel Bony Fish Lipoxygenase Isoforms and Their Possible Involvement in Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(24):16026.
204. Tappel AL, Lundberg WO, Boyer PD. Effect of temperature and antioxidants upon the lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate. *Arch Biochem Biophys*. 1953;42(2):293-304.
205. Kühn H, Götze R, Schewe T, Rapoport SM. Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin. A model for lipoxygenases. *Eur J Biochem*. 1981;120(1):161-8.
206. Banthiya S, Kalms J, Galemou Yoga E, Ivanov I, Carpena X, Hamberg M, Kuhn H, Scheerer P. Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1861(11):1681-92.
207. Ludwig P, Holzhütter HG, Colosimo A, Silvestrini MC, Schewe T, Rapoport SM. A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur J Biochem*. 1987;168(2):325-37.
208. Kutzner L, Goloshchapova K, Heydeck D, Stehling S, Kuhn H, Schebb NH. Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(7):666-75.
209. Chen XS, Kurre U, Jenkins NA, Copeland NG, Funk CD. cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. *J Biol Chem*. 1994;269(19):13979-87.
210. Kutzner L, Goloshchapova K, Rund KM, Jübermann M, Blum M, Rothe M, Kirsch SF, Schunck WH, Kühn H, Schebb NH. Human lipoxygenase isoforms form complex patterns of double and triple oxygenated compounds from eicosapentaenoic acid. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(12):158806.
211. Ivanov I, Kakularam KR, Shmendel EV, Rothe M, Aparoy P, Heydeck D, Kuhn H. Oxygenation of endocannabinoids by mammalian lipoxygenase isoforms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2021;1866(6):158918.
212. Romano M. Lipid mediators: lipoxin and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006;5(2):81-90.

213. Welty FK, Schulte F, Alfaddagh A, Elajami TK, Bistrrian BR, Hardt M. Regression of human coronary artery plaque is associated with a high ratio of (18-hydroxy-eicosapentaenoic acid + resolvin E1) to leukotriene B(4). *Faseb j.* 2021;35(4):e21448.
214. Elphick MR, Egertová M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1407):381-408.
215. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology.* 2008;153(2):199-215.
216. Klein C, Hill MN, Chang SC, Hillard CJ, Gorzalka BB. Circulating endocannabinoid concentrations and sexual arousal in women. *J Sex Med.* 2012;9(6):1588-601.
217. Wang H, Xie H, Dey SK. Endocannabinoid signaling directs periimplantation events. *Aaps j.* 2006;8(2):E425-32.
218. Wang H, Xie H, Sun X, Kingsley PJ, Marnett LJ, Cravatt BF, Dey SK. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;83(1-2):62-74.
219. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9371-6.
220. Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res.* 2009;60(2):85-92.
221. Cottone E, Guastalla A, Mackie K, Franzoni MF. Endocannabinoids affect the reproductive functions in teleosts and amphibians. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1-2 Suppl 1):S41-5.
222. Cottone E, Campantico E, Guastalla A, Aramu S, Polzonetti-Magni AM, Franzoni M. Are the cannabinoids involved in bony fish reproduction? *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1040:273-6.
223. Migliarini B, Carnevali O. Anandamide modulates growth and lipid metabolism in the zebrafish *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1-2 Suppl 1):S12-6.
224. Watson S, Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. The endocannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(1):89-97.
225. Yazulla S, Studholme KM. Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. *J Neurocytol.* 2001;30(7):551-92.
226. Urquhart P, Nicolaou A, Woodward DF. Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1851(4):366-76.
227. Ueda N, Yamamoto K, Yamamoto S, Tokunaga T, Shirakawa E, Shinkai H, Ogawa M, Sato T, Kudo I, Inoue K, Takizawa H, Nagano T, Hirobe M, Matsuki N, Saito H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 1995;1254(2):127-34.
228. Moody JS, Kozak KR, Ji C, Marnett LJ. Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase. *Biochemistry.* 2001;40(4):861-6.
229. Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of

- a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23278-86.
230. Kühn H, Wiesner R, Alder L, Fitzsimmons BJ, Rokach J, Brash AR. Formation of lipoxin B by the pure reticulocyte lipoxygenase via sequential oxygenation of the substrate. *Eur J Biochem.* 1987;169(3):593-601.
231. Juránek I, Suzuki H, Yamamoto S. Affinities of various mammalian arachidonate lipoxygenases and cyclooxygenases for molecular oxygen as substrate. *Biochimica et biophysica acta.* 1999;1436(3):509-18.
232. Kalms J, Banthiya S, Galemou Yoga E, Hamberg M, Holzhutter HG, Kuhn H, Scheerer P. The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase Ala420Gly mutant explains the improved oxygen affinity and the altered reaction specificity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017;1862(5):463-73.
233. Takahashi Y, Glasgow WC, Suzuki H, Taketani Y, Yamamoto S, Anton M, Kühn H, Brash AR. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. *Eur J Biochem.* 1993;218(1):165-71.
234. Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids.* 1987;44(2-4):175-89.
235. Schäfer M, Fan Y, Gu T, Heydeck D, Stehling S, Ivanov I, Yao YG, Kuhn H. The lipoxygenase pathway of *Tupaia belangeri* representing Scandentia. Genomic multiplicity and functional characterization of the ALOX15 orthologs in the tree shrew. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(2):158550.
236. Chavis C, Vachier I, Chanez P, Bousquet J, Godard P. 5(S),15(S)-dihydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin generation in human polymorphonuclear cells: dual specificity of 5-lipoxygenase towards endogenous and exogenous precursors. *J Exp Med.* 1996;183(4):1633-43.
237. Sheppard KA, Greenberg SM, Funk CD, Romano M, Serhan CN. Lipoxin generation by human megakaryocyte-induced 12-lipoxygenase. *Biochimica et biophysica acta.* 1992;1133(2):223-34.
238. Edenius C, Haeggström J, Lindgren JA. Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. *Biochemical and biophysical research communications.* 1988;157(2):801-7.
239. Serhan CN, Sheppard KA. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J Clin Invest.* 1990;85(3):772-80.
240. Fiore S, Serhan CN. Formation of lipoxins and leukotrienes during receptor-mediated interactions of human platelets and recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-primed neutrophils. *J Exp Med.* 1990;172(5):1451-7.
241. Borngräber S, Kuban RJ, Anton M, Kühn H. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *J Mol Biol.* 1996;264(5):1145-53.
242. Sloane DL, Leung R, Craik CS, Sigal E. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature.* 1991;354(6349):149-52.
243. Jansen C. Untersuchung der Stereospezifität und Positionsspezifität von Wirbeltier-Lipoxygenasen [Ph.D. thesis]. Berlin: Freie Universität; 2014.
244. Eek P, Järving R, Järving I, Gilbert NC, Newcomer ME, Samel N. Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem.* 2012;287(26):22377-86.

245. Andreou AZ, Vanko M, Bezakova L, Feussner I. Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. *Phytochemistry*. 2008;69(9):1832-7.
246. Oldham ML, Brash AR, Newcomer ME. 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*. 2005;280(47):39545-52.
247. Nelson MJ, Cowling RA, Seitz SP. Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase. *Biochemistry*. 1994;33(16):4966-73.
248. Kitaguchi H, Ohkubo K, Ogo S, Fukuzumi S. Direct ESR detection of pentadienyl radicals and peroxy radicals in lipid peroxidation: mechanistic insight into regioselective oxygenation in lipoxygenases. *J Am Chem Soc*. 2005;127(18):6605-9.
249. Gilbert NC, Bartlett SG, Waight MT, Neau DB, Boeglin WE, Brash AR, Newcomer ME. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science*. 2011;331(6014):217-9.
250. Blažek R, Polačik M, Reichard M. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *Evodevo*. 2013;4(1):24.
251. Hartmann N, Englert C. A microinjection protocol for the generation of transgenic killifish (Species: *Nothobranchius furzeri*). *Dev Dyn*. 2012;241(6):1133-41.
252. Valenzano DR, Sharp S, Brunet A. Transposon-Mediated Transgenesis in the Short-Lived African Killifish *Nothobranchius furzeri*, a Vertebrate Model for Aging. *G3 (Bethesda)*. 2011;1(7):531-8.
253. Allard JB, Kamei H, Duan C. Inducible transgenic expression in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *J Fish Biol*. 2013;82(5):1733-8.
254. Harel I, Benayoun BA, Machado B, Singh PP, Hu CK, Pech MF, Valenzano DR, Zhang E, Sharp SC, Artandi SE, Brunet A. A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate. *Cell*. 2015;160(5):1013-26.
255. Reichwald K, Petzold A, Koch P, Downie BR, Hartmann N, Pietsch S, Baumgart M, Chalopin D, Felder M, Bens M, Sahm A, Szafranski K, Taudien S, Groth M, Arisi I, Weise A, Bhatt SS, Sharma V, Kraus JM, Schmid F, Priebe S, Liehr T, Görlach M, Than ME, Hiller M, Kestler HA, Volf JN, Scharl M, Cellerino A, Englert C, Platzer M. Insights into Sex Chromosome Evolution and Aging from the Genome of a Short-Lived Fish. *Cell*. 2015;163(6):1527-38.
256. Valenzano DR, Benayoun BA, Singh PP, Zhang E, Etter PD, Hu CK, Clément-Ziza M, Willemsen D, Cui R, Harel I, Machado BE, Yee MC, Sharp SC, Bustamante CD, Beyer A, Johnson EA, Brunet A. The African Turquoise Killifish Genome Provides Insights into Evolution and Genetic Architecture of Lifespan. *Cell*. 2015;163(6):1539-54.
257. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
258. Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. 1990;347(6291):400-2.
259. Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano DR, Cattaneo A, Cellerino A. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging cell*. 2005;4(5):223-33.
260. Graf M, Hartmann N, Reichwald K, Englert C. Absence of replicative senescence in cultured cells from the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Exp Gerontol*. 2013;48(1):17-28.
261. Baumgart M, Groth M, Priebe S, Savino A, Testa G, Dix A, Ripa R, Spallotta F, Gaetano C, Ori M, Terzibasi Tozzini E, Guthke R, Platzer M, Cellerino A. RNA-

- seq of the aging brain in the short-lived fish *N. furzeri* - conserved pathways and novel genes associated with neurogenesis. *Aging cell*. 2014;13(6):965-74.
262. Baumgart M, Priebe S, Groth M, Hartmann N, Menzel U, Pandolfini L, Koch P, Felder M, Ristow M, Englert C, Guthke R, Platzer M, Cellerino A. Longitudinal RNA-Seq Analysis of Vertebrate Aging Identifies Mitochondrial Complex I as a Small-Molecule-Sensitive Modifier of Lifespan. *Cell Syst*. 2016;2(2):122-32.
263. Tozzini ET, Baumgart M, Battistoni G, Cellerino A. Adult neurogenesis in the short-lived teleost *Nothobranchius furzeri*: localization of neurogenic niches, molecular characterization and effects of aging. *Aging cell*. 2012;11(2):241-51.
264. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet*. 1992;2(4):324-9.
265. Almáida-Pagan PF, Ortega-Sabater C, Lucas-Sánchez A, González-Silvera D, Martínez-Nicolas A, Rol de Lama MA, Mendiola P, de Costa J. Age-related changes in mitochondrial membrane composition of *Nothobranchius furzeri*: comparison with a longer-living *Nothobranchius* species. *Biogerontology*. 2019;20(1):83-92.
266. PAMPLONA R, BARJA G, PORTERO-OTÍN M. Membrane Fatty Acid Unsaturation, Protection against Oxidative Stress, and Maximum Life Span. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;959(1):475-90.
267. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiological Reviews*. 2007;87(4):1175-213.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Alexandra Roigas, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen niederer Vertebraten/ Studies on the reaction specificity of ALOX15 orthologs from lower vertebrates“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung

Sophie Alexandra Roigas hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Roigas S, Heydeck D, Kuhn H, Functional characterization of novel bony fish lipoxygenase isoforms and their possible involvement in inflammation, International Journal of Molecular Sciences, 2022

Beitrag im Einzelnen: Ich habe die Proteinaufreinigung und den zugehörigen Western Blot durchgeführt, welche in Abbildung 1 gezeigt sind. Ich habe die Aktivitätsassays und zugehörigen HPLC-Analysen gemacht, die in Abbildung 2 gezeigt sind. Ich habe die Experimente zur enzymatischen Charakterisierung gemacht und die erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. Daraus resultierten die Abbildungen 4, 5 und 6. Ich war an den Experimenten unter norm- und hyperoxischen Bedingungen beteiligt und habe die erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. Daraus resultierte Abbildung 7. Ich habe die Aktivitätsassays und zugehörigen HPLC-Analysen gemacht, die in Abbildung 8 gezeigt sind. Aus meinen Ergebnissen zur Substratspezifität der Knochenfisch ALOX-Isoformen resultierte die Tabelle 1.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Kuhn H, Humeniuk L, Kozlov N, **Roigas S**, Adel S, Heydeck D. **The evolutionary hypothesis of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs.** Prog Lipid Res. 2018;72:55-74.

2. Heydeck D, Reisch F, Schäfer M, Kakularam KR, **Roigas SA**, Stehling S, Püschel GP, Kuhn H. **The Reaction Specificity of Mammalian ALOX15 Orthologs is Changed During Late Primate Evolution and These Alterations Might Offer Evolutionary Advantages for Hominidae.** Front Cell Dev Biol. 2022;10:871585.

3. **Roigas S**, Heydeck D, Kuhn H. **Functional Characterization of Novel Bony Fish Lipoxygenase Isoforms and Their Possible Involvement in Inflammation.** International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(24):16026.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. Hartmut Kühn für die Überlassung des Promotionsthemas und die sehr gute Betreuung. Ganz besonders möchte ich auch Frau Dr. Heydeck und Frau Stehling für ihre Hilfe und Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten danken. Mein Dank gebührt weiterhin allen anderen Mitgliedern der AG Kühn, die mir bei Fragen immer zur Seite standen sowie meiner Familie und meinen Freunden.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Roigas, Sophie Alexandra
Emailadresse: sophie.roigas@charite.de
Matrikelnummer: 222476
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. sc. Med. Hartmut Kühn
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für Biochemie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Frau Sophie Alexandra Roigas* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- *Termin 1: 06.09.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Revision ursprünglicher Kommentare
- Keine weiteren Kommentare

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: Name des Beraters/ der Beraterin:

15.12.2022, Erin Sprünken

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel