

**CHARAKTERISIERUNG UND ZELLULÄRE LOKALISATION
DER HUMANEN 5-LIPOXYGENASE UND DEREN ISOFORMEN
5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 UND 5-LOp12**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

von Ann-Katrin Ball
aus Herrenberg

Frankfurt am Main, 2017

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Thorsten Maier

Datum der Disputation: 16.02.2018

*Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind
vor der Märchenwelt.*

(Marie Curie)

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	11
1.1 Lipoxygenasen.....	11
1.2 5-Lipoxygenase.....	12
1.2.1 Das 5-LO-Gen.....	12
1.2.2 Gen-Regulation und –Expression.....	13
1.2.3 5-LO-Protein-Regulation.....	14
1.2.4 Enzymatische Katalyse der Leukotriene.....	17
1.2.5 Struktur der 5-LO.....	18
1.2.6 Involvierte Proteine im AA-Metabolismus und Interaktionspartner der 5-LO...	21
1.2.7 Pathologische und physiologische Rolle der 5-LO-Stoffwechselprodukte.....	29
1.3 Alternatives Spleißen.....	33
1.3.1 Isoformen der 5-Lipoxygenase.....	35
2 Ziel der Dissertation.....	37
3 Material und Methoden.....	38
3.1 Material.....	38
3.1.1 Chemikalien und Lösungen.....	38
3.1.2 Verwendete Geräte und Chemikalien.....	39
3.1.3 Verwendete Kits.....	41
3.1.4 Verwendete Reagenzien.....	42
3.1.5 Verwendete Enzyme.....	42
3.1.6 Verwendete Antikörper.....	43
3.1.7 Verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusätze.....	44
3.2 Methoden.....	45
3.2.1 Klonierung von 3 × FLAG-Tag in pcDNA3.1 5-LO.....	45
3.2.2 Herstellung der Expressionsvektoren für die stabile Integration.....	46
3.2.3 Klonierung des P2A-Linkers mittels „Overlap-PCR“.....	47
3.2.4 Mutagenese-PCR und Transformation in <i>E. coli</i>	49
3.2.5 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	50
3.2.6 Zellkultur.....	50

Inhaltsverzeichnis

3.2.7	Zellzahlbestimmung	51
3.2.8	Transfektion	51
3.2.9	5-LO-Aktivitätsassay	52
3.2.10	SDS-PAGE und Western Blot.....	53
3.2.11	Konfokalmikroskop.....	55
3.2.12	Isolierung von primären B- und T-Lymphozyten	57
3.2.13	Isolierung von primären Monozyten	57
3.2.14	Isolierung von Granulozyten und alveolären Makrophagen aus humanem Blut	58
3.2.15	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	59
3.2.16	PCR zur semiquantitativen Analyse der 5-LO-Transkripte	60
4	Ergebnisse	63
4.1	Detektion der alternativ gespleißten 5-LO-Transkripte in B- und T-Zelllinien, primären B- und T-Zellen und myeloiden Zellen	63
4.2	Detektion von 5-LO-Transkripten in primären Monozyten von Sepsis-Patienten und Patienten mit rheumatoider Arthritis.....	67
4.3	Untersuchung der 5-LO-Produktbildung in transient transfizierten HEK293T-Zellen 69	
4.4	Untersuchung der Lokalisation in transient transfizierten Zellen	73
4.5	Untersuchung einer möglichen Interaktion/Dimerisierung zwischen 5-LO-WT und deren Isoformen	74
4.6	Stabile Integration mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode.....	82
4.7	Untersuchung der Lokalisation des GFP-5-LO-WT und mCherry-Isoformen in stabil transfizierten Zellen	86
4.8	Behandlung der Zellen zur Translokation der Isoformen in den Zellkern	89
4.9	Behandlung der Zellen zur Translokation des GFP-5-LO-WT in das Zytosol	95
4.10	Mutation der mCherry-getagten Isoformen.....	98
4.11	Untersuchung der Lokalisation der GFP-5-LO-S271A-Mutante und deren Einfluss auf die 5-LO-Isoformen	102
4.12	Untersuchung der 5-LO-Aktivität der 5-LO-S271A-Mutante	107
4.13	Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und der alternativen 5-LO- Isoformen	109
5	Diskussion	113
5.1	Untersuchung der mRNA-Expression von 5-LO-WT und deren Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12	113
5.2	Untersuchung der Aktivität des 5-LO-WT und der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in stabil und transient transfizierten HEK293T-Zellen.....	115
5.3	Überprüfung der Lokalisation mittels Konfokalmikroskopie	119

Inhaltsverzeichnis

5.4	Beeinflussung der zellulären Lokalisation der Proteine mit Hilfe unterschiedlicher Stimuli	124
5.4.1	Translokation der Isoformen vom Zytosol in den Zellkern.....	124
5.4.2	Translokation des 5-LO-WT aus dem Nukleus in das Zytosol und Untersuchung des Einflusses der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität nach Stimuli-Behandlung.....	128
5.5	Aktivitätsuntersuchungen der stabil transfizierten 5-LO-S271A-Mutante nach Zugabe eines p38- und CamKII-Inhibitors	133
6	Zusammenfassung.....	134
	References.....	136
	Anhang.....	163
A1	Vektorkarte pSBbi-Puromycin.....	163
A2	Vektorkarte pSBbi-Puromycin-mCherry	164
A3	Vektorkarte pSBbi-Puromycin-GFP	165
A4	Vektorkarte pSBbi-GFP-5-LO	166
A5	Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LO Δ 13	167
A6	Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LO Δ 4.....	168
A7	Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LOp12	169
A8	Klinische Daten der untersuchten Sepsis-Patienten	170
A9	Klinische Daten der untersuchten RA-Patienten.....	171
	Eidesstattliche Erklärung.....	1722

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Polygenetischer Stammbaum der LOs nach.	12
Abbildung 2: Aufbau des humanen 5-LO-Gens.....	13
Abbildung 3: Zelluläre Regulation der 5-LO.	16
Abbildung 4: Umwandlung der AA zu LTs durch die 5-LO.	17
Abbildung 5: Darstellung der C2ld und Koordination des Eisenatoms im aktiven Zentrum.....	20
Abbildung 6: Homologiemodell des 5-LO-Dimers in head-to-tail-Anordnung.....	20
Abbildung 7: Kristallstruktur von FLAP als Monomer (links) und als Trimer (rechts)	22
Abbildung 8: Kristallstruktur der humanen LTA ₄ H und Mechanismus der Umwandlung von LTA ₄ in LTB ₄	24
Abbildung 9: Struktur von CLP	26
Abbildung 10: Strukturdarstellung der LTC ₄ S und Schematische Darstellung der Umwandlung von LTA ₄ zu LTC ₄ mit Hilfe des GSH.	28
Abbildung 11: Darstellung der Formen des alternativen Spleißens	34
Abbildung 12: Darstellung der identifizierten 5-LO-Isoformen	36
Abbildung 13: Darstellung der Anlagerung der Oligonukleotide zur Konstruktion des FLAG- Tags.....	46
Abbildung 14: Schematische Darstellung der durchgeführten „overlap-PCR“.	48
Abbildung 15: Schematische Darstellung der untersuchten Isoformen und Bindung der Primerpaare für die PCR-Analyse.....	65
Abbildung 16: Untersuchung der Expression des 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in B- und T-Zelllinien sowie primären B- und T-Zellen.....	65
Abbildung 17: Untersuchung der Expression des 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in myeloiden Zellen sowie in monozytären Zelllinien	66
Abbildung 18: Überprüfung der Expression von 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in primären Monozyten von Sepsis- und RA-Patienten sowie gesunden Kontrollen	69
Abbildung 19: Produktbildung des 5-LO-WT und der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5- LOp12 in transient transfizierten HEK293T-Zellen.	71
Abbildung 20: Vergleich der Aktivität zwischen 5-LO-WT und FLAG-5-LO	72
Abbildung 21: Untersuchung der Lokalisation der 5-LO und deren Isoformen in transient transfizierten HEK293T-Zellen.	74
Abbildung 22: Untersuchung der Aktivität von FLAG-5-LO in Zellhomogenaten.....	76
Abbildung 23: Überprüfung des Einflusses der phosphomimetischen Isoformen auf die 5-LO- Aktivität.	78
Abbildung 24: Überprüfung der Lokalisation der phosphomimetischen Isoform-Mutanten.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: Reaktion von GSH mit cysteinhaltigen Proteinen durch Diamid	80
Abbildung 26: Einfluss von Diamid auf die 5-LO-Aktivität.	82
Abbildung 27: 5-LO-Produktbildung und 5-LO-Expression in transienten und stabil transfizierten HEK293T-Zellen	84
Abbildung 28: Quantifizierung der 5-LO-Expression.....	85
Abbildung 29: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.....	87
Abbildung 30: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.....	88
Abbildung 31: Untersuchung der Lokalisation der Proteine GFP und mCherry in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.	89
Abbildung 32: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Stresstimulus NaAsO ₂	90
Abbildung 33: Zelluläre Lokalisation des GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem PKC-Aktivator PMA.....	91
Abbildung 34: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit den Stimuli PMA und H-89	92
Abbildung 35: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin.	93
Abbildung 36: Zelluläre Lokalisation der mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Exportin-Inhibitor Leptomycin B. 94	
Abbildung 37: Untersuchung der zellulären Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry- getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit einem p38-Inhibitor namens SB203580	95
Abbildung 38: Zelluläre Lokalisation des GFP-5-LO-WT in stabil transfizierten HEK293T- Zellen nach Behandlung mit einem p38-Inhibitor namens SB203580 und dem CaMKII-Inhibitor KN-93.....	97
Abbildung 39: Untersuchung der Lokalisation von GFP-5-LO-WT in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit den Stresstimuli H ₂ O ₂ und Sorbitol....	98
Abbildung 40: Zelluläre Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen	99
Abbildung 41: Zelluläre Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 42: Detektion der zellulären Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Stimulation mit einem PKA-Inhibitor (H-89) und einem PKC-Aktivator (PMA).....	101
Abbildung 43: Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Stresstimulus NaAsO ₂	102
Abbildung 44: Vergleich der Aktivitäten zwischen GFP-5-LO-WT und GFP-5-LO-S271A mit Hilfe von Aktivitätsassays	104
Abbildung 45: Zelluläre Lokalisation von GFP-5-LO-S271A in stabil transfizierten HEK293T-Zellen	105
Abbildung 46: Bestimmung der zellulären Lokalisation von GFP-5-LO-S271A in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 und dem CaMKII-Inhibitor KN-93.....	106
Abbildung 47: Zelluläre 5-LO-Enzymaktivität der stabil integrierten GFP-5-LO-S271A-Mutante nach Behandlung mit einem Stresstimulus und einem CaMKII-/p38-Inhibitor.....	108
Abbildung 48: Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und der 5-LO-Isoformen.	110
Abbildung 49: Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen sowie deren Expression mittels Western Blot	112
Abbildung 50: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen mit gebundenem Eisen und den zugehörigen Eisenliganden	117
Abbildung 51: Darstellung der Membranbindung der 5-LO.....	124
Abbildung 52: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen mit Abstandsmessungen zwischen den Phosphorylierungsstellen (gelb) und den fehlenden Sequenzen (grün) in Å	126
Abbildung 53: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen (fehlende Sequenzen in grün) mit nukleären Importsequenzen (orange).....	128
Abbildung 54: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen CamKII und MK2/3	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.	38
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien.	39
Tabelle 3: Verwendete Kits.....	41
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	42
Tabelle 5: Verwendete Enzyme.	42
Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper.....	43
Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper.....	44
Tabelle 8: verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusätze.....	44
Tabelle 9: : verwendete Oligos für 3 × FLAG-Tag-Herstellung.....	46
Tabelle 10: verwendete Primer, um Schnittstellen Sfi I und Bsa I einzufügen.....	47
Tabelle 11: verwendete Primer der „overlap-PCR“.	48
Tabelle 12: verwendetes PCR-Programm für „overlap-PCR“.	48
Tabelle 13: verwendete Mutagenese-Primer.....	49
Tabelle 14: verwendetes Programm für die Mutagenese-PCR.	50
Tabelle 15: Verwendete Chemikalien zur Behandlung der Zellen zur Untersuchung der 5-LO- Aktivität.....	53
Tabelle 16: Verwendete Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot.....	54
Tabelle 17: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele. Angegeben sind die Mengen in µL für 4 Gele einer Dicke von 0,75 mm.....	55
Tabelle 18: Verwendete Lösungen zur Herstellung der Konfokal-Proben.	56
Tabelle 19: Verwendete Reagenzien zur Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Zellen.	56
Tabelle 20: verwendete Primer für cDNA-Vervielfältigung.....	61
Tabelle 21: verwendetes PCR-Programm für Detektion von Δ13/p12.	61
Tabelle 22: verwendetes PCR-Programm für Detektion von Δ4.	61
Tabelle 23: verwendetes PCR-Programm für Detektion von β2M.	62
Tabelle 24: Zusammenfassung der gefundenen Transkripte in unterschiedlichen Zellen.	67

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AdC	5-aza-2'-deoxycytidin
AS	Aminosäure
AP	<i>activating protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BLT	Leukotriene B4-Rezeptor
BMMC	<i>mouse bone marrow-derived mast cells</i>
C2Id	C2-ähnliche Domäne
CLP	coactosin-like protein
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
cysLT	Cysteinyl-haltiges Leukotrien
Dnp-Cl	1-Chloro-2,4-dinitrobenzen
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Egr-1/2	<i>early growth response protein 1/2</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FLAP	5-LO-aktivierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEDH	Hydroxyeicosadehydrogenase
H(p)ETE	Hydro(pero)xyeicosatetraensäure
IF	Immunofluoreszenz
IL	Interleukin
LB	Luria Broth
LILBID	<i>laser induced liquid bead ion desorption</i>
LO	Lipoxygenase

Abkürzungsverzeichnis

LT	Leukotrien
MALDI-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry</i>
MAPEG	<i>membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MGST2	<i>microsomal glutathione S-transferase 2</i>
MK 2/3	<i>mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2/3</i>
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
myb	<i>myeloblastosis</i>
NAF	neutrophilaktivierender Faktor
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIS	nukleäre Importsequenz
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
oxo-ETE	5-oxo-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraensäure
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Phosphatpuffer, pH 7,4
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Dulbeccos phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PGB ₁	Prostaglandin B ₁
PLC	Phospholipase C
PM	peritonealen Makrophagen
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RA	rheumatoide Arthritis
RBL1	<i>rat basophilic leukemia cells</i>
RORα	<i>retinoic acid receptor related orphan-receptor</i>
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RZRα	retinoid Z receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungsverzeichnis

SMAD	<i>SMA (small body size) and MAD (mothers against decapentaplegic) related protein</i>
SP1/3	<i>specificity protein 1/3</i>
T20	Tween® 20
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + 0,1% T20
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TRAP-1	<i>TGFβ-rezeptor-associated protein 1</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOs) gehören zur Familie der Dioxygenasen, welche die Oxygenierung von freien, mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren. Sie tragen ein nicht-Häm-gebundenes Eisen in ihrem aktiven Zentrum, wodurch sie in der Lage sind, molekularen Sauerstoff an die mehrfach ungesättigten Fettsäuren einzubauen [1]. LOs werden in Pflanzen, Tieren und Pilzen exprimiert, wobei in Hefe bis heute keine LOs gefunden werden konnten [2]. Lange Zeit galten Bakterien als LO-negativ. Im Jahre 2001 entdeckten jedoch Porta und Rocha-Sosa zwei bakterielle LOs [3]. Das erste Mal konnte die Lipoxygenase 1947 in Sojabohnen identifiziert werden [4]. 1974 wurde in humanen Plättchen erstmals das Produkt 12-HETE (12-(*S*)hydroxyeicosatetraensäure) des 12-LO-Stoffwechsels nachgewiesen [5]. Heute sind mehr als 18 verschiedene LO-Sequenzen in Säugetieren bekannt und können in vier Gruppen nach ihren enzymatischen Eigenschaften unterteilt werden: 12*S*/15*S*-LOs, Plättchen-Typ-12*S*-LOs, 5*S*-LOs und Epidermis-Typ-LOs [1]. Im Menschen sind bisher fünf LO-Gene beschrieben: die humane 5*S*-LO [6], Epidermis-Typ-15*S*-LO [7], Epidermis-Typ-12*R*-LO [8], Plättchen-Typ-12*S*-LO [9] und Retikulozyten-Typ-15*S*-LO [10] (siehe Abb. 1). Das Substrat der LOs unterscheidet sich in Pflanzen und Säugetieren. Während das Substrat in Pflanzen die Linolsäure oder Linolensäure darstellt, setzen die LOs in Säugetieren die Arachidonsäure (AA) als Hauptsubstrat um [1,11]. Ebenso unterscheiden sich die LOs in ihrer Größe. Die pflanzlichen LOs weisen eine Größe von rund 97-102 kDa auf, die Säugetier-LOs sind mit rund 75-80 kDa etwas kleiner [2]. Strukturell haben die LOs jedoch große Ähnlichkeiten. Sie besitzen eine kleine, N-terminale regulatorische Domäne, welche aus β -Sandwiches besteht und eine größere, C-terminale katalytische Domäne, die überwiegend aus α -Helices aufgebaut ist [12,13].

Einleitung

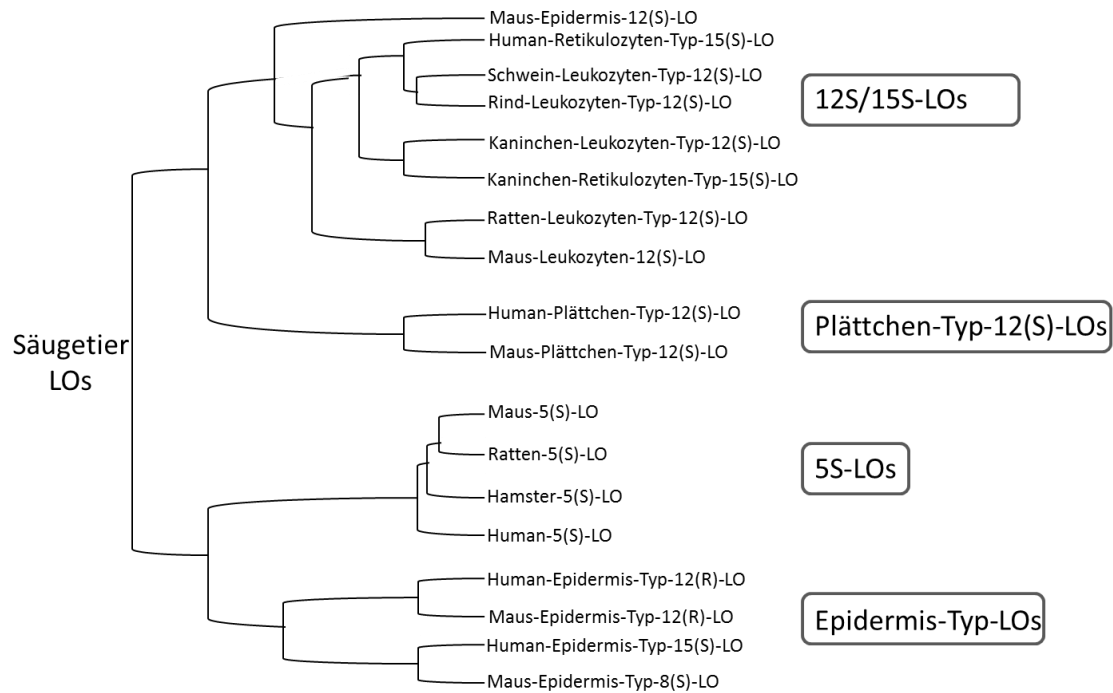


Abbildung 1: Polygenetischer Stammbaum der LOs nach [1].

1.2 5-Lipoxygenase

1.2.1 Das 5-LO-Gen

Das Gen der humanen 5-Lipoxygenase ist auf dem Chromosom 10q11.21 lokalisiert, weist eine Länge von 82 kb auf und besteht aus 14 Exons und 13 Introns [14]. Der Promotor hat keine typischen TATA- oder CCAAT-Sequenzen, besitzt jedoch viele GC-Boxen innerhalb einer GC-reichen Region. Diese Besonderheiten sind vergleichbar mit dem Promotor von sogenannten Haushaltsgenen [14]. Es wurde gezeigt, dass 5 von 8 GC-Boxen in Tandems angeordnet sind und Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3, Egr-1 und Egr-2 (*early growth response protein*) darstellen. Zusätzlich konnten auf dem 5-LO-Promotor weitere Konsensus-Bindestellen für NF κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), GATA, myb (*myeloblastosis*), Vertreter der AP-Familie (*activator protein*) sowie den nukleären Rezeptoren RZR α (*retinoid Z receptor*) und ROR α (*retinoic acid receptor related orphan-receptor*) gefunden werden [15–17]. Außerdem wurden Response-Elemente für TGF β (*transforming growth factor β*) und den Vitamin-

D-Rezeptor nachgewiesen [18,19]. Es wurden bisher natürliche Mutationen im Promotor beschrieben. Es konnten u. a. Deletionsmutanten gefunden werden, in denen ein oder zwei SP1-Bindestellen fehlen, aber auch Mutanten, in denen eine zusätzliche SP1-Bindestelle existiert. Es konnte gezeigt werden, dass Asthma-Patienten mit Mutationen innerhalb des Promotors nicht auf die Behandlung mit 5-LO-Inhibitoren ansprechen, wohingegen dies bei Patienten mit einem Wildtyp-Promotor der Fall ist [20–22].

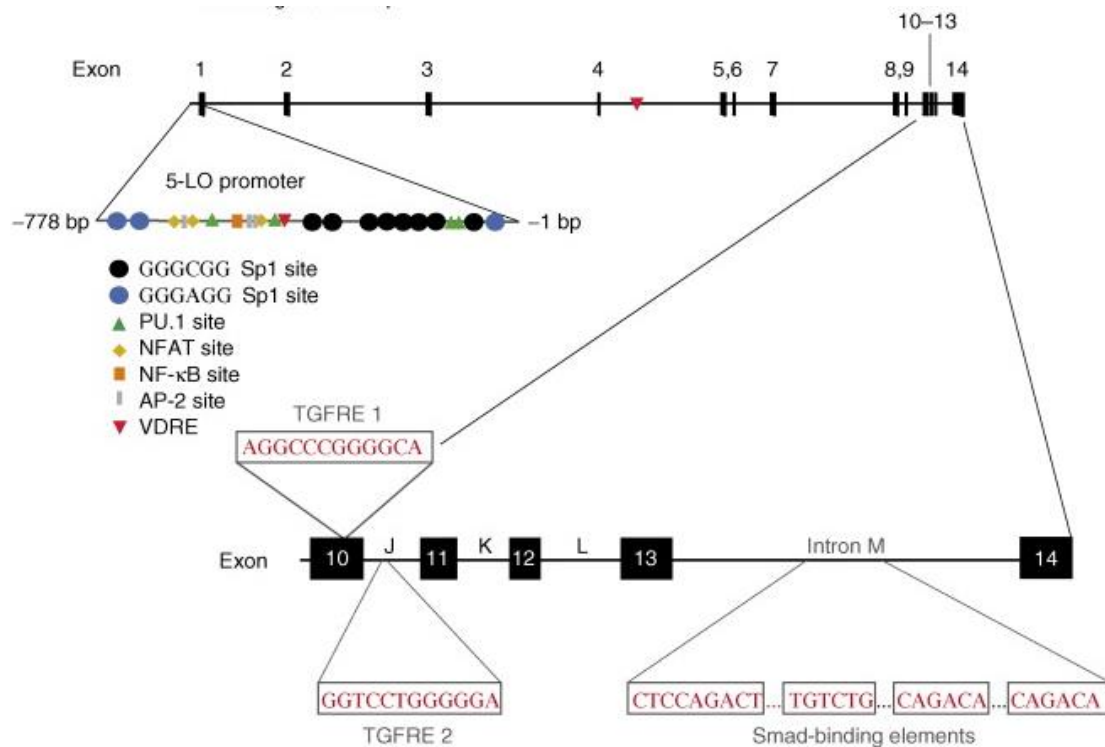


Abbildung 2: Aufbau des humanen 5-LO-Gens [23].

1.2.2 Gen-Regulation und –Expression

Die Regulation des 5-LO-Gens kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Uhl et al. fanden heraus, dass die Methylierung des Promotors eine Rolle in der Genexpression spielt. Durch Behandlung unterschiedlicher Zelllinien mit dem Demethylierungsreagenz AdC (5-aza-2'-deoxycytidin) wurde eine Hochregulation der Expression der 5-LO-mRNA beobachtet [24]. Des Weiteren konnte eine Erniedrigung der Genexpression durch Überexpression von c-myb in differenzierten HL-60-Zellen analysiert werden [25]. Ebenso war es möglich, die Behandlung von humanen neutrophilen Granulozyten

mit dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) zu einer erhöhten Genexpression zu führen [26]. Eine Repression der Promotor-Aktivität nach Zugabe von Melatonin konnte in humanen Zelllinien wie RPMI1788 und P16 gemessen werden, während in differenzierten HL-60- und Mono Mac 6-Zellen (MM6) kein Effekt zu sehen war, wobei diese Zelllinien kein RZR α exprimieren [27]. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der Status der Histon-Acetylierung eine Rolle bei der Regulation des 5-LO-Gens spielt. Durch Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A kam es zu einer Induktion der Promotor-Aktivität [28]. Ahmad et al. konnten zeigen, dass das Protein MLL (*mixed lineage leukemia*) den Promotor stark aktiviert, wenn gleichzeitig ein Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) anwesend ist. Im Gegensatz dazu hat das Fusionsprotein MLL-AF4 nur ohne HDACi eine aktivierende Wirkung [29]. Studien zeigten, dass die Behandlung von differenzierten MM6- und HL-60-Zellen mit TGF β und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Zunahme der mRNA sowie des 5-LO-Proteins und dessen Aktivität führt [18,30]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressor-Protein p53 an das Intron G des 5-LO-Gens bindet und dadurch die Genexpression verstärkt wird [31].

1.2.3 5-LO-Protein-Regulation

Frühere Untersuchungen ergaben, dass die 5-LO zelltypabhängig sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert sein kann. So konnte gezeigt werden, dass sie zum Beispiel in unstimulierten alveolären Makrophagen [32], Mastzellen aus Mausknochenmark (*mouse bone marrow-derived mast cells*, BMDC) [33] und in basophilen Leukämie-Zellen der Ratte (*rat basophilic leukemia cells*, RBL) [34] im Nukleus lokalisiert ist, während die 5-LO unter anderem in polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten (PMN) [34], humanen eosinophilen Granulozyten [35] und peritonealen Makrophagen (PM) [36] im Zytosol lokalisiert ist. Die Regulation des nukleären Imports und Exports ist bis heute nicht vollständig geklärt. Jedoch zeigte sich, dass die Lokalisation der 5-LO von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist. Jones et al. konnten beweisen, dass die 5-LO über nukleäre Import-Sequenzen (NIS) verfügt, welche sowohl auf der regulatorischen N-terminalen C2-ähnlichen Domäne als auch auf der katalytischen C-terminalen Domäne lokalisiert sind [37]. Die relevanten Aminosäuren für den nukleären Import sind R112, K158 und R518 [37,38]. Neben den NIS gibt es auch nukleäre

Export-Sequenzen (NES). Hanaka et al. war es möglich, eine Hemmung des Exports zu detektieren, indem sie die mit 5-LO transfizierten Zellen mit dem Exportin-1-Inhibitor Leptomycin B behandelten [39,40]. Der nukleäre Import und Export ist ebenso von der Phosphorylierung abhängig. Bisher sind drei verschiedene Phosphorylierungsstellen bekannt, welche teilweise auch durch MALDI-MS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry*) nachgewiesen werden konnten [41]. Das Serin S271 kann durch MK2/3 (*mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2/3*) phosphoryliert werden, nachdem diese durch p38 aktiviert wurde. Die Phosphorylierung an S663 geschieht durch die sogenannten ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*) und an S523 durch PKA (Proteinkinase A) [42–44]. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung an S523 einen hemmenden Effekt auf die Leukotrien (LT) - Biosynthese ausübt und die 5-LO im Zytosol verbleibt. Da S523 in der Nähe der NIS R518 liegt, wird der Kernimport behindert und die enzymatische Aktivität somit herabgesetzt. Im Gegensatz dazu induzieren die Phosphorylierungsstellen S271 und S663 nach Phosphorylierung die Translokation an die Kernmembran, wodurch es zu einer Steigerung der LT-Bildung führt [43,45–47]. Markoutsa et al. konnten in vitro weitere Phosphorylierungsstellen mit Hilfe der Massenspektrometrie finden, deren physiologische Relevanz bisher jedoch noch nicht geklärt sind [41]. Neben der Phosphorylierung gibt es weitere Faktoren, die zur Aktivierung und auch zur Translokation der 5-LO beitragen. Ein wichtiger Faktor spielt hierbei das Ca^{2+} . Borgeat et al. konnten schon früh zeigen, dass durch Stimulierung mittels eines Ca^{2+} -Ionophors die LT-Biosynthese aktiviert wird [48]. Anschließend folgten viele Studien, die zeigten, dass Ca^{2+} die Aktivität der 5-LO stimuliert und die Translokation an die Membran induziert [49,50]. Ebenso wurde gezeigt, dass ATP einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität ausübt, wobei eine Hydrolyse des ATP nicht notwendig ist. Möglicherweise wird die Struktur der 5-LO durch ATP stabilisiert, wodurch die Steigung der Aktivität erklärt werden könnte [23,51]. Des Weiteren spielt auch der Redox-Status in der Zelle eine wichtige Rolle. Um die 5-LO in ihre aktive Form zu verwandeln, muss das Fe^{2+} im aktiven Zentrum durch Lipidhydroperoxide in das aktive Fe^{3+} oxidiert werden. Kommt es durch unterschiedliche Bedingungen wie durch Zugabe von 5-HPETE oder Dnp-Cl (1-Chloro-2,4-dinitrobenzen) zu einer Erhöhung der Lipidhydroperoxide, so wird auch die 5-LO-Produktbildung gesteigert [52–55]. In Anwesenheit von Ca^{2+} hat auch das PC (Phosphatidylcholin) einen stimulierenden Effekt. Möglicherweise bindet die 5-LO an die synthetischen PC-Vesikel, welche die Membran als stimulierenden Faktor ersetzen.

Dadurch soll ein stabilisierender Effekt auf die 5-LO-Struktur ausgeübt werden [51,56,57].

Es konnte gezeigt werden, dass sich das intrazelluläre Ca^{2+} durch Zellstimulanzen wie z. B. Ca^{2+} -Ionophor A23187, rezeptorabhängige lösliche Agonisten wie PAF (plättchenaktivierender Faktor) und NAF (neutrophilaktivierender Faktor) oder durch unlösliche Stimulatoren wie Zymosan oder Urate erhöht [58,59]. Nach Stimulation transloziert die 5-LO an die Kernmembran, an der sie mit dem 5-LO-aktivierenden Protein (FLAP) und der cPLA₂ (zytosolischen Phospholipase A₂) kolokalisiert und interagiert [60,61]. Calciumabhängig setzt die cPLA₂ die AA aus den Phospholipiden der Membran frei [62,63]. Dixon et al. stellten eine Theorie auf, in der FLAP als eine Art Membrananker fungiert [64]. Später war es jedoch möglich die Funktion von FLAP zu bestimmen: FLAP bindet die AA und übergibt diese an die 5-LO (siehe Abb. 3) [65,66].

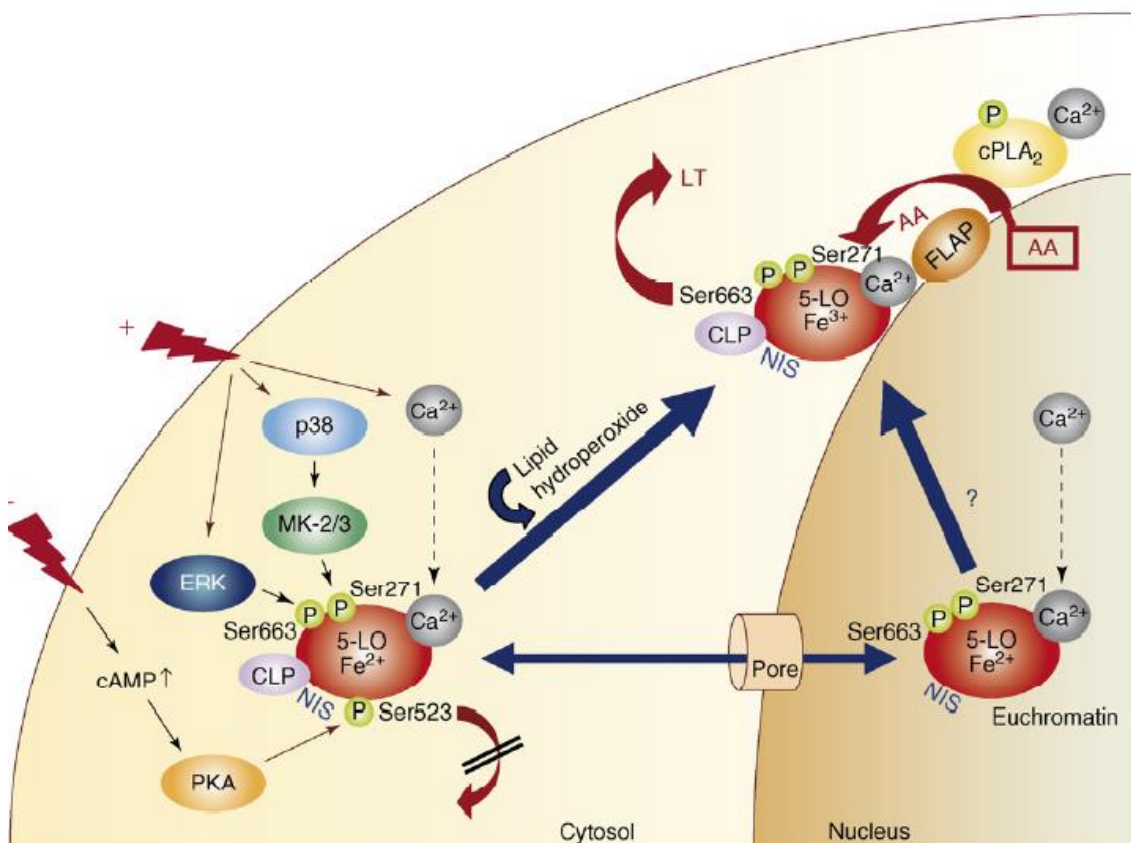


Abbildung 3: Zelluläre Regulation der 5-LO [23].

1.2.4 Enzymatische Katalyse der Leukotriene

In der LT-Biosynthese besitzt die 5-LO zwei enzymatische Funktionen. Zum einen besitzt sie eine Oxygenase-Aktivität und zum anderen LTA₄-Synthase-Aktivität [67,68]. Um eine katalytische Aktivität aufzuweisen, muss das Fe²⁺ im aktiven Zentrum durch Lipidhydroperoxide zu Fe³⁺ oxidiert werden [69]. Die Umsetzung der AA zu den LTs läuft in einer zweistufigen Reaktion ab. Im 1. Reaktionsschritt läuft eine Oxygenierung ab. Dabei wird an der 5. Position der AA Sauerstoff eingefügt, wodurch das Produkt 5-HpETE (5(*S*)-Hydroperoxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraensäure) entsteht. Dieses kann durch Reduktion zum korrespondierenden Alkohol 5-HETE (5(*S*)-Hydroxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraensäure) umgewandelt werden. Dieser Alkohol kann weiter reduziert werden zu 5-oxo-EETE (5-oxo-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraensäure) durch die 5-HEDH (5-Hydroxyeicosanoid-Dehydrogenase) [70]. Im 2. Reaktionsschritt wird durch die oben genannte LTA₄-Synthase-Aktivität ein instabiles Epoxid, das LTA₄ (Leukotrien A₄) gebildet [71,72]. Dieses Zwischenprodukt kann entweder durch die LTC₄-Synthase zu dem sogenannten Cysteinyl-haltigen Leukotrien (cysLT) LTC₄ umgewandelt werden, welches dann zu LTD₄ und LTE₄ degradiert werden kann [73] oder mit Hilfe der LTA₄-Hydrolase zu LTB₄ hydrolysiert werden (siehe Abb. 4) [74].

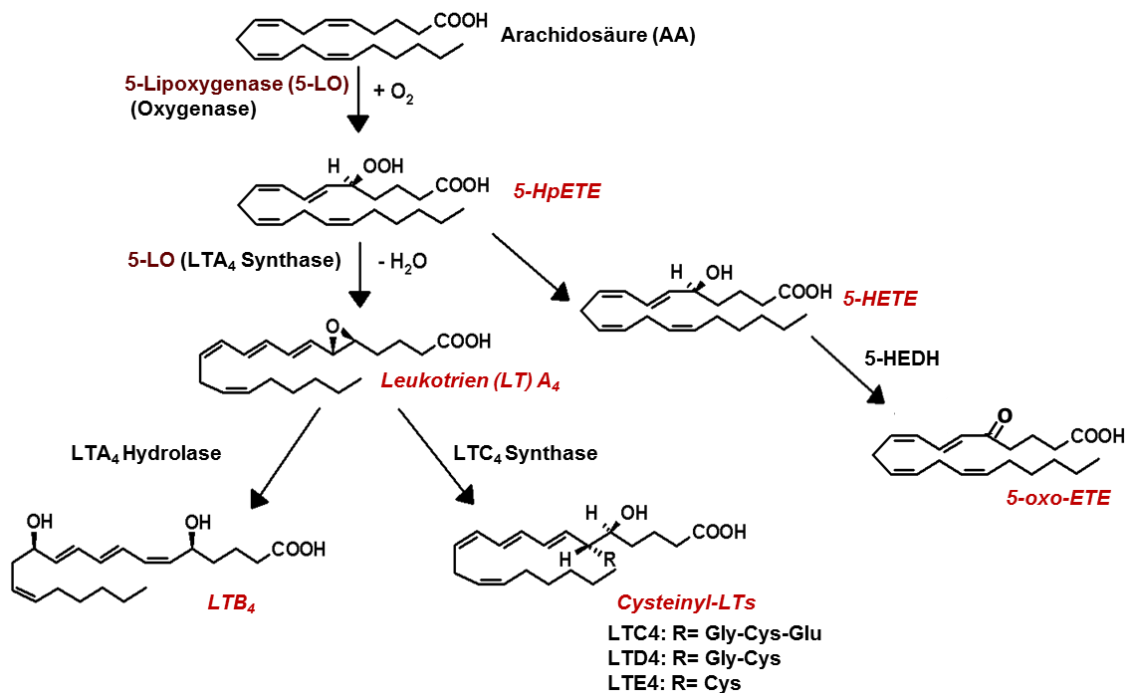


Abbildung 4: Umwandlung der AA zu LTs durch die 5-LO (nach [23]).

1.2.5 Struktur der 5-LO

Die erste strukturell aufgeklärte Säugetier-5-LO stammt aus Kaninchen-Retikulozyten und wurde 1997 von Gillmor et al. gelöst [75]. Da die Kristallisation und somit die Strukturaufklärung der humanen 5-LO lange Zeit nicht möglich war, galt diese Struktur für strukturbasierte Untersuchungen als Vorlage [49,76]. Später gelang es jedoch mit Hilfe von Mutationen in der sogenannten Stable-5-LOX, die Kristallstruktur der humanen 5-LO aufzuklären. Um die stabile 5-LO zu erhalten, wurden sowohl Aminosäuren ausgetauscht als auch entfernt. Die Lysine 653-655 (KKK) wurden gegen die Sequenz der 8R-LO (ENL) getauscht, die beiden Cysteine C240 und C561 wurden durch Alanine ersetzt. Zusätzlich wurden die Aminosäuren 40-44 durch Glycin und Serin (Δ 40-44GS) getauscht und die folgenden weiteren Mutationen eingefügt: W13E, F14H, W75G und L76S [77]. Um die Struktur ohne Mutationen zu erhalten, wurde von Bettina Hofmann unseres Arbeitskreises die Mutationen *in silico* rückgängig gemacht und die Struktur neu berechnet. Anhand dieser Berechnung sind alle weiteren Abbildungen der 5-LO dargestellt.

Die 5-LO besteht aus zwei Domänen. Einer N-terminalen regulatorischen Domäne, welche von Aminosäuren 1-114 reicht, und einer C-terminalen katalytischen Domäne, die die Aminosäuren 121-673 umfasst. Diese beiden Domänen sind um 45° gegeneinander verschoben und sind über einen Loop von sieben Aminosäuren miteinander verbunden [23]. Ryge et al. diskutieren jedoch, dass die beiden Domänen durch eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren R101 und D166 miteinander verbunden sein könnten [78].

Da die N-terminale Domäne viele Ähnlichkeiten mit anderen C2-Domänen besitzt, wird diese auch C2-ähnliche Domäne (C2ld) bezeichnet [79]. Die C2ld besteht aus acht β -Faltblättern [49] und ist (wie viele andere C2-Domänen) unter anderem verantwortlich für die Bindung an Phospholipidmembranen [79,80], an Diacylglyceride [81], für die Calciumbindung [49] und auch für die Bindung an CLP [82]. Durch Mutationen und Immunfluoreszenzdaten konnte gezeigt werden, dass die C2ld essentiell für die Translokation und die Bindung an die Membran ist [83]. Durch ATR-Infrarotspektroskopie (abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie) wurde dargestellt, dass der N-Terminus in einer definierten Orientierung mit einem 45° Winkel an die Membran bindet [56]. Für die Bindung an die Membran konnten drei wichtige Aminosäuren identifiziert werden: W13, W75 und W102 (Abb. 5). Dabei wurde

bewiesen, dass W75 am weitesten in die Membran eindringt [49,80,84]. Diese drei Tryptophane zeigten sich ebenso als Bindestelle für Dicer [85]. Als potentielle Ca^{2+} -Liganden konnten die drei Aminosäuren N43, D44 und E46 ausfindig gemacht werden [49,50]. Für die Bindung an das Protein CLP ist ebenfalls die Aminosäure W102 essentiell [86]. Die 5-LO besitzt zwei Bindestellen für ATP, wobei sich eine davon auf der C2ld (73-83) befindet.

Die C-terminale Domäne ist für die katalytische Aktivität verantwortlich. Sie besteht überwiegend aus α -Helices und trägt das Nicht-Häm-Eisen im aktiven Zentrum [77]. Für die Koordination des Eisen konnten drei Histidine (H367, H372, H550), ein Isoleucin (I673) und ein Asparagin (N554) identifiziert werden (Abb. 5) [87–89]. Die zweite ATP-Bindestelle befindet sich in der katalytischen Domäne und umfasst die Aminosäuren 193-209. Trotz zweier Bindestellen für ATP, liegt das Verhältnis von gebundenem ATP zu 5-LO bei 1:1. Die für die Regulation und Lokalisation wichtigen Phosphorylierungsstellen befinden sich ebenfalls auf dem C-Terminus. Dabei handelt es sich um die Serine S271, S523 und S663 [39,42,43].

Lange Zeit wurde die 5-LO als Monomer beschrieben [90,91]. Jedoch gelang es Ann-Kathrin Häfner et al. mittels Gelfiltration und LILBID-Massenspektrometrie zu beweisen, dass die 5-LO ebenfalls als Dimer vorliegen kann, wobei ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer vorliegt. Durch andere strukturelle Charakteristiken lag die Theorie nahe, dass es sich um eine head-to-tail-Anordnung handelt, bei der zwischen beiden Monomeren die vier Cysteine C159, C416, C418 und C300 im Dimerisierungsinterface liegen. Dabei ist es möglich, dass zwischen den drei Cysteinen C159, C416, C418 Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Zusätzlich könnte das C598 Einfluss auf die Dimerisierung ausüben (Abb. 6) [92].

Einleitung

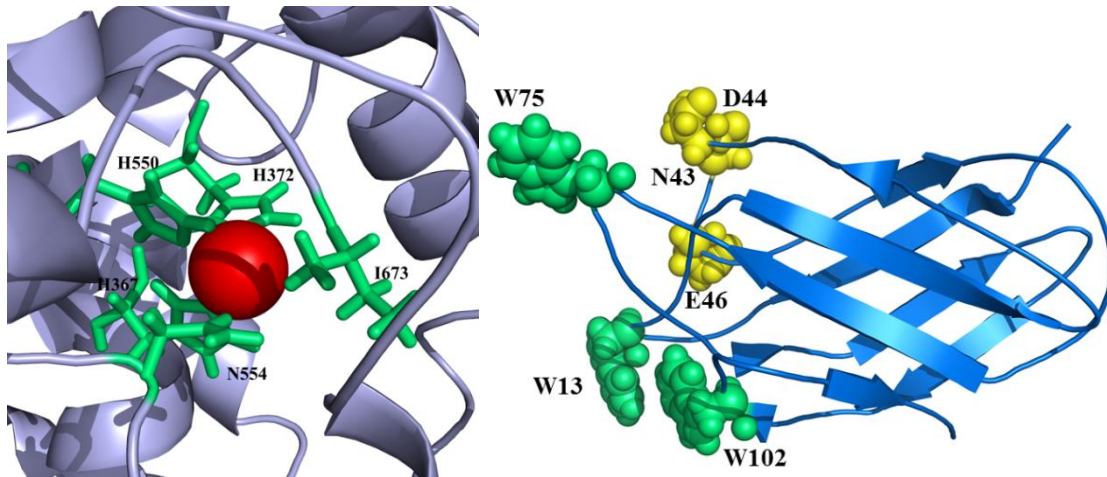


Abbildung 5: Darstellung der C2ld (links) und Koordination des Eisenatoms im aktiven Zentrum (links).

Links: In Gelb sind die Aminosäuren dargestellt, die für die Ca^{2+} -Bindung verantwortlich sind. In grün sind die Membranbindungsstellen gezeigt. Rechts: Koordination des Eisenatoms (rot) im aktiven Zentrum und die daran beteiligten Liganden (grün).

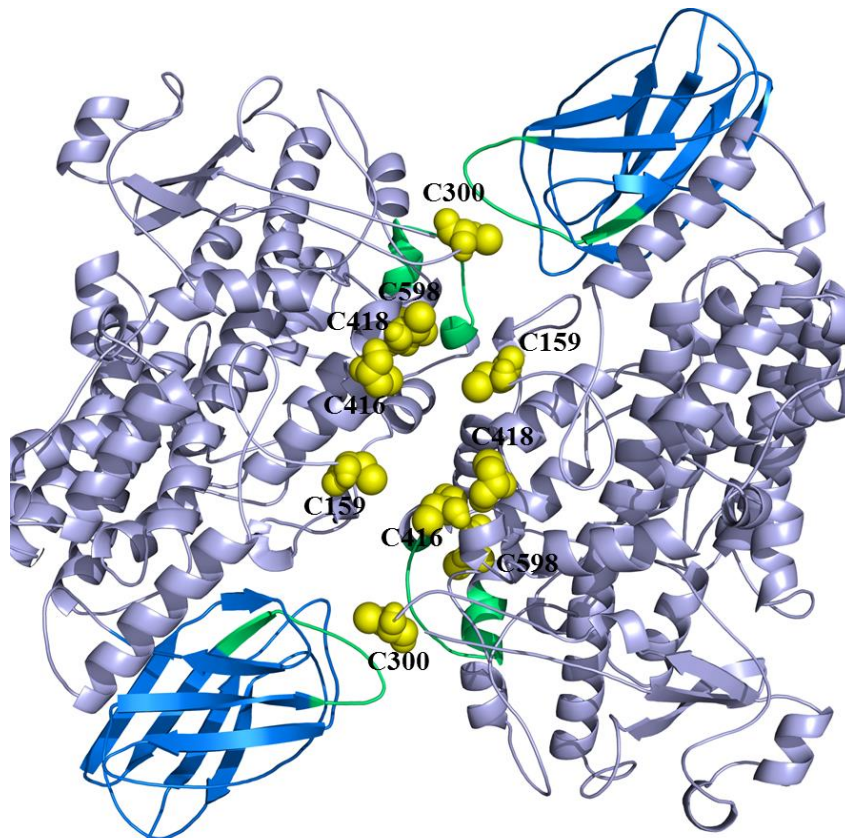


Abbildung 6: Homologiemodell des 5-LO-Dimers in head-to-tail-Anordnung.

ATP-Bindungsregionen sind in grün, die C2ld in blau und die katalytische Domäne in grau dargestellt. Die Cysteine, die im Dimerisierungsinterface liegen, sind in gelb dargestellt (PDB: 3O8Y).

1.2.6 Involvierte Proteine im AA-Metabolismus und Interaktionspartner der 5-LO

1.2.6.1 5-LO-aktivierendes Protein (FLAP)

Im Jahr 1990 konnten Miller et al. ein neues Protein, das an der LT-Bildung beteiligt ist, isolieren und identifizieren. Sie zeigten, dass es sich um ein 18 kDa großes Protein handelt, welches für die volle Aktivität der 5-LO sorgt und somit als 5-LO-aktivierendes Protein bezeichnet wurde [93]. In Osteosarkomzellen war es möglich zu zeigen, dass die 5-LO-Metabolite nur dann gebildet werden, wenn sowohl die 5-LO als auch FLAP anwesend sind [64]. Das FLAP-Gen ALOX5AP ist 31 kb groß, besteht aus fünf kleinen Exons und vier großen Introns. Es ist auf dem Chromosom 13q12 lokalisiert. Es wurde sowohl eine TATA-Box als auch Bindeelemente für AP2 und Glucocorticoid-Rezeptoren identifiziert [94]. FLAP gehört zur MAPEG-Familie (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*) und bildet mit den Proteinen Leukotrien C₄ (LTC₄)-Synthase und MGST2 (*microsomal glutathione S-transferase 2*), welche alle in die LT-Biosynthese involviert sind, die erste von vier Untergruppen der MAPEG-Familie [95]. Mit Hilfe von Immunelektronenmikroskopie konnte festgestellt werden, dass nahezu die gesamte Menge an FLAP an der Kernmembran lokalisiert ist, wohingegen in Monozyten ein geringer Anteil auch am endoplasmatischen Retikulum gefunden werden konnte [32,96]. Nach Stimulation interagieren FLAP und 5-LO an der Kernmembran, wobei FLAP die AA bindet und an die 5-LO übergibt [65,66,97]. Es wäre möglich, dass eine Komplexbildung zwischen FLAP und 5-LO zustande kommt und somit die Übergabe der AA erleichtert wird [98]. Die Expression von FLAP zusammen mit der 5-LO konnte sowohl in myeloiden Zellen als auch in Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Jedoch auch 5-LO-negative Zellen wie lymphatische T-Zellen und undifferenzierte Mono Mac 6-Zellen exprimieren FLAP [15,99–101]. FLAP enthält vier transmembrane Helices, diese sind durch zwei verlängerte zytosolische Loops und einem kurzen Loop, welcher Richtung Nukleus zeigt, miteinander verbunden (Abb. 7). Anhand Kristallisationsstudien konnte ebenso gezeigt werden, dass FLAP als Trimer an der Membran gebunden ist [102]. Der bekannteste Inhibitor (MK-886) der Leukotrien-Biosynthese wurde im Jahr 1989 entwickelt [103]. Dieser bindet an FLAP, wodurch die Weiterleitung der AA blockiert

ist und somit keine LTs mehr metabolisiert werden können [104,105]. Die Struktur von FLAP sowie dessen Orientierung in der Membran ist in Abbildung 7 dargestellt.

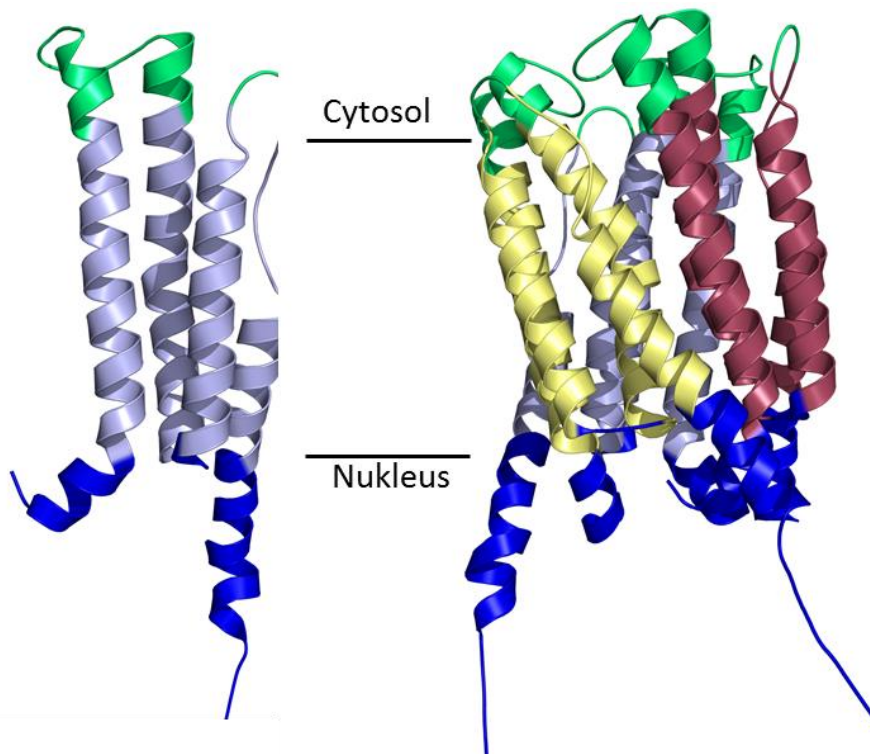


Abbildung 7: Kristallstruktur von FLAP als Monomer (links) und als Trimer (rechts).

In dunkelblau sind die Abschnitte dargestellt, die in Richtung Nukleus angeordnet sind. In grün sind die Abschnitte dargestellt, die in Richtung Zytosol angeordnet sind.

1.2.6.2 Leukotrien A₄-Hydrolase (LTA₄H)

LTA₄H ist das Schlüsselenzym für die Umwandlung des instabilen Epoxids LTA₄ in das proinflammatorische LTB₄ [48,106–108]. Es handelt sich um ein lösliches Enzym [109], das nahezu in allen Geweben des Meerschweinchens, der Ratte und des Menschen, aber auch in Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten unterschiedlicher Spezies, sowie Zelllinien unterschiedlicher Herkunft vorkommt [110–113]. Das Protein besteht aus 610 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 69 kDa [114]. Die genetische Information der LTA₄H liegt auf dem Chromosom 12q23.1. Das Gen besteht aus 19 Exons und hat eine Größe von > 35 kb. Der Promotor besitzt keine TATA-Box, jedoch konnten Erkennungselemente für AP2 und Xenobiotika (XRE) identifiziert werden [115]. Durch Vergleich der Sequenz mit anderen Zink-Proteasen

und -Peptidasen war es möglich, in der katalytischen Domäne ein Zinkbindungsmotiv zu postulieren. Durch Atomabsorptionsspektrometrie konnte dieser Verdacht bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass ein Verhältnis von 1 mol Zink zu 1 mol Enzym vorliegt [116,117]. Durch Mutationsstudien wurden die drei Aminosäuren H295, H299 und Q318 als Zinkbindungsliganden identifiziert [118]. Die Erkenntnis, dass es sich um ein Protein der Zink-Metalloproteasen handelt, deutete darauf hin, dass es neben der Hydrolase-Aktivität noch eine Aminopeptidase-Aktivität besitzen könnte. Haeggström et al. konnten durch Zugabe von Alanin-4-Nitroanilid eine Aminopeptidase-Aktivität aufzeigen [119]. Diese lässt sich durch monovalente Anionen wie z. B. Cl^- stimulieren, während die Hydrolyse-Aktivität unbeeinflusst bleibt [120]. Andererseits können beide Enzymaktivitäten durch divalente Kationen wie Zn^{2+} gehemmt werden, wenn das molare Verhältnis von 1:1 überschritten wird [121]. Eine sehr charakteristische Eigenschaft der LTA_4H ist die kovalente Bindung ihres eigenen Substrates LTA_4 , wodurch es zur Inaktivierung beider Enzymaktivitäten kommt [122,123]. Die Struktur der LTA_4H ist in drei Domänen unterteilt: die N-terminale, die katalytische und die C-terminale Domäne. Die drei Domänen sind eng gepackt und bilden eine tiefe Tasche, in der das katalytische Zn^{2+} lokalisiert ist. Dort liegt auch die vermeintliche Bindetasche, in der das Substrat LTA_4 binden soll (siehe Abb. 8) [124].

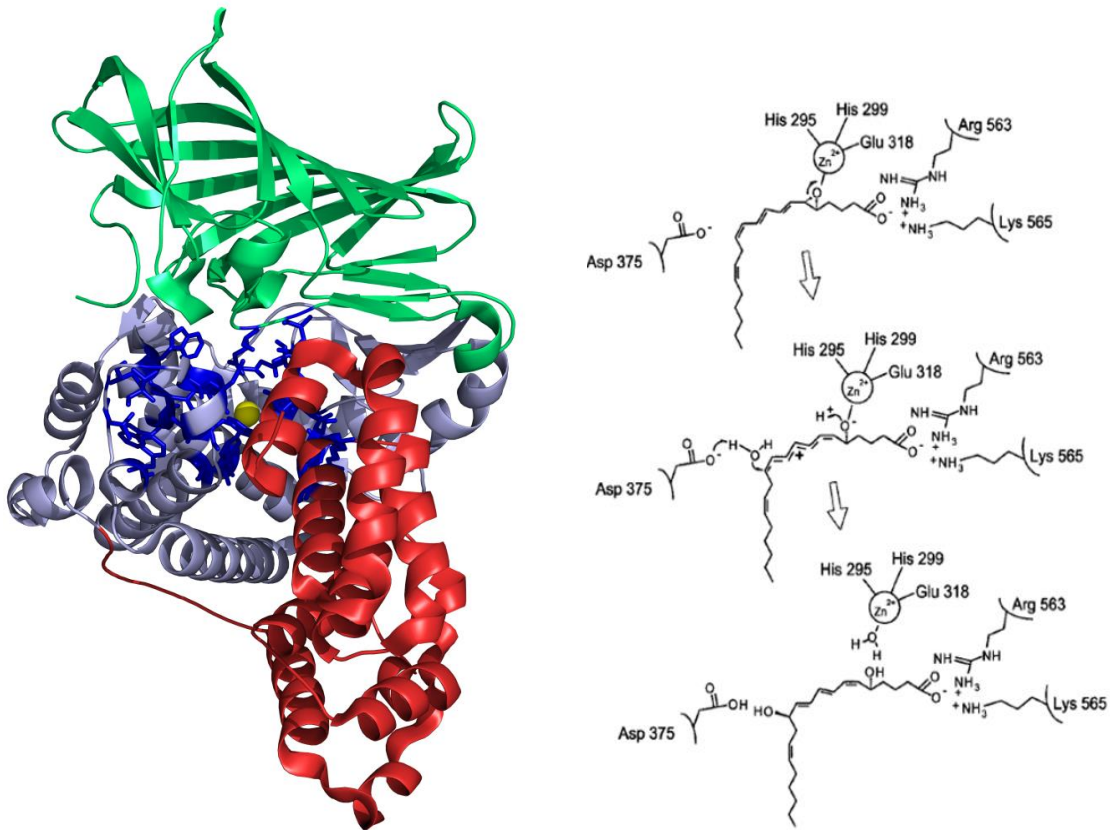


Abbildung 8: Kristallstruktur der humanen LTA₄H (PDB 4RVB) (links) und Mechanismus der Umwandlung von LTA₄ in LTB₄ (rechts).

Links: Es sind die drei Domänen in unterschiedlichen Farben dargestellt: die N-terminale Domäne in grün, die katalytische Domäne in grau und die C-terminale Domäne in rot. Der gelbe Punkt zeigt das Zn²⁺ und die dunkelblauen Aminosäuren stellen die vermeintliche Bindetasche für das Substrat LTA₄ dar. Rechts: Mechanismus der Umwandlung von LTA₄ in LTB₄ [124].

1.2.6.3 Zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂)

Allgemein sind die zugehörigen Enzyme der Phospholipase A₂ (PLA₂)-Familie in der Lage, zentrale Ester-Bindungen (sn-2) ihres Substrats (Phospholipide) zu hydrolysieren und somit zu spalten [125–127]. Dabei entstehen Produkte, welche wichtige sekundäre Botenstoffe oder auch Vorläufer für die Eicosanoid-Synthese darstellen [128,129]. Inzwischen gibt es 11 Gruppen der PLA₂-Familie, welche wiederum in 23 Untergruppen unterteilt sind. Die Gruppierung erfolgt nach vier Kriterien: Sequenz, Homologie, Splice-Varianten und Aktivität [127]. Alonso et al. konnten den ersten Vertreter der cPLA₂ in stimulierten humanen Neutrophilen nachweisen. Dieser weist eine relative Spezifität für Arachidonyl-enthaltendes Phosphatidylcholin auf [130].

Außerdem war es möglich, eine sn-2-Spezifität gegenüber der AA aufzuzeigen [131]. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 85 kDa und ist 749 Aminosäuren lang [132]. Die genetische Information ist auf dem Chromosom 1q31.1 lokalisiert [133,134]. cPLA₂ wird in zahlreichen Zellen und Geweben, wie Niere, Lunge, Leber, und Hippocampus exprimiert [135]. Viele der Zelltypen sind in das Entzündungsgeschehen involviert wie die Monozyten, Neutrophilen und synovialen Fibroblasten [136–138]. cPLA₂ verfügt neben der Phospholipase A₂-Aktivität sowohl über eine starke Lysophospholipase-Aktivität als auch eine schwache Transacylase-Aktivität. Das Enzym kann durch viele Reagenzien stimuliert werden. Dabei konnte eine Hochregulation der Enzymaktivität durch Behandlung mit Cytokinen (z. B. Interleukin-1 α) beobachtet werden [139]. Weitere Stimulantien sind solche, die die Ca²⁺-Konzentration innerhalb der Zelle erhöhen, wie der Ca-Ionophor A23187. Durch Stimulation transloziert die cPLA₂ sowohl an die Kernmembran als auch an das ER, wodurch die AA-Freisetzung induziert wird [140,141]. Die Struktur besteht aus zwei Domänen. Zum einen aus der regulatorischen Ca²⁺-abhängigen Lipid-bindenden Domäne und zum anderen aus der Ca²⁺-unabhängigen katalytischen Domäne [142], weshalb die Aktivierung des Enzyms durch Erhöhung des Ca²⁺-Levels nicht überaus überraschend ist. Neben der Regulation über Ca²⁺ sind auch Phosphorylierungen durch u. a. MAP-Kinasen an unterschiedlichen Serinen an der Regulation beteiligt. Als Phosphorylierungsstellen konnten die Serine S437, S454, S505 und S727 durch Massenspektrometrie identifiziert werden [143]. Jedoch stellten sich bisher nur zwei davon (S505 und S727) als relevant für die Enzymaktivität heraus [144,145].

1.2.6.4 Coactosin-like Protein (CLP)

Das Coactosin-like Protein (CLP) wurde durch Zufall bei Untersuchungen des Smith-Magenis-Syndroms entdeckt. Das Protein erhielt seinen Namen durch seine weitgehende identische Aminosäure-Sequenz mit dem Protein Coactosin, ein Protein, welches zur Familie der Aktin-bindenden Proteine gehört. Die genetische Information ist auf dem Chromosom 16q24.1 lokalisiert [146]. Durch ein sogenanntes Yeast Two-Hybrid Screening wurde herausgefunden, dass CLP mit der 5-LO interagiert [147]. Dieses konnte anhand einer Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Das stöchiometrische Verhältnis der beiden Proteine liegt bei 1:1 [148]. Das Protein besitzt

ein Molekulargewicht von 16 kDa und besteht aus 142 Aminosäuren [147]. Neben der 5-LO kann CLP ebenso das filamentäre Aktin (F-Aktin) binden. Hierbei liegt jedoch ein Verhältnis von 1:2 (CLP:F-Aktin) vor [149]. Die Bindung von CLP und 5-LO scheint einen stabilisierenden Effekt auf die 5-LO auszuüben [86]. Knock-out-Experimente und Aktivitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass die Anwesenheit von CLP alleine oder zusammen mit PC sowohl das Verhältnis von 5-HETE/5-HPETE erhöht als auch die LT-Bildung steigert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit von CLP keine zielgerichtete Translokation der 5-LO an die Kernmembran mehr möglich ist [82,150]. Das Protein kann als Monomer, aber auch als Dimer vorliegen [149]. Das Monomer besteht aus 6 β -Sheets, bei denen die vier Zentralen antiparallel angeordnet sind, während die zwei Äußeren parallel verlaufen. Diese sind umgeben von zwei α -Helices auf jeder Seite (siehe Abb. 9) [151]. Die beiden Aminosäuren K75 und K131 scheinen wichtig für die 5-LO-Bindung zu sein [148,149].

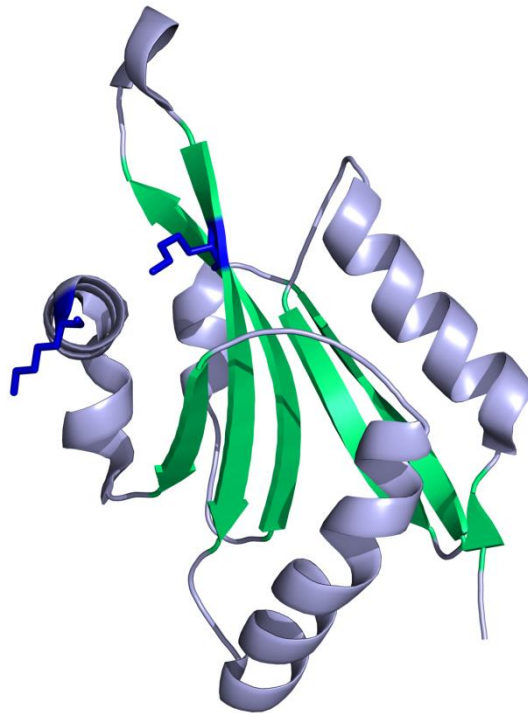


Abbildung 9: Struktur von CLP.

β -Sheets sind in grün und die α -Helices in grau dargestellt. Die blauen dargestellten Aminosäuren sind K75 und K131, welche für die 5-LO- bzw. Aktin-Bindung wichtig sind. Anmerkung: Der C-Terminus (letzten 11 Aminosäuren) fehlt aufgrund der Flexibilität. (PDB: 1T3X)

1.2.6.5 Leukotrien C₄-Synthase (LTC₄S)

Genau wie FLAP konnte auch die LTC₄S der MAPEG-Familie zugeordnet werden [95]. LTC₄S besitzt die gleiche Intron/Exon-Organisation wie FLAP und besitzt ebenso fünf kurze Exons und vier lange Introns. Die genetische Information liegt auf Chromosom 5q35.3 [152]. Das Protein wurde bereits in unterschiedlichen humanen Zelllinien aufgereinigt und besitzt ein Molekulargewicht von 18 kDa und ist 150 Aminosäuren lang, während 31 % der Aminosäuresequenz identisch zu der von FLAP ist [152–155]. LTC₄S wird in einigen Zellpopulationen wie z. B. in eosinophilen und basophilen Granulozyten, Plättchen und Mastzellen exprimiert [156–158]. Bei Aufreinigungsuntersuchungen stellte man fest, dass es sich in der mikrosomalen Fraktion befindet [159]. Genauere Untersuchungen zeigten, dass es sich um ein integrales Membran-gebundenes Protein des Nukleus handelt [154,160]. Lange Zeit dachte man, dass es sich um ein Homodimer handelt [155]. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Homotrimer vorliegt [161]. Dabei besteht jedes Monomer aus fünf α -Helices, wobei vier davon transmembranär vorliegen [162]. Die Aufgabe von LTC₄S ist die Konjugation von LTA₄ mit reduziertem GSH, um so das LTC₄ zu bilden [163,164]. Dafür bindet das GSH in einer Art Höhle in einem Interface zwischen zwei benachbarten Monomeren. Dabei sind die Aminosäuren R51, N55, E58, Y59, Y93, Y97, W116 und R104 des einen Monomers und die Aminosäuren R30 und Q53 des benachbarten Monomers von wichtiger Bedeutung. Es wird vermutet, dass die Seitenkette des R104 ein Proton des GSH abtrennt, wodurch ein Thiolat-Anion entsteht und das GSH katalytisch aktiv wird. Dieses Thiolat-Anion greift das C6 des Substrats LTA₄ an und bildet eine Thioether-Bindung. Das R31 des benachbarten Monomers übergibt ein Proton, um eine Hydroxylgruppe an C5 bilden. Daraus resultiert das Cysteinyl-Leukotrien LTC₄. Die Aminosäure W116 bildet einen Deckel über das ω -Ende des LTA₄ und spielt eine essentielle Rolle in der Positionierung der aliphatischen Kette (siehe Abb. 10) [162,165].

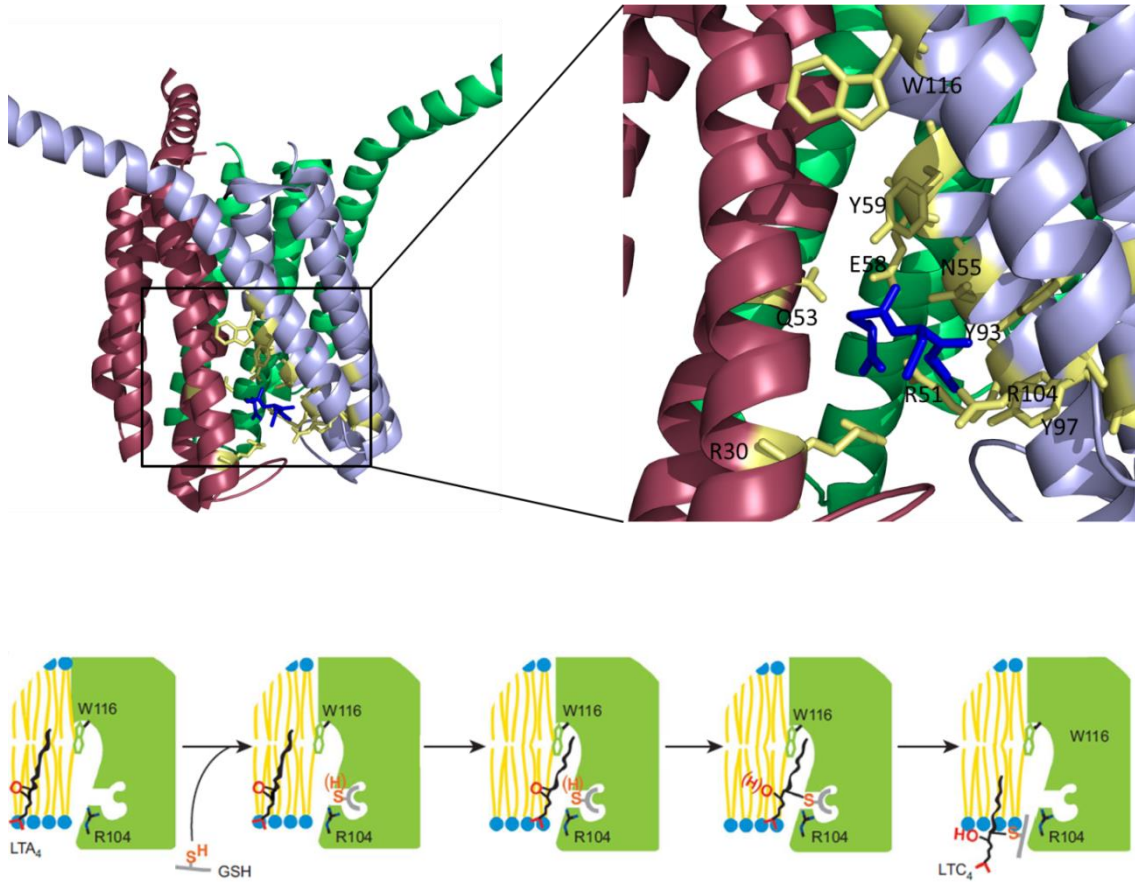


Abbildung 10: Strukturdarstellung der LTC4S (oben) und Umwandlung von LTA4 zu LTC4 (unten).

Oben: In gelb sind die wichtigsten Aminosäuren dargestellt, blau stellt das gebundene GSH dar. Unten: Schematische Darstellung der Umwandlung von LTA₄ zu LTC₄ mit Hilfe des GSH [162].

1.2.6.6 Weitere Interaktionspartner der 5-LO

Ein weiterer Interaktionspartner stellt Dicer dar. Dicer ist ein Multi-Domänen-Protein und gehört zur Familie der Ribonukleasen III [166]. Es ist 1912 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 218 kDa und besitzt einige Domänen: eine N-terminale ATPase/Helicase-Domäne, eine Domäne, deren Funktion unklar ist, eine zentrale PIWI/Ago/Zwille (PAZ)-Domäne, eine C-terminale RNase III-Domäne und eine C-terminale dsRNA (*double stranded RNA*)-Bindedomäne [166–169]. Im Jahr 2009 konnten Dinibas-Renqvist et al. eine Interaktion der 5-LO mit Dicer beschreiben. Dabei spielen 140 Aminosäuren der C-terminalen dsRNA-Bindedomäne eine entscheidende Rolle. Durch Mutationsstudien konnte ebenso gezeigt werden, dass der N-Terminus der

5-LO an der Interaktion beteiligt ist. Durch Co-Inkubation der 5-LO mit einem Dicer-Fragment, wurde eine Erhöhung der 5-LO-Produktbildung beobachtet [85].

Ein weiteres Protein, mit dem eine Interaktion nachgewiesen werden konnte, ist das TRAP-1 (TGF β -Rezeptor-assoziierte Protein I) [147]. Es wurde gezeigt, dass der C-Terminus von TRAP-1 mit der 5-LO interagiert [147]. TRAP-1 besteht aus 860 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 97 kDa. Es ist im Zytosol lokalisiert und bindet an TGF β -Rezeptoren [170]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass TRAP-1 nur mit der aktivierten Form des Typ I TGF β -Rezeptors interagiert [147]. Ebenso interagiert TRAP-1 mit Smad4, wobei ihm eine Funktion als Chaperon zugeschrieben wird [171]. Da die 5-LO-Expression durch TGF β und Calcitriol erhöht wird, wäre es denkbar, dass TRAP-1 für die Assoziation der 5-LO mit dem TGF β -Rezeptor verantwortlich ist [147]. Es wurden weitere zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der Human Interactome-Datenbank identifiziert, darunter auch mehrere für die 5-LO [172].

1.2.7 Pathologische und physiologische Rolle der 5-LO-Stoffwechselprodukte

1.2.7.1 5-HETE/5-HPETE/5-oxo-ETE

Das Stoffwechselprodukt 5-HETE der Arachidonsäurekaskade sowie dessen Keto-Derivat 5-oxo-ETE können unterschiedliche Rollen sowohl in der Pathologie als auch in der Physiologie zugeschrieben werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter anderem humane Monozyten, Lymphozyten, PMNL und neutrophile Granulozyten spezifische Dehydrogenasen enthalten, welche 5-HETE zu 5-oxo-ETE konvertieren [173,174]. 5-HETE führt zu einer Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels innerhalb der Zelle, wodurch eine Chemotaxis induziert werden kann [175,176]. Dafür wurde 5-oxo-ETE als ein potenter Induktor identifiziert, welcher für die Migration von eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten verantwortlich ist und somit in Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt [177–179]. O’Flaherty et al. konnten zeigen, dass 5-oxo-ETE in Anwesenheit von hämatopoetischen Zytokinen wie GM-CSF zur Stimulation von MAPKs und cPLA₂ führt. Ebenso war es ihnen möglich zu beweisen, dass in PMN 5-oxo-ETE durch Vorbehandlung mit GM-CSF in der Lage ist,

die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Degranulation der Zelle zu aktivieren. Außerdem stimuliert 5-oxo-ETE in PMN die Translokation sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran [180]. Die Involvierung in verschiedenen Krebserkrankungen wird ebenfalls diskutiert. So wurde unter anderem gezeigt, dass Prostatakarzinomzellen dauerhaft eine hohe Konzentration an 5-HETE produzieren. Inhibiert man diese Produktion, so führt das zur Apoptose dieser Zellen. Dies zeigt auch, dass das Vorhandensein von 5-HETE die Apoptose von Krebszellen verzögert [181,182]. Auch die Untersuchung von Pankreaskarzinomzellen deutet darauf hin, dass 5-HETE die Einführung der Mitose stimuliert und es somit zur schnelleren Teilung der Krebszellen kommt [183]. Dies könnte auch den Effekt erklären, dass durch Zugabe von 5-HETE zu Brustkarzinomzellen eine deutliche Beschleunigung des Wachstums zu erkennen ist [184]. Das Stoffwechselprodukt 5-HPETE ist in der Lage, die neuronale Na^+ , K^+ -ATPase-Aktivität zu inhibieren und wirkt somit auch bei der Kontraktion des Herzmuskels und der glatten Muskulatur mit [185]. Die Funktionen von 5-H(P)ETE und 5-oxo-ETE werden durch Rezeptoren vermittelt. Diese sind G-Protein-gekoppelt und werden in Eosinophilen, Neutrophilen und Monozyten exprimiert [186,187]. Da 5-oxo-ETE der stärkste Agonist ist, werden die Rezeptoren auch OXE genannt [188].

1.2.7.2 Cysteinyl-Leukotriene

In der Vergangenheit zeigte sich, dass die sogenannten cysLTs eine sehr wichtige Rolle in Atemwegserkrankungen spielen. Allgemein sind cysLTs sehr potente Faktoren für die Kontraktion glatter Muskulatur, insbesondere der Atemwege [189]. Aufgrund dieser potenten Eigenschaft untersuchten bereits viele Forschungsgruppen die Funktion der cysLTs bei Asthma. So konnte nachgewiesen werden, dass LTD_4 und LTC_4 eine ca. 100-1000fach stärkere bronchokonstriktorische Wirkung aufweisen als Histamin [190,191]. Bei allergiebedingter Bronchokonstriktion stellen sowohl LTC_4 , LTD_4 als auch LTE_4 wichtige Mediatoren dar [192]. CysLTs erhöhen auch die Schleimsekretion und die Sekretion von Glykoproteinen in den Atemwegen, wodurch es dort zu einer Blockade kommen kann [193–196]. In Asthma-Patienten wurde herausgefunden, dass vor allem LTD_4 eine Migration von Eosinophilen in den Lungen und Atemwegen hervorruft und es dadurch zu einer Entzündungsreaktion führen kann. Die Zugabe eines IL-5-Inhibitors führte zu einer Reduktion der Eosinophil-Migration, jedoch nicht zu

einer Hemmung der Bronchokonstriktion. Somit scheint IL-5 eine Rolle bei der LTD₄-induzierten Entzündung der Atemwege zu spielen [197]. In atopischen Asthma-Patienten konnte LTD₄ eine Stimulation des Wachstums und Differenzierung von eosinophilen und basophilen Vorläuferzellen hervorrufen [198]. Durch Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit wurde jedoch herausgefunden, dass sowohl LTC₄ als auch LTD₄ bei geringer Konzentration sogar zu einer leichten Endothel-abhängigen Relaxation der *vena saphena magna* führt [199]. Auch eine koronare Vasokonstriktion und eine myokardiale Dysfunktion wurde durch Injektion von LTD₄ in Schafen beobachtet [200]. Zudem wird ihnen nachgesagt, in aktivierten B-Lymphozyten die Produktion der Immunglobuline IgE und IgG zu erhöhen und sind somit auch im adaptiven Immunsystem involviert [201]. Es wurden bisher zwei Rezeptoren entdeckt, der cysLT₁- und der cysLT₂-Rezeptor. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Für beide Rezeptoren scheint das LTD₄ der potenteste Agonist der cysLTs zu sein [202,203]. Die Expression des cysLT₁-Rezeptors ist weit verbreitet und konnte in Lungengewebe, Gewebe der Milz, in Leukozyten des peripheren Blutes, aber auch in Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten und in Zellen der glatten Muskulatur nachgewiesen werden [204–206]. Durch Bindung eines cysLT an den cysLT₁-Rezeptor kommt es zu einer komplexen Signalweiterleitung. Vereinfacht gesagt, kommt es zu einer Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC), was wiederum eine Muskelkontraktion zur Folge hat [202]. Außerdem verursacht die Bindung an cysLT₁ eine Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur, Ödeme, Migration von Eosinophilen und eine Schädigung der Schleimhaut in der Lunge [206]. Untersuchungen ergaben, dass durch die Bindung an diesen Rezeptor die Interleukine IL-4, IL-13 und IL-8 hochreguliert werden. Eine Mutationsstudie zeigte, dass die Hochregulation von IL-8 durch LTD₄ nur dann möglich ist, wenn die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 anwesend sind [207,208]. Heutzutage werden cysLT-Antagonisten als neue Asthma-Medikamente erforscht, wobei schon drei davon auf dem Markt sind (Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast) [209].

1.2.7.3 Leukotrien B₄

Dem LTB₄ wird eine Vielzahl von Funktionen in der Immunreaktion nachgesagt, vor allem aber scheint es eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen zu spielen. Wie schon bei den cysLTs beschrieben, verursacht auch das LTB₄ eine Erhöhung der Sekretausscheidung sowie eine erhöhte Freisetzung von granulären Enzymen [210]. Außerdem ist LTB₄ an der Stimulation der Leukozytenadhäsion am Endothelium und an der Freilassung von ROS in unter anderem Neutrophilen, Eosinophilen und Fibroblasten verantwortlich und hat somit auch eine antiinflammatorische Wirkung [108,211–214]. Es besitzt eine chemotaktische und eine chemokinetische Eigenschaft. Bei einer Entzündungsreaktion ist LTB₄ an der Chemotaxis zahlreicher Zellen verantwortlich, unter anderem bei PMNL, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Phagozyten, was hinsichtlich der Rolle als Entzündungsmediator eine der wichtigsten Funktionen erscheint [71,215–218]. Hinsichtlich dazu erhöht LTB₄ ebenso die Gefäßpermeabilität [219]. Während einer akuten Entzündungsreaktion fördert LTB₄ die Akkumulation von Neutrophilen, somit ist es auch bei der akuten Immunantwort beteiligt [220]. Da das LTB₄ bei vielen Krankheiten involviert zu sein scheint, haben sich viele Forschungsgruppen damit beschäftigt, dies genauer zu untersuchen. So konnte beispielsweise beobachtet werden, dass LTB₄ in der Darmschleimhaut entzündlicher Darmerkrankungen, in alveolaren Makrophagen bei Patienten mit Lungenfibrose, in Neutrophilen von Psoriasis-Patienten und in Atherosklerose-Plaques stark hochreguliert ist [221–225]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in alveolären Makrophagen von HIV-Patienten eine geringere LTB₄-Produktion [226,227]. Nach intravenöser Zugabe von LTB₄ bei HIV-Patienten führte dies zu einer Freisetzung von α -Defensin und MIP-1 β , die zu den wichtigen anti-HIV-Mediatoren gehören [228]. Zusätzlich konnte es mit den Krankheiten rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und Osteoporose in Verbindung gebracht werden, da es bei letzterem die Anzahl der Osteoklasten erhöht und somit den Knochenabbau begünstigt [229–233]. Ebenso ist LTB₄ in allergischen Reaktionen involviert, wie z. B. allergischer Bindehautentzündung, allergischem Schnupfen, allergischem Asthma oder unterschiedlichen allergischen Hautkrankheiten [234]. In humanen Pankreas-Krebszellen konnte durch LTB₄ ein Wachstum der Zellen stimuliert werden. Die Zugabe des 5-LO-Stoffwechselproduktes zu diesen Krebszellen führte wiederum zu einer Aktivierung von ERK1/2, das die Erklärung für die Wachstumssteigerung sein

könnte [235]. Es wurde festgestellt, dass LTB_4 in der Lage ist, an den intranukleären Transkriptionsfaktor $\text{PPAR}\alpha$ zu binden und diesen zu aktivieren, wodurch ein sogenannter „Feedback-Mechanismus“ ausgelöst werden könnte, da $\text{PPAR}\alpha$ für den oxidativen Abbau von Fettsäuren verantwortlich ist [71,236,237]. Durch Behandlung von Monozyten und Makrophagen mit LTB_4 konnte eine Erhöhung des Wachstumsfaktors IL-2 beobachtet werden, dies hat wiederum eine Erhöhung von $\text{TNF}\alpha$ zur Folge, was unter anderem eine Entzündungsreaktion auslösen kann [238]. Ebenso hat es Einfluss auf die IL-4-induzierte IgE-Produktion und spielt somit eine wichtige Rolle bei IL-4-gekoppelten allergischen Entzündungsprozessen [239]. Die Auslösung der unterschiedlichen Aktivitäten durch LTB_4 , kommt durch Bindung an spezifische Rezeptoren zustande. An den Rezeptoren BLT1 und BLT2 wirkt LTB_4 als Agonist. Auch bei diesen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [240,241]. Der BLT2-Rezeptor wird ubiquitär exprimiert, während der BLT1-Rezeptor überwiegend in Leukozyten, Milz und im Thymus lokalisiert ist [240,241]. Durch Bindung an die BLT-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine kommt, dies erhöht den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, inhibiert die Adenylylcyclase, aktiviert wiederum die Phospholipase C und resultiert in einer Chemotaxis [240,242]. BLT1 zeigt eine sehr hohe Affinität gegenüber LTB_4 , während BLT2 auch 12-(S)-HETE, 12-(S)-HpETE, 12-(S)-HHT und 15-(S)-HETE binden kann [243,244].

1.3 Alternatives Spleißen

Es ist bekannt, dass alternatives Spleißen ein sehr wichtiger Prozess ist, um die Komplexität des menschlichen Genoms zu erhalten. Außerdem ist bekannt, dass mindestens die Hälfte der menschlichen Gene dem alternativen Spleißen unterliegt [245,246]. Die daraus resultierenden mRNA-Transkripte spielen eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen, in der Entwicklung und in vielen Krankheiten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Transkripte und auch die daraus resultierenden Proteine andere biologische Eigenschaften besitzen können, z. B. in der enzymatischen Aktivität, Protein-Interaktionen und auch in der zellulären Lokalisation [247,248]. Durch alternatives Spleißen ist es möglich, dass aus nur einem Gen eine Familie mehrerer Proteine entstehen kann [249]. Die meisten alternativen Spleißvorgänge

können in fünf unterschiedliche Spleißmuster unterteilt werden: es gibt die sogenannten Kassettenexons, die zusätzlich in die mRNA eingefügt werden können (*mutually exclusive exons*), es gibt die zwei Varianten, in denen entweder das Intron beibehalten (*intron retention*) oder das Exon übersprungen wird (*exon skipping*). Außerdem können unterschiedliche 5'-oder 3'-Spleißseiten benutzt werden (*alternative 5'/3'-splicing sites*). Weitere Formen des Spleißvorganges können die Benutzung alternativer Promotoren oder Polyadenylierungsstellen sein (siehe Abb. 11). Alternatives Spleißen konnte für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich gemacht werden [248], unter anderem bei der spinalen Muskelatrophie [250], der sogenannten Sandhoff-Krankheit [251], der Frontotemporalen Demenz [252], der Porphyrie [253], dem Menkes-Syndrom [254], bei angeborenen Immundefekten [255], der metachromatische Leukodystrophie [256], der myotonen Dystrophie [257] und bei unterschiedlichen Krankheiten des Herzes [258]. Heutzutage ist bekannt, dass alternatives Spleißen in der Entstehung vieler Krebsarten involviert ist und einer der Hauptfaktoren für die Metastasen-Bildung bei Krebspatienten ist [259,260]. Das alternative Spleißen kann durch sogenannte exonische und intronische Spleiß-Enhancer durch Bindung von Aktivatoren verstärkt oder durch exonische und intronische Spleiß-Silencer durch Bindung von Repressoren runterreguliert werden [249]. Ein Teil der entstandenen Spleiß-Transkripte, werden jedoch nicht zu Proteinen umgesetzt. Sie beinhalten vorzeitige Stopcodons und unterliegen somit dem Prozess des sogenannten *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) und werden sofort wieder abgebaut [248].

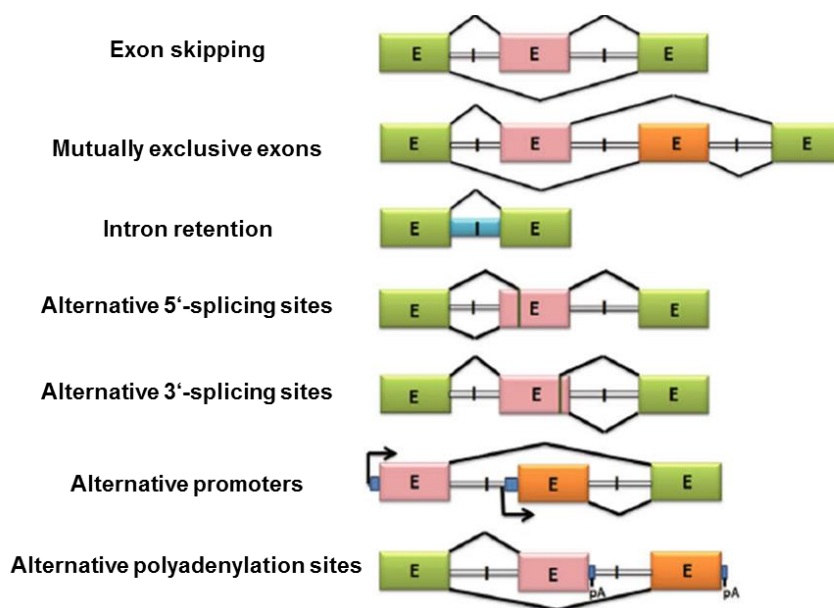


Abbildung 11: Darstellung der Formen des alternativen Spleißens (nach [261]).

1.3.1 Isoformen der 5-Lipoxygenase

Bereits 1992 konnten Boado et al. zeigen, dass es unterschiedliche Spleißvarianten der 5-LO auf mRNA-Ebene gibt. Sie wurden in Hirntumoren und in differenzierten HL-60 gefunden, waren 2,7; 3,1; 4,8; 6,4 und 6,6 kbp groß und wurden mit Hilfe von Northern Blots nachgewiesen [262]. Jahre später konnten weitere alternative Transkripte der 5-LO in unterschiedlichen Zelllinien wie z. B. THP-1, Raji und PMN gefunden werden. Bei diesen Transkripten handelte es sich um die sogenannte $\Delta 13$, bei der das komplette Exon 13 herausgespleißt wurde, die $\alpha 10$, bei der das Intron 10 beibehalten wurde, die $\Delta 10\Delta 13$, bei der beide Exons fehlen und die $\Delta p10$, bei der die ersten 96 Basen des Exons 10 fehlen. Bei näheren Untersuchungen der $\Delta 13$ und $\Delta p10$ wurde auf Protein-Ebene gezeigt, dass die Isoformen katalytisch inaktiv sind und dass nach transienter Kotransfektion in HEK293-Zellen die Aktivität des vollen Konstrukts der 5-LO inhibiert wird. Daraufhin wurde diskutiert, ob es sich bei den Isoformen um endogene Inhibitoren handeln kann [263]. Später konnten sie darstellen, dass sich in transient transfizierten HEK293-Zellen die Lokalisation der Isoform $\Delta 13$ von der des WT unterscheidet [264]. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten unterschiedliche Zelllinien auf alternativ gespleißte 5-LO-Varianten auf mRNA-Ebene. So war es möglich zusätzliche alternative Transkripte zu entdecken, wie $\Delta 3$, $p1\Delta 1p3$, $\alpha 10$, $\alpha 10\Delta 11\Delta 12p13$, $p10p11$, $p2\Delta 3p4$ und $p12$, wobei das ‚Delta‘ für das Fehlen eines kompletten Exons und das ‚p‘ nur für ein Teil des herausgespleißten Exons steht. Das Symbol α stellt ein zusätzliches Intron dar, welches nicht heraus gespleißt wurde [265–267]. Kürzlich identifizierten wir ein neues 5-LO-Transkript, welches 5-LO $\Delta 4$ genannt wird [266]. Bezüglich der Isoform 5-LO $\Delta 4$ konnten wir bisher zeigen, dass die Protein-Isoform in der Lage ist, ATP zu binden und somit auch für weitere Untersuchungen aufgereinigt werden kann, während es jedoch kein Eisen im aktiven Zentrum enthält. Das aufgereinigte Enzym ist katalytisch inaktiv und zeigt eine leichte Stimulation der Aktivität des 5-LOWT bei einer Koinkubation des 5-LOWT mit der 5-LO $\Delta 4$ [266]. Die meisten dieser Isoformen besitzen jedoch vorzeitige Stopcodons und unterliegen somit dem NMD. Potentielle Protein-Isoformen sind die 5-LO $\Delta 13$, 5-LO $p12$ und 5-LO $\Delta 4$, da diese nicht dem NMD unterliegen [267,268].

Einleitung



Abbildung 12: Darstellung der identifizierten 5-LO-Isoformen (nach [263,267]).

Dargestellt sind nur die potentiellen Protein-Isoformen. Diese besitzen keine vorzeitigen Stop-Codons und stellen somit keine NMD-Targets dar. Zusätzlich wurden die Zellen aufgelistet, in denen die dargestellten Isoformen bisher identifiziert wurden.

2 Ziel der Dissertation

Die 5-LO-Metabolite spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen Krankheiten und Allergien. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, durch Medikamente die Bildung der 5-LO-Produkte inhibieren oder stimulieren zu können. Dieses Gebiet wird im Moment weitgehend erforscht. Schon in den 90ern konnten die ersten Spleißvarianten der 5-LO in Hirntumoren und differenzierten HL-60-Zellen identifiziert werden [262]. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet folgten und es konnten weitere Isoformen auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Zelllinien detektiert werden [263,266,267]. Jedoch handelte es sich bei den meisten gefundenen alternativen 5-LO-Transkripten um NMD-Targets. Nur wenige konnten als potentielle Protein-Isoformen identifiziert werden. Um deren Funktion auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden bereits unter anderem Aktivitätstests und Lokalisationsstudien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Isoformen Einfluss auf die Aktivität des WT ausüben und dass sich die Lokalisation der Isoform 5-LO Δ 13 zu der des 5-LO-WT unterscheidet.

Auf diesen Daten aufbauend wurde diese Arbeit angefertigt. Ziel war es, die potentiellen Protein-Isoformen der 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene zu untersuchen. So wurden unter anderem myeloide Zellen und primäre B- und T-Zellen auf 5-LO-Isoformen untersucht. Des Weiteren wurden primäre Monozyten von Patienten mit Sepsis und rheumatoider Arthritis analysiert. Anhand dieser Daten sollten semiquantitative Auswertungen durchgeführt werden. Um ein stabiles System auf Protein-Ebene zu erhalten, wurden die Isoformen stabil in HEK293T-Zellen transfiziert. Dadurch konnten Aktivitätsuntersuchungen und Lokalisationsstudien durchgeführt werden. Es galt weiterhin anhand von Western Blots die Phosphorylierungen aller untersuchten Proteine zu ermitteln, um somit eventuelle Rückschlüsse auf die Lokalisation ziehen zu können. Ebenso sollten die Einflüsse der Isoformen auf die Lokalisation und die Aktivität des 5-LO-WT mit Hilfe von Mutagenese-PCRs überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ampicillin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
APS	Sigma (MO, USA)
Arachidonsäure	Cayman Chemical (MI, USA)
Blocking Puffer	LI-COR Biosciences (NE, USA)
β -Mercaptoethanol	Sigma (MO, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dextran	Sigma (MO, USA)
Diamid	Sigma (MO, USA)
EDTA	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol (87 %)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
HBSS	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
HCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Calcium-Ionophor	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Luria-Broth-Medium	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (MA, USA)

Chemikalie	Hersteller
Lysozym	Sigma (MO, USA)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nonidet P-40 (Igepal Ca630)	Sigma (MO, USA)
PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Polyvinylalkohol (Mowiol-488)	Sigma (MO, USA)
Separations-Medium (Histopaque-1077)	Sigma (MO, USA)
SDS	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
TEMED	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tween-20	Sigma (MO, USA)
Trypsin	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

3.1.2 Verwendete Geräte und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien.

Gerät/Material	Typ	Hersteller
Deckgläser	Ø 18 mm	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Festphasenextraktionssäulen	C18, 100 mg, 10 mL	United Chemical Technologies (PA, USA)
SDS-Gel-Elektrophorese-System	Mini-Protean® 3 Systems	Bio-Rad Laboratories (CA, USA)
Lithium-Heparin-Gefäß	S-Monovette	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Membran (Nitrocellulose)	RPN303E	GE Healthcare Amersham (Buckinghamshire,

Gerät/Material	Typ	Hersteller
		Großbritannien)
UV/VIS-Spektralphotometer	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Objektträger	Geschliffen, Mattrand	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Odyssey® Infrared Imaging System	Model 9120	LI-COR Biosciences (NE, USA)
Schüttler (Plasmidvervielfältigung)	MaxQ4000	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Stromgerät für Ultraschall	Sonopuls HD 200	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Taumelroller	RM5-348	Karl Hecht GmbH und Co. KG (Sondheim, Deutschland)
Ultraschallspitze	MS72D	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Zellzählgerät	TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories (CA, USA)
Zellkulturschalen	35 mm	VWR International (PA, USA)
Zellkulturschalen	145 mm	VWR International (PA, USA)
Zentrifuge (Proteinexpression, für 15 – 50 mL Reaktionsgefäße)	Sorvall RC 5B PLUS	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Zentrifuge (Zellkultur, für 15 – 50 mL Reaktionsgefäße)	Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge (für 1,5 mL Reaktionsgefäße)	Microfuge® 22R	Beckman Coulter (CA, USA)
1,5 mL Reaktionsgefäße	Polypropylen, 1,5 mL Reagiergefäße	nerbe plus GmbH (Winsen, Deutschland)
15 mL Reaktionsgefäße	Polypropylen, kubischer Boden	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
50 mL Reaktionsgefäße	Polypropylen, kubischer Boden	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

Gerät/Material	Typ	Hersteller
75 mL, 175 mL, 250 mL Gewebekulturflaschen	Polystyrol	VWR International (Leuven, Belgien)
6-Well-Platte	Polystyrol, flacher Boden	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)

3.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
CD14 MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CD16 MicroBeads Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
DNase-Verdau-Kit	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Dynabeads® Untouched™ Human B Cells Kit	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Life Technologies (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland)
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma (MO, USA)
GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma (MO, USA)
Human T Cell Enrichment Kit	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
NucleoBond® Xtra Mini Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Nucleospin Gel and PCR clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

3.1.4 Verwendete Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
β_2 M-Positivkontrolle (pCMV6-XL5- β_2 M)	OriGene (MD, USA)
Glycoblue	Ambion® Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Complete protease inhibitor cocktail (EDTA-frei)	Roche (Basel, Schweiz)
DAPI	Sigma (MO, USA)
dNTP-Mischung	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
PhosStop phosphatase inhibitor cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
Precision Plus Protein Standard (all blue)	Bio-Rad Laboratories (CA, USA)
TRIzol	Ambion™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Generuler 100 bp-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Generuler 1 kb-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
6 × DNA loading dye	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)

3.1.5 Verwendete Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
Bsa I	New England Biolabs (MA, USA)
DNase I (RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
EcoR I	New England Biolabs (MA, USA)
Fse I	New England Biolabs (MA, USA)
Hind III	New England Biolabs (MA, USA)
Kpn I	New England Biolabs (MA, USA)
Pfu-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Q5-Polymerase	New England Biolabs (MA, USA)

Bezeichnung	Hersteller
RNase A	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Sfi I	New England Biolabs (MA, USA)
Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (MA, USA)
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs (MA, USA)

3.1.6 Verwendete Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper.

Antigen	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung/ Verwendung
5-LO (Bezeichnung: 6A12)	monoklonal	Maus	Arbeitsgruppen- intern hergestellt in Kooperation mit AK Prof. Dingermann*	1:200 (WB)
5-LO	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories TM (NJ, USA) (610695)	1:50 (IF)
FLAG	monoklonal	Maus	Sigma (MO, USA) (F1804)	1:1000 (WB)
Phospho-5-LO S271	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling (MA, USA) (#3748)	1:1000 (WB)
Phospho-5-LO S523	polyklonal	Kaninchen	Sigma (MO, USA) (L1168)	1:500 (WB)
GFP	polyklonal	Ziege	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, TX, USA (sc-5385)	1:500 (WB)
mCherry	polyklonal	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific (MA, USA) (PA5-34974)	1:1000 (WB)
anti- β -Actin	polyklonal	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) Katalognr: sc-1616	1:5000 (WB)

* Institut für Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt

Tabelle 7: Verwendete Sekundär-Antikörper.

Antigen	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung/ Verwendung
Kaninchen	polyklonal	Ziege	Sigma (MO, USA)	1:5000 (WB)
Maus	polyklonal	Ziege	Sigma (MO, USA)	1:5000 (WB)
Ziege	polyklonal	Kaninchen	Sigma (MO, USA)	1:5000 (WB)
Alexa-647 gekoppelten anti-Maus IgG (590 – 630 nm)	polyklonal	Ziege	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)	1:2000 (IF)

3.1.7 Verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusätze

Tabelle 8: verwendete Zellkultur-Medien und deren Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
RPMI 1640 Medium	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
FCS (Fetal calf serum)	Biochrom AG (Berlin, Germany)
Penicillin/Streptomycin	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Natriumpyruvat	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
L-Glutamin	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
DMSO	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (MA, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Klonierung von 3 × FLAG-Tag in pcDNA3.1 5-LO

Für die Herstellung des FLAG-Tags wurde die Oligonukleotid-Hybridisierungstechnik gewählt. Dafür wurden die Oligonukleotide so konstruiert, dass sich diese wie Bausteine aneinander lagern können. Zusätzlich wurden Überhänge mit Schnittstellen für EcoR I und Hind III konstruiert, um so ein ‚*cleavage close to the end*‘ zu gewährleisten (Primer siehe Tabelle 9). Die Anlagerung der Oligonukleotide ist in Abbildung 13 bildlich dargestellt. Zunächst mussten die Oligonukleotide phosphoryliert werden. Dies wurde mit der T4-Polynukleotid-Kinase von New England Biolabs 1 h bei RT durchgeführt. Danach folgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 min. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung. Dafür wurde zu dem Phosphorylierungsansatz 100 µL 100 % Ethanol und 3 mM Natriumacetat (pH 6,5) zugegeben und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde der Reaktionsmix bei 14000 rpm (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter) 20 min bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet konnte nach dem Trocknen in 20 µL MQ aufgenommen werden. Anschließend erfolgte ein Annealing-Schritt der phosphorylierten Oligonukleotide, der bei 95 °C für 5 min auf einem Heizblock durchgeführt wurde. Der Reaktionsansatz wurde so lange in dem Heizblock gelagert bis dieser auf eine Temperatur von 10 °C abkühlte. Das Plasmid pcDNA3.1-5-LO, in das der dreifache FLAG-Tag eingefügt werden sollte, wurde mit den Restriktionsenzymen Hind III und EcoR I 1 h bei 37 °C verdaut. Das verdaute Plasmid wurde auf einem 1%igen Ethidiumbromid-Agarosegel getrennt und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Diese wurde durch ein Gelextraktions-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Der Annealingansatz und der verdaute Vektor wurden mit Hilfe der T4-Ligase bei 16 °C über Nacht ligiert. Da das finale Start-ATG der 5-LO ebenfalls als Startcodon abgelesen wurde, wurde dieses in ein Glycin (GGG) mutiert. Dafür wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt, wie sie bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben ist (Mutationsprimer siehe Tabelle 10). Die Sequenzierung wurde von SRD (Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 9: : verwendete Oligos für 3 × FLAG-Tag-Herstellung.

Bezeichnung	Oligo-Sequenz
Oligo 1 FLAG	AGC TTA TGG ACT ACA AAG ACC ATG ACG GTG
Oligo 2 FLAG	ATT ATA AAG ATC ATG ACA TCG ATT ACA AGG ATG ACG ATG ACA AGG G
Oligo 3 FLAG	ATG TCA TGA TCT TTA TAA TCA CCG TCA TGG TCT TTG TAG TCC ATA
Oligo 4 FLAG	AAT TCC CTT GTC ATC GTC ATC CTT GTA ATC G
FLAG_MzuG_fwd	GGG AAT TCC CAC CGG GCC CTC CTA CAC GGT C
FLAG_MzuG_rev	GAC CGT GTA GGA GGG CCC GGT GGG AAT TCC C

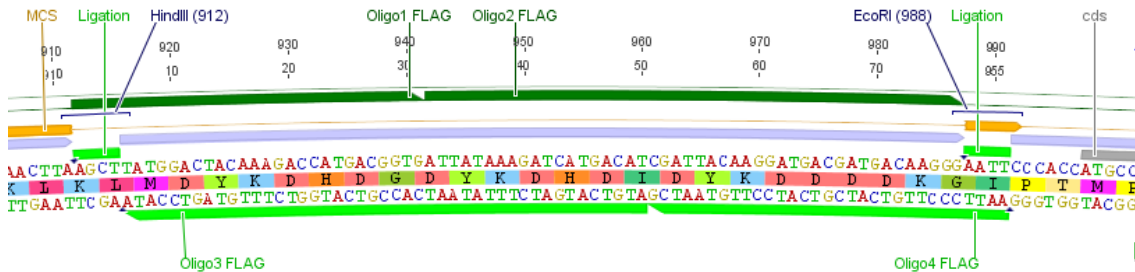


Abbildung 13: Darstellung der Anlagerung der Oligonukleotide zur Konstruktion des FLAG-Tags.

3.2.2 Herstellung der Expressionsvektoren für die stabile Integration

Folgende Vektoren mussten für die stabile Transfektion hergestellt werden: pSBbi-GFP-5-LO, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12. Als stabile Transfektionsmethode wurde die Sleeping-Beauty-Methode gewählt. Sowohl der pSBbi- als auch der pGEM-T-Vektor, welcher das GFP- bzw. mCherry-Fragment enthielt, wurde freundlicherweise von Eric Kowarz der Arbeitsgruppe Prof. Marschalek zur Verfügung gestellt. Um die sogenannte ‚filler DNA‘ aus dem pSBbi-Vektor auszuschneiden, wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym Sfi I verdaut. Das GFP/mCherry-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bsa I und Sfi I ausgeschnitten. Um die kodierende Sequenz der 5-LO zu erhalten, wurden zunächst die Schnittstellen Bsa I und Sfi I in das Plasmid pcDNA3.1-5-LO eingefügt, um anschließend die kodierende Sequenz der 5-LO mit

diesen Restriktionsenzymen ausschneiden zu können (Primer siehe Tabelle 10). Die geschnittenen Fragmente wurden über ein 1,5%iges Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe eines Gelaufreinigungs-Kits von Macherey-Nagel aufgereinigt. Der verdaute pSBbi-Vektor, die kodierende Sequenz des 5-LO-WT und der GFP-bzw. mCherry-Tag wurden mit einer T4-Ligase 1h bei 16 °C ligiert. Dies wurde in Kooperation mit Dr. Ann-Kathrin Häfner durchgeführt. Um die mCherry-5-LO-Isoformen zu erhalten und die entsprechenden fehlenden Sequenzen der Isoformen zu entfernen, wurde mit dem mCherry-5-LO-WT eine Deletion durchgeführt (Primer und Durchführung siehe Kapitel 3.2.4). Die Überprüfung der Sequenz wurde durch die Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 10: verwendete Primer, um Schnittstellen Sfi I und Bsa I einzufügen.

Bezeichnung	Primer-Sequenz
BsaI-5LO_fwd	GGT CTC AAC TCA TGC CCT CCT ACA CGG TCA CCG
SfiI-5LO_rev	GGC CTG ACA GGC CTC AGA TGG CCA CAC TGT TCG G

3.2.3 Klonierung des P2A-Linkers mittels „Overlap-PCR“

Der P2A-Linker sollte in das Plasmid pSBbi-GFP-5-LO-WT zwischen dem GFP-Tag und 5-LO inkloniert werden, um so eine Spaltung zwischen GFP und 5-LO zu erhalten. Dafür wurden 3 PCRs durchgeführt. Als Polymerase wurde die Q5-Polymerase von New England Biolabs verwendet. Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet. Für die 1. PCR wurden die Primer A und B und für die 2. PCR Primer C und D verwendet. Als Vorlage diente bei beiden PCRs das pSBbi-GFP-5-LO-WT-Konstrukt. Für die 3. PCR wurden die Primer A und D eingesetzt, wobei die beiden PCR-Produkte aus den ersten beiden PCRs eingesetzt wurden. Die schematische Darstellung der Methode ist in Abbildung 14 dargestellt, die verwendeten Primer in Tabelle 11. Nach jeder PCR wurden die Produkte mittels 1,5 % Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden über ein Geextraktions-Kit aufgereinigt. Anschließend erfolgte ein Verdau sowohl des Vektors als auch des Produkts aus der 3. PCR mit den Restriktionsenzymen Fse I und Kpn I. Dies erfolgte 1 Stunde bei 37 °C.

Nach einem PCR-clean-up erfolgte als letzter Schritt eine Ligation mit Hilfe der T4-Ligase bei 16 °C über Nacht. Das verwendete Programm, das für die Overlap-PCR verwendet wurde, ist in Tabelle 12 dargestellt.

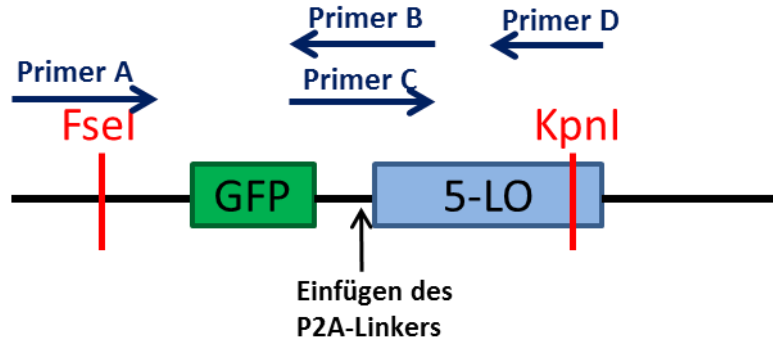


Abbildung 14: Schematische Darstellung der durchgeführten „overlap-PCR“.

Tabelle 11: verwendete Primer der „overlap-PCR“.

	Primer-Sequenz
Primer A	GGG GGT AGT CTC AAG CTG GC
Primer B	CTC CGG CTT GTT TCA GCA GAG AGA AGT TTG TTG CGC CGG ATC CGA GTC CGG ACC TGT ACA GCT C
Primer C	CTC TCT GCT GAA ACA AGC CGG AGA TGT CGA AGA GAA TCC TGG ACC GAT GCC CTC CTA CAC GGT CAC
Primer D	CGT GAT GTA CTT CAG GTA CCA GTC G

Tabelle 12: verwendetes PCR-Programm für „overlap-PCR“.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
Denaturierung	1	95	0:30
Denaturierung		95	0:30
Annealing	16	55-63	0:30
Extension		72	2:00
finale Extension	1	72	10:00
Lagerung	1	4	unbegrenzt

3.2.4 Mutagenese-PCR und Transformation in *E. coli*

Um die 5-LO-Isoformen auf Protein-Ebene zu untersuchen, mussten die Expressionsplasmide der Isoformen zunächst mittels Mutagenese-PCR hergestellt werden. Das Plasmid der pcDNA3.1-5-LO Δ 13 wurde freundlicherweise von Dr. Mirjam Schröder zur Verfügung gestellt. Die Plasmide der Isoformen 5-LOp12 und 5-LO Δ 4 wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem Vektor pcDNA3.1-Vektor hergestellt.

Die erforderlichen Mutationen/Deletionen wurden durch Mutagenese-PCR mittels QuikChangeTM-Protokoll von Stratagene eingefügt. Als Polymerase wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Anschließend erfolgte, im Falle einer Deletion, eine Ligation für 30 min bei RT (T4-Ligase), gefolgt von einem Dpn I-Verdau bei 37 °C für 45 min. Die verwendeten Mutagenese-Primer sind in Tabelle 13 dargestellt. Die mutierten Konstrukte wurden in *E.coli* DH5 α (InvitrogenTM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durch die Hitzeschockmethode transformiert. Dafür wurde die Plasmid-DNA zu 100 μ L kompetente *E.coli* DH5 α gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Nach Zugabe von 500 μ L LB-Medium (Luria Broth) wurde der Ansatz bei 37 °C für 1 Stunde bei 180 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden auf einer Ampicillin-haltigen (100 μ g/mL), vorgewärmten Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 13: verwendete Mutagenese-Primer.

Bezeichnung	Primer fwd	Primer rev
S271A	GCC TGG AGC GGC AGC TCG CCT TGG AGC AGG AGG TC	GAC CTC CTG CTC CAA GGC GAG CTG CCG CTC CAG GC
S523A	GGC CGC AAG TCC GCA GGC TTC CCC AAG TCG	CGA CTT GGG GAA GCC TGC GGA CTT GCG GCC
5-LOp12	Phos-GTC AAC TTC GGC CAG TAC GAC TGG	Phos-CGA CTT GGG GAA GCC TGA GGA CTT
5-LO Δ 4	Phos-GAT GGA GAA CCT GTT C	Phos-CGA TAT TGT TTT TGC CGT G
S523D	CGC AAG GAC TCA GGC TTC CC	GGG AAG CCT GAG TCC TTG CG

Tabelle 14: verwendetes Programm für die Mutagenese-PCR.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Denaturierung	1	95	0:30
Denaturierung		95	0:30
Annealing	16	65-72	1:00
Extension		72	17:30
finale Extension	1	72	18:00
Lagerung	1	4	unbegrenzt

3.2.5 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli*

Von der angewachsenen Agar-Platte wurden einzelne Klone gepickt und in 5 mL Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) LB-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht vermehrt. Je nachdem, ob man eine Mini- oder Maxipräparation durchführte, wurden die 5 mL direkt verwendet oder in 500 mL Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Für die Maxi- und Mini-Präparation wurde das Kit von Macherey-Nagel verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Plasmid-Konzentration wurde mittels Nanodrop gemessen. Die Überprüfung der Sequenz wurde durch die Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt.

3.2.6 Zellkultur

HEK293T-Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, welches mit 10 % FCS (*fetal calf serum*) 100 µg/mL Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 1 mM Natriumpyruvat versetzt wurde. Die Zellen wurden bei einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Die adhärennten Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage abgespült und in einem Verhältnis von 1:25 in neues Medium überführt.

Die Suspensions-Zelllinien JURKAT, MOLT-4, Rec-1 und Raji-Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, welches mit 10 % FCS, 100 µg/mL Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und im Falle von JURKAT-Zellen mit 2 mM L-Glutamin versetzt wurde. Die

Zellen wurden bei einer Atmosphäre von 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Die Suspensionszellen wurden alle 3 bis 4 Tage resuspendiert und in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /mL in neues Medium überführt.

3.2.7 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden adhärenente Zellen abgespült bzw. Suspensionszellen gut resuspendiert. Anschließend wurden 20 µL der Zellsuspension mit 20 µL Trypanblau-Lösung (0,4 % Trypanblau, 0,81 % NaCl, 0,06 % KH₂PO₄) resuspendiert und mittels automatischen Zellzahlgeräts ermittelt.

3.2.8 Transfektion

3.2.8.1 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion erfolgte durch die Calciumphosphat-Methode. Dafür wurden 3×10^6 HEK293T-Zellen in einer 14,5 cm Zellkulturplatte ausplattiert und im Brutschrank weiter kultiviert (5 % CO₂, 37 °C). Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 µg pro Plasmid-DNA mit MQ so verdünnt, dass ein Volumen von 450 µL erreicht wurde. Wurden Kotransfektionen mit einzelnen Transfektionen verglichen, so wurde der entsprechende Ansatz mit einem sogenannten Leerplasmid aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 50 µL einer 2,5 M CaCl₂-Lösung zu der Plasmidlösung. Dieser Ansatz wurde unter Lufteinstrom zu 500 µL HeBS-Puffer (28 M NaCl, 5 M HEPES, 120 mM Na₂HPO₄, pH 7,05) 1 min lang zugetropft. Pro Schale wurden 800 µL der Plasmidlösung langsam auf die Zellen gegeben und vorsichtig im Medium verteilt. Nach 16 h wurde das Medium gewechselt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgespült, gezählt und pro Ansatz 5×10^6 Zellen für den entsprechenden Versuch weiter verarbeitet.

3.2.8.2 Stabile Transfektion (Sleeping Beauty)

Die hergestellten Plasmide wurden mit Hilfe der Sleeping-Beauty-Methode stabil in HEK293T-Zellen integriert [269]. Dafür wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde jedes Well mit 2,85 μg pro Plasmid-DNA und 0,15 μg pSB100X-Vektor (von Zoltan Ivics zur Verfügung gestellt [270]) transfiziert. Als Transfektionsmethode wurde die Calciumphosphat-Methode gewählt und wurde wie bereits in Kapitel 3.2.8.1 beschrieben, durchgeführt [271]. Um eine 100%ige Transfektionseffizienz zu erhalten, wurden die Zellen mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin für zwei Tage selektioniert. Die Selektion wurde $3 \times$ wiederholt. Die co-transfizierten HEK293T-Zellen wurden ebenfalls mit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin für zwei Tage selektioniert, gefolgt von einer Sortierung der doppelt-positiven Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Die Sortierung der Zellen wurde freundlicherweise von Duran Sürün am Uniklinikum Frankfurt am Main, wie von Markoutska et al. beschrieben, durchgeführt [41].

3.2.9 5-LO-Aktivitätsassay

3.2.9.1 Intakte Zellen

5×10^6 geerntete Zellen (siehe Zellkultur) wurden in 1 mL PBS/Glucose resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Glasröhrchen überführt und mit 1 mM CaCl_2 versetzt. Im Falle einer Behandlung, wurde die Substanz hinzugegeben und 4 h (KN-93, 3 μM und Sorbitol, 0,4 M) oder 30 min (SB203580, 10 μM) bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die Behandlung mit Diamid (30%ig) erfolgte 10 min bei RT (siehe Tabelle 15). Anschließend wurde mit 10 μL einer Mischung aus AA/ Ca^{2+} -Ionophor (10 $\mu\text{M}/5 \mu\text{M}$) stimuliert, gevortext und es erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 % Methanol gestoppt und anschließend auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 μL PBS, 30 μL 1 M HCl und 10 μL PGB₁ als interner Standard (ca. 200 ng/10 μL) zugegeben und bei 2000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) 10 min bei RT zentrifugiert. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden durch eine Festphasenextraktion aufgereinigt. Dafür wurden die Säulen zunächst mit 1 mL 100 % Methanol konditioniert und mit 1 mL MQ gespült. Anschließend wurde die

Probe auf die Säule beladen und mit 1 mL MQ und 1 mL 25 % Methanol gewaschen. Die Metaboliten wurden mit 300 µL 100 % Methanol eluiert, wobei dem Eluat noch 120 µL MQ zugegeben werden musste. 100 µL der Probe wurden mittels RP-HPLC (C-18 Radial Pak Säule; 100 mm, 5mm I.D., 4 µm Partikelgröße, Waters, Eschborn, Deutschland) analysiert. Das Fließmittel bestand aus einem Gemisch aus Methanol/Wasser/TFA (72/28/0,007 V/V/V), die Flussrate wurde auf 1,2 mL/min eingestellt. Die Berechnung der Aktivität erfolgte in ‚Prozent der Kontrolle‘, wobei die Produkte trans-/epitrans-LTB₄, LTB₄ und 5-H(p)ETE bestimmt wurden.

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien zur Behandlung der Zellen zur Untersuchung der 5-LO-Aktivität.

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller
Sorbitol	0,4 M	4 h	Sigma (MO, USA)
KN-93	3 µM	4 h	Cayman Chemical (MI, USA)
SB203580	10 µM	30 min	Sigma (MO, USA)
Diamid	1 mM	10 min	Sigma (MO, USA)

3.2.9.2 Homogenate:

5×10^6 geerntete HEK293T-Zellen (siehe Zellkultur) wurden in 1 mL PBS aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde 1 mM EDTA (pH 8) zugegeben. Es folgte eine Ultraschallbehandlung von 3×10 sec auf Eis. Das Homogenat wurde in Glasröhrchen überführt und mit 1 mM ATP versetzt. Der Ansatz inkubierte 30 sec bei 37 °C, gefolgt von einer Stimulation mit 10 µM AA und 1 mM CaCl₂. Die Reaktion wurde weitere 10 min bei 37 °C inkubiert und mit 1 mL Methanol abgestoppt. Danach konnte, wie unter Abschnitt ‚intakte Zellen‘ beschrieben, weiter vorgegangen werden.

3.2.10 SDS-PAGE und Western Blot

5×10^6 Zellen wurden bei 1000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) 5 min geerntet. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 3 mL kaltem PBS, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation. Die Zellen wurden mit 100 µL Lysepuffer lysiert. Die

Suspension wurde gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13000 rpm (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter), 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5 × Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Von der Probe wurde jeweils 20 µL in die Tasche des SDS-Gels (Sammelgel 4 %, Trenngel 12 %) aufgetragen (Zusammensetzung siehe Tabelle 17). Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli [272] durchgeführt bei einer Einstellung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Danach wurde die Membran mit PBS/Blocking Puffer in einem Verhältnis von 1:1 mindestens 1 h inkubiert. Es erfolgte eine Inkubation mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag konnte die Membran 4 × mit Waschpuffer gewaschen und in dem passenden Sekundär-Antikörper 1 h bei RT inkubiert werden. Nach weiteren 4 Waschschritten, wobei der letzte Schritt nur in PBS erfolgte, erfolgte das Scannen des Blots mit einem LI-COR Odyssey® Infrared Imaging System.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM Tris/HCl (pH 6,8), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,5 % NP-40, 1 × Protease-Inhibitor, 1 × Phosphatase-Inhibitor
5 × Ladepuffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau, 2 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	20 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol
Waschpuffer	PBS + 0,1 % Tween-20

Tabelle 17: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele. Angegeben sind die Mengen in μL für 4 Gele einer Dicke von 0,75 mm.

Lösungen	12 %	4 %
Acrylamidstammlösung (30 %)	5600	1067
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3546	—
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	—	2016
10 % SDS	140	80
MilliQ-H ₂ O	4554	4777
10 % APS-Lösung	144	48
TEMED	16	12

3.2.11 Konfokalmikroskop

3.2.11.1 Transient transfizierte Zellen

3×10^6 HEK293T-Zellen wurden in einer Zellkulturschale (145 mm) ausgesät. Anschließend erfolgte eine transiente Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode, wie bereits unter dem Punkt ‚transiente Transfektion‘ beschrieben. Nach 16 h wurden die transfizierten Zellen abgespült, gezählt und 35000 Zellen auf Deckgläser überführt. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit einer 4 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung für 30 min bei RT. Es folgte ein Waschschriff mit TBS (+ 0,2 % Triton X-100) für 5 min. Anschließend wurden die Zellen in einer Permeabilisierungs-Lösung für 30-45 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte eine Inkubation mit einem anti-5-LO-Antikörper (BD, 1:50) bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen $3 \times$ gewaschen und mit einem Sekundär-Antikörper 1 h bei RT versetzt. Nach weiteren Waschschriffen wurde der Zellkern mit $1 \mu\text{g/mL}$ 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, lichtgeschützt) für 5 min bei RT gefärbt. Nach nochmaligem Waschen wurden die Deckgläser auf Objektträger mit den Zellen nach unten mit Hilfe von Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88) befestigt und über Nacht getrocknet. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Fiji (www.fiji.sc). Als Mikroskop diente das Leica TCS SP5, Frankfurt Center for

Advanced Light Microscopy [FCAM]). Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Verwendete Lösungen zur Herstellung der Konfokal-Proben.

Lösung	Zusammensetzung
TBS	150 mM NaCl; 7,7 Tris-HCl pH 7,4
Wasch-Lösung	TBS + 0,2 % Triton X-100
Permeabilisierungs-Lösung	5 % Milchpulver gelöst in TBS + 0,2 % Triton X-100
Antikörper-Lösung	1 % Milchpulver gelöst in TBS + 0,2 % Triton X-100

3.2.11.2 Stabil transfizierte Zellen

$1,5 \times 10^5$ stabil transfizierte HEK293T-Zellen wurden auf einem Deckglas in kleinen Zellkulturschalen ausgesät (35 mm). Nach 48 h wurden diese mit dem entsprechenden Reagenz bei 37 °C behandelt (siehe Tabelle 19). Anschließend wurden die Zellen $1 \times$ mit PBS für 5 min bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 4%igen Formaldehyd/PBS-Lösung für 30 min bei RT fixiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit PBS wurde der Kern mit 1 µg/mL DAPI für 5 min bei RT gefärbt. Gefolgt von 3 Waschschrritten wurden die Deckgläser auf Objektträger mit Hilfe von Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88) befestigt und über Nacht getrocknet. Anschließend konnten die Zellen mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5, Frankfurt Center for Advanced Light Microscopy [FCAM]) untersucht werden. Die Darstellung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Fiji (www.fiji.sc).

Tabelle 19: Verwendete Reagenzien zur Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller
Sorbitol	0,4 M	4 h	Sigma (MO, USA)
KN-93	3 µM	4 h	Cayman Chemical (MI, USA)
SB203580	10 µM	30 min	Sigma (MO, USA)
Ionophor	5 µM, 25 µM	10 min	Sigma (MO, USA)
NaAsO ₂	10 µM	5 min	Sigma (MO, USA)
PMA	100 nM	10 min	Sigma (MO, USA)

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller
H-89	10 μ M	15 min	Enzo Life Science GmbH (NY, USA)
Staurosporin	40 nM	1 h, 16 h	Sigma (MO, USA)
Leptomycin B	5 ng/mL	2 h	Cayman Chemical (MI, USA)
H ₂ O ₂	1 mM	1 h, 1,5h	Merck (Darmstadt, Deutschland)

3.2.12 Isolierung von primären B- und T-Lymphozyten

Folgendes Protokoll wurde in Kooperation mit Dr. Kim Beilstein und Lara Ullrich durchgeführt. Primäre B- und T-Zellen wurden aus Buffy Coats (DRK-Blutspendedienst Hessen GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) isoliert. Die einzelnen Blutbestandteile wurden mit Hilfe der Dextran-Sedimentation (5 % Dextran) und Dichtezentrifugation (2300 rpm, 10 min, RT, ohne Bremse, Varifuge 3.0R, Heraeus) voneinander getrennt. Der Monozyten-Ring, in dem sich die B- und T-Zellen befinden, wurde abgenommen. Die isolierten PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) wurden in vorgewärmten HBSS-Puffer (Hank's Balanced Salt Solution) aufgenommen, und bei 1100 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die B- und T-Zellen mit Hilfe des T cell enrichment Kits und Dynabeads untouched human B cell Kits nach Herstellerprotokoll (T-Zellen: Stemcell Technologies, B-Zellen: Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific) voneinander getrennt. Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen in 1 mL Trizol-Reagenz (TRIzol Reagent®) aufgenommen und wie in Kapitel 3.2.15 beschrieben weiter verfahren.

3.2.13 Isolierung von primären Monozyten

Die RNA der primären Monozyten wurden freundlicherweise von Helena Frey aus der Arbeitsgruppe von Prof. Schäfer am Uniklinikum Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Die primären Monozyten wurden nach folgendem Protokoll isoliert:

Ungefähr 40 mL Blut wurden in ein Lithium-Heparin-Gefäß überführt, mit vorgewärmten PBS 1:3 verdünnt und vorsichtig auf ein vorgewärmtes Separations-Medium (Histopaque-1077) gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) mit vorgewärmten PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Isolierung der Monozyten durch eine CD14-positive Selektion mit Hilfe von magnetischen Beads von Miltenyi Biotec nach Herstellerprotokoll.

3.2.14 Isolierung von Granulozyten und alveolären Makrophagen aus humanem Blut

Die folgenden Proben wurden von Nicolas Flamand (medizinisches Institut, Universität Laval, Kanada) zur Verfügung gestellt.

Um das Plättchen-reiche Plasma von den übrigen Blutbestandteilen abzutrennen, wurde das Gesamt-Blut bei $250 \times g$ für 17 min zentrifugiert. Für die Sedimentation der Erythrozyten wurde 6 % Dextran hinzu gegeben. Anschließend wurden die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) durch Gradientenzentrifugation bei $325 \times g$ für 20 min von den Granulozyten getrennt. Anschließend erfolgte mit dem Granulozyten-Pellet eine hypotone Lyse mit sterilem Wasser für 30 sec, um zu gewährleisten, dass keine Verunreinigung durch Erythrozyten vorhanden ist. Die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurden durch anti-CD16-konjugierte magnetische Beads von Miltenyi Biotec nach Herstellerprotokoll selektioniert.

Die alveolären Makrophagen wurden durch eine bronchoalveoläre Lavage von gesunden Probanden zur Verfügung gestellt. Die Zellen (150 mL) wurden nach der Lavage $2 \times$ mit PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen/mL in RPMI-Medium, welches mit 1 % FCS versetzt wurde, auf 6-Well-Platten ausplattiert und 90 min bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen $4 \times$ mit vorgewärmten PBS gewaschen. Die Reinheit und Lebensfähigkeit wurde jeweils mittels Trypanblau-Färbung überprüft.

3.2.15 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Um zu testen, ob in unterschiedlichen Zelllinien und Patientenproben 5-LO und 5-LO-Splicevarianten enthalten sind, wurden die geernteten Zellen (siehe Zellkultur) mit 1 mL Trizol-Reagenz (TRIZOL Reagent®) lysiert. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und anschließend eine Zugabe von 200 µL Chloroform. Das Gemisch wurde 15 sec gevortext und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei $12000 \times g$ für 45 min bei 4 °C. Die obere, farblose Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA wurde mittels 500 µL kaltem 100 % Isopropanol und 3 mM Natriumacetat (pH 6,5) bei -20 °C über Nacht durchgeführt. Zur besseren Erkennung des RNA-Pellets wurde 1 µL Glycoblu, welches das Pellet blau färbt, zugegeben. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation ($12000 \times g$, 4 °C, 30 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und anschließend getrocknet. Dieses wurde in 55 µL DEPC-Wasser gelöst und 5 min bei 37 °C erwärmt, um das Lösen des gesamten Pellets sicher zu stellen. Der darauffolgende DNase-Verdau erfolgte mittels DNase-Kit von Thermo Fisher nach Angaben des Herstellerprotokolls. Um eine bessere Reinheit der RNA zu erlangen, erfolgte eine zweite RNA-Fällung. Dafür wurde das 5-fache des Volumens an 100 % Ethanol, 3 mM Natriumacetat und 1 µL Glycoblu zugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei -80 °C inkubiert. Das Pelletieren der RNA erfolgte durch erneute Zentrifugation ($12000 \times g$, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet getrocknet. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung mittels Nanodrop. Die RNA-Integrität wurde mit einem 1,5 %igem Ethidiumbromid-Agarose-Gel überprüft. Waren zwei Banden (28S- und 18S-rRNA) erkennbar, wurde die RNA als intakt angesehen.

1 µg der erhaltenen RNA wurde mittels High Capacity RNA-to-cDNA Kit zu cDNA nach Herstellerprotokoll von Life Technologies umgeschrieben. Die cDNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C gelagert.

3.2.16 PCR zur semiquantitativen Analyse der 5-LO-Transkripte

Die Vervielfältigung der 5-LO-Transkripte sowie β_2M als endogene Kontrolle wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase nach Herstellerprotokoll von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Dafür wurden spezifische Primer, welche in Tabelle 20 aufgelistet sind, verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 95 °C für 2:30 min denaturiert. Die verwendeten Reaktionsprogramme für die 5-LO-Transkripte und der internen Kontrolle β_2M sind in den Tabellen 21, 22, 23 dargestellt. Als Positivkontrollen wurden jeweils 1 ng von pcDNA3.1-5-LO, pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4, pcDNA3.1-5-LOp12 und pCMV6-XL5- β_2M eingesetzt. Die Positivkontrolle pCMV6-XL5- β_2M wurde bei OriGene gekauft. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1,5 % Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetrennt. Dafür wurden 10 μ L der PCR-Produkte der Proben und 1 μ L der PCR-Produkte der Positivkontrollen auf das Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte über ein Agarosegel wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und über ein Gelextraktions-Kit eluiert. Da die Konzentration der PCR-Produkte gering ausfiel, musste die Konzentration der PCR-Produkte erhöht werden, um diese sequenzieren zu können. Zum einen wurden die eluierten PCR-Produkte in ein CloneJET-Plasmid mittels CloneJET PCR Cloning Kit nach Herstellerprotokoll von Thermo Fisher Scientific eingefügt. Das Plasmid wurde anschließend vervielfältigt und mittels Mini-Präparations-Kit von Macherey-Nagel eluiert (siehe Kapitel 3.2.5). Zum anderen wurde mit den aufgereinigten PCR-Produkten eine weitere PCR mit Hilfe von spezifischen Primern durchgeführt, sodass sich die Konzentration der PCR-Produkte erhöht und somit direkt sequenziert werden konnten. Die darauffolgende Sequenzierung wurde von der Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Bad Homburg, Deutschland) bzw. SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Quantifizierung der 5-LO und deren Isoformen wurde densitometrisch über ein Agarosegel mit Hilfe des Odyssey Imaging Systems durchgeführt. Die Berechnung der RNA-Menge wurde auf die interne Kontrolle β_2M bezogen. Um den Einfluss der Länge bei der Quantifizierung der PCR-Produkte zu berücksichtigen, wurde die jeweilige Positivkontrolle mit einberechnet.

Tabelle 20: verwendete Primer für cDNA-Vervielfältigung.

Bezeichnung	Primer fwd	Primer rev
5-LO p12/ Δ 13 (PP1)	GCA TGG AGA GCA AAG AAG ACA TCC	ATG GCC ACA CTG TTC GGA ATC C
5-LO Δ 4 (PP2)	GC AAA AAC AAT ATC GGA TGG	CCA GCA GCT CAA AGT CC
5-LO Δ 4 (PP3)	GGC CCG AGA TGA CCA AAT TC	CAG GCT GCA CTC TAC CAT CT
β_2 M	CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TC	CTC CAT GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG

Tabelle 21: verwendetes PCR-Programm für Detektion von Δ 13/p12.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer
Denaturierung	1	94	2:30
Denaturierung		94	0:45
Annealing	32	63	0:45
Extension		72	2:00
finale Extension	1	72	5:00
Lagerung	1	4	unbegrenzt

Tabelle 22: verwendetes PCR-Programm für Detektion von Δ 4.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
Denaturierung	1	94	2:30
Denaturierung		94	0:45
Annealing	32	61	0:45
Extension		72	2:00
finale Extension	1	72	5:00
Lagerung	1	4	unbegrenzt

Tabelle 23: verwendetes PCR-Programm für Detektion von β 2M.

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
Denaturierung	1	94	2:30
Denaturierung		94	0:45
Annealing	22	61	0:45
Extension		72	2:00
finale Extension	1	72	5:00
Lagerung	1	4	unbegrenzt

4 Ergebnisse

4.1 Detektion der alternativ gespleißten 5-LO-Transkripte in B- und T-Zelllinien, primären B- und T-Zellen und myeloiden Zellen

Bereits im Jahr 1992 konnten auf mRNA-Ebene unterschiedliche Transkripte der 5-LO in Hirntumoren und differenzierten HL60-Zellen gefunden werden [262]. Da diese Transkripte möglicherweise Einfluss auf die Karzinogenese und andere Erkrankungen haben könnten, wurden weitere Untersuchungen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene durchgeführt. Es wurde in Zellen und Gewebe die mRNA-Expression der 5-LO-Isoformen untersucht, ferner der Einfluss von Protein-Isoformen auf die 5-LO-Aktivität, getestet. Später konnten mehrere Arbeitsgruppen weitere mRNAs von 5-LO-Isoformen in unterschiedlichen Zelllinien finden [263,266,268]. Die meisten unterliegen jedoch dem NMD, da sie vorzeitige Stopcodons besitzen [267,268]. In dieser Arbeit wurden deshalb Isoformen untersucht, die nicht dem NMD unterliegen und deshalb potentielle Protein-Isoformen darstellen. Dabei handelt es sich um die 5-LO-Transkripte 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12. Die Isoform 5-LO Δ 13 konnte bisher in PMN und in wenigen Zelllinien (Raji, TA, THP-1, Reh) nachgewiesen werden [263,267].

Um die mRNA-Expression des 5-LO-WT und der Spleißvarianten in weiteren Zellen zu untersuchen, wurde die RNA mittels Trizol-Reagenz isoliert und mit Hilfe der PCR analysiert. Dafür wurden unterschiedliche B-Zelllinien wie Raji, BL41 und Rec-1 und T-Zelllinien wie MOLT-4 und Jurkat, primäre B- und T-Zellen und myeloide Zellen verwendet. Für die Detektion der Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 wurde das Primerpaar 1 (PP1) eingesetzt, welches Exon 10 bis Exon 14 umspannt (siehe Abb. 15). Die erwartete Größe der PCR-Produkte beträgt 646 bp für den WT, 574 bp für 5-LOp12 und 475 bp für die Isoform 5-LO Δ 13. Die Detektion der 5-LO Δ 4 erfolgte mittels Primerpaar 2 (PP2), das auf dem Exonübergang von Exon 3 und 5 bindet bzw. Primerpaar 3 (PP3), welches von Exon 3 bis 6 reicht. Die erwartete Größe der PCR-Produkte beträgt 455 bp für den WT und 328 bp für die Isoform 5-LO Δ 4 (PP2) bzw. 445 bp und 322 bp (PP3) (siehe Abb. 15). Als interne Kontrolle wurde β_2 M verwendet. Um die Sequenzen zu überprüfen, wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel extrahiert, anschließend entweder in den pJET1.2-Vektor kloniert oder per erneuter PCR amplifiziert. Als Kontrolle wurden die Produkte anschließend sequenziert.

Wie in Abbildung 16 A und C ersichtlich, konnte in der B-Zelllinie Raji alle Isoformen detektiert werden, in den B-Zelllinien BL-41 und Rec-1 konnten jedoch lediglich die Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 detektiert werden. In der T-Zelllinie MOLT-4 konnte wiederum nur der 5-LO-WT und in Jurkat nur sehr wenig an 5-LO-WT, 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 gefunden werden. Das Transkript 5-LOp12 konnte in keiner T-Zelllinie gefunden werden. In Abbildung 16 C sind die Ergebnisse der primären B- und T-Zellen dargestellt. Interessanterweise konnten alle Spleißvarianten sowie der WT detektiert werden. Im Gegensatz dazu enthielten die myeloiden Zellen den 5-LO-WT, 5-LO Δ 13 und 5-LOp12, jedoch keinerlei 5-LO Δ 4, wobei die Menge an Isoformen in den M1-Makrophagen nur sehr gering zu sein scheint (Abb. 17 A). Ebenso wurden mit 1 ng/mL TGF β und 50 nM Calcitriol für 3 Tage differenzierte monozytäre Zelllinien getestet, welche freundlicherweise von Dr. Kim Beilstein zur Verfügung gestellt wurden. In monozytären Zelllinien konnten die alternativen Spleißvarianten 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 detektiert werden (Abb. 17 C). In Abbildung 16 B, D und 17 B und D sind die Verhältnisse zwischen den detektierten Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4, 5-LOp12 und 5-LO-WT dargestellt. Es ist zu sehen, dass das Verhältnis zwischen Isoformen und dem WT zellspezifisch zu sein scheint. B-Zelllinien zeigen einen höheren Anteil an Isoform-Transkripten, während in T-Zelllinien das WT-Transkript deutlich überwiegt (Abb. 16 B). Eine ähnliche Verteilung wurde in den primären B- und T-Zellen beobachtet. In beiden primären Zelllinien wurde die 5-LO Δ 4 nur wenig exprimiert (Abb. 16 D). In den myeloiden Zellen konnte verhältnismäßig mehr 5-LOp12 detektiert werden als 5-LO Δ 13 (Abb. 17 B). Im Vergleich dazu wurde die Spleißvariante 5-LO Δ 13 in den B-Zelllinien Raji und Rec-1 stärker exprimiert, während in primären Zellen die Expression von 5-LOp12 und 5-LO Δ 13 nahezu gleich stark zu sein scheint. Die Quantifizierung der monozytären Zelllinien zeigt, dass in der monozytären Zelllinie HL-60 deutlich mehr Isoformen transkribiert werden, als in MM6 oder THP-1-Zellen (siehe Abb. 17 D). Die Versuche zu den Abbildung 16 und 17 C wurden in Kooperation mit Dr. Kim Beilstein und Anne Lopic durchgeführt. In Tabelle 24 ist eine Zusammenfassung der gefundenen Transkripte tabellarisch dargestellt.

Ergebnisse

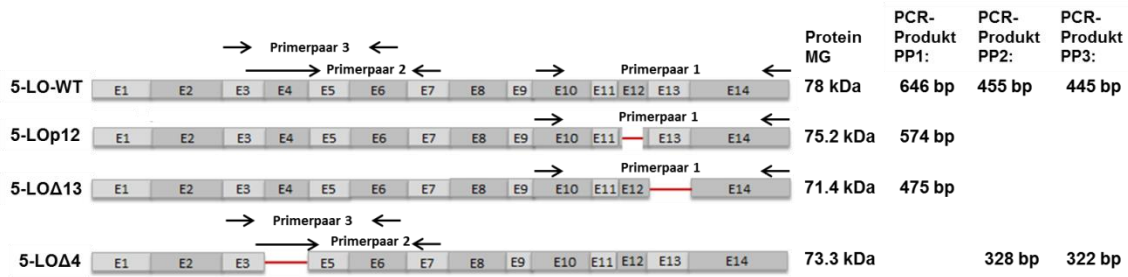


Abbildung 15: Schematische Darstellung der untersuchten Isoformen und Bindung der Primerpaare für die PCR-Analyse.

Primerpaar 1 wurde für die Detektion der Isoformen 5-LOΔ13 und 5-LOp12 verwendet. Primerpaar 2 und Primerpaar 3 diente zur Detektion der Isoform 5-LOΔ4.

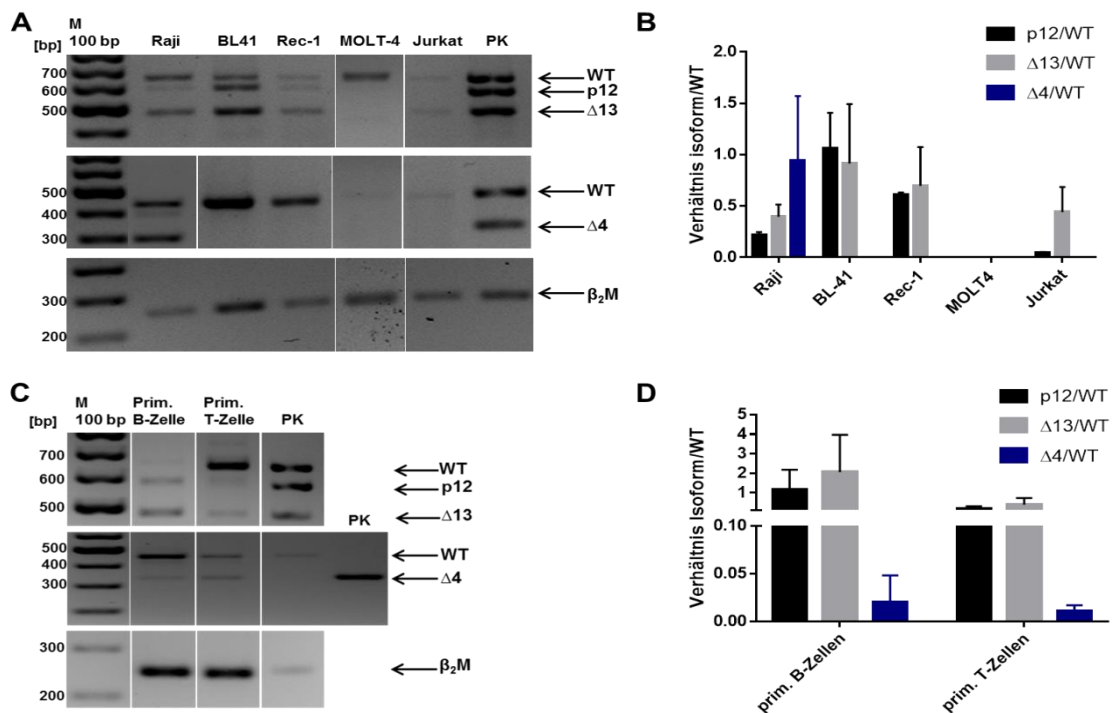


Abbildung 16: Untersuchung der Expression des 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in B- und T-Zelllinien sowie primären B- und T-Zellen.

Als Positivkontrolle wurden pcDNA3.1-5-LO-WT und pcDNA3.1-5-LOΔ13, pcDNA3.1-5-LOΔ4 und pcDNA3.1-5-LOp12 verwendet. Für die Detektion von 5-LO-WT, 5-LOΔ13 und 5-LOp12 wurde Primerpaar 1 verwendet bei einer Annealing-Temperatur von 63 °C und 32 Zyklen. Für 5-LOΔ4 wurde das Primerpaar 2 bzw. Primerpaar 3 eingesetzt bei einer Annealing-Temperatur von 61 °C und 32 Zyklen. β₂M wurde als interne Kontrolle verwendet, die Annealing-Temperatur betrug 61 °C für 22 Zyklen. Dafür wurde als Positivkontrolle das Plasmid pCMV6-XL5-β₂M verwendet. Alle PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels (2 μg/μL Ethidiumbromid) voneinander getrennt. (A) 5-LO-Expression in B- und T-Zelllinien mittels RT-PCR unter Verwendung von PP1 und PP3 (n = 3). (B) Verhältnis der Signalstärken zwischen den 5-LO-Isoformen und des 5-LO-WT in B- und T-Zelllinien (MW + SEM, n = 3). (C) 5-LO-Expression in primären B- und T-Zellen mittels RT-PCR unter Verwendung von PP1 und PP2 (n = 2-3). (D) Verhältnis der Signalstärken zwischen den 5-LO-Isoformen und des 5-LO-WT in primären B- und T-Zellen (MW + SEM, n = 2-3).

Ergebnisse

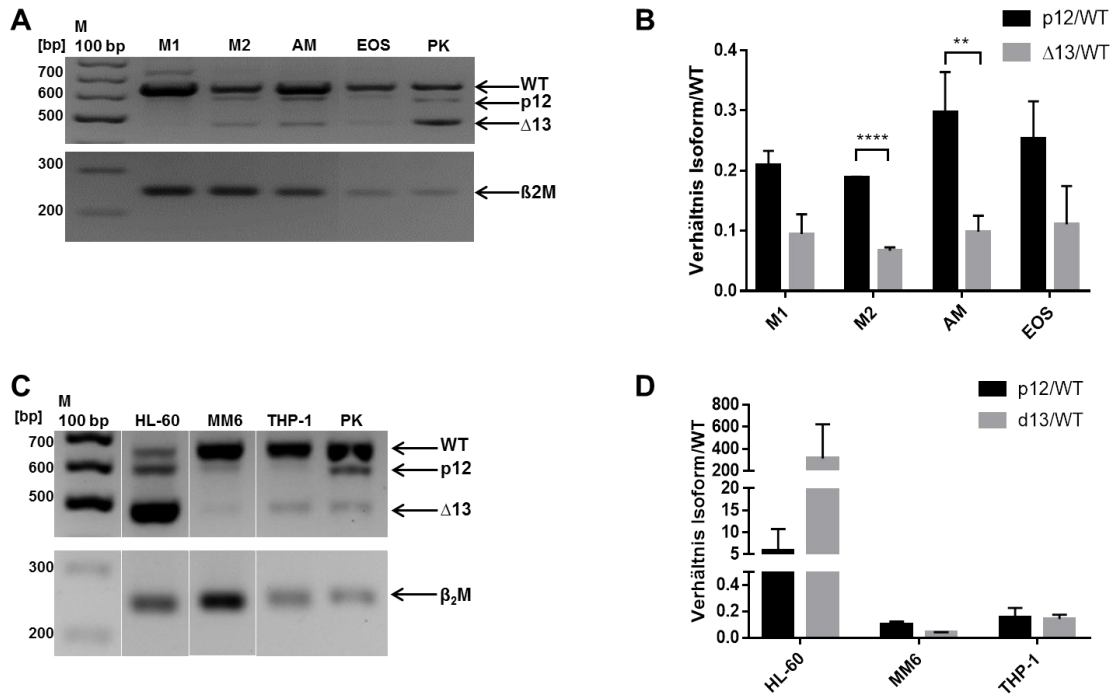


Abbildung 17: Untersuchung der Expression des 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in myeloiden Zellen sowie monozytären Zelllinien.

Als Positivkontrolle wurden pcDNA3.1-5-LO-WT und pcDNA3.1-5-LOΔ13, pcDNA3.1-5-LOΔ4 und pcDNA3.1-5-LOp12 verwendet. Für die Detektion von 5-LO-WT, 5-LOΔ13 und 5-LOp12 wurde Primerpaar 1 verwendet bei einer Annealing-Temperatur von 63 °C und 32 Zyklen. β₂M wurde als interne Kontrolle verwendet, die Annealing-Temperatur betrug 61 °C für 22 Zyklen. Dafür wurde als Positivkontrolle das Plasmid pCMV6-XL5-β₂M verwendet. Alle PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels (2 μg/μL Ethidiumbromid) voneinander getrennt. (A) 5-LO-Expression in myeloiden Zellen mittels RT-PCR unter Verwendung von PP1 (n = 3-4). (B) Verhältnis der Signalstärken zwischen den 5-LO-Isoformen und des 5-LO-WT in myeloiden Zellen (MW + SEM, n = 3-4). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines T-Tests (*unpaired, two-tailed student's t-test*) durchgeführt. $p \leq 0.01$ (**), $p < 0.0001$ (****). (C) 5-LO-Expression in differenzierten monozytären Zelllinien mittels RT-PCR unter Verwendung von PP1 (n = 3). (D) Verhältnis der Signalstärken zwischen den 5-LO-Isoformen und des 5-LO-WT in monozytären Zelllinien (MW + SEM, n = 3).

Tabelle 24: Zusammenfassung der gefundenen Transkripte in unterschiedlichen Zellen.

	5-LO Δ 13	5-LO Δ 4	5-LOp12
Raji	+	+	+
BL41	+	-	+
Rec-1	+	-	+
MOLT-4	-	-	-
Jurkat	+	-	+
Prim. B-Zellen	+	+	+
Prim. T-Zellen	+	+	+
M1	+	-	+
M2	+	-	+
AM	+	-	+
EOS	+	-	+
HL-60	+	-	+
MM6	+	-	+
THP-1	+	-	+

4.2 Detektion von 5-LO-Transkripten in primären Monozyten von Sepsis-Patienten und Patienten mit rheumatoider Arthritis

Um die 5-LO-Expression in Menschen während einer entzündlichen Immunreaktion zu untersuchen, wurden primäre Monozyten aus dem Blut von Patienten mit Sepsis und rheumatoider Arthritis (RA), jedoch auch von gesunden Personen als Kontrolle isoliert. Die Expression von sowohl 5-LO-WT als auch den 5-LO-Isoformen wurde durch eine PCR ermittelt. Auch hier wurde das Primerpaar 1 für die Detektion der Transkripte 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 verwendet und das Primerpaar 3 für die Untersuchung der 5-LO Δ 4. Die Bindung der verwendeten Primer sowie die erwarteten Größen der PCR-Produkte sind in Abbildung 15 dargestellt. Allgemein kann man sagen, dass auf mRNA-Ebene sowohl in Sepsis- als auch in RA-Patienten die 5-LO-Varianten WT, 5-LO Δ 13

und 5-LO Δ 12 exprimiert werden, die 5-LO Δ 4 konnte jedoch nicht detektiert werden. In den gesunden Probanden ist ersichtlich, dass die Konzentration der 5-LO-Transkripte deutlich geringer ist. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression densitometrisch quantifiziert (Abb. 18 B). Anhand dieser ist zu erkennen, dass die gesamte 5-LO-Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist, in den RA-Proben bis zu 6-fach bzw. in Sepsis-Proben bis zu 15-fach. Um zu überprüfen, ob die detektierten alternativen Spleißvarianten unterschiedlich stark exprimiert werden, wurde ein Verhältnis zwischen der jeweiligen Isoform und 5-LO-WT berechnet (Abb. 18 C). Dies zeigt, dass 5-LO-WT in RA-Patienten das Haupttranskript darstellt. Überraschenderweise konnte in Sepsis-Proben jedoch eine starke Induktion von 5-LO Δ 13 detektiert werden, anhand dieser Daten liegen dort 5-LO-WT und 5-LO Δ 13 zu gleichen Teilen vor.

Ergebnisse

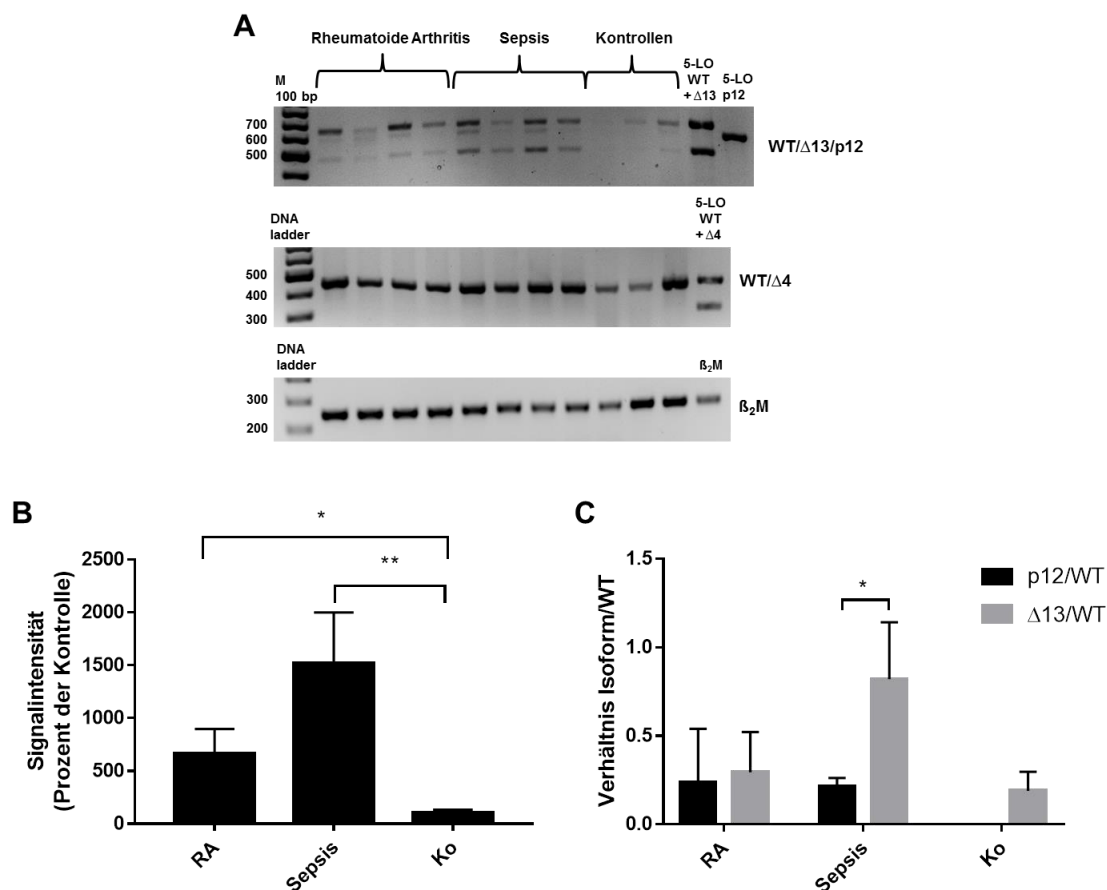


Abbildung 18: Überprüfung der Expression von 5-LO-WT und Isoformen mittels RT-PCR in primären Monozyten von Sepsis- und RA-Patienten sowie gesunden Kontrollen.

(A) 5-LO-mRNA-Expression in primären Monozyten aus Sepsis- und RA-Patienten sowie Kontrollpersonen. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines 1,5%igen Agarose-Ethidiumbromidgels aufgetrennt (n = 4-6). (B) Quantifizierung aller 5-LO-Transkripte (5-LO-WT, 5-LOΔ13, 5-LOp12). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch durch das Odyssey-Imaging-System (LI-COR Biosciences) (MW + SEM, n = 4-6). (C) Verhältnis der jeweiligen Isoform zu 5-LO-WT. (MW + SEM, n = 4-6). Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines T-Tests (*unpaired, two-tailed student's t-test*) durchgeführt. $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**).

4.3 Untersuchung der 5-LO-Produktbildung in transient transfizierten HEK293T-Zellen

Boudreau et al. untersuchten bereits die Aktivität der Isoform 5-LOΔ13 und deren Einfluss auf die Enzymaktivität des WT. Sie konnten herausfinden, dass 5-LOΔ13 enzymatisch inaktiv ist und die Produktbildung des 5-LO-WT reduziert [263]. Anhand dieser Ergebnisse wurden die folgenden Daten aufgebaut. Es wurden zusätzlich die

Ergebnisse

Isoformen 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 untersucht. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde ebenfalls die 5-LO Δ 13 mitgetestet.

Um die Produktbildung der 5-LO und der Isoformen zu überprüfen, wurden Aktivitätsassays durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert bzw. kotransfiziert. Als Plasmide dienten pcDNA3.1-5-LO-WT sowie pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4 und pcDNA3.1-5-LOp12. Pro Plasmid wurden 10 μ g eingesetzt. Die Stimulation erfolgte mit 5 μ M Ca²⁺-Ionophor A23187 und 10 μ M AA. Die Reaktion verlief 10 min bei 37 °C und wurde mit kaltem Methanol abgestoppt. Die Produktbildung wurde mittels RP-HPLC analysiert. Als Expressionskontrolle wurden Western Blots durchgeführt.

Anhand des Diagramms ist ersichtlich, dass das Ergebnis für 5-LO Δ 13 von Boudreau et al. reproduziert werden konnte. Keine der drei Isoformen war katalytisch aktiv. Außerdem führten alle Isoformen in kotransfizierten Zellen zu einer Inhibition der 5-LO-Aktivität. (Abb. 19 A). Die Expressionskontrollen in Abbildung 19 B zeigen, dass sowohl 5-LO-WT als auch die Isoformen exprimiert wurden. Da das Molekulargewicht zwischen den alternativen Spleißvarianten und dem des WT so nah beieinander liegen, war es jedoch schwierig, diese mit Hilfe des Western Blots zu trennen. Um zu untersuchen, ob die Aktivitätshemmung des 5-LO-WT durch gegenseitige Beeinflussung der Proteine in ihrer Expression hervorgerufen wird, galt es, die Proteine im Western Blot besser voneinander zu trennen.

Ergebnisse

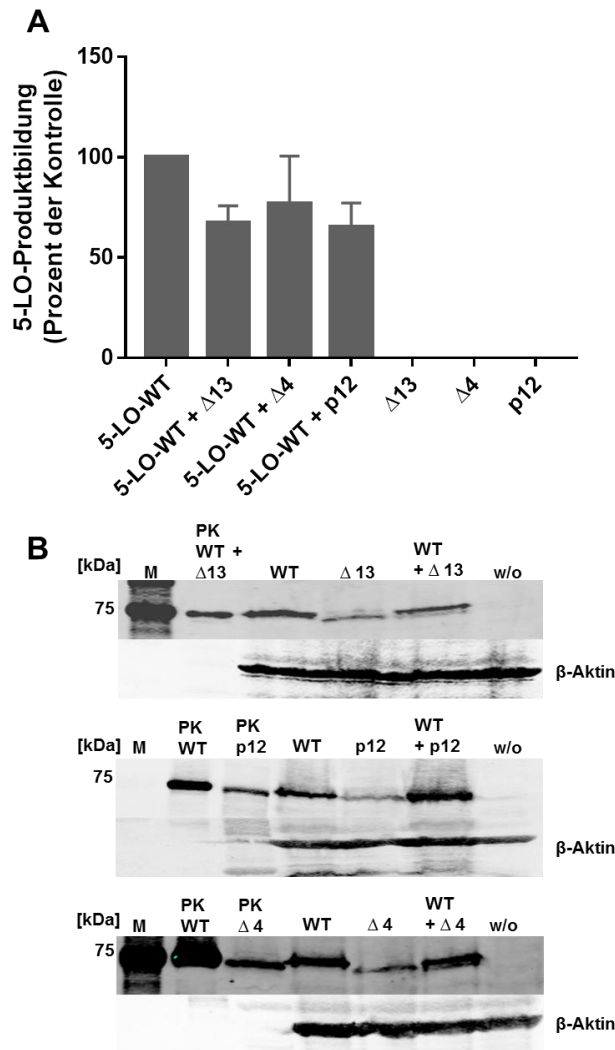


Abbildung 19: Produktbildung des 5-LO-WT und der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in transient transfizierten HEK293T-Zellen.

(A) 5×10^6 HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-5-LO-WT, pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4 und pcDNA3.1-5-LOp12 transfiziert bzw. pcDNA3.1-5-LO-WT mit jeweils einem Isoform-Plasmid kotransfiziert. Als Stimulus wurde eine Mischung aus 5 μ M Ionophor A23187 und 10 μ M AA zugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion mit kaltem Methanol gestoppt. Die Daten sind als Prozent der Kontrolle (5-LO-WT entspricht 100 %) dargestellt (MW + SEM, n = 3). (B) Zugehörige Expressionskontrolle mittels Western Blot. Als Antikörper wurde ein hauseigener monoklonaler anti-5-LO-Antikörper (Maus, 1:200). Als Beladungskontrolle diente β -Aktin.

Zur besseren Trennung der Banden in kotransfizierten Zellen wurde ein N-terminaler dreifacher FLAG-Tag in das 5-LO-WT-Plasmid kloniert, der das Molekulargewicht des WT-Proteins um 3 kDa erhöht (FLAG-5-LO). Um zu gewährleisten, dass dieser keinen Einfluss auf die Aktivität ausübt, wurden auch hier Aktivitätsassays unter den gleichen

Ergebnisse

Bedingungen durchgeführt. Ebenso wurden mittels Western Blots Expressionskontrollen angefertigt.

Es ist zu erkennen, dass die enzymatische Aktivität von 5-LO-WT und FLAG-5-LO vergleichbar war (Abb. 20 A). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von FLAG-5-LO signifikant verringert war, wenn es zusammen mit Isoformen koexprimiert wurde (Abb. 20 B). Durch den dreifachen FLAG-Tag konnte eine deutlich bessere Trennung zwischen WT und Isoform erzielt werden (Abb. 20 C). Des Weiteren sieht man, dass die Proteinmenge von FLAG-5-LO durch die Kotransfektion nicht beeinflusst wurde. Somit wurde die Inhibition der 5-LO-Aktivität weiter untersucht.

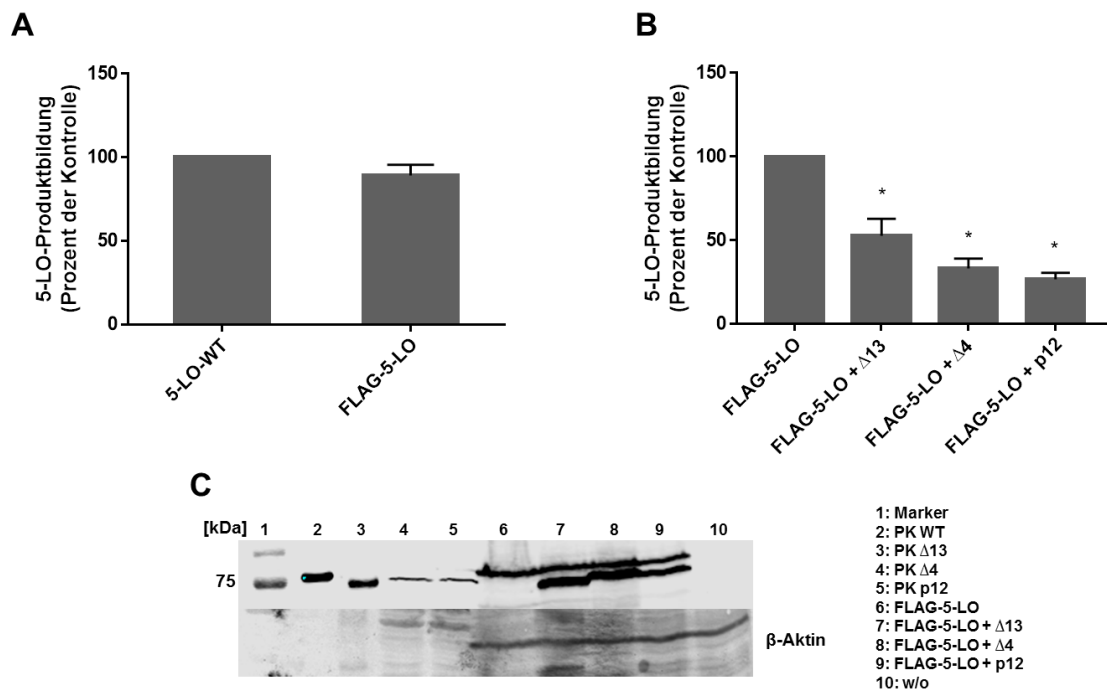


Abbildung 20: Vergleich der Aktivität zwischen 5-LO-WT und FLAG-5-LO sowie Kotransfektion von pcDNA3.1-FLAG-5-LO mit den Isoformen pcDNA3.1-5-LOΔ13, pcDNA3.1-5-LOΔ4 und pcDNA3.1-5-LOp12 in transient transfizierten HEK293T-Zellen.

5×10^6 HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-5-LO-WT und pcDNA3.1-FLAG-5-LO (A) bzw. pcDNA3.1-FLAG-5-LO mit jeweils einem Isoform-Plasmid kotransfiziert (B). Stimuliert wurde mit einer Mischung aus 5 μ M Ionophor A23187 und 10 μ M AA. Nach 10 min wurde die Reaktion mit kaltem Methanol gestoppt. Die Daten sind als Prozent der Kontrolle dargestellt (MW + SEM, n = 3). Die Signifikanz wurde mit Hilfe von GraphPad durch einen *unpaired two-tailed student's t-test* berechnet ($P \leq 0,05 = *$). (C) Zugehörige Expressionskontrolle. Als Antikörper wurde ein hausgener monoklonaler anti-5-LO-Antikörper (Maus, 1:200) sowie ein monoklonaler anti-FLAG-Antikörper eingesetzt (Sigma-Aldrich, Maus, 1:1000). Als interne Kontrolle diente β -Aktin.

4.4 Untersuchung der Lokalisation in transient transfizierten Zellen

Um die Abnahme der enzymatischen Aktivität des 5-LO-WT weiter zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Lokalisation der Proteine durch Konfokalmikroskopie analysiert. Bisher ist bekannt, dass die 5-LO abhängig der Zellart sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommen kann [32–34]. Unter anderem konnte bereits in der Zelllinie HEK293 gezeigt werden, dass die 5-LO eine nukleäre Lokalisation aufweist [264]. Um zu überprüfen, ob die 5-LO-Isoformen in demselben Zellkompartiment lokalisiert sind, wurden im folgenden Versuch Konfokaluntersuchungen durchgeführt. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit pcDNA3.1-5-LO-WT bzw. pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4, pcDNA3.1-5-LOp12 und pcDNA3.1-FLAG-5-LO mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen auf Deckgläsern überführt und dort 24 h adhären gelassen. Die Zellen wurden fixiert und anschließend permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation der Zellen über Nacht mit einem monoklonalen anti-5-LO-Antikörper (BD, 1:50). Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (anti-Maus 647, Alexa Fluor®, Thermo Fisher Scientific). Um den Zellkern zu visualisieren wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden mit einem Leica TCS SP5-Konfokalmikroskop untersucht. Es zeigte sich eine Verteilung der Proteine 5-LO-WT, 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in der gesamten Zelle, wobei der WT mehr im Kern lokalisiert war (Abb. 21). Auch wies die FLAG-5-LO dieselbe Lokalisation auf wie der WT. Eine Möglichkeit für die erniedrigte 5-LO-Aktivität könnte sein, dass die alternativen 5-LO-Isoformen mit dem 5-LO-WT interagieren bzw. kolokalisieren und es so zu einer Hemmung der Aktivität führt. Jedoch konnten nur wenige Zellen detektiert werden, bei denen die Proteine eine Färbung zeigten. Außerdem war die Färbung der Proteine durch den Sekundär-Antikörper in den Zellen nur sehr schwach, weshalb die Intensität des Lasers stark hochgesetzt werden musste und eine schnelle Entfärbung der Zellen resultierte.

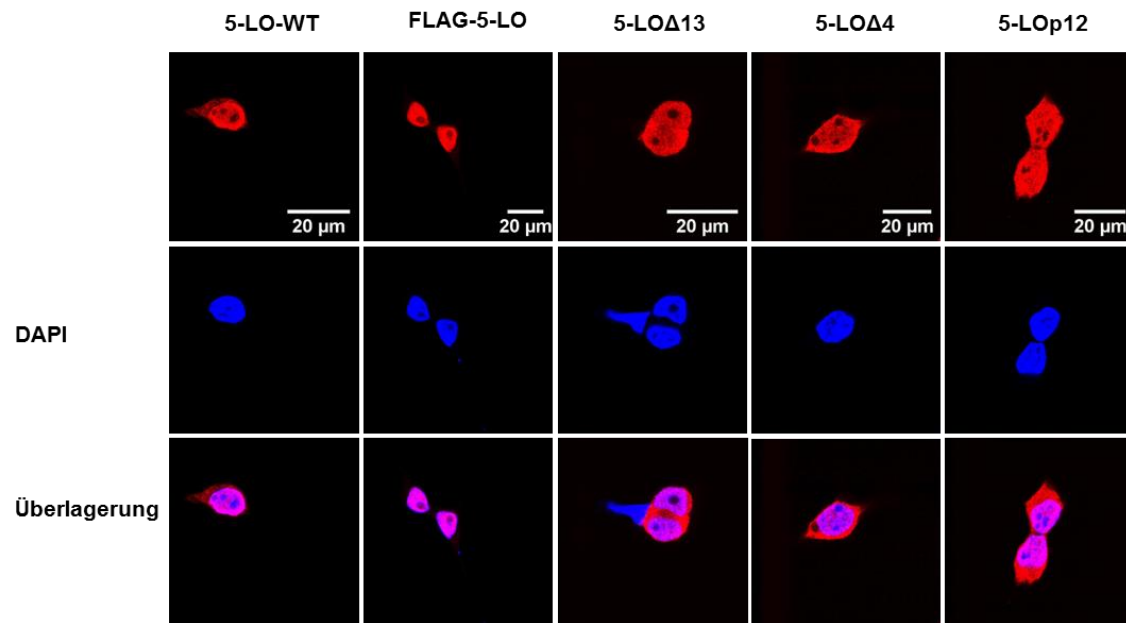


Abbildung 21: Untersuchung der Lokalisation der 5-LO und deren Isoformen in transient transfizierten HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Dafür dienten folgende Expressionsplasmide: pcDNA3.1-5-LO-WT, pcDNA3.1-FLAG-5-LO, pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4 und pcDNA3.1-5-LOp12. Nach 2 Tagen wurden die Zellen auf Deckgläser überführt und nach 24 h erfolgten eine Fixierung und eine Permeabilisierung der Zellen. Die 5-LO und die alternativen 5-LO-Isoformen wurden mit einem monoklonalen anti-5-LO-Antikörper (BD, 1:50, rot) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem sekundären anti-Maus 647-Antikörper (Alexa Fluor®, Thermo Fisher Scientific). Der Zellkern wurde mit Hilfe einer DAPI-Färbung (blau) visualisiert. Die Detektion erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5.

4.5 Untersuchung einer möglichen Interaktion/Dimerisierung zwischen 5-LO-WT und deren Isoformen

Eine Möglichkeit eine eventuelle Interaktion zwischen 5-LO-WT und deren Isoformen zu untersuchen, war die Analyse der Produktbildung nach Sonifizierung der Zellen. Durch die Ultraschall-Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Zellorganisation aufgehoben. Somit sollte die Bildung eines möglichen Hetero-Dimers nicht mehr stattfinden und die inhibierende Wirkung der 5-LO-Isoformen aufgehoben sein. Des Weiteren können die gesamten Proteine und Zellbestandteile in den Homogenaten dazu führen, dass es zu keiner Dimerisierung kommt. Für die Untersuchung der Homogenate wurden 5×10^6 transient transfizierte HEK293T-Zellen in 1 mL PBS aufgenommen und

Ergebnisse

3×10 sec auf Eis mit dem Sonifizierer homogenisiert. Die Stimulation erfolgte mit $10 \mu\text{M}$ AA für 10 min bei 37°C . Die gebildeten Metaboliten wurden über eine Festphasenextraktion aufgereinigt. Die Bestimmung der 5-LO-Produktbildung wurde mit Hilfe einer RP-HPLC durchgeführt. In Abbildung 22 A ist das Ergebnis der enzymatischen Aktivität der FLAG-5-LO in Homogenaten dargestellt. Im Vergleich zu Abbildung 20 zeigte sich interessanterweise bei der Kombination von FLAG-5-LO und 5-LO Δ 13 durch die Homogenisierung eine Wiederherstellung der 5-LO-Aktivität. Bei den anderen beiden alternativen Spleißvarianten 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 konnte weiterhin eine Hemmung der Aktivität gemessen werden. Die Expressionskontrolle zeigt, dass alle Proteine exprimiert wurden (Abb. 22 B). In kotransfizierten Zellen konnte eine leichte Abnahme der Expression von FLAG-5-LO detektiert werden, die jedoch nicht im Verhältnis zur Abnahme der Aktivität steht. Besonders in FLAG-5-LO/5-LOp12 kotransfizierten Zellen fällt auf, dass die Proteinmenge (Abb. 22 B, Linie 6) nicht mit der niedrigen Aktivität korreliert (Abb. 22 A). Da simultan mit zwei unterschiedlichen Antikörpern inkubiert wurde, wurde zur besseren Veranschaulichung die Überlagerung der beiden Antikörper in Farbe gezeigt.

Ergebnisse

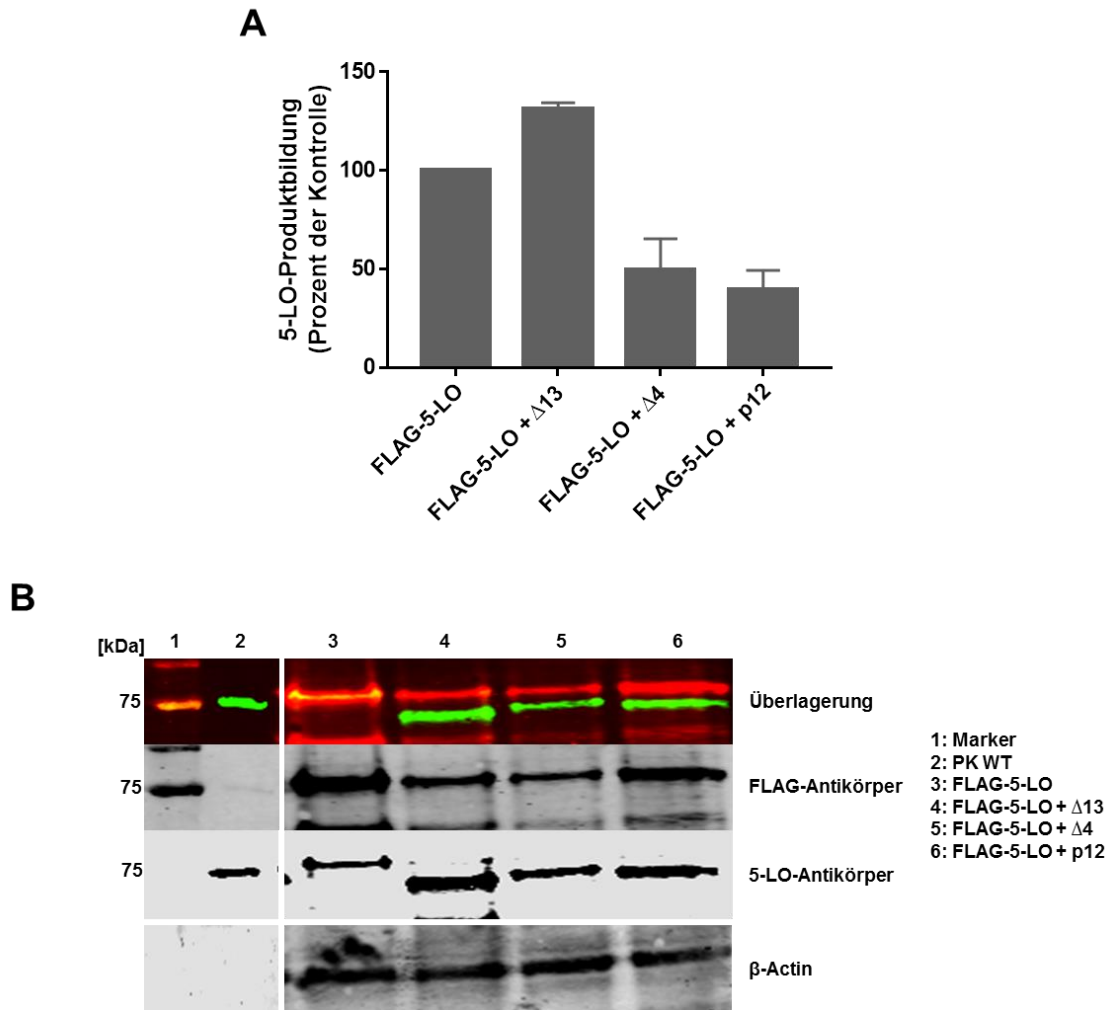


Abbildung 22: Untersuchung der Aktivität von FLAG-5-LO in Zellhomogenaten.

(A) HEK293T-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1-FLAG-5-LO transfiziert bzw. pcDNA3.1-FLAG-5-LO und den Isoformen pcDNA3.1-5-LOΔ13, pcDNA3.1-5-LOΔ4 und pcDNA3.1-5-LOp12 kotransfiziert. Die Zellen wurden 3 x 10 sec mit Ultraschall auf Eis behandelt. Die Stimulation erfolgte mit 10 μM AA 10 min bei 37 °C. Dargestellt ist die 5-LO-Produktbildung in Prozent der Kontrolle (MW + SEM, n = 3). (B) Exemplarischer Western Blot zur Darstellung der Expressionskontrolle. Es wurde simultan mit einem spezifischen FLAG-Antikörper (Sigma-Aldrich, 1:1000, rot) und mit einem anti-5-LO-Antikörper (6A12, 1:200, grün) inkubiert. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

Um eine mögliche Interaktion zwischen der 5-LO und 5-LOΔ13, 5-LOΔ4 und 5-LOp12 zu erleichtern, wurden phosphomimetische Mutanten der Isoformen hergestellt, indem die Aminosäure S523 in Asparaginsäure (D) mutiert wurde. Diese ist negativ geladen und soll somit eine Phosphorylierung imitieren. Da die Phosphorylierung an Serin 523 für eine zytosolische Lokalisation des Proteins verantwortlich ist, sollten die mutierten Isoformen im Zytosol lokalisiert vorliegen [42]. Da 5-LO-WT überwiegend im Kern

und die alternativen Spleißvarianten nach Mutation zytosolisch vorliegen sollen, sollte die inhibierende Wirkung der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität ausbleiben. Damit könnte eine mögliche Interaktion zwischen den unterschiedlichen 5-LO-Proteinen nachgewiesen werden. HEK293T-Zellen wurden transient mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Anschließend erfolgte ein Aktivitätsassay, der wie bereits beschrieben durchgeführt wurde. Für eine bessere Expressionskontrolle mittels Western Blot, wurde der Test mit der FLAG-5-LO durchgeführt. Nach Analyse der 5-LO-Produktbildung zeigte sich jedoch, dass nach der Kotransfektion von FLAG-5-LO mit den phosphomimetischen Mutanten die Erniedrigung der Aktivität weiterhin bestand (Abb. 23 A). Es war eine Inhibierung der Aktivität von um 30 % nach Kotransfektion mit 5-LO Δ 13-S523D bis zu 50 % nach Kotransfektion der FLAG-5-LO mit 5-LOp12-S523D detektierbar. Die Expressionskontrolle zeigt auch hier, dass durch Kotransfektion die Expression von FLAG-5-LO ebenso leicht beeinflusst wird (vgl. Abb. 22 B), jedoch nicht mit der Aktivitätshemmung korreliert. Somit kann die inhibierende Wirkung mit Hilfe von Aktivitätsassays nicht erklärt werden (Abb. 23 B) und bedurfte weiterer Untersuchungen.

Ergebnisse

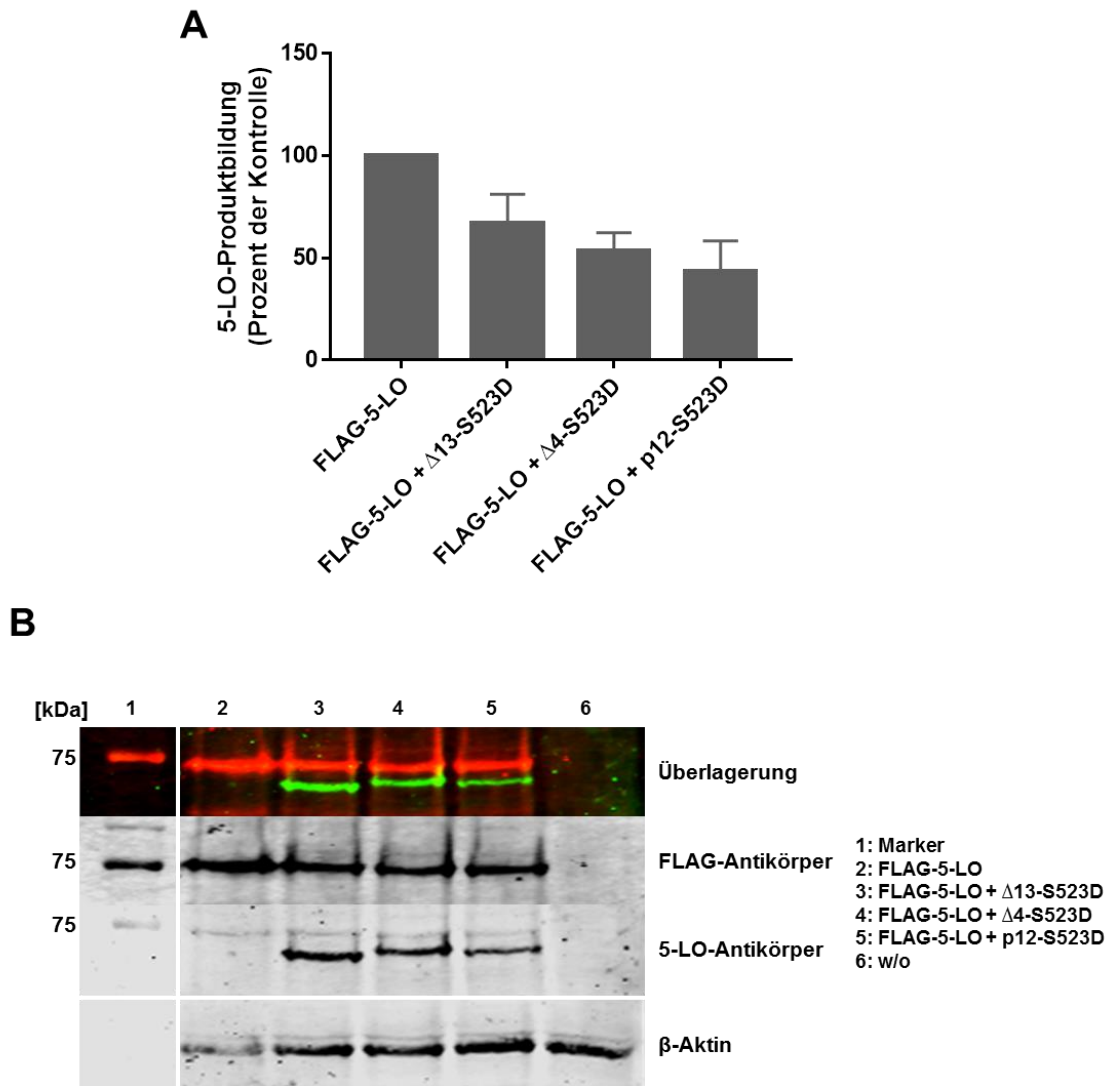


Abbildung 23: Überprüfung des Einflusses der phosphomimetischen Isoformen auf die 5-LO-Aktivität.

(A) HEK293T wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode mit FLAG-5-LO bzw. den phosphomimetischen Mutanten 5-LO Δ 13-S523D, 5-LO Δ 4-S523D und 5-LO Δ p12-S523D transient transfiziert. Für den Aktivitätsassay wurde den Zellen 1 mM CaCl₂ zugegeben und mit 5 μ M Ca²⁺-Ionophor A23187 und 10 μ M AA stimuliert. Die 5-LO-Aktivität wurde mit einer RP-HPLC analysiert (MW + SEM, n = 3). (B) Zugehörige Expressionskontrolle mittels Western Blot. Für die Detektion der FLAG-5-LO diente ein spezifischer FLAG-Antikörper (Sigma-Aldrich, 1:1000, rot). Die phosphomimetischen Isoform-Mutanten wurden mit einem monoklonalen hauseigenen anti-5-LO-Antikörper (6A12, 1:200, grün) visualisiert. β -Aktin diente als interne Beladungskontrolle.

Das Ausbleiben des gewünschten Effektes der Isoform-Mutanten wurde durch die Konfokalmikroskopie weiter überprüft. Eine Möglichkeit bestand darin, dass die Translokation der Isoformen ins Zytosol durch die Mutation nicht erzielt wurde. Um dies zu visualisieren wurden HEK293T-Zellen, wie oben beschrieben, transient

Ergebnisse

transfiziert und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Wie das Ergebnis erkennen lässt, zeigen die mutierten Isoformen anders als vermutet, keine alleinige zytosolische Lokalisation (Abb. 24). Sowohl 5-LO Δ 13-S523D als auch 5-LO Δ 4-S523D und 5-LOp12-S523D sind über die ganze Zelle verteilt. Zur besseren Veranschaulichung wurde diesmal nicht nur eine Überlagerung, sondern auch ein Kontrastbild aufgenommen. Jedoch war es auch hier erneut sehr schwierig positiv transfizierte Zellen zu finden. Zusätzlich war die Färbung durch den Sekundär-Antikörper sehr schwach, wodurch mit einer sehr hohen Laser-Intensität die Proteine visualisiert werden mussten. Außerdem waren die Ergebnisse zwischen jedem Versuch sehr schwankend, was vermutlich durch den Stress der Zellen aufgrund der transienten Transfektion und Ablösung der Zellen hervorgerufen werden könnte.

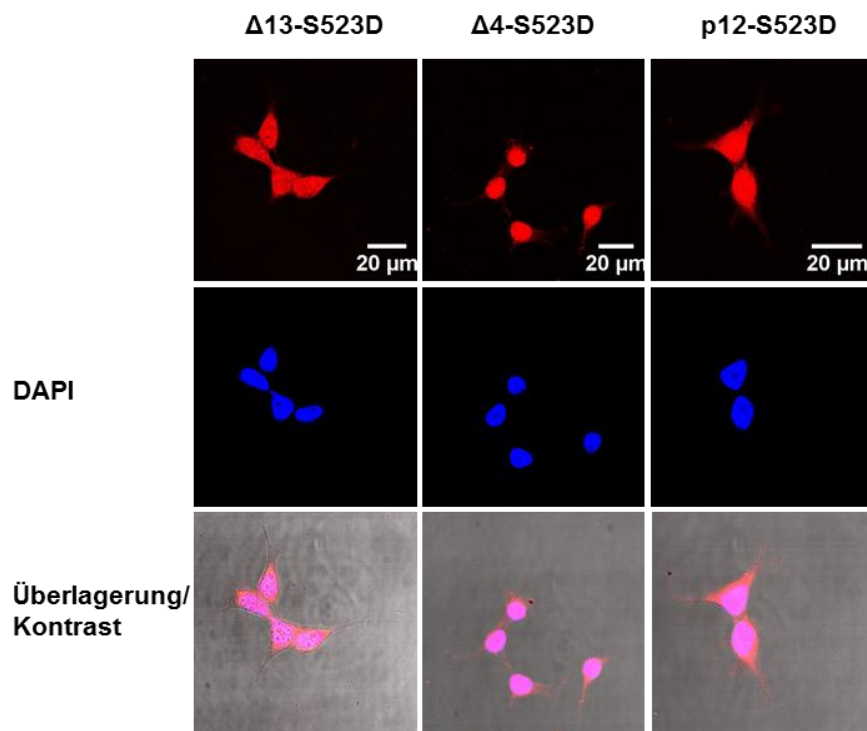


Abbildung 24: Überprüfung der Lokalisation der phosphomimetischen Isoform-Mutanten.

Mit Hilfe einer Mutagenese-PCR wurde die Aminosäure S523 der Isoformen in Asparaginsäure D umgewandelt. Die Lokalisation dieser wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. HEK293T-Zellen wurden transient mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Folgende Plasmide wurden dafür verwendet: pcDNA3.1-5-LO Δ 13-S523D pcDNA3.1-5-LO Δ 4-S523D und pcDNA3.1-5-LOp12-S523D. Die Zellen wurden nach 2 Tagen abgelöst und auf Deckgläser überführt. Nach 24 h erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, gefolgt von einer Inkubation mittels monoklonalem anti-5-LO-Antikörpers (BD, 1:50, rot) bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde mit einem Sekundär-Antikörper (anti-Maus 647, Alexa Fluor®, Thermo Fisher Scientific) 1 h bei RT inkubiert. Der Zellkern konnte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) angefärbt werden. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (Leica LCS SP5).

Die nächste Methode eine mögliche Dimerisierung zu untersuchen, lag in der Verwendung von Diamid. Häfner et al. konnten zeigen, dass die 5-LO in der Lage ist, Homodimere zu bilden [92]. Dabei wurden mehrere beteiligte Oberflächencysteine identifiziert, die im Dimerisierungsinterface liegen. [92]. Diese Dimerisierung könnte ebenfalls zwischen dem 5-LO-WT und den Isoformen stattfinden und bedurfte näherer Untersuchungen. Um dies zu analysieren, wurde Diamid (1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamid)) eingesetzt. Diamid ist in der Lage reduziertes Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) umzusetzen [273]. Es gibt bereits mehrere Untersuchungen, bei denen eine Steigerung der 5-LO-Aktivität bzw. der Produktbildung beschrieben werden konnte [52,100,274]. Anhand dieser Beobachtungen kam es zu der Hypothese, dass Diamid als eine Art Katalysator fungiert. Dabei wird das GSH an die Azogruppe des Diamids addiert und von dort anschließend auf das cysteinhaltige Protein übertragen (Abb. 25). Am rekombinanten Enzym mit anschließender Gelfiltrationsanalyse wurde bereits gezeigt, dass dann aufgrund sterischer Hinderung die 5-LO nicht mehr dimerisieren kann. Dadurch bleibt das aktive Zentrum frei zugänglich und die Aktivität wird erhöht.

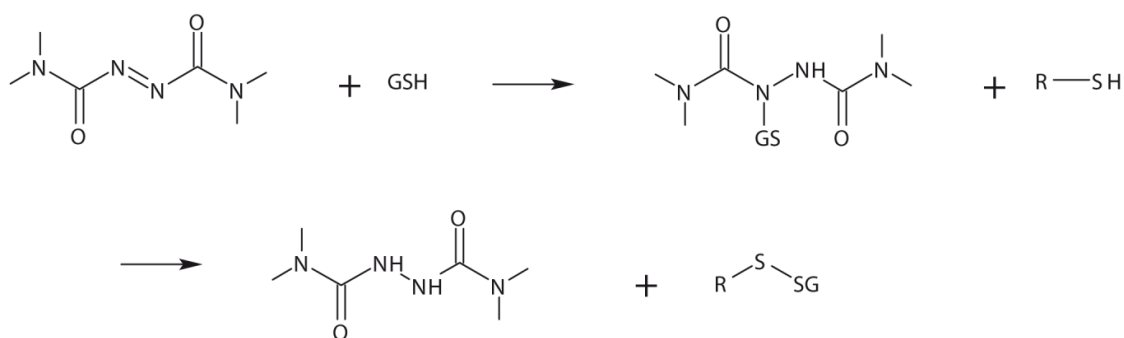


Abbildung 25: Reaktion von GSH mit cysteinhaltigen Proteinen durch Diamid.

GSH addiert sich an die Azogruppe des Diamids und wird anschließend von dort auf das Cystein (R-SH) übertragen [92].

Aufgrund dieser Theorie sollte überprüft werden, ob die Hemmung der 5-LO-Aktivität durch Kotransfektion mit den Isoformen aufgehoben werden kann. Dies könnte dann ein Hinweis auf eine Dimerisierung zwischen 5-LO-WT und den 5-LO-Isoformen sein. Dafür wurden HEK293T-Zellen durch die Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Für den Aktivitätsassay erfolgte eine Behandlung mit 1 mM Diamid für 10 min bei RT. Anschließend wurde 1 mM CaCl₂ zugesetzt und wie gewohnt mit 5 µM Ionophor A23187 und 10 µM AA stimuliert. Die Reaktion wurde nach 10 min durch

Zugabe von Methanol abgestoppt. Die Analyse der Produktbildung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt. Die HEK293T-Zellen wurden sowohl mit pcDNA3.1-5-LO-WT bzw. pcDNA3.1-FLAG-5-LO alleine als auch mit einem Plasmid jeweils einer Isoformen pcDNA3.1-5-LO Δ 13, pcDNA3.1-5-LO Δ 4 und pcDNA3.1-5-LOp12 kotransfiziert.

Bei 5-LO-WT/Isoform kotransfizierten Zellen hatte die Behandlung mit Diamid keinen Effekt (Abb. 26 A). Lediglich der 5-LO-WT alleine zeigte, wie auch in den vorigen Veröffentlichungen, eine Erhöhung der Produktbildung [52,274,275]. Anders sah es bei FLAG-5-LO/Isoform kotransfizierten Zellen aus. Dort konnte sogar eine weitere Abnahme der Produktbildung nach Diamid-Behandlung detektiert werden. Es scheint, dass Diamid einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von FLAG-getaggtter 5-LO hat und nicht wie bei 5-LO-WT einen aktivitätssteigernden Effekt (Abb. 26 B). Daraus zogen wir die Schlussfolgerung, dass der FLAG-Tag einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der 5-LO zu haben scheint und die Ergebnisse in 5-LO-WT/5-LO-Isoformen kotransfizierten Zellen mit und ohne FLAG-Tag nur bedingt vergleichbar sind. Deshalb konnten durch diese Methode keine Hinweise auf eine Dimerisierung bzw. Kolokalisation von der 5-LO und deren Isoformen gefunden werden und wurde deshalb mit anderen Methoden, wieder Konfokalmikroskopie, weiter untersucht. Ebenso lieferte die Untersuchungen zur Lokalisation durch transiente Transfektion und Detektion mittels Antikörper nur unzureichende Ergebnisse. Aus diesem Grund und aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Ergebnissen, entschieden wir, von transienten Transfektion auf stabil transfizierte Zellen zu wechseln.

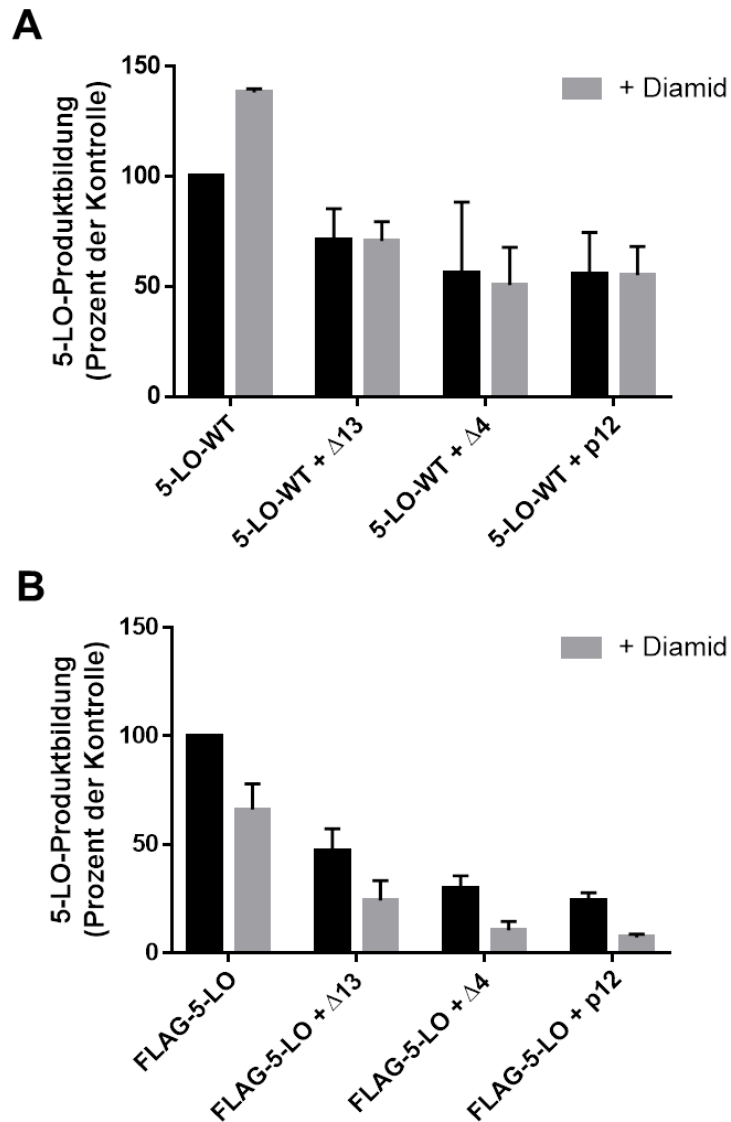


Abbildung 26: Einfluss von Diamid auf die 5-LO-Aktivität.

Für die transiente Transfektion der HEK293T-Zellen wurden die Plasmide pcDNA3.1-5-LO-WT, pcDNA3.1-5-LOΔ13, pcDNA3.1-5-LOΔ4 und pcDNA3.1-5-LOp12 (A) bzw. pcDNA3.1-FLAG-5-LO und die jeweiligen Isoformen (B) verwendet. Nach 2 Tagen wurden 5×10^6 der transfizierten Zellen geerntet. Diese wurden mit 1 mM Diamid für 10 min bei RT behandelt. Anschließend wurde 1 mM CaCl_2 zugegeben und mit 5 μM Ionophor A23187 und 10 μM AA stimuliert. Die Analyse der 5-LO-Produkte erfolgte mittels RP-HPLC (MW + SEM, n = 2-6).

4.6 Stabile Integration mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode

Da die Visualisierung der Proteine innerhalb der Zelle durch transiente Transfektion keine guten und reproduzierbaren Ergebnisse erzielte, wurde eine stabile

Transfektionsmethode gewählt. Dabei handelte es sich um die Sleeping Beauty-Methode, in der die DNA mit Hilfe der Transposase 100X genomisch integriert wird. In die entsprechenden Plasmide wurden Fluoreszenz-Tags (*green fluorescent protein* (GFP) für 5-LO-WT oder mCherry für die 5-LO-Isoformen) eingefügt, um die Proteine ohne Anfärbung mittels Antikörper darstellen zu können. Als Vektor diente ein pSBbi-Vektor, auf dem eine Puromycin-Resistenz lokalisiert ist. Als Plasmide wurden demnach pSBbi-GFP-5-LO-WT, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 verwendet. Diese wurden mit einem Plasmid, das für die Transposase kodiert, in HEK293T-Zellen durch die Calciumphosphat-Methode kotransfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte mit 2 μ g/mL Puromycin für zwei Tage. Die Selektion wurde dreimal wiederholt. Die HEK293T-Zellen, die mit einem GFP- bzw. mCherry-getaggten Protein transfiziert wurden, konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops in der Arbeitsgruppe Prof. Marschalek mit Hilfe von Dr. Alessa Kühn betrachtet werden. Da die kotransfizierten HEK293T-Zellen nicht mittels Puromycin selektioniert werden konnten, wurden diese in Kooperation mit Duran Sürün (Universitäts-Klinikum Frankfurt am Main) mittels FACS sortiert. Zunächst wurde mit Hilfe von Aktivitätsassays überprüft, ob die pSBbi-Plasmide die Ergebnisse der transienten Transfektion mit pcDNA3.1-Plasmiden reproduziert werden können. Als Vergleich wurden sowohl mit den pSBbi-Vektoren transiente als auch stabil transfizierte Zellen verwendet und miteinander verglichen. Western Blots dienen zur Expressionskontrolle. Es wurden spezifische Antikörper gegen den mCherry- bzw. den GFP-Tag verwendet. Abbildung 27 A zeigt die enzymatische Aktivität nach transienter Transfektion. Auch hier war nach der Kotransfektion von GFP-5-LO mit den mCherry-getaggten Isoformen eine Reduktion der 5-LO-Aktivität von bis zu 50 % zu erkennen. Dies deutete darauf hin, dass die Fluoreszenz-Tags bzw. der neue Vektor keinen Einfluss ausüben. Betrachtet man hingegen die Enzymaktivität der stabil transfizierten Zellen, so sieht man deutlich, dass nach Kotransfektion eine ca 2,5-fache Aktivitätssteigerung resultierte (Abb. 27 C). Bei beiden Transfektions-Methoden sind die Isoformen enzymatisch inaktiv. B und D zeigen die jeweiligen Expressionskontrollen. Diese wiesen unterschiedliche Expressionsmuster auf. In Abbildung 27 B zeigt sich, dass durch die transiente Kotransfektion mit den Isoformen die Menge an GFP-5-LO-WT abnimmt, während der Western Blot in Abbildung 27 D eine Zunahme nach stabiler Transfektion zeigt. Jedoch zeigt sich auch hier eine Zunahme der Expression der 5-LO-Isoformen. Um dies zu verdeutlichen, wurde GFP-5-

Ergebnisse

LO-WT mit Hilfe von Western Blots quantifiziert und in einem Diagramm bildlich dargestellt (Abb. 27 A und B). Die Quantifizierung der 5-LO-Expression erfolgte mittels densitometrischer Analyse mit Hilfe der Software Image Studio Lite Version 3.1. β -Aktin diente als Beladungskontrolle und wurde zur Normalisierung mit einberechnet (Abb 28). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Proteine (5-LO-WT und Isoformen) in ihrer Proteinexpression gegenseitig beeinflussen.

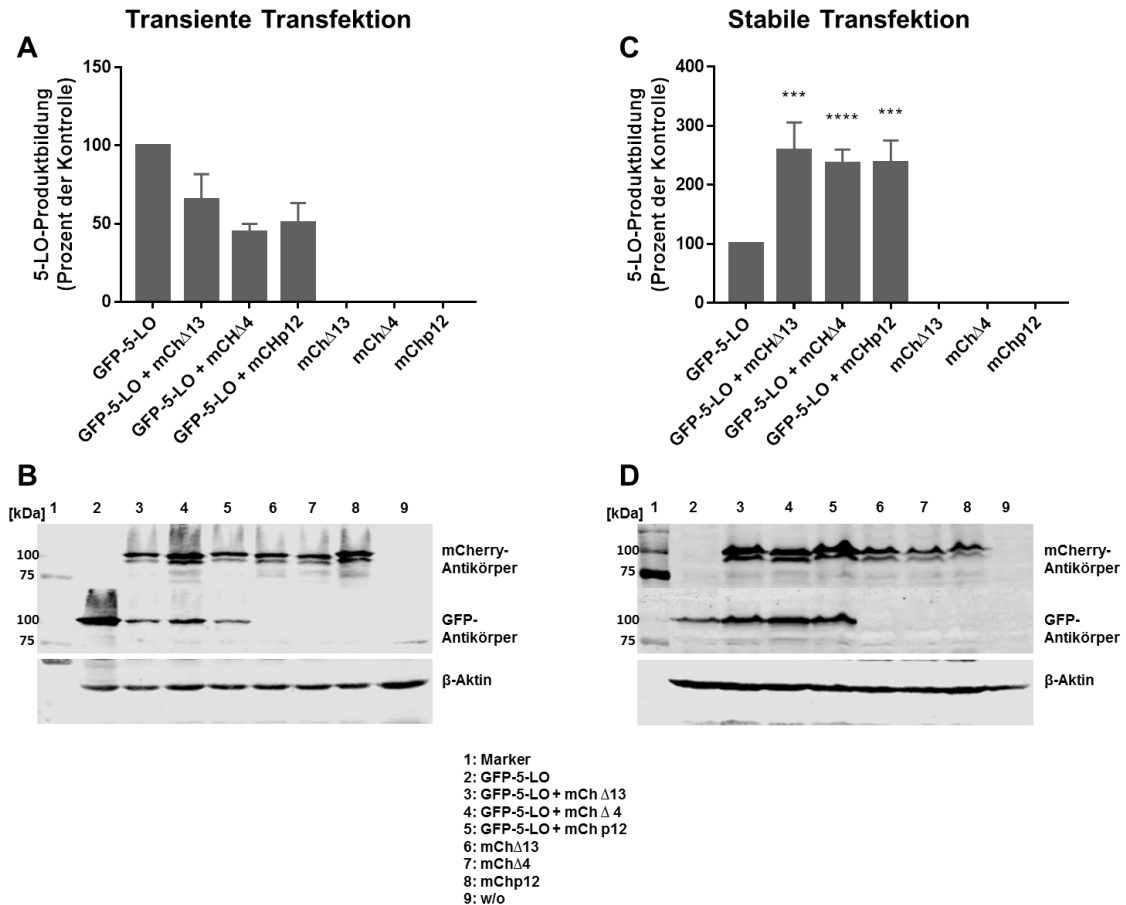


Abbildung 27: 5-LO-Produktbildung und 5-LO-Expression in transienten und stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

Die Zellen wurden mit dem Vektor pSBbi-GFP-5-LO alleine oder gemeinsam mit den Vektoren der mCherry-getaggten Isoformen transfiziert. (A) Zelluläre 5-LO-Aktivität in transient transfizierten HEK293T-Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle dargestellt (MW + SEM, n = 3). (B) Expressionskontrolle von GFP-5-LO und mCherry-getaggten Isoformen nach transienter Transfektion. (C) Zelluläre 5-LO-Aktivität in stabil transfizierten HEK293T-Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrolle dargestellt (MW + SEM, n = 3). Die Signifikanz wurde mit Hilfe von GraphPad durch einen *unpaired two-tailed student's t-test* berechnet ($P \leq 0,001 = ***$, $P \leq 0,0001 = ****$). (D) Expression von GFP-5-LO und mCherry-getaggten Isoformen nach stabiler Transfektion.

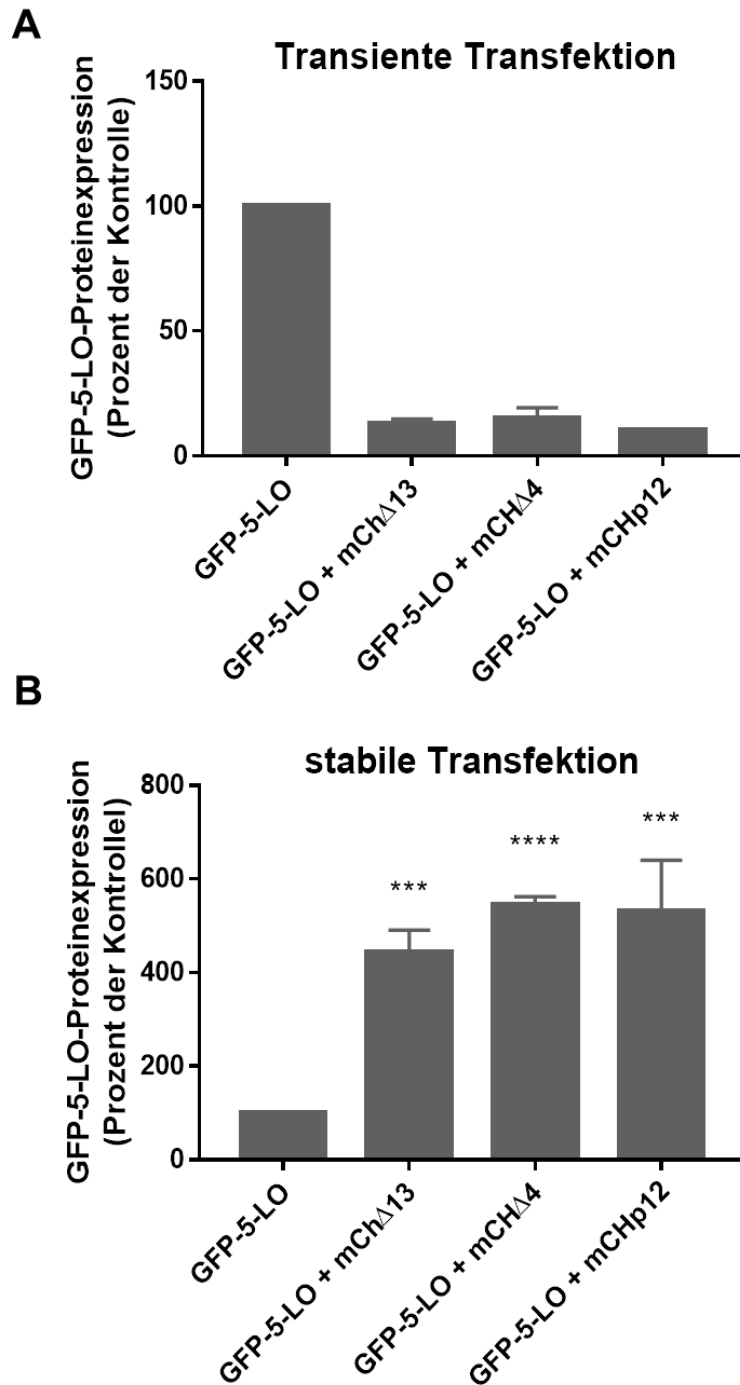


Abbildung 28: Quantifizierung der 5-LO-Expression.

Die Quantifizierung der GFP-5-LO-Expression wurde mit Hilfe eines spezifischen GFP-Antikörpers (1:1000, Santa Cruz) mittels densitometrischer Analyse (bezogen auf die jeweilige β -Aktin-Bande) durchgeführt. (A) Expression der GFP-5-LO in transient transfizierten HEK293T-Zellen (MW + SEM, $n = 3$). (B) Expression der GFP-5-LO in stabil transfizierten HEK293T-Zellen (MW + SEM, $n = 3$). Die Signifikanz wurde mit Hilfe von GraphPad durch einen *unpaired two-tailed student's t-test* berechnet ($P \leq 0,001 = **$, $P \leq 0,0001 = ****$).

4.7 Untersuchung der Lokalisation des GFP-5-LO-WT und mCherry-Isoformen in stabil transfizierten Zellen

Um die Lokalisation sowohl des GFP-getaggen 5-LO-WT als auch von mCherry-5-LO Δ 13, mCherry-5-LO Δ 4 und mCherry-5-LOp12 darzustellen, wurden Untersuchungen mittels Konfokalmikroskop durchgeführt. $1,5 \times 10^5$ stabil transfizierte HEK293T-Zellen wurden auf einem Deckglas ausgesät und nach 48 h mit dem Stimulus Ca²⁺-Ionophor (5 μ M) 10 min bei 37 °C behandelt. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen mit Formaldehyd, gefolgt von einer Visualisierung des Zellkerns mit DAPI. Die Zellen wurden mit Hilfe des Leica TCS SP5 abgebildet. Der WT ist in grün, die Isoformen in rot dargestellt. Der Nukleus ist blau gefärbt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Proteine im Kontrastmodus übereinander gelagert. Anhand der Konfokalbilder in Abbildung 29 wird deutlich, dass der WT und die Isoformennach stabiler Integration in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Während sich der 5-LO-WT überwiegend im Zellkern befindet, sind alle drei Isoformen im Zytosol lokalisiert. Auch nach Behandlung mit 5 μ M Ionophor zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten der Proteine. 5-LO-WT zeigte eine deutliche Translokation nach Stimulus-Behandlung an die Kernmembran, dies ist an einem grünen Ring rund um den Zellkern zu erkennen. Im Gegensatz dazu war keine der drei Isoformen in der Lage an die Kernmembran zu translozieren.

Ergebnisse

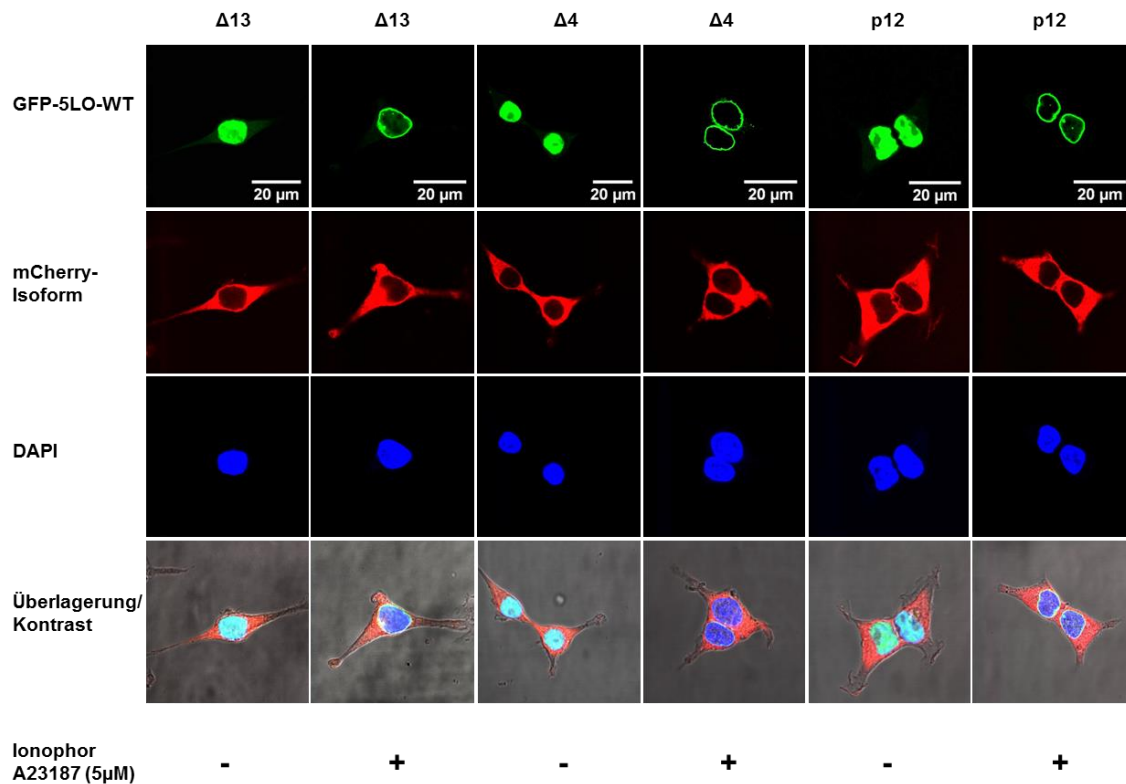


Abbildung 29: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 5 μ M Ionophor A23187 stimuliert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Zur Überprüfung, ob die Isoformen mehr Ca²⁺ benötigen um an die Kernmembran zu translozieren, wurde eine deutlich höhere Menge an Ca²⁺-Ionophor A23187 eingesetzt. Die Endkonzentration betrug diesmal 25 μ M, die Inkubation und weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie vorher beschrieben. Überraschenderweise konnte eine Veränderung der Translokation beobachtet werden. Während die beiden Isoformen 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 weiterhin keine Translokation zeigten, konnte bei der Isoform 5-LO Δ 13 eine Translokation beobachtet werden. Ebenso wie bei dem Protein 5-LO-WT, sieht man einen roten Ring um den Nukleus. Bei der Überlagerung der beiden Proteine zeigt sich der Ring in Gelb, was ebenso auf eine gleiche Lokalisation des WT und der Isoform hindeutet (Abb. 30).

Ergebnisse

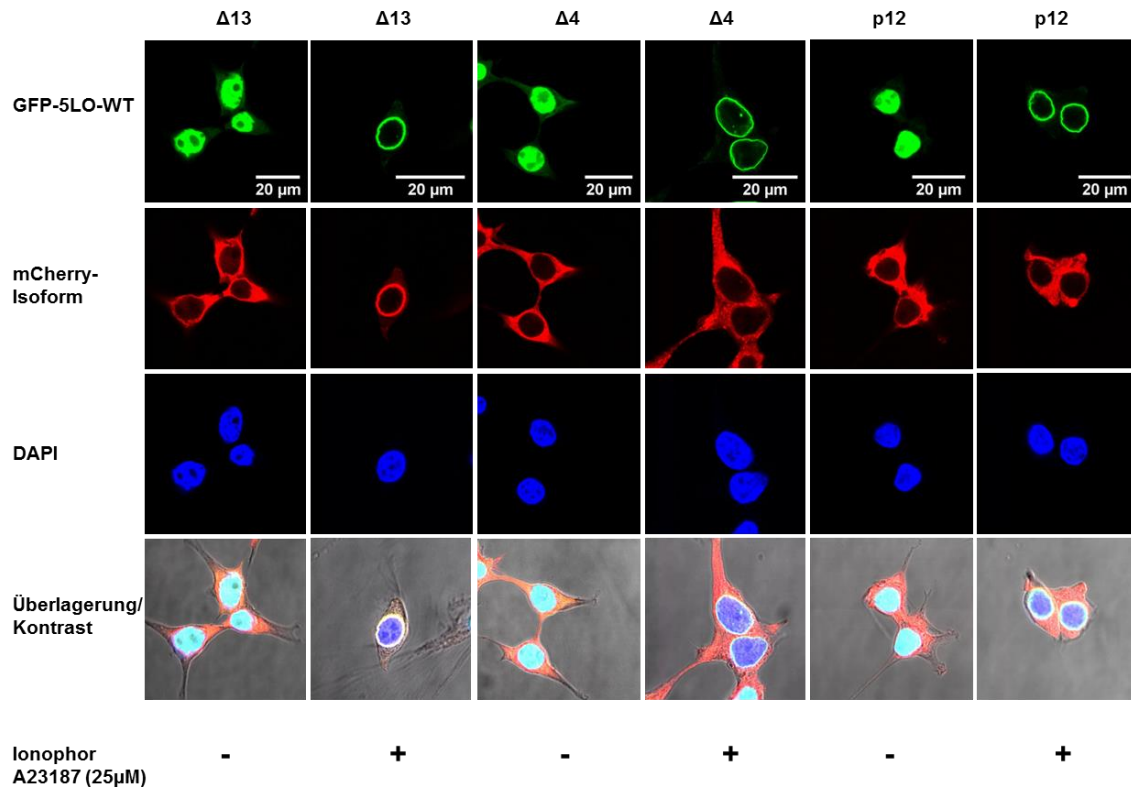


Abbildung 30: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 25 μ M Ionophor A23187 stimuliert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Um auszuschließen, dass die Translokation und auch die Lokalisation durch den GFP- bzw. mCherry-Tag beeinflusst wird, wurden HEK293T-Zellen zusätzlich mit GFP- bzw. mCherry-Konstrukten stabil integriert, die keine 5-LO exprimieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt. Es zeigt, dass sowohl GFP als auch mCherry in der gesamten Zelle verteilt vorliegen. Auch durch Stimulation mit 5 μ M Ionophor A23187 konnte keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden. Somit ist auszuschließen, dass die beiden Tags Einfluss auf das Verhalten der gefragten Proteine ausüben.

Ergebnisse

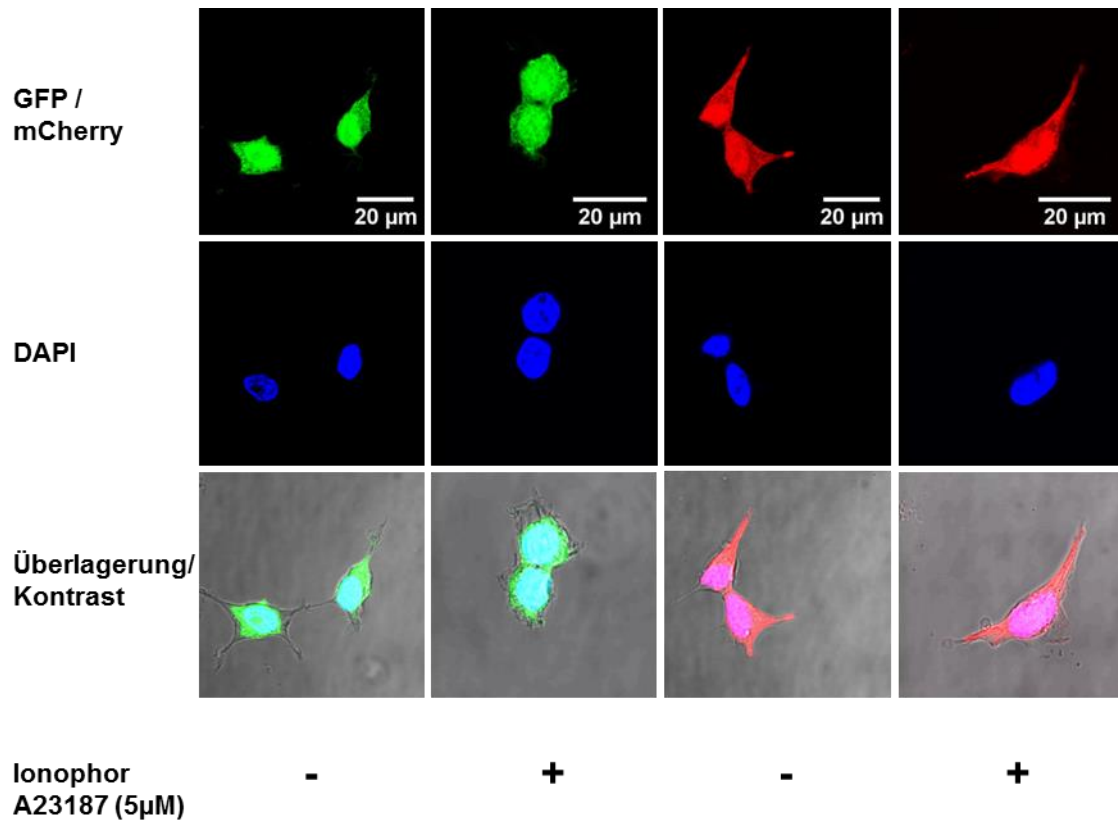


Abbildung 31: Untersuchung der Lokalisation der Proteine GFP und mCherry in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP (grün) bzw. pSBbi-mCherry (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil integriert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 5 μM Ca^{2+} -Ionophor A23187 für 10 min bei 37 °C, anschließend wurden die Zellen mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

4.8 Behandlung der Zellen zur Translokation der Isoformen in den Zellkern

Es galt, mögliche Interaktionen zwischen WT und Isoformen zu charakterisieren. Dies war nur möglich, wenn alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert waren. Dafür wurden unterschiedliche Stimuli getestet, um die 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in den Zellkern bzw. den WT aus dem Nukleus in das Zytosol translozieren zu lassen.

Zunächst wurden die Zellen oxidativem Stress durch eine Behandlung mit NaAsO_2 ausgesetzt. Anschließend kommt es zu einer Aktivierung von p38, das wiederum zu

Ergebnisse

einer Phosphorylierung an S271 führt. Wie bereits beschrieben, führt die Phosphorylierung an diesem Serin zur Translokation der 5-LO in den Zellkern [276]. Da alle Isoformen im Zytosol lokalisiert sind, sollten sie durch diese Behandlung im Nukleus zu finden sein. Es wurde eine Endkonzentration von 10 μM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 37 °C. Vor der Behandlung wurden die Zellen mit 1 mM CaCl_2 versetzt. Durch die Stimulation konnte jedoch nur bei wenigen Zellen eine Translokation der mCherry-getaggtten Isoformen beobachtet werden (Abb. 32). Da es sowohl Zellen gab, in denen die Isoform nach Behandlung im Zellkern lokalisiert war, aber auch Zellen, in denen die Isoform weiterhin im Zytosol verblieb, wurden beide Zellarten dargestellt. Mit dieser Stimulierung konnte also keine vollständige Translokation der Isoformen in den Zellkern erzielt werden. Für die Untersuchung der möglichen Interaktion musste jedoch gewährleistet sein, dass alle Zellen eine Translokation der Isoform in den Zellkern zeigen. Aus diesem Grund wurden weitere Stimuli getestet.

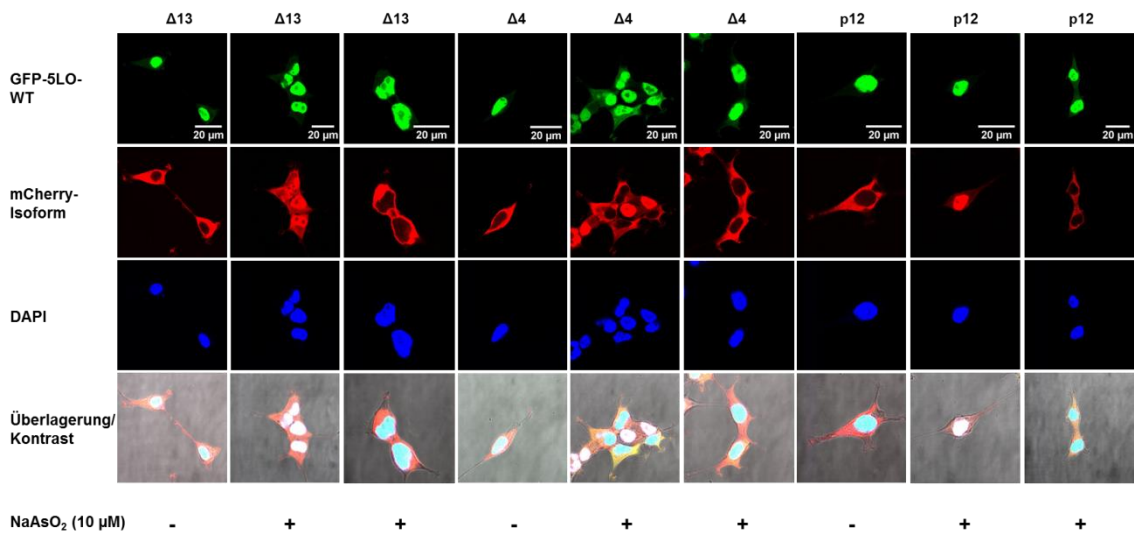


Abbildung 32: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Stressstimulus NaAsO_2 .

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO $\Delta 13$, pSBbi-mCherry-5-LO $\Delta 4$ und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil integriert. Die Zellen wurden mit 10 μM NaAsO_2 für 5 min bei 37 °C stimuliert. Nach Fixierung der Zellen mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung wurde der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops des Typs Leica TCS SP5 untersucht.

Ergebnisse

Als weiterer Stimulus für die Translokation der Isoformen in den Zellkern wurde der Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) getestet. Dieses führt zur Aktivierung von MAPKs und später ERK. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle S663, wodurch eine Translokation der 5-LO in den Nukleus begünstigt wird [43]. Die Zellen wurden mit 100 nM PMA für 10 min bei 37 °C behandelt. Die restliche Durchführung verlief wie bereits beschrieben. In Abbildung 33 wird deutlich, dass sowohl die Isoform 5-LO Δ 13 und 5-LO Δ 4 durch die Behandlung in den Nukleus translozieren können, während die alternative Spleißvariante 5-LOp12 komplett im Zytosol verblieb. Doch auch bei dieser Stimulation konnte keine 100%ige Translokation erreicht werden, weshalb in der Abbildung sowohl Zellen mit als auch ohne translozierter 5-LO Δ 13 und 5-LO Δ 4 dargestellt sind. Da bei 5-LOp12 keinerlei Translokation zu beobachten war, wurde nur eine Zelle nach Behandlung dargestellt.

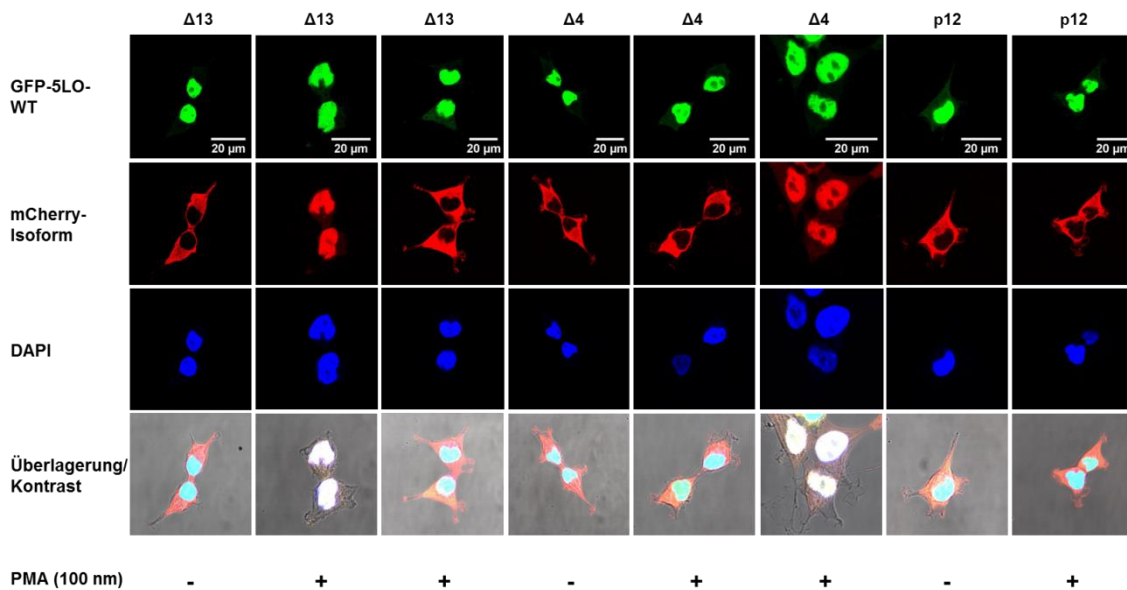


Abbildung 33: Zelluläre Lokalisation des GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten

HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem PKC-Aktivator PMA. Mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode wurden HEK293T-Zellen mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) stabil transfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 nM PMA für 10 min bei 37 °C. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Zur Darstellung der Zellen diente ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5.

Ergebnisse

Als nächstes wurde zusätzlich ein PKA-Inhibitor (H-89) verwendet. Durch Inhibition der PKA, wird die Phosphorylierungsstelle S523 nicht mehr phosphoryliert. Da diese Phosphorylierung eine Translokation durch Blockierung einer NIS in den Zellkern verhindert, sollte eine PKA-Inhibition zu einer Translokation der 5-LO in den Zellkern führen [42]. Um zu testen, ob die Verwendung sowohl eines PKA-Inhibitors und des vorher erwähnten PKC-Aktivators (PMA) zu einer verstärkten Translokation der Isoformen führt, wurden beide Stimuli simultan eingesetzt. PMA wurde wie im Experiment vorher beschrieben eingesetzt (100 nM, 5 min). H-89 wurde in einer Endkonzentration von 10 μ M den Zellen zugesetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Gegensatz zum vorigen Experiment zeigte sich diesmal eine teilweise Translokation der alternativen Spleißvariante 5-LOp12 in den Nukleus. Auch 5-LO Δ 4 war in einigen Zellen in der Lage in den Zellkern zu translozieren. Jedoch konnte 5-LO Δ 13 nur im Zytosol gefunden werden. Somit konnte auch durch die Kombination von PMA und H-89 keine ausreichende Translokation der Isoformen erzielt werden (Abb. 34).

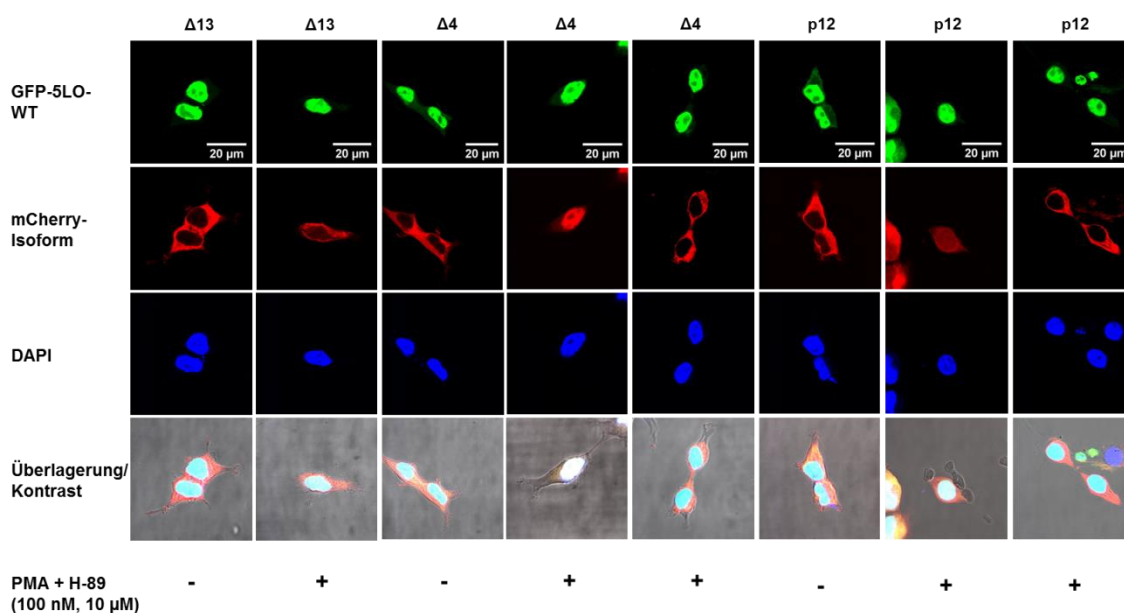


Abbildung 34: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit den Stimuli PMA und H-89.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 100 nm PMA für 10 min bei 37 °C und 10 μ M H-89 für 15 min bei 37 °C behandelt. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert und der Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Ergebnisse

Für die Translokation der Isoformen in den Zellkern wurde eine weitere Behandlung durchgeführt. Bei Staurosporin handelt es sich um einen unselektiven Inhibitor, der eine Vielzahl Kinasen hemmt, indem er die ATP-Bindung verhindert. Konzentrationsabhängig inhibiert er die PKA und aktiviert wiederum p38, weshalb es zu einer Translokation der mCherry-getaggtten alternativen 5-LO-Isoformen in den Nukleus führen sollte. In höheren Konzentrationen induziert es Apoptose, weshalb wir uns für eine geringe Konzentration von 40 nM entschieden haben. Die Inkubation wurde 1 h und 16 h bei 37 °C durchgeführt. In Abbildung 35 sind sowohl die behandelten als auch unbehandelten Zellen dargestellt. Nach Vergleich der HEK293T-Zellen konnte kein Unterschied detektiert werden. Auch hier konnte keine Translokation der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 detektiert werden. Auch eine lange Inkubationszeit von 16 h hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation. Weiterhin ist der GFP-5-LO-WT im Kern und die alternativen 5-LO-Spleißvarianten im Zytosol zu finden.

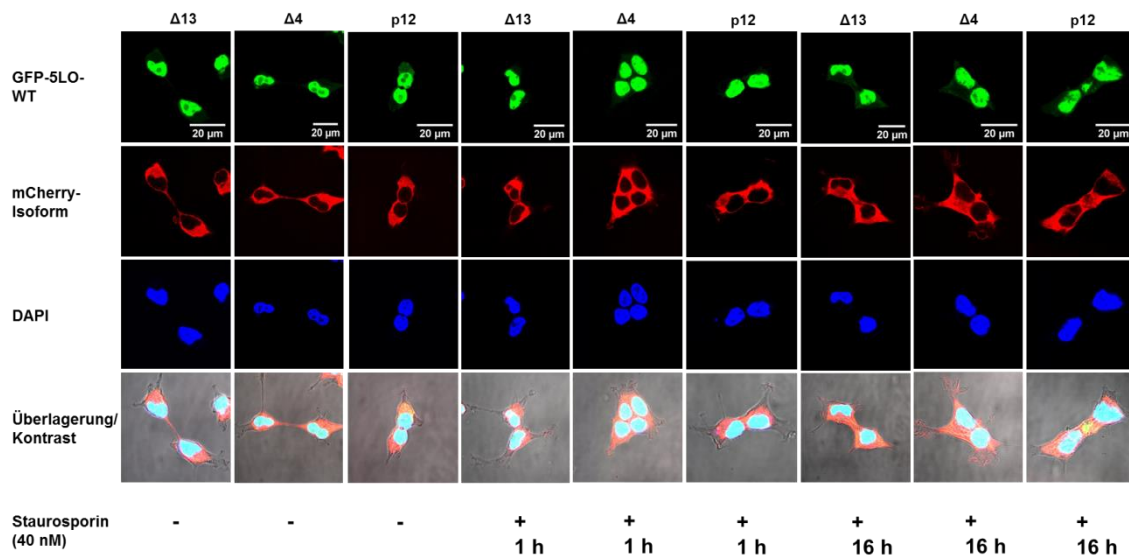


Abbildung 35: Zelluläre Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggtten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Kinase-Inhibitor Staurosporin.

HEK293T-Zellen wurden mittels der Sleeping Beauty-Methodestabil integriert. Als Plasmide wurden folgende eingesetzt: pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot). Die Zellen wurden mit 40 nM Staurosporin für 1 bzw. 16 h bei 37 °C behandelt. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Ergebnisse

Um einen Export der Isoformen aus dem Zellkern komplett zu inhibieren, wurde im folgenden Experiment ein Exportin-Inhibitor, namens Leptomycin B, eingesetzt. Leptomycin B bindet an CRM1 (Exportin 1), wodurch dieses nicht mehr an die NES eines Proteins binden kann und der Export aus dem Zellkern somit nicht mehr stattfinden kann [277]. Das Leptomycin B wurde für 2 h bei 37 °C bei einer Endkonzentration von 5 ng/mL mit den Zellen inkubiert. Nach Betrachtung der Zellen mittels Konfokalmikroskop konnte jedoch keinerlei nukleäre Lokalisation der Isoformen beobachtet werden (Abb. 36). Die Zellen und die stabil transfizierten Proteine zeigten keine Veränderung nach der Behandlung. Alle Versuche, die alternativen 5-LO-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T in den Nucleus translozieren zu lassen, blieben ohne Erfolg. Aufgrund dessen erfolgten weitere Behandlungen der Zellen mit dem Ziel, GFP-5-LO-WT in das Zytosol zu translozieren.

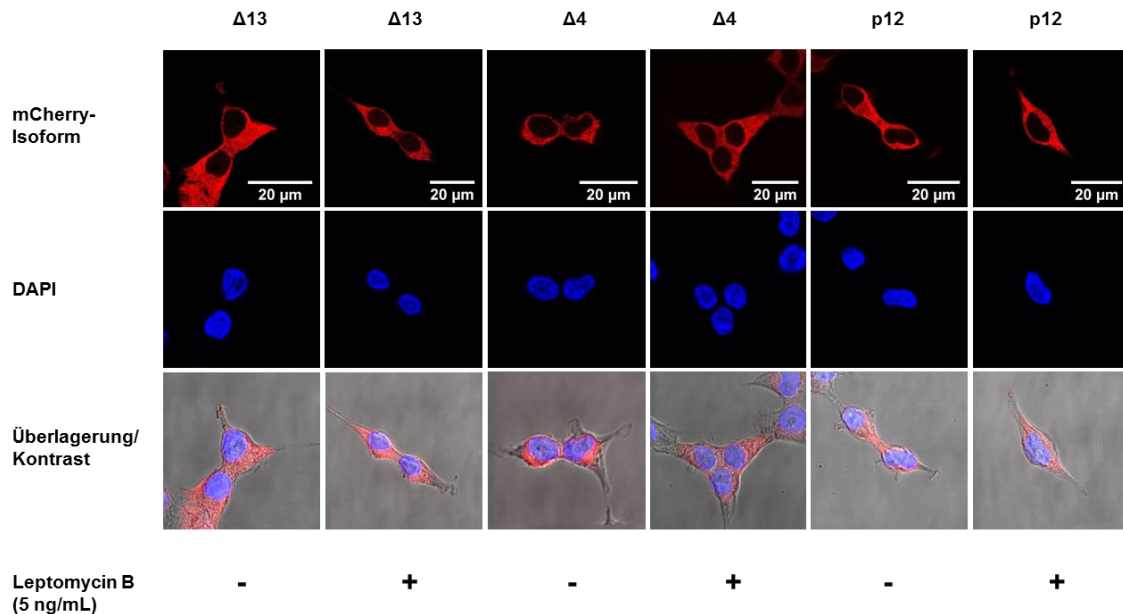


Abbildung 36: Zelluläre Lokalisation der mCherry-getaggten Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Exportin-Inhibitor Leptomycin B.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 5 ng/mL Leptomycin B für 2 h bei 37 °C behandelt. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

4.9 Behandlung der Zellen zur Translokation des GFP-5-LO-WT in das Zytosol

Da es nicht möglich war, die Isoformen in den Zellkern zu translozieren, galt es in weiteren Experimenten den 5-LO-WT aus dem Nukleus in das Zytosol wandern zu lassen. Dafür wurde zunächst ein p38-Inhibitor (SB203580) verwendet. Aufgrund der Inhibierung von p38 kann das S271 der 5-LO nicht mehr phosphoryliert werden. Daraufhin müsste das Protein nicht mehr im Nukleus, sondern im Zytosol lokalisiert sein [39]. Es wurde eine Endkonzentration von 10 μM eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Nach Untersuchungen mittels Konfokalmikroskop konnte gezeigt werden, dass GFP-5-LO-WT weiterhin im Kern verblieb (Abb. 37). Aus diesem Grund wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Lokalisation des WT zu verändern, sodass alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert sind.

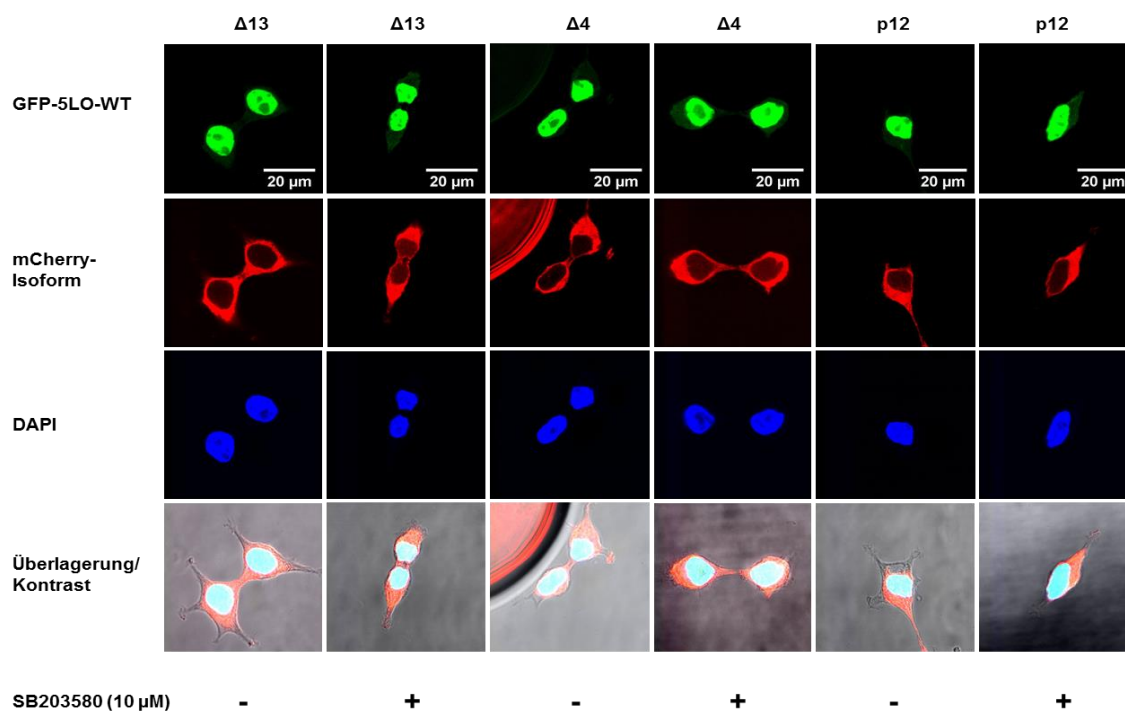


Abbildung 37: Untersuchung der zellulären Lokalisation der GFP-5-LO-WT und mCherry-getaggen Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit einem p38-Inhibitor namens SB203580.

Die Plasmide pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LO $\Delta 13$, pSBbi-mCherry-5-LO $\Delta 4$ und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) dienten zur stabilen Integration in HEK293T-Zellen mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode. Die Behandlung der Zellen wurde mit 10 μM SB203580 für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Kürzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der CaMKII (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II) und der Lokalisation bzw. Aktivierung der 5-LO gefunden werden [278]. Durch Inhibierung der CaMKII wird die Aktivierung von p38 und MAPKs unterdrückt. Dies reduziert die Phosphorylierung an S271, wodurch die Lokalisation der 5-LO von Nukleus in das Zytosol verschoben wird [278]. Um diesen Effekt auszunutzen, wurde ein CaMKII-Inhibitor (KN-93) eingesetzt. Da die simultane Verwendung des p38-Inhibitors SB203580 bereits in einer Veröffentlichung einen additiven Effekt zeigte [276], wurde auch hier die Behandlung mit beiden Inhibitoren gleichzeitig durchgeführt. Die Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 erfolgte wie bereits beschrieben. KN-93 wurde in einer Konzentration von 3 μ M für 2, 4 und 6 h bei 37 °C inkubiert. Anhand der Konfokalbilder ist zu erkennen, dass keine stabile Translokation des WT erzielt werden konnte. Nach 2 h Behandlung mit KN-93 (und 30 min SB203580) konnte sowohl zytosolischer WT als auch nukleärer WT detektiert werden. Nach 4 h war das gleiche Verhaltensmuster zu beobachten, wobei die Zellen nach 4 h deutlich gestresst aussahen. Nach 6-stündiger Inkubation konnte eine zytosolische Lokalisation des WT erkannt werden, jedoch sahen alle Zellen morphologisch stark verändert aus. Außerdem konnte eine Ablösung der Zellen beobachtet werden (Abb. 38).

Ergebnisse

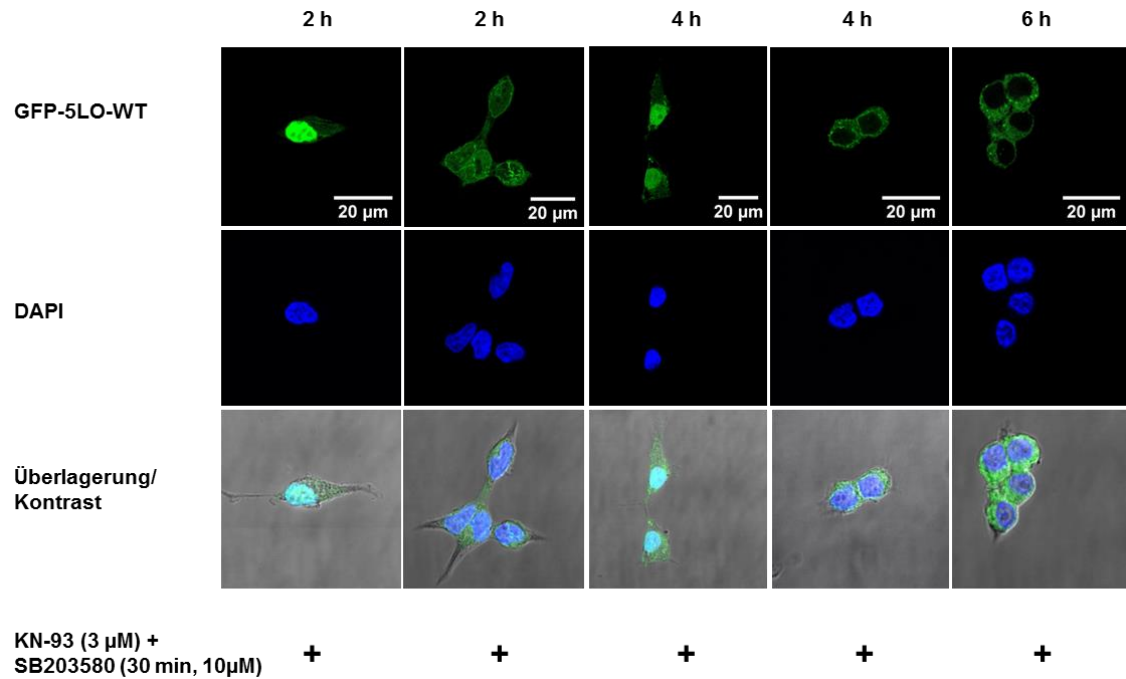


Abbildung 38: Zelluläre Lokalisation des GFP-5-LO-WT in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit einem p38-Inhibitor namens SB203580 und dem CaMKII-Inhibitor KN-93.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT(grün) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 µM SB203580 für 30 min und mit 3 µM KN-93 für 2, 4 und 6 h bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, und der Zellkern mit DAPI (blau) visualisiert. Für die Detektion der Zellen diente ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5.

Der nächste Versuch lag darin, die Zellen mit Hilfe von Stressstimuli zu behandeln, um so eine Translokation des 5-LO-WT in das Zytosol zu erreichen. Die Funktion der Phosphorylierung an S271 wird kontrovers diskutiert. Es gibt gegensätzliche Aussagen bezüglich der Lokalisation der 5-LO, wenn sie eine Phosphorylierung an S271 aufweist. Flamand et al. und andere Arbeitsgruppen konnten nach Phosphorylierung an dieser Phosphorylierungsstelle eine Lokalisation der 5-LO im Nukleus detektieren [43,45–47,276]. Im Kontrast dazu zeigten Hanaka et al., dass die 5-LO mit Hilfe von Stressstimuli (u. a. H₂O₂ oder Sorbitol) durch Aktivierung von p38 an S271 phosphoryliert wird und einen Export aus dem Zellkern begünstigt [39]. Aus diesem Grund wurde in folgendem Experiment versucht dieses Ergebnis zu reproduzieren. Dafür wurden die Zellen mit entweder 0,4 M Sorbitol für 30, 60 und 90 min oder mit 1 mM H₂O₂ für 60 und 90 min bei 37 °C inkubiert. Durch Behandlung konnte eine leichte Translokation des 5-LO-WT in das Zytosol beobachtet werden (Abb. 39). Es zeigt sich

Ergebnisse

jedoch nur eine Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle. Auch anhand der Überlagerung der Färbungen kann man sehen, dass immer noch ein bedeutender Anteil des 5-LO-WT eine nukleäre Lokalisation aufweist. Um eine stärkere Translokation zu erzielen, wurden Mutationen an sowohl den Isoformen als auch am WT vorgenommen.

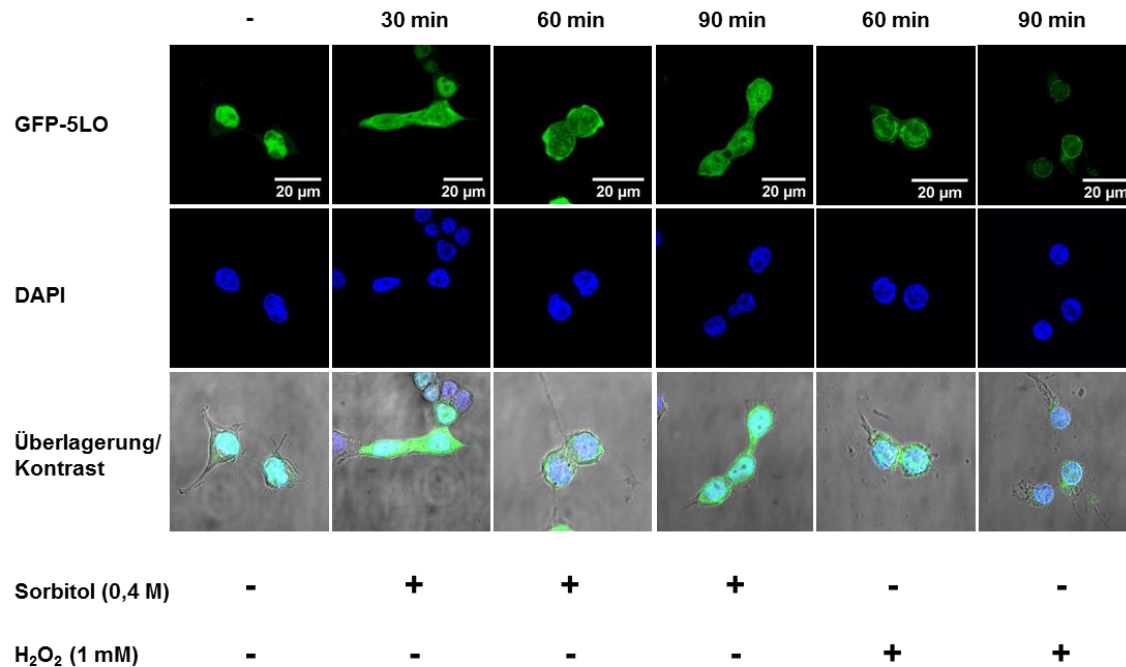


Abbildung 39: Untersuchung der Lokalisation von GFP-5-LO-WT in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit den Stressstimuli H₂O₂ und Sorbitol.

HEK293T-Zellen wurden mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün) transfiziert. Die Zellen wurden mit 0,4 M Sorbitol für 30, 60 und 90 min und mit 1 mM H₂O₂ für 60 und 90 min bei 37 °C behandelt. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert. Zur Visualisierung des Zellkerns wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Detektion der Zellen.

4.10 Mutation der mCherry-getaggten Isoformen

Da die bisherigen Behandlungen der Zellen zu keiner gewünschten Translokation der 5-LO-Isoformen in den Zellkern führten, wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt. Dabei wurde das S523 in ein Alanin (A) getauscht. Das S523 befindet sich in der NIS. Durch Phosphorylierung an diesem Serin kann das Importin nicht mehr an der NIS binden, wodurch die 5-LO nicht mehr in der Lage ist in den Nukleus zu translozieren und somit im Zytosol verbleibt [42]. Durch die Umwandlung in ein Alanin ist eine

Ergebnisse

Phosphorylierung an dieser Stelle nicht mehr möglich. Das sollte eine nukleäre Lokalisation der mutierten Isoformen begünstigen. Betrachtet man hingegen das Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie, so sieht man, dass alle Isoform-Mutanten weiterhin im Zytosol lokalisiert sind (Abb. 40). Es konnte keine Veränderung zu den unmutierten Isoformen detektiert werden.

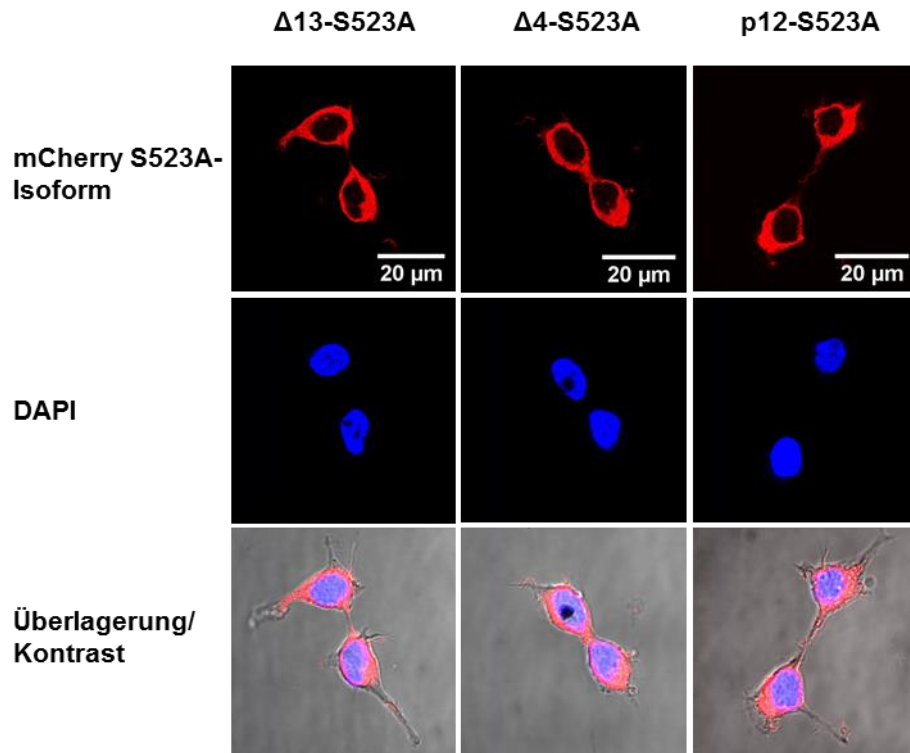


Abbildung 40: Zelluläre Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

Durch Mutagenese-PCR wurde das S271 in ein Alanin getauscht. HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13-S523A, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4-S523A und pSBbi-mCherry-5-LOp12-S523A (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil integriert. Nach Fixierung der Zellen mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung wurde der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Zur Betrachtung der Zellen diente folgendes Konfokalmikroskop: Typs Leica TCS SP5.

Da die S523A-mutierten alternativen Spleißvarianten ohne Behandlung weiterhin eine zytosolische Lokalisation aufweisen, wurden diese mit bereits getesteten Stimuli und Aktivatoren behandelt. Zunächst wurde nochmals der Exportin-Inhibitor Leptomycin B verwendet, der an das Exportin 1 binden soll. Durch diese Bindung ist es nicht mehr in der Lage an die NES-Sequenz des zu exportierenden Proteins zu binden und verbleibt somit im Nukleus. Auch hier wurde eine Konzentration von 5 ng/mL eingesetzt, die

Ergebnisse

Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Abbildung 41 zeigt, dass die Translokation der Isoformen aus dem Zellkern durch die Behandlung nicht verhindert werden kann. Die Isoformen sind weiterhin deutlich im zytosolischen Kompartiment der Zelle zu erkennen. Zwischen behandelten und unbehandelten Zellen ist keinerlei Unterschied der zellulären Lokalisation zu beobachten. Somit mussten weitere Stimuli getestet werden.

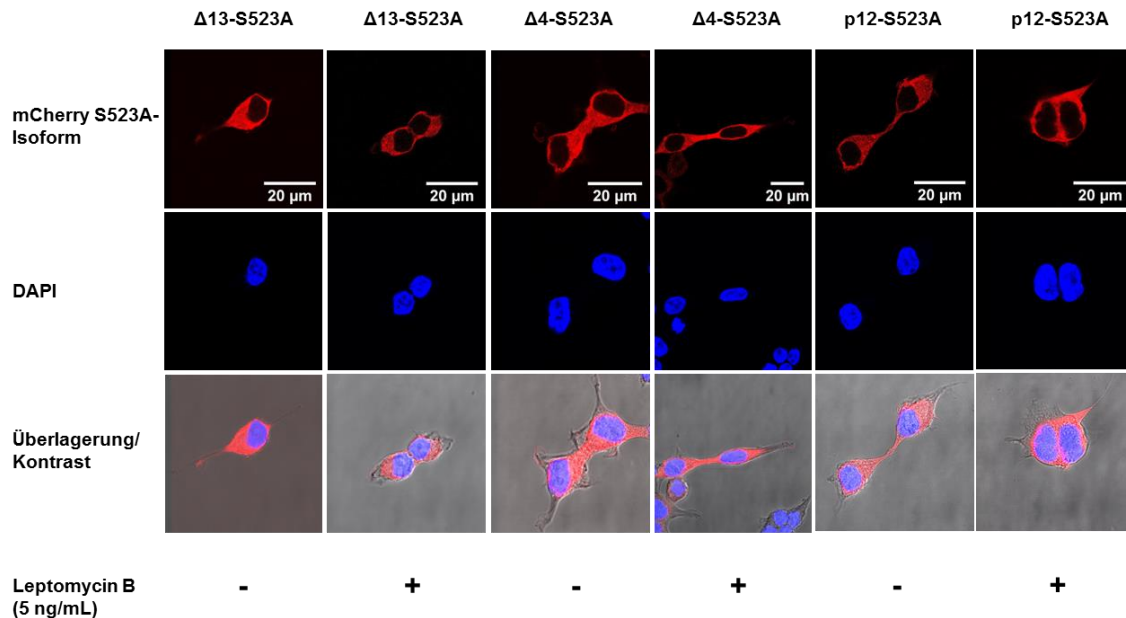


Abbildung 41: Zelluläre Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

Durch Mutagenese-PCR wurde das Serin an der Stelle 523 in ein Alanin getauscht. HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13-S523A, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4-S523A und pSBbi-mCherry-5-LOp12-S523A (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Es erfolgte eine Behandlung mit 5 ng/mL Leptomycin B für 2 h bei 37 °C. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Als weitere Stimulation wurde nochmals die Kombination eines PKA-Inhibitors und eines PKC-Aktivators eingesetzt. Als PKA-Inhibitor wurde H-89 und als PKC-Aktivator PMA verwendet. Diese wurden bereits in einem vorigen Versuch (Abb. 34) getestet. Beide Stimuli wurden simultan eingesetzt, um zu überprüfen, ob der simultane Einsatz zweier Stoffe einen additiven Effekt erzielt. Durch den PKA-Inhibitor sollte die Phosphorylierungsstelle an S523 nicht mehr phosphoryliert werden. Denn diese Phosphorylierungsstelle übt eine inhibierende Wirkung auf die 5-LO aus und führt dazu, dass die 5-LO im Zytosol verbleibt. Durch den PKC-Aktivator werden MAPKs

Ergebnisse

und wiederum ERK aktiviert und stimuliert somit die Phosphorylierung an S663. Diese fördert die Translokation der 5-LO in den Nukleus. Der PKA-Inhibitor wurde in einer Konzentration von 10 μM und der PKC-Aktivator mit einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 10 min mit PMA bzw. 15 min mit H-89. Beide wurden bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Die Detektion der Proteine ist in Abbildung 42 dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass auch durch diese Behandlung alle Isoformen eine zytosolische Lokalisation aufweisen. Auch durch die Überlagerung von DAPI und den mCherry-getaggten Isoformen machen dies deutlich. Denn wäre auch ein geringer Anteil der Isoformen in den Kern transloziert, so würde man dies anhand einer lila-Färbung des Nukleus sehen.

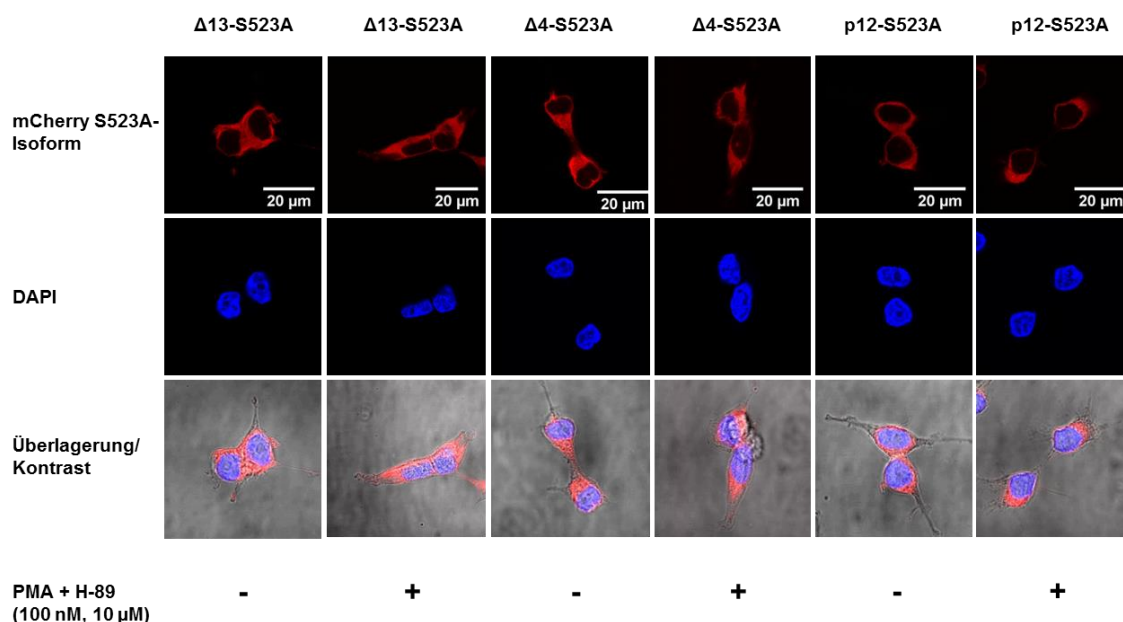


Abbildung 42: Detektion der zellulären Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Stimulation mit einem PKA-Inhibitor (H-89) und einem PKC-Aktivator (PMA).

Durch Mutagenese-PCR wurde das S523 in ein Alanin getauscht. HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13-S523A, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4-S523A und pSBbi-mCherry-5-LOp12-S523A (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Es erfolgte eine Behandlung mit 100 nm PMA für 10 min und 10 μM H-89 für 15 min bei 37 °C. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Um einen oxidativen Stress der Zellen auszulösen, wurde nochmals NaAsO₂ eingesetzt. Durch den oxidativen Stress kommt es zu einer Aktivierung von p38, welches für die

Ergebnisse

Phosphorylierung an S271 verantwortlich ist. Dieses soll die nukleäre Lokalisation der Isoformen begünstigen. Die Endkonzentration des NaAsO_2 betrug $10 \mu\text{M}$. Die Behandlung erfolgte für 5 min bei 37°C . Auch trotz dieser Behandlung konnte keine Translokation der S523A-mutierten 5-LO-Isoformen beobachtet werden (Abb. 43). Es konnte kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen detektiert werden. Aufgrund der ausbleibenden Effekte, musste eine weitere Strategie getestet werden.

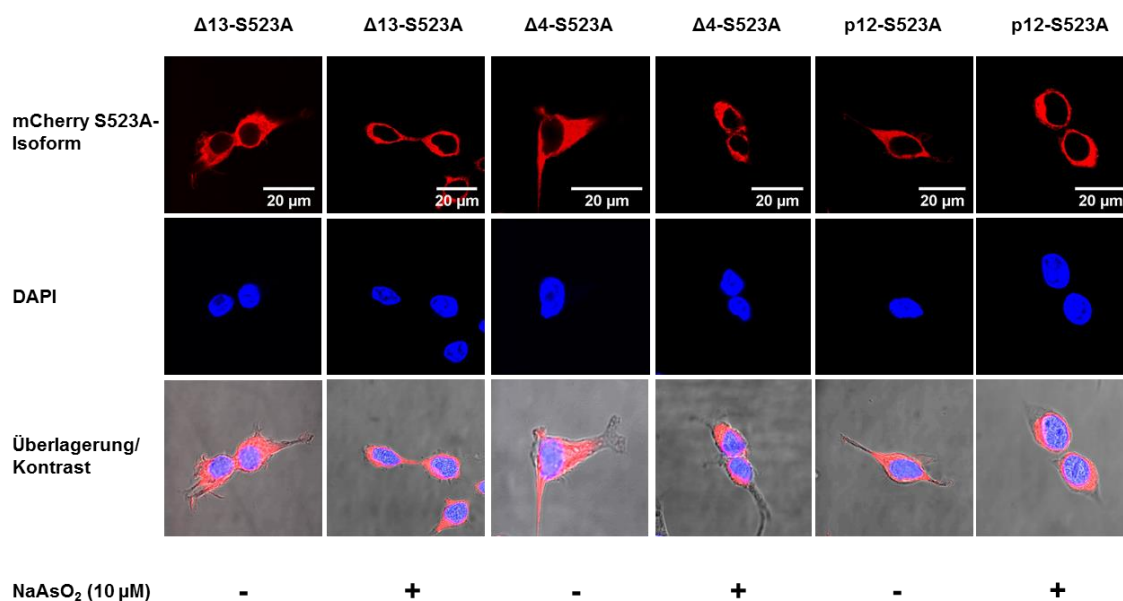


Abbildung 43: Lokalisation der mutierten mCherry-Isoformen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem Stressstimulus NaAsO_2 .

Das S523 wurde durch eine Mutagenese-PCR in ein Alanin getauscht. HEK293T-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert: pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13-S523A, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4-S523A und pSBbi-mCherry-5-LOp12-S523A (rot). Es erfolgte eine Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ NaAsO_2 für 5 min bei 37°C . Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert und der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Die Zellen wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5) betrachtet.

4.11 Untersuchung der Lokalisation der GFP-5-LO-S271A-Mutante und deren Einfluss auf die 5-LO-Isoformen

Da die Mutation der Isoformen an der Aminosäure 523 nicht den gewünschten Effekt zeigte, wurde eine weitere Mutation durchgeführt. Mittels Mutagenese-PCR erfolgte ein Austausch der Aminosäure S271 des GFP-5-LO-WT. Das Serin wurde in ein Alanin

(A) umgewandelt. Dadurch kann das Protein an dieser Stelle nicht mehr durch p38 bzw. MK2/3 phosphoryliert werden. Aufgrund dessen sollte der WT nicht mehr nukleär lokalisiert sein, sondern eine zytosolische Lokalisation aufweisen. Auch diese Mutante wurde durch das Sleeping Beauty-Verfahren stabil integriert und die Zellen mit Hilfe von Puromycin selektioniert.

Zunächst wurde mit Hilfe von Aktivitätsassays getestet, ob die 5-LO-Mutante weiterhin eine katalytische Aktivität aufweist. Dafür wurden die stabil transfizierten HEK293T-Zellen mit 5 μM Ionophor und 10 μM AA für 10 min bei 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde mit 1 mL kalten Methanol gestoppt und anschließend die entstandenen Metabolite mit einer Festphasenextraktion aufgereinigt und per HPLC analysiert. Der Vergleich der GFP-5-LO-S271A-Mutante mit dem GFP-5-LO-WT ist in Abbildung 44 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die S271A-Mutante eine vergleichbare enzymatische Aktivität aufweist wie der 5-LO-WT. Aus diesem Grund konnte mit diesem System weiter gearbeitet werden. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Lokalisation des Proteins GFP-5-LO-S271A mittels Konfokalmikroskop ohne Behandlung. Damit wurde getestet, ob die Mutante dieselbe Translokation aufweist wie der WT. Um zu testen, ob die Mutante ebenfalls nach Stimulation eine Translokation an die Kernmembran aufweist, erfolgte anschließend eine Ionophor-Zugabe von 5 μM für 10 min bei 37 °C. Durch den Ionophor A23187 erhöht sich das intrazelluläre Ca^{2+} und die 5-LO transloziert an die Kernmembran. Abbildung 45 zeigt, dass die S271A-Mutante ohne Behandlung nicht, wie eigentlich gedacht, im Zytsosol lokalisiert ist. Sie zeigt jedoch eine Verteilung in der gesamten Zelle. Dadurch ist ein Anteil der 5-LO-WT und die Isoformen im selben Zellkompartiment und es können mögliche Interaktionen untersucht werden. Nach Stimulation der Zellen mit Ca^{2+} -Ionophors A23187 translozierte GFP-5-LO-S271A an die Kernmembran und zeigte damit das gleiche Verhalten wie GFP-5-LO-WT. Somit kann dieses Protein für die weiteren Experimente verwendet werden. Auch hier ist zu erkennen, dass die Isoformen nicht an die Kernmembran translozieren. Um einen möglichen Einfluss auf die Aktivität nach Translokation der 5-LO in das Zytsosol zu untersuchen, wurde die S271A-Mutante mit weiteren Stimuli wie dem p38-Inhibitor SB203580, dem CaMKII-Inhibitor KN-93 und dem Stressstimulus Sorbitol behandelt, sodass diese komplett zytosolisch lokalisiert war.

Ergebnisse

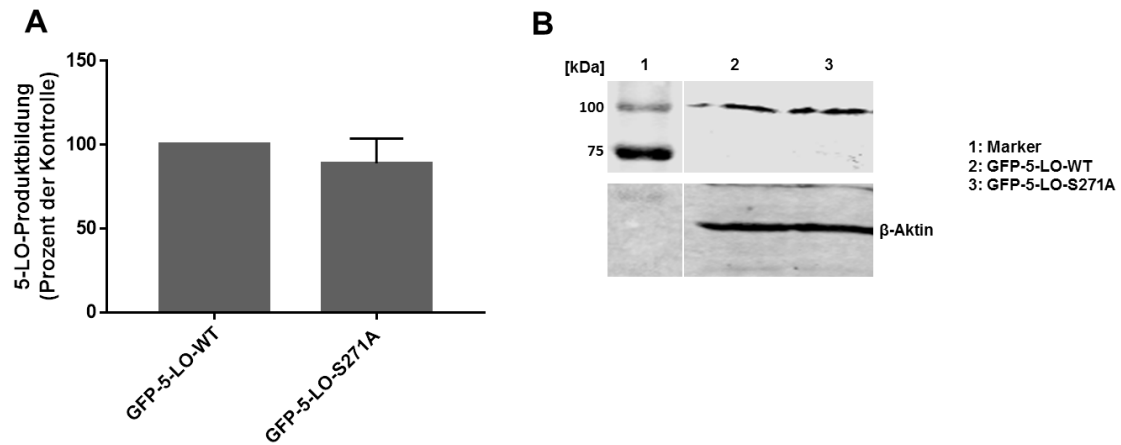


Abbildung 44: Vergleich der Aktivitäten zwischen GFP-5-LO-WT und GFP-5-LO-S271A mit Hilfe von Aktivitätsassays.

(A) HEK293T wurden mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode mit den Plasmiden pSBbi-GFP-5-LO-WT bzw. mit der Mutante pSBbi-GFP-5-LO-S271A stabil transfiziert. Für den Aktivitätsassay wurde den Zellen 1 mM CaCl_2 zugegeben und mit 5 μM Ca^{2+} -Ionophor A23187 und 10 μM AA stimuliert. Die 5-LO-Aktivität wurde mit einer RP-HPLC analysiert (MW + SEM, n = 3). (B) Expressionskontrolle von GFP-5-LO-WT und der Mutante GFP-5-LO-S271A nach stabiler Transfektion.

Ergebnisse

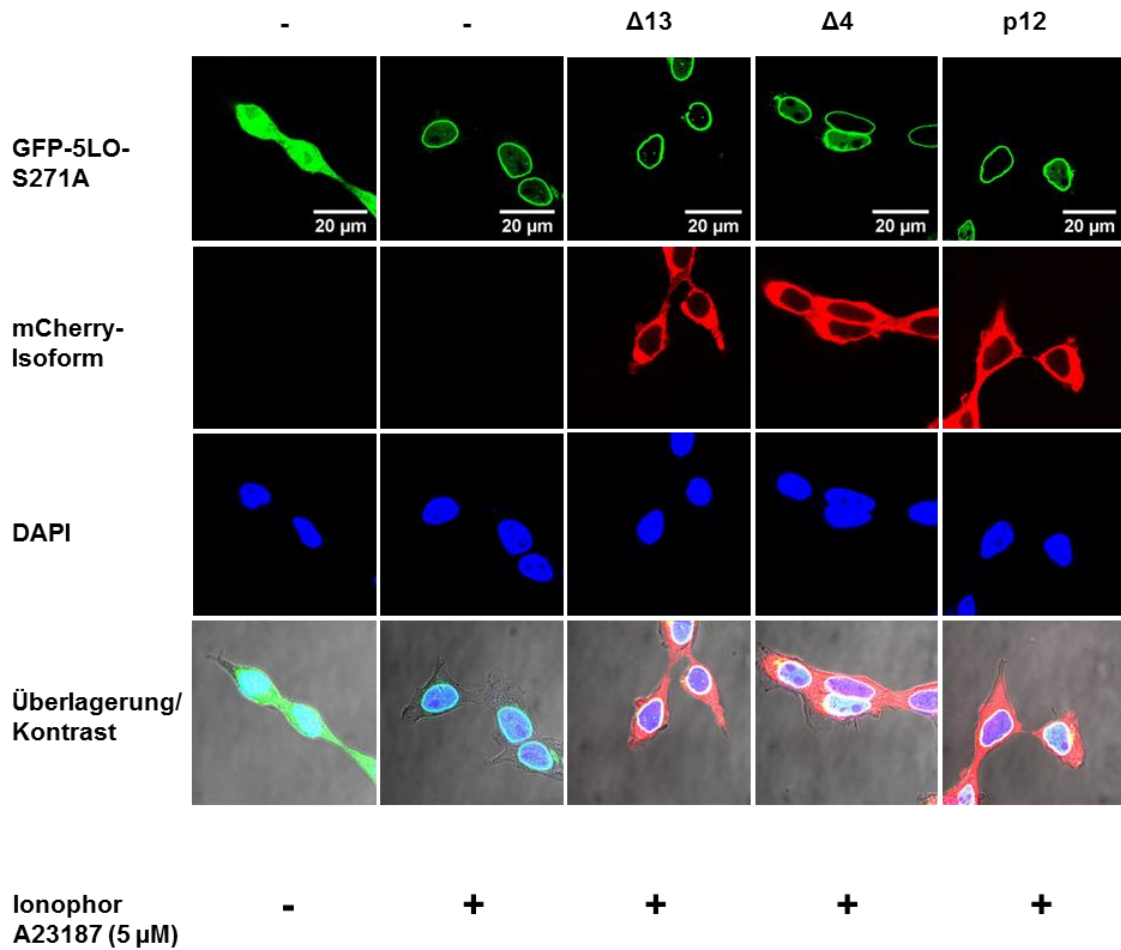


Abbildung 45: Zelluläre Lokalisation von GFP-5-LO-S271A in stabil transfizierten HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-S271A (grün) und pSBbi-mCherry-5-LO Δ 13, pSBbi-mCherry-5-LO Δ 4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil transfiziert. Die Zellen wurden mit 5 μ M Ionophor A23187 stimuliert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Ein Konfokalmikroskop des Typs Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

Die vorigen Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung des 5-LO-WT mit Sorbitol und der Kombination aus dem CaMKII- und dem p38-Inhibitor die besten Ergebnisse lieferten (Abb. 38 und 39). Somit wurde die Behandlung mit der S271A-Mutante wiederholt. Als CaMKII-Inhibitor wurde das sogenannte KN-93 eingesetzt. Es erfolgte eine Behandlung mit einer Konzentration von 3 μ M für 4 h bei 37 °C. Dies wurde in Kombination mit dem p38-Inhibitor SB203580 eingesetzt, welcher in einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Da der Stressstimulus Sorbitol ebenfalls eine leichte Translokation des WT in das Zytosol

Ergebnisse

verursachte, wurde auch diese Behandlung nochmals mit GFP-5-LO-S271A getestet. Auch hier betrug die Inkubationszeit 4 h bei 37 °C bei einer Konzentration von 0,4 M. Anhand der Fluoreszenzdaten kann man erkennen, dass die 5-LO (grün) nach der Behandlung nahezu komplett im Zytosol lokalisiert ist (Abb. 46). Somit sind alle Proteine im selben Zellkompartiment. Überlagert man die Signale der einzelnen Proteine ist dies anhand der gelben Farbe zu erkennen. Da nun das Ziel erreicht wurde, dass alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert sind, wurden mit diesen Zellen Aktivitätsassays mit denselben Behandlungen durchgeführt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob die Isoformen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der 5-LO ausüben.

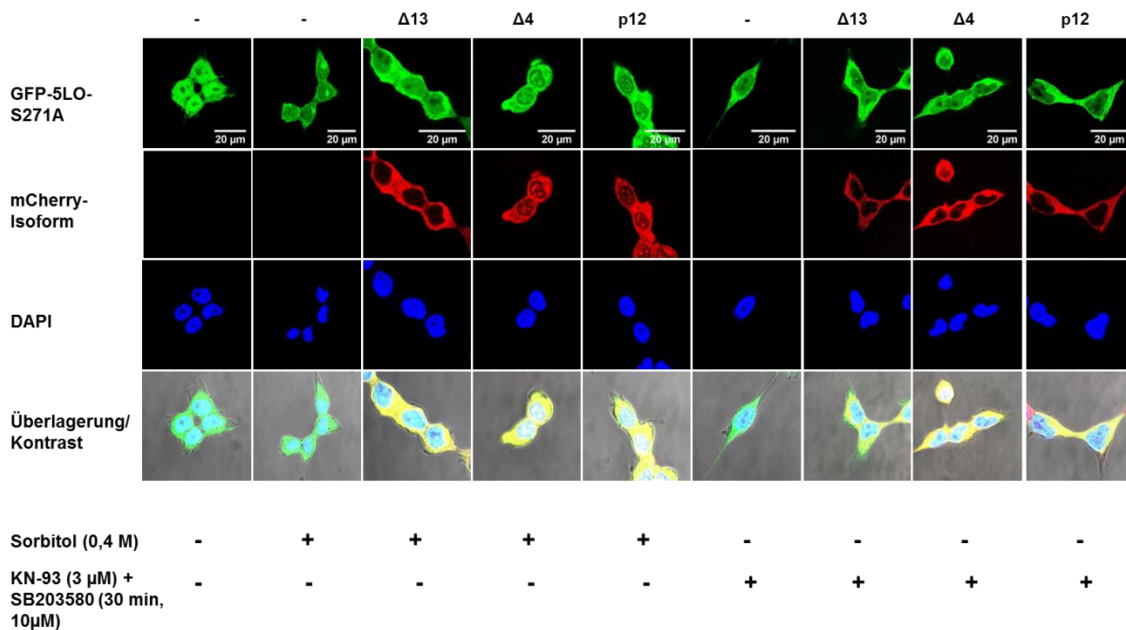


Abbildung 46: Bestimmung der zellulären Lokalisation von GFP-5-LO-S271A in stabil transfizierten HEK293T-Zellen nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 und dem CaMKII-Inhibitor KN-93.

HEK293T-Zellen wurden mit pSBbi-GFP-5-LO-WT (grün), pSBbi-mCherry-5-LOΔ13, pSBbi-mCherry-5-LOΔ4 und pSBbi-mCherry-5-LOp12 (rot) mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil integriert. Diese wurden mit 10 μM SB203580 für 30 min und mit 3 μM KN-93 für 4 h bei 37 °C stimuliert. Außerdem erfolgte eine Behandlung mit dem Stressstimulus Sorbitol für 4 h mit einer Konzentration von 0,4 M. Die Zellen wurden mit einer 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert, gefolgt von einer Färbung des Zellkerns mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau). Das Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 diente zur Visualisierung der Zellen.

4.12 Untersuchung der 5-LO-Aktivität der 5-LO-S271A-Mutante

Die Aktivitätsuntersuchungen dienten dazu, einen möglichen Einfluss der alternativen Spleißvarianten 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 auf die enzymatische Aktivität der 5-LO zu untersuchen. Mit Hilfe von Sorbitol und einer Kombination aus KN-93 und SB203580 war es möglich, die GFP-5-LO-S271A-Mutante aus dem Kern in das Zytosol translozieren zu lassen. Anhand von Ionophor-Behandlungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Isoformen keinen Einfluss auf die Translokation der 5-LO an die Kernmembran ausüben. Deshalb galt es nun, die Produktbildung der stabil integrierten S271A-Mutante mit und ohne Behandlung und in An- und Abwesenheit der Isoformen zu untersuchen. Dafür wurden 5×10^6 stabil integrierte Zellen geerntet und mit 1 mM CaCl₂ versetzt. Anschließend wurde mit folgenden Stimuli behandelt: CaMKII-Inhibitor KN-93, p38-Inhibitor SB203580 und Sorbitol, um einen osmotischen Stress der Zelle hervorzurufen. Die Zellen wurden mit Sorbitol und KN-93 für 4 h und mit SB203580 für 30 min in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von AA und Ca-Ionophor A23187 (5 μ M und 10 μ M) für 10 min. Die Reaktion wurde mit kaltem Methanol gestoppt. Die Metaboliten wurden mit Hilfe einer Festphasenextraktion aufgereinigt und mittels HPLC analysiert. Als Ergebnis ist die Menge an 5-LO-Produkte (ng) pro 1×10^6 Zellen dargestellt. Abbildung 33 A stellt die Ergebnisse der unbehandelten und mit KN-93/SB203580 oder Sorbitol behandelten Zellen dar. Das Ergebnis in Abbildung 47 A (links) der unbehandelten Zellen zeigt einen leichten Anstieg der Produktbildung der 5-LO-Aktivität in koexprimierenden Zellen. Die Menge der gebildeten Produkte liegt zwischen 600 und 800 ng/ 10^6 Zellen. Dasselbe Verhaltensmuster ist auch nach der Behandlung mit KN-93/SB203580 zu erkennen. Auch hier ist eine minimale Erhöhung der Aktivität zu sehen. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen hat die enzymatische Aktivität jedoch insgesamt stark abgenommen. Die Produktbildung liegt lediglich zwischen 40 bis 70 ng/ 10^6 Zellen. Nach Zugabe von Sorbitol ist der Anstieg der 5-LO-Aktivität bei den koexprimierenden Zellen etwas höher als bei den unbehandelten bzw. den KN-93/SB2003580-behandelten Zellen. Jedoch ist auch hier die erhöhte Produktbildung lediglich bei der Koexpression von GFP-5-LO-S271A und der Isoform mCherry Δ 4 gering signifikant (*unpaired two-tailed student's t-test*, P-value: GFP-5-LO-S271A + mCherry Δ 4: 0,0499). Die Menge der 5-LO-Produkte liegt hier zwischen 180 bis 380 ng/ 10^6 Zellen. Abbildung 47 B zeigt die Quantifizierung der Expressionskontrolle. Diese wurde densitometrisch mit Hilfe

Ergebnisse

von Western Blots über die Software Imaging Studio Lite durchgeführt und auf β -Aktin normiert. GFP-5-LO und die mCherry-getaggten Isoformen wurden mit spezifischen GFP- bzw. mCherry-Antikörpern visualisiert. Außerdem ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt (Abb. 33 C). Beide zeigen, dass die Proteinmenge der GFP-5-LO-S271A ansteigt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Zunahme der Aktivität der 5-LO-Mutante in den Aktivitätsassays in Abbildung A. Anhand dieser Ergebnisse kann man daraus schließen, dass die 5-LO-Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 die enzymatische Aktivität der 5-LO auch dann nicht beeinflussen, wenn die Proteine im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind. Jedoch wird weiterhin (wie in den Abbildungen 27 und 28 vorher schon ersichtlich war) die Expression des 5-LO-WT durch Kotransfektion hochreguliert.

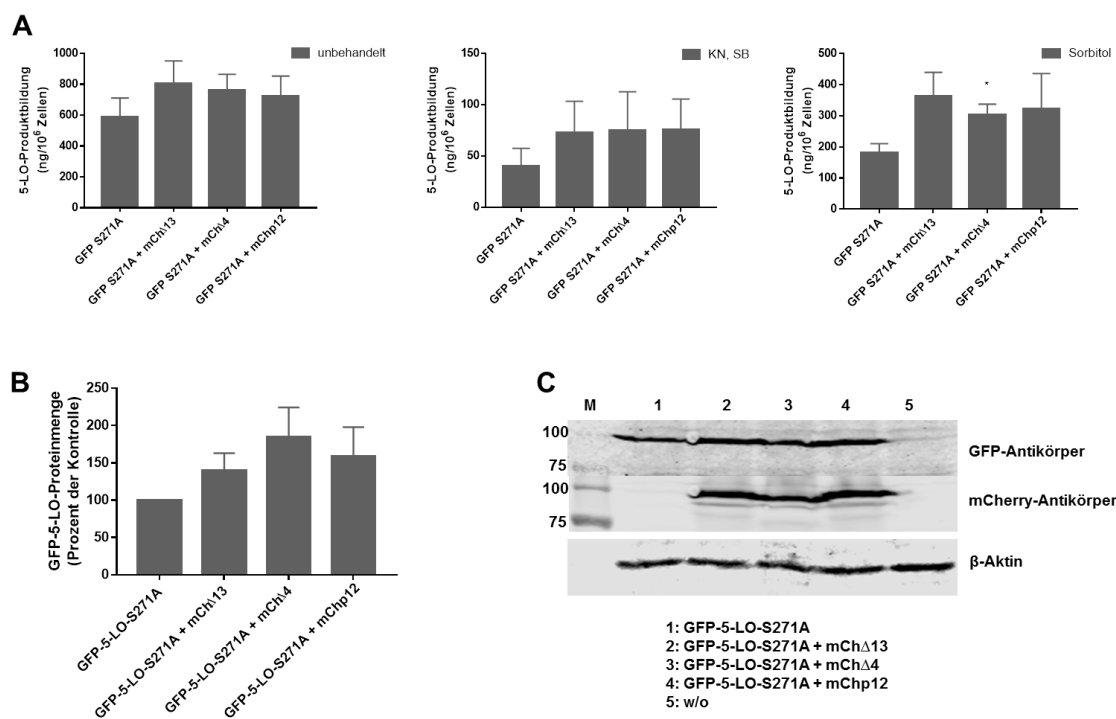


Abbildung 47: Zelluläre 5-LO-Enzymaktivität der stabil integrierten GFP-5-LO-S271A-Mutante nach Behandlung mit einem Stressstimulus und einem CaMKII-/p38-Inhibitor.

(A) 5-LO-Produktbildung der in HEK293T stabil integrierten Mutante GFP-5-LO-S271A ohne Behandlung, nach Behandlung einer Kombination aus KN-93 und SB203580 (KN/SB) oder Sorbitol. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in Abbildung 32 beschrieben. Die Produktbildung ist als ng/10⁶ Zellen dargestellt (MW + SEM, n = 3). Mit Hilfe von GraphPad wurde ein *unpaired two-tailed student's t-test* durchgeführt (p \leq 0,05 = *). (B) Quantifizierung der GFP-5-LO-Expression. Mit Hilfe von spezifischen GFP- bzw. mCherry-Antikörpern wurden die GFP-5-LO und die mCherry-getaggten Isoformen visualisiert. Danach erfolgte eine densitometrische Analyse, wobei β -Aktin zur Normalisierung mit einberechnet wurde (MW + SEM, n = 3). (C) Repräsentativer Western Blot.

4.13 Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und der alternativen 5-LO-Isoformen

Wie bereits erwähnt, ist sowohl die Lokalisation als auch die 5-LO-Aktivität abhängig von der Phosphorylierung der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen. Vor allem die Phosphorylierung an S271 und S523 scheinen einen starken Einfluss auf die Regulation der 5-LO auszuüben [45–47,279]. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation von 5-LO-WT und den Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12, war es von großem Interesse, die Phosphorylierungen aller Proteine zu untersuchen. Dafür wurden Western Blots angefertigt. Um die Phosphorylierungen detektieren zu können, wurden phosphorylierungs-spezifische Antikörper (anti-Phospho-5-LO (S271) und anti-Phospho-5-LO (S523)) verwendet. Um zu zeigen, dass es sich bei den Phospho-Banden um die 5-LO handelt und um die 5-LO-Gesamtmenge zu bestimmen, wurden die Blots zusätzlich mit einem anti-5-LO-Antikörper inkubiert. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin. In Abbildung 48 A ist zu erkennen, dass GFP-5-LO-WT (Linie 2) lediglich sehr wenig an S271 phosphoryliert ist. Dies ist vergleichbar mit dem Ergebnis in Abbildung B, jedoch ist dort der WT an S523 noch schwächer phosphoryliert. Die Proben 3-5 stellen die 5-LO-Phosphorylierungen in kotransfizierten Zellen dar. Auch hier zeigt sich ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster zwischen den beiden Serinen. Während in Abbildung 48 A eine starke Phosphorylierung aller kotransfizierten Zellen (Linie 3, 4, 5) zu erkennen ist, konnte an der Phosphorylierungsstelle S523 lediglich bei den kotransfizierten Zellen mit pSBbi-GFP-5-LO + pSBbi-mCherry12 (Abb. 48 B, Linie 5) ein starkes Signal detektiert werden, während bei den anderen beiden (GFP-5-LO + mCherry Δ 13 und GFP-5-LO + mCherry12) relativ schwache Phosphorylierungen gemessen wurden. Zusätzlich wurden die Isoformen alleine auf ihre Phosphorylierung untersucht. Interessanterweise ist die Isoform 5-LOp12 und 5-LO Δ 13 (Abb. 48 A, Linie 6 und 8) relativ stark an S271 phosphoryliert, die Spleißvariante 5-LO Δ 4 hingegen zeigt ein deutlich schwächeres Signal. Die Phosphorylierungsstelle S523 scheint bei der Isoform 5-LOp12 am stärksten phosphoryliert zu sein, die anderen beiden Isoformen hingegen weisen eine sehr geringe Phosphorylierung an dieser Stelle auf (Abb. 48 B Linie 6, 7, 8). Vergleicht man in Abbildung A die kotransfizierten Zellen mit den Zellen, in denen die Isoformen alleine transfiziert wurden, so erkennt man deutlich, dass die Phosphorylierungen in kotransfizierten Zellen stärker erscheinen. Betrachtet man jedoch die Färbung mit 5-LO-Antikörper, so zeigt sich auch hier ein deutlicher Anstieg

der Protein-Expression, sobald beide Proteine (GFP-WT + mCherry-Isoform) coexprimiert sind. Somit könnte die stärkere Phosphorylierung auf die erhöhte Protein-Expression zurück zu führen sein. Der Blot in Abbildung B zeigt ebenfalls eine stark erhöhte Proteinexpression in kotransfizierten Zellen, dies lässt sich jedoch nicht in einer erhöhten Phosphorylierung widerspiegeln. Da GFP-5-LO und die mCherry-Isoformen sehr ähnliche Molekulargewichte haben, waren sie über den Western Blot leider nicht auftrennbar. Um zu untersuchen, ob die Expression des WT oder der Isoformen oder beides in kotransfizierten Zellen zunimmt, mussten diese auf den Western Blots voneinander getrennt werden.

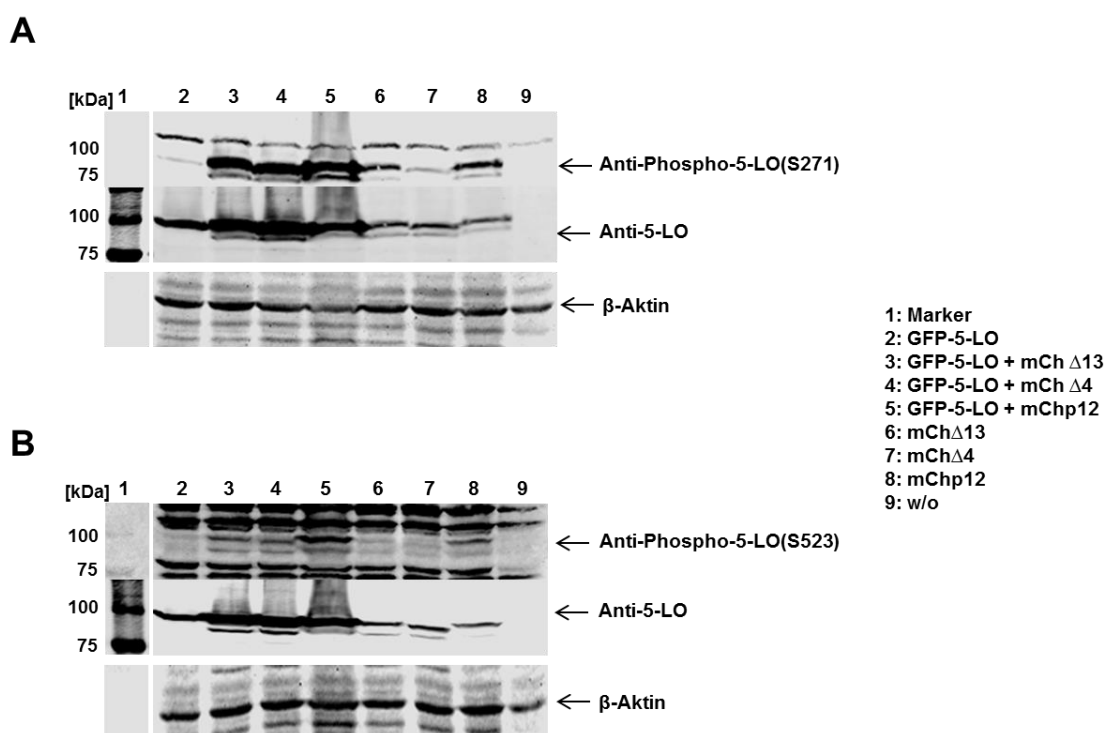
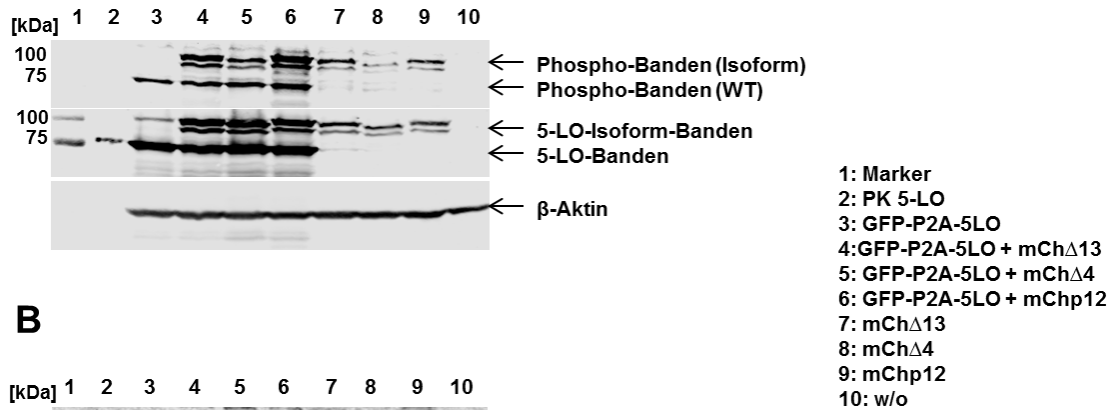


Abbildung 48: Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und der 5-LO-Isoformen.

(A) Untersuchung der S271-Phosphorylierung von 5-LO sowie deren Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in stabil integrierten HEK293T-Zellen mit Hilfe von Western Blots. Für die Detektion wurde ein spezifischer anti-Phospho-5-LO(S271)-Antikörper (Cell Signaling, 1:500) eingesetzt. Die Expression der gesamten 5-LO und der Isoformen wurden durch einen hauseigenen anti-5-LO-Antikörper (6A12, 1:200) visualisiert. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. (B) Untersuchung der S523-Phosphorylierung. Phosphorylierte 5-LO wurde mittels eines spezifischen anti-Phospho-5-LO(S523)-Antikörper (Sigma, 1:1000) detektiert. Die Expression von 5-LO und deren alternativen Spleißvarianten wurden durch einen 5-LO-Antikörper (6A12, 1:200) detektiert. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Um die Proteine (GFP-5-LO-WT und mCherry-5-LO-Isoformen) auf Western Blots voneinander trennen zu können, wurde ein P2A-Linker mittels Overlap-PCR zwischen dem GFP-Tag und 5-LO-WT in das Konstrukt kloniert. Dieser Linker führt zu einem Ribosom-Skipping zwischen GFP und 5-LO, so dass beide getrennt translatiert werden. Folglich konnte 5-LO-WT wieder auf der Höhe von 78 kDa detektiert werden, während die Isoformen weiterhin mit mCherry-Tag exprimiert wurden. Das ermöglichte, 5-LO-WT und die Isoformen getrennt zu detektieren und zu bestimmen, welche Proteine durch die Kotransfektion hochreguliert werden. Für die Analyse wurden spezifische Phospho-Antikörper (anti-Phospho-5-LO(S271)) und anti-Phospho-5-LO(S523)) verwendet. Um die 5-LO allgemein zu visualisieren, wurde ein hauseigener monoklonaler anti-5-LO-Antikörper verwendet. Interessanterweise konnte so gezeigt werden, dass in kotransfizierten Zellen die Isoformen verstärkt exprimiert werden (Abb. 49 A). Vergleicht man die Banden des 5-LO-WT in Zellen mit und ohne koexprimierten 5-LO-Isoformen (Abb. 49 A Bande 3, 4, 5, 6), so erkennt man einen minimalen Anstieg der Proteinmenge. Betrachtet man jedoch die Banden der 5-LO-Isoformen auf der Höhe von ca. 100 kDa, so sieht man deutlich, dass die Isoformen alleine (Bande 7, 8, 9) im Vergleich zur Kotransfektion relativ schwach exprimiert werden. Da die Proteinkonzentration der 5-LO-Isoformen nach Co-Expression mit 5-LO-S271A ansteigt, kann man keine Rückschlüsse darauf ziehen, ob es zusätzlich zu einem Anstieg der Phosphorylierung an S271 kommt. Allgemein sind die Phosphorylierungen vergleichbar mit denen in Abbildung 48. In Abbildung 49 B sind die Detektion der Phosphorylierungsstelle S523 und der 5-LO dargestellt. Auch hier zeigt sich dasselbe Expressionsmuster wie es auch in Abbildung A zu erkennen ist. Es ist deutlich zu sehen, dass sich die Proteinkonzentration der Isoformen in den kotransfizierten Zellen erhöht, die des WT zeigt eine geringe Zunahme (vgl. Abb. 27). Hier ergab sich jedoch die Schwierigkeit, dass nach Abspaltung des GFP-Tags, der 5-LO-WT auf der Höhe der unspezifischen Banden des anti-Phospho-5-LO(S523) zu finden ist. Somit konnte über die Phosphorylierungen an S523 des WT keine Aussage getroffen werden.

A



B

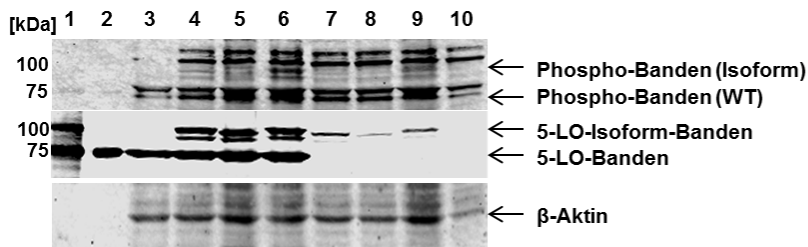


Abbildung 49: Untersuchung der Phosphorylierung von 5-LO-WT und mCherry-getaggten Isoformen sowie deren Expression mittels Western Blot.

(A) Für die Untersuchung der Phosphorylierung an S271 wurde ein spezifischer anti-Phospho-5-LO(S271)-Antikörper (Cell Signaling, 1:500) eingesetzt. Die 5-LO-Expression wurde mit Hilfe eines hauseigenen monoklonalen anti-5-LO-Antikörper (6A12, 1:200) überprüft. β-Aktin diente als interne Beladungskontrolle. (B) Untersuchung der Phosphorylierungsstelle S523 von 5-LO und deren Isoformen wurde mit einem spezifischen anti-Phospho-5-LO(S523)-Antikörper (Sigma, 1:1000) durchgeführt. Zur Visualisierung der gesamten 5-LO diente ein monoklonaler anti-5-LO-Antikörper (hauseigen, 1:200). β-Aktin diente als interne Beladungskontrolle.

5 Diskussion

LTs sind Lipidmediatoren, die innerhalb des angeborenen Immunsystems, bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen und in vielen Krebsarten eine große Rolle spielen. Die 5-LO katalysiert die ersten beiden Reaktionsschritte der LT-Biosynthese. Dabei wird die AA zunächst in Position 5 oxygeniert, wodurch das Produkt 5-HpETE entsteht. Dieses kann wiederum zu 5-HETE reduziert werden. Im 2. Reaktionsschritt wird aus 5-HpETE das instabile Epoxid LTA₄ gebildet, welches entweder in LTB₄ oder in cysteinyl-haltige LTs umgewandelt wird [70–74]. Wie bei einer Vielzahl anderer humaner Gene, wurden auch alternativ gespleißte 5-LO-Transkripte entdeckt. Die ersten entdeckten Isoformen wurden in humanen Hirntumoren im Jahr 1992 entdeckt. Jedoch konnte ihre Sequenz zu dieser Zeit noch nicht analysiert werden [262]. Kürzlich wurden einige neue alternative 5-LO-Varianten in unterschiedlichen B-Zelllinien und primären Leukozyten identifiziert [267,268]. Viele der gefundenen Isoformen besitzen vorzeitige Stopcodons und stellen somit NMD-Targets dar, sodass eine Translation dieser mRNA in Proteine unwahrscheinlich ist. Es wurden jedoch auch Transkripte beschrieben, die keine vorzeitigen Stopcodons besitzen und somit mögliche Protein-Isoformen darstellen [263,267]. Die Isoform 5-LO Δ 13 wurde als stabiles, enzymatisch inaktives Protein in eukaryotischen Zellen untersucht [263].

5.1 Untersuchung der mRNA-Expression von 5-LO-WT und deren Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12

In dieser Arbeit wurden die alternative Spleißvariante 5-LO Δ 13 und die neu gefundene 5-LO Δ 4, sowie die Isoform 5-LOp12 näher untersucht. Es wurden unterschiedliche B- und T-Zellen, primäre B- und T-Zellen sowie myeloide Zellen auf die Expression der 5-LO und deren alternative Spleißvarianten auf mRNA-Ebene untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass neben 5-LO-WT auch die Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 in einigen B- und T-Zelllinien exprimiert werden. Weiterhin wurde die 5-LO Δ 4 lediglich in der B-Zelllinie Raji detektiert. 5-LO-WT wurde ausschließlich in der T-Zelllinie MOLT-4 identifiziert werden. Interessanterweise wurden in primären B- und T-Zellen alle 5-LO-Varianten gefunden. Über viele Jahre wurde angenommen, dass T-Zellen 5-

LO-negativ seien. Jedoch zeigen neuere Ergebnisse die Existenz der 5-LO in primären T-Zellen [280]. Eine frühere Studie zeigte, dass der 5-LO-Level in frisch isolierten T-Zellen sehr schnell sinkt, wenn diese in Kultur genommen werden [281]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass alternative 5-LO-Transkripte in der T-Zelllinie MOLT-4 nicht detektiert werden konnten und die Expression von 5-LO-WT sowie der Isoform 5-LO Δ 13 in Jurkat-Zellen sehr gering war. Myeloide Zellen sind ein wichtiger Teil des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Aus diesem Grund wurden ebenfalls M1, M2, alveoläre Makrophagen und Eosinophile auf die Expression der 5-LO und der alternativen Spleiß-Transkripte untersucht. Wie erwartet konnte 5-LO-WT detektiert werden. Es wurden jedoch auch die Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 identifiziert. Die Isoform 5-LO Δ 4 wurde in diesen Zellen nicht gefunden. Das Expressionsmuster der detektierten alternativen Isoformen und 5-LO-WT scheint zellspezifisch zu sein. Während Zellen lymphoiden Ursprungs entweder die gleiche Menge an 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 oder eine erhöhte Menge an 5-LO Δ 13 exprimieren, scheinen myeloide Zellen die Expression von 5-LOp12 zu bevorzugen. Ebenso ist das Verhältnis zwischen den Isoformen und 5-LO-WT signifikant unterschiedlich und scheint von Zelltyp zu Zelltyp zu variieren. Vor allem die B-Zellen zeigen eine hohe Expression der Isoformen. Ihre Menge ist vergleichbar mit dem Expressionslevel an 5-LO-WT. Um einen möglichen Einfluss der Isoformen in pathophysiologischen Prozessen zu untersuchen, wurden primäre Monozyten von Patienten mit Sepsis und rheumatoider Arthritis sowie von gesunden Probanden getestet. Die Zellen zeigten auf mRNA-Ebene eine Expression von 5-LO-WT und den Spleißvarianten 5-LO Δ 13 und 5-LOp12, jedoch nicht von der Isoform 5-LO Δ 4. Dasselbe Verhaltensmuster konnte in monozytären Zelllinien beobachtet werden. Während die Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 detektiert wurden, scheint die Spleißvariante 5-LO Δ 4 in Monozyten nicht exprimiert zu werden (Abb. 17 C). Bisher konnten Boudreau et al. ebenfalls sowohl 5-LO-WT als auch die Isoform 5-LO Δ 13 in der monozytären Zelllinie THP-1 finden [263]. Interessanterweise zeigte sich in den Patientenproben von Monozyten im Vergleich zu den Kontrollen (gesunde Probanden) eine deutliche Hochregulation sowohl von 5-LO-WT als auch der Isoformen. Dies stimmt mit vorigen Veröffentlichungen überein in denen gezeigt wurde, dass die 5-LO sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in Geweben und Zellen von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und einiger Krebsarten ansteigt, unter anderem in Atherosklerose, rheumatoider Arthritis sowie Ösophagus- oder Prostatakarzinom [282–288]. Besonders konnte bei der Isoform 5-LO Δ 13 eine

Hochregulation in den Proben der Sepsis-Patienten beobachtet werden, hier lagen 5-LO-WT und 5-LO Δ 13 im Verhältnis 1:1 vor. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die alternativen Spleißvarianten als Regulatoren bei Erkrankungen des Immunsystems fungieren.

5.2 Untersuchung der Aktivität des 5-LO-WT und der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in stabil und transient transfizierten HEK293T-Zellen

Die Struktur der 5-LO lässt sich in zwei funktionelle Untereinheiten unterteilen: Die C-terminale katalytische Domäne und die N-terminale regulatorische C2-ähnliche Domäne (C2ld) [76,77]. Die C2ld umfasst die Aminosäuren 1-114, besteht hauptsächlich aus β -Faltblättern und ist verantwortlich für die Translokation der 5-LO sowie die Calcium- und Membranbindung [50,80,83]. Die größere katalytische Domäne ist überwiegend in α -Helices aufgebaut und besitzt ein nicht-Häm-gebundenes Eisen, welches essentiell für die katalytische Aktivität der 5-LO ist [83]. Interessanterweise fehlen bei allen untersuchten Isoformen Aminosäuren in der katalytischen Domäne. Um die enzymatische Aktivität der Isoformen zu bestimmen, wurden HEK293T-Zellen sowohl transient als auch stabil transfiziert, um ein robusteres Testsystem zu erhalten. Bei beiden Methoden wurden 5-LO-WT, die Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 alleine exprimiert, aber auch 5-LO-WT mit jeweils einer Isoform koexprimiert und auf 5-LO-Aktivität hin untersucht. Alle untersuchten Isoformen waren katalytisch inaktiv. Dies stimmt mit vorigen Untersuchungen der 5-LO Δ 13 überein [263]. Für die Aktivität der 5-LO ist das gebundene Eisen, das über die Aminosäuren H550, H372, I673, N554 und H367 koordiniert wird, essentiell [53,69,289]. Bei der Spleißvariante 5-LO Δ 13 wurde das Exon 13 herausgespleißt, wodurch die Aminosäuren 558-614 fehlen. Auch diese Isoform zeigt keinerlei 5-LO-Produktbildung. Jedoch fehlen hier keine der bisher bekannten strukturell wichtigen Elemente. Allerdings befindet sich der fehlende Teil der katalytischen Domäne in der Nähe der Eisen-bindenden Aminosäure I673. Dies könnte ein Hinweis auf eine konformationelle Veränderung der katalytischen Domäne sein, wodurch die Eisen-bindenden Liganden möglicherweise das Eisen nicht mehr koordinieren können. Aus diesem Grund könnte die enzymatische Aktivität der Isoform ausbleiben. Leider gelang es in Vorarbeiten nicht, die 5-LO Δ 13 in *E.coli* in löslicher

Form zu überexprimieren, weshalb keine Aussage über den Eisengehalt getroffen werden konnte. In der Isoform 5-LOp12 fehlen die Aminosäuren 530-553, wodurch zwei Eisenliganden in ihrer Funktion beeinträchtigt sein könnten. Zum einen H550, das komplett deletiert ist, zum anderen N554, das die erste Aminosäure nach der Deletion darstellt und somit vermutlich an anderer Stelle in der Proteinstruktur vorliegt. Strukturell betrachtet liegt auch die Aminosäure H367 in der Nähe der fehlenden Sequenz. So ist 5-LOp12 möglicherweise nicht in der Lage das katalytische Eisen zu binden, was die enzymatische Inaktivität erklären würde. In der Isoform 5-LO Δ 4 wurde das Exon 4 herausgespleißt, weshalb die Aminosäuren 144-184 fehlen. In vorigen Untersuchungen konnte durch Atomabsorptionsspektrometrie mit rekombinantem Protein nachgewiesen werden, dass die Spleißvariante 5-LO Δ 4 kein Eisen enthält [266]. Dies ist insofern interessant, da keine wichtigen Eisen-Bindungselemente in dieser Isoform fehlen. Durch Betrachtung der Struktur wurde jedoch ersichtlich, dass sich der Eisenligand I673 in naher Umgebung der herausgespleißten Sequenz befindet (siehe Abb. 50). Somit kann es auch hier zu einer Strukturveränderung kommen, wodurch möglicherweise das Eisen nicht gebunden werden kann. Andererseits ist die 5-LO Δ 4 in der Lage ATP zu binden, was wiederum dafür spricht, dass sowohl die C21d als auch die größere katalytische Domäne in diesen Bereichen ihre Konformation beibehält [266].

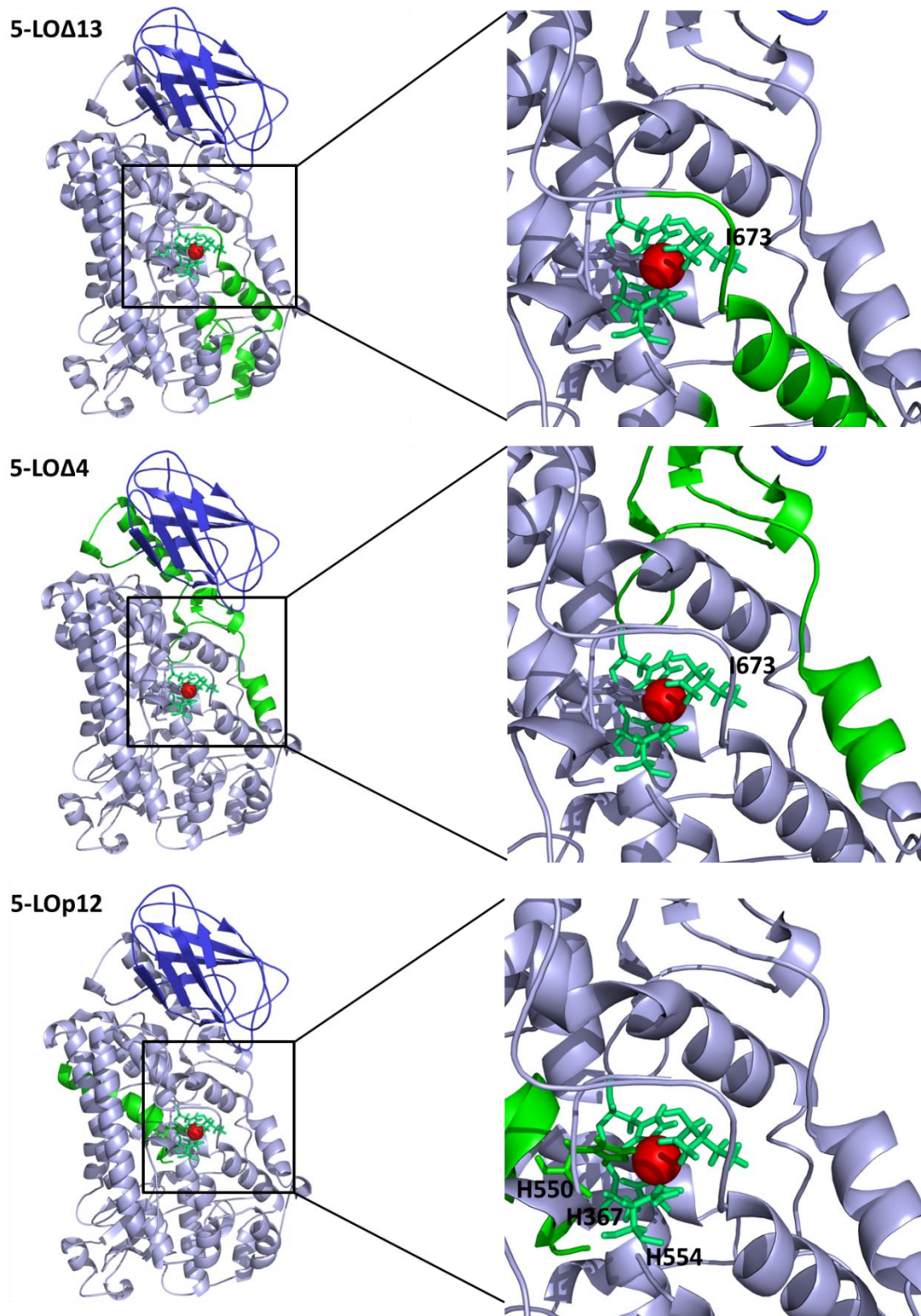


Abbildung 50: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen mit gebundenem Eisen und den zugehörigen Eisenliganden.

Die strukturell wichtigsten Eisen-bindenden Aminosäuren sind beschriftet. Die C2ld ist in blau, die katalytische Domäne in grau und das gebundene Eisen in rot dargestellt. In grün sind die herausgespleißten Exons gezeigt. Die Abstandsmessungen wurden mit Hilfe der Software PyMOL berechnet.

Ein sehr interessantes Resultat lieferte die Kotransfektion des 5-LO-WT mit jeweils einer Isoform. Abhängig von der Transfektionsmethode, zeigten die Aktivitätsassays unterschiedliche Ergebnisse. Wurden die HEK293T-Zellen transient transfiziert, so resultierte eine Inhibition der 5-LO-Aktivität im Vergleich zum 5-LO-WT alleine. Den inhibierenden Effekt der Koexpression des 5-LO-WT mit 5-LO Δ 13 konnten bereits andere Forschergruppen detektieren [263]. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die anderen beiden 5-LO-Varianten 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 in transient transfizierten HEK293T-Zellen ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität des 5-LO-WT ausüben. Da Häfner et al. eine Homo-Dimerisierung der 5-LO nachweisen konnten [92], wurde die Theorie aufgestellt, dass eine Hetero-Dimerisierung zwischen 5-LO-WT und den Isoformen stattfinden kann. Somit wäre das aktive Zentrum nicht mehr frei zugänglich. Häfner et al. konnten bereits zeigen, dass durch den Einsatz von Diamid und GSH an rekombinantem Protein, das Dimer nicht mehr gebildet wird und die 5-LO als Monomer vorliegt [92]. Aus diesem Grund wurde Diamid als eine Art Katalysator eingesetzt. Dieses addiert das in der Zelle vorkommende GSH an seine Azogruppe und wird von dort anschließend auf das cysteininhaltige Protein übertragen. Da die Cysteine (C159, C416, C418 und C300) im Dimerisierungsinterface nun glutathionyliert vorliegen, kann kein Dimer gebildet werden. Mit Hilfe von Diamid sollte also die inhibierende Wirkung der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität aufgehoben werden. Jedoch konnte die Aktivität der 5-LO nicht wiederhergestellt werden (Abb. 26). Es ist also möglich, dass zwischen den Proteinen keine Hetero-Dimerisierung stattfindet und diese deshalb über andere Wege miteinander interagieren. Eine Möglichkeit ist, dass die Isoformen ebenfalls AA aufnehmen und dem 5-LO-WT somit weniger AA zur Verfügung steht.

Nach stabiler Integration der Zellen wurde jedoch ein leichter Anstieg der enzymatischen Aktivität gemessen. Um dies näher zu untersuchen, wurden Western Blots zur Kontrolle der Proteinexpression angefertigt und quantifiziert. Anhand dieser Daten zeigte sich eine Korrelation zwischen der Menge an 5-LO und der 5-LO-Produktbildung. In transient kotransfizierten HEK293T-Zellen konnte eine deutliche Reduktion der 5-LO-Proteinmenge detektiert werden, während in stabil kotransfizierten Zellen eine Zunahme der Proteinexpression beobachtet werden konnte (Abb. 27 und 28). Außerdem zeigte ich in stabil kotransfizierten Zellen ebenfalls eine Erhöhung der Expression der Isoformen (Abb. 27). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die

Isoformen und der 5-LO-WT in der Regulation der Expression gegenseitig beeinflussen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Transfektionsmethoden könnten jedoch ebenso durch den Stresslevel der Zellen erklärt werden. Die Aufnahme der Plasmide stellt für die Zellen Stress dar. Die Zellen bei transienter Transfektion werden lediglich 2 Tage verwendet. In dieser Zeit sind die Zellen auf höchstem Level darauf ausgerichtet, die Plasmide zu vervielfältigen und Proteine zu exprimieren. Durch die stabile Integration mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode können die Zellen ruhen, bevor diese für Experimente benutzt werden. Dies könnte auf die Physiologie und Pathophysiologie übertragen werden. Kommt es z.B. durch endogene oder exogene chemische Stoffe, physikalische Noxen oder auch durch Immunreaktionen zu akutem kurzfristigem Zellstress, so kann eine Herunterregulation von Proteinen die Folge sein [290–292]. Diese Theorie könnte auch auf die 5-LO übertragen werden. Liegt jedoch eine längere entzündliche Immunreaktion vor, wie es z.B. bei systemischer Sklerose [293] oder auch rheumatoider Arthritis der Fall ist, so könnte dies zu einer Erhöhung der 5-LO-Expression führen, was mit unseren Ergebnissen der Untersuchungen auf mRNA-Ebene übereinstimmen würde. Des Weiteren wäre ein Artefakt der Transfektionsmethode denkbar. Es wäre möglich, dass durch transiente Kotransfektion weniger Plasmid als bei alleiniger transienter Transfektion mit 5-LO-WT aufgenommen wird. Dies ist jedoch auszuschließen, da der 5-LO-WT gemeinsam mit Plasmiden transfiziert wurde, die kein Protein exprimieren (sog. Leerplasmid). Da hierdurch die Konzentration der transfizierten Plasmide angepasst wurde, sollte bei jeder Transfektion die gleiche Menge an Plasmid aufgenommen werden.

5.3 Überprüfung der Lokalisation mittels Konfokalmikroskopie

Um die Lokalisation und eine mögliche Interaktion zwischen 5-LO-WT und den Isoformen zu bestimmen, wurden Untersuchungen mittels Konfokalmikroskop durchgeführt. Es ist bisher bekannt, dass die Lokalisation der 5-LO abhängig vom Zelltyp und der jeweiligen Behandlungen ist. Während die 5-LO in Eosinophilen des peripheren Blutes im Zytosol lokalisiert ist, konnte sie in Mastzellen aus Mausknorpelmark (*mouse bone marrow-derived mast cells*, BMDC) und alveolären Makrophagen überwiegend im Nukleus gefunden werden [32–35,294]. Die Lokalisationsregulation der 5-LO ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es konnte aber

gezeigt werden, dass sie nicht nur vom Zelltyp und von Stimuli abhängig ist, da die 5-LO auch über sogenannte NIS und NES verfügt. Jones et al. fanden NIS, welche sich sowohl auf der katalytischen als auch auf der regulatorischen Domäne befinden. Die relevanten Aminosäuren für den nukleären Import sind R112, K158 und R518 [37,38]. Neben den NIS gibt es auch Sequenzen, welche für den nukleären Export verantwortlich sind. Hanaka et al. zeigten eine Inhibition des Exports nach der Behandlung mit dem spezifischen Exportin-Inhibitor Leptomycin B [39,40]. Ebenso wird der nukleäre Import und Export der 5-LO in intakten Zellen durch die Phosphorylierung beeinflusst. Einige Studien konnten hierzu drei verschiedene Phosphorylierungsstellen identifizieren: S271 kann durch MK2, S663 durch ERKs und S523 durch die PKA phosphoryliert werden [42–44]. Es ist bekannt, dass durch Phosphorylierung an S523 die 5-LO im Zytosol verbleibt, da die NIS blockiert ist und das Importin nicht mehr in der Lage ist daran zu binden. Die Phosphorylierungsstellen an S663 und S271 gelten hingegen als aktivierende Phosphorylierungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an diesen beiden Serinen die Translokation in den Zellkern stimuliert und die LT-Bildung hierdurch hochreguliert wird [46,47,276,279]. Die Auswirkung der Phosphorylierung an S271 wird jedoch kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen haben eine nukleäre Lokalisation der 5-LO bei Phosphorylierung dieses Serins bspw. in NIH 3T3-Zellen nachgewiesen, wohingegen Hanaka et al. in CHO-K1- und HEK293T-Zellen zeigen konnten, dass die Phosphorylierung dieser Aminosäure zu einem Export der 5-LO aus dem Nukleus führt [39,276].

Um die Lokalisation von 5-LO-WT und der Isoformen zu bestimmen, wurden zunächst transient transfizierte HEK293T-Zellen verwendet, die anschließend mittels Immunofluoreszenz detektiert wurden. Dafür wurden die HEK293T-Zellen mit Hilfe der sogenannten Calciumphosphat-Methode transient transfiziert und mit Hilfe von spezifischen Fluorophor-gekoppelten Antikörpern visualisiert. Die Lokalisation der Proteine wurde anschließend mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass 5-LO-WT überwiegend im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 29). Dies konnten Allain et al. ebenfalls in HEK293-Zellen detektieren [264]. Die Isoformen sind jedoch gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt (Abb. 29). Ein Grund für die unterschiedliche Lokalisation des 5-LO-WT und der 5-LO-Isoformen könnte eine strukturelle Veränderung oder ein abweichendes Phosphorylierungsmuster sein. Durch die teilweise

gleiche Lokalisation der Proteine in der Zelle, könnte dies (neben der verminderten Expression nach transienter Transfektion) eine weitere Erklärung für den inhibierenden Effekt nach transienter Kotransfektion des 5-LO-WT mit den Isoformen sein. In diesem Fall wäre eine Interaktion der Proteine denkbar. Des Weiteren ist, aufgrund der Anwesenheit der Isoformen, ebenso eine verminderte Aufnahme der AA durch den 5-LO-WT denkbar, wodurch eine geringere Aktivität resultieren könnte. Um zu testen, ob die Lokalisation der Isoformen Einfluss auf die Aktivität des 5-LO-WT ausübt, wurden phosphomimetische Mutanten hergestellt. Dafür wurde das S523 der Isoformen in Asparaginsäure (D) umgewandelt. Diese imitiert durch ihre negative Ladung eine Phosphorylierung, wodurch die Isoformen komplett im Zytosol lokalisiert sein sollten. Die Proteine könnten somit nicht mehr miteinander interagieren und die Runterregulation der Produktbildung sollte somit aufgehoben werden. Im Vergleich zu den unmutierten Proteinen konnte jedoch anhand der Konfokalbilder kein unterschiedliches Lokalisationsmuster detektiert werden. Weiterhin wiesen sie eine Verteilung in der gesamten Zelle auf, wohingegen bei der Isoform 5-LO Δ 4 eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Lokalisation im Nukleus zu erkennen war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Lokalisation von weiteren Faktoren als von der Phosphorylierung abhängig zu sein scheint. Bei der Betrachtung der Proteine in transient transfizierten HEK293T-Zellen ist jedoch aufgefallen, dass die Färbung der Proteine mittels Antikörper nicht zufriedenstellend war. Die Färbung der Zellen war oftmals sehr schwach, wodurch die Intensität des Lasers sehr hoch eingestellt werden musste und es somit zu einer schnellen Entfärbung des Farbstoffes gekommen ist. Es könnte sein, dass die Permeabilität unzureichend war und die Antikörper somit nicht in die Zelle eindringen konnten. Außerdem konnte man anhand der Morphologie erkennen, dass die Zellen stark gestresst waren und keine stabilen Ergebnisse aufgenommen werden konnten, da die Resultate zwischen jedem Experiment schwankten. Des Weiteren könnten auch hier die abweichenden Ergebnisse und die morphologische Veränderungen der Zellen durch einen erhöhten Zellstress nach transienter Transfektion erklärt werden.

Deshalb wurde mit den HEK293T-Zellen eine stabile Transfektion durchgeführt, um so ein robustes System und ein physiologischeres Level zu erhalten. Da die Zellen nach der stabilen Integration keinem permanenten Selektionsdruck unterliegen, sollten die Ergebnisse stabil und die Zellen keinem Stress ausgesetzt sein. Durch die Verknüpfung

mit einem mCherry- bzw. GFP-Tag konnten die Proteine mit einem Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskop betrachtet werden. Es zeigte sich eine deutliche Besserung im Vergleich zur transienten Transfektion. Die Zellen waren deutlich unter dem Mikroskop sichtbar, wodurch die Intensität des Lasers stark reduziert werden konnte. Betrachtet man die Lokalisation des 5-LO-WT, so sieht man, dass auch hier eine nukleäre Lokalisation vorhanden ist. Nach Stimulation der Zellen mit Ionophor A23187, konnte eine Translokation des Proteins an die Kernmembran beobachtet werden (Abb. 29), was in Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen ist [61]. Somit kann dieses System für weitere Untersuchungen als geeignet angesehen werden, sodass alle weiteren Untersuchungen durch das Konfokalmikroskop mit stabil integrierten Zellen durchgeführt wurden. Im Gegensatz zum 5-LO-WT lagen alle mCherry-getaggten Isoformen zytosolisch vor. Dies ist widersprüchlich zu den Ergebnissen der transienten Transfektion, bei der die Isoformen gleichmäßig in der gesamten Zelle lokalisiert waren. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Veröffentlichung von Allain et al., die ebenfalls in stabil transfizierten HEK293-Zellen eine zytosolische Verteilung der 5-LO Δ 13 beobachten konnten [264]. Um zu testen, ob die GFP- bzw. mCherry-Tags Einfluss auf die Lokalisation der Proteine und die Translokation des 5-LO-WT an die Kernmembran ausüben, wurden Plasmide stabil transfiziert, die lediglich die Fluoreszenzproteine, jedoch keine 5-LO exprimieren. Auch diese wurden mit Ionophor A23187 behandelt. Es zeigte sich, dass GFP- und mCherry in der gesamten Zelle verteilt sind und die Behandlung mit dem Stimulus keinerlei Translokation verursachte. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sowohl die Lokalisation als auch die Translokation der Proteine von GFP bzw. mCherry beeinflusst werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die unterschiedliche Lokalisation der Isoformen nach transienter und stabiler Transfektion durch andere Bedingungen hervorgerufen werden muss. Ein Grund könnte sein, dass die Isoformen im Vergleich zu 5-LO-WT an anderen Serinen phosphoryliert werden. Möglicherweise wird die PKA erst nach längerer Zeit induziert und führt somit bei stabilen Zellen zu einer stärkeren Phosphorylierung an S523, welche einen inhibitorischen Effekt auf die Translokation der 5-LO ausübt. Dies könnte ein Grund für die zytosolische Lokalisation der Isoformen sein. Die genaue Ursache hierfür konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden und bedürfen noch weiterer Untersuchungen. Durch Stimulation der Isoformen mit Ca²⁺-Ionophor in einer physiologischen Konzentration (5 μ M) konnte keine Translokation an die Kernmembran detektiert werden (Abb. 29). Das Ergebnis ist insofern überraschend, da

die regulatorische Domäne, welche für die Membran- und Calciumbindung verantwortlich ist, bei allen Isoformen intakt sein sollte. Jedoch konnten Pande et al. in einem Modell zeigen, dass es Aminosäuren in der katalytischen Domäne gibt, die ebenfalls für die Membranbindung verantwortlich sein können. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren K183, W599, W201, F197 (siehe Abb. 51) [84]. Im Falle der alternativen Spleißvariante 5-LO Δ 4 fehlt somit die Aminosäure K183, bei 5-LO Δ 13 wurde W599 herausgespleißt. Dies könnte ein Grund für die ausbleibende Translokation an die Kernmembran sein. 5-LOp12 enthält alle essentiellen Aminosäuren für eine Membranbindung, allerdings liegt die Aminosäure W599 in unmittelbarer Nähe des fehlenden Exons. Eine konformationelle Veränderung könnte somit Einfluss auf die Membranbindung haben. Wurde die Konzentration des Stimulus erhöht, konnte jedoch eine Translokation der Isoform 5-LO Δ 13 beobachtet werden. Interessanterweise verblieben die alternativen 5-LO-Varianten 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 weiterhin im Zytosol (Abb. 30). Es könnte sein, dass 5-LO Δ 13 durch die fehlende Aminosäure W599 und durch die strukturelle Veränderung eine höhere Ca²⁺-Konzentration benötigt. Ein möglicher Grund für die ausbleibende Translokation der anderen beiden alternativen 5-LO-Isoformen könnte durch eine stärkere konformationelle Strukturänderung erklärt werden. Dadurch könnten die membranbindenden Aminosäuren nicht mehr in der Lage sein mit der Membran zu interagieren.

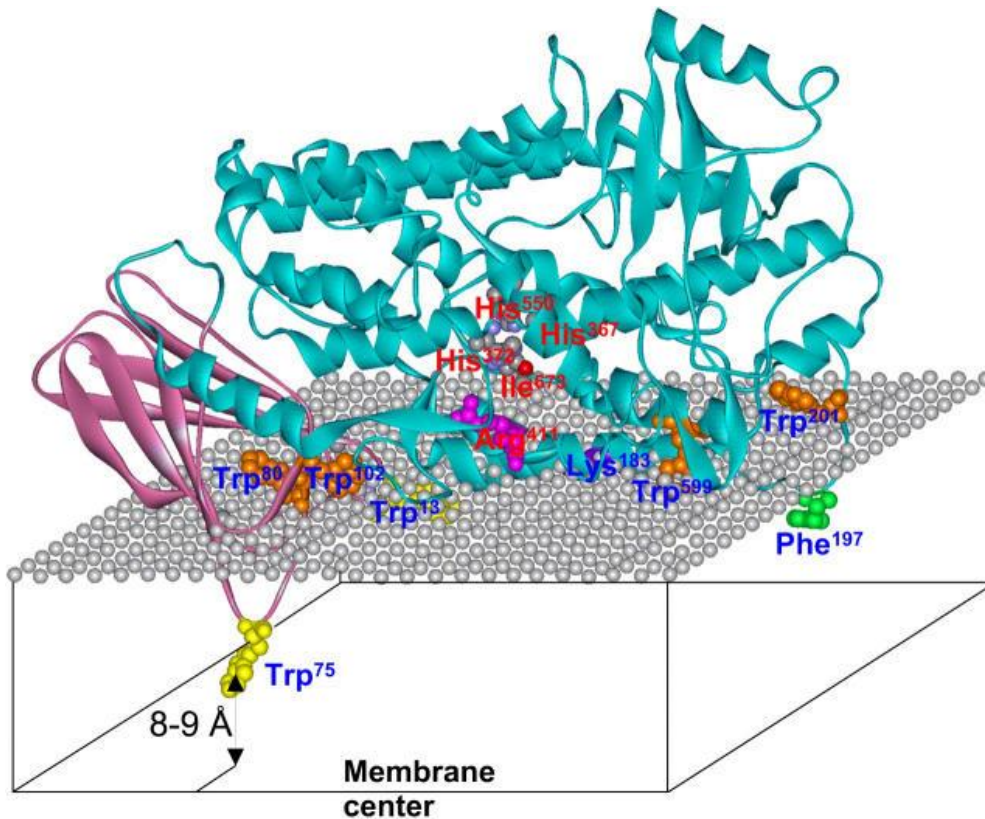


Abbildung 51: Darstellung der Membranbindung der 5-LO [84].

5.4 Beeinflussung der zellulären Lokalisation der Proteine mit Hilfe unterschiedlicher Stimuli

5.4.1 Translokation der Isoformen vom Zytosol in den Zellkern

Wie bereits erwähnt, haben Phosphorylierungen der 5-LO großen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins. Um eine mögliche Interaktion zwischen 5-LO-WT und deren alternativen Spleißvarianten zu untersuchen, mussten alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert sein. Zunächst wurde mit Hilfe von Stimuli versucht, die Isoformen in den Zellkern zu translozieren. Um einen oxidativen Stress in der Zelle hervorzurufen, wurde NaAsO_2 eingesetzt, welches p38 aktiviert, das wiederum zur Phosphorylierung der Aminosäure S271 führt und einen aktivierenden Einfluss auf die 5-LO ausübt [276]. Die Resultate zeigen, dass die Translokation nur teilweise funktioniert hat. Bei vielen Zellen verblieb die Isoform weiterhin im Zytosol, nur bei wenigen Zellen konnte eine Translokation beobachtet werden. Durch eine mögliche

strukturelle Veränderung der Protein-Isoformen ist es denkbar, dass diese längere Zeit benötigen, um die Kernmembran zu passieren. Als weiterer Stimulus wurde der PKC-Aktivator PMA eingesetzt, der zur Aktivierung der MAPKs führt und somit auch ERK stimuliert. Dies begünstigt die Phosphorylierung an S663, welche zur Translokation der Protein-Isoformen in den Nukleus führen sollen [43]. Außerdem wurden der PKA-Inhibitor H-89 und der nicht-selektive Kinase-Inhibitor Staurosporin eingesetzt. Diese verhindern die Phosphorylierung an S523, wodurch die alternativen Spleißvarianten in den Zellkern translozieren sollen. Jedoch zeigte keiner der verwendeten Stimuli zufriedenstellende Ergebnisse. Nach dem Einsatz des PKC-Aktivators PMA konnte lediglich eine Translokation der Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LO Δ 4 in den Zellkern detektiert werden. Aber auch hier handelte es sich nur um sehr wenige Zellen, die eine Translokation aufwiesen. In den meisten Zellen lagen die Isoformen weiterhin im Zytosol vor. Auch die zusätzliche Zugabe des PKA-Inhibitors H-89 zeigte keinen additiven Effekt. Hier konnte lediglich bei 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 eine Translokation in sehr wenigen Zellen beobachtet werden. Der Einsatz von Staurosporin und Leptomycin B zeigte bei keiner Isoform eine Veränderung der Lokalisation. Durch die fehlenden Sequenzen der Protein-Isoformen ist es möglich, dass die Phosphorylierungsstellen der Isoformen somit nicht mehr zugänglich sind und daher der gewünschte Effekt ausbleibt oder geschwächt auftritt. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierungsstellen strukturell in naher Umgebung der herausgespleißten Sequenzen liegen, wurden die Abstände mit Hilfe der Software PyMOL in Angström (Å) ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die fehlende Sequenz der 5-LO Δ 13 und der 5-LOp12 mit 14,81 Å und 11,39 Å relativ nahe bei der Aminosäure S663 liegen. Des Weiteren konnte durch die Auswertung gezeigt werden, dass die Sequenz von 5-LOp12 mit 14,11 Å ebenfalls in der Umgebung von S523 liegt. Der Abstand von S523 zu der fehlenden Helix der 5-LO Δ 4 wurde mit 11,97 Å berechnet, somit wäre auch hier eine konformationelle Veränderung denkbar. Dies könnte die zytosolische Lokalisation dieser Isoformen erklären. Andererseits konnte durch die strukturelle Betrachtung der 5-LO Δ 13 lediglich die Phosphorylierungsstelle S663 als naheliegend angesehen werden. Somit galt es, die Phosphorylierungen der Isoformen wie auch des 5-LO-WT näher zu untersuchen. Eine bildliche Darstellung der Strukturen und den zugehörigen Abstandsmessungen sind in Abbildung 52 dargestellt.

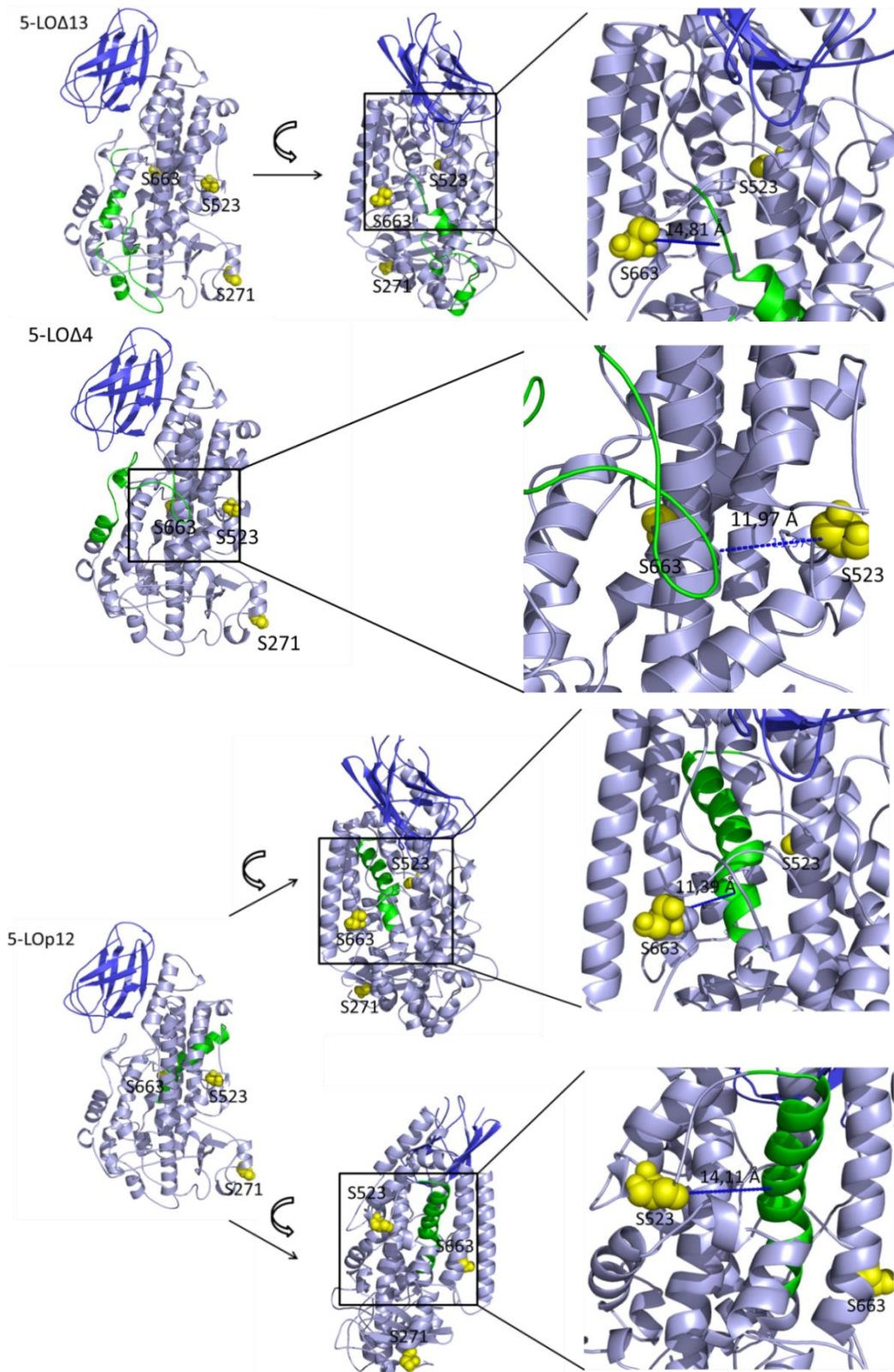


Abbildung 52: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen mit Abstandsmessungen zwischen den Phosphorylierungsstellen und den fehlenden Sequenzen in Å.

In blau ist die C2ld und in grau die katalytische Domäne dargestellt. Phosphorylierungsstellen wurden grün und die fehlenden Sequenzen in gelb markiert. Die Abstandsmessungen wurden mit Hilfe der Software PyMOL berechnet.

Wie schon erwähnt, sind die sogenannten NIS ebenfalls an der nukleären Lokalisation von Proteinen involviert und könnten hier möglicherweise für die ausbleibende Translokation der Protein-Isoformen verantwortlich sein. Wie bereits dargestellt, fehlen bei 5-LO Δ 13 die Aminosäuren Y558-E614, bei 5-LOp12 reichen die herausgespleißten Aminosäuren von K530-V553 und bei 5-LO Δ 4 von W144-A184. Vergleicht man diese fehlenden Einheiten mit den Aminosäuren, die im nukleären Import involviert sind (NIS: R112, K158, R518), so erkennt man, dass die NIS K158 bei der Δ 4 herausgespleißt wurde. Des Weiteren ist R112 in unmittelbarer Umgebung, weshalb auch diese möglicherweise nicht mehr als NIS erkannt werden kann. Es konnte außerdem eine strukturelle Nähe zu der NIS R518 von nur 4,36 Å berechnet werden (siehe Abb. 53). Somit wäre es bei dieser Isoform nicht auszuschließen, dass diese NIS durch strukturelle Veränderungen nicht mehr zugänglich sind und deshalb im Zytosol verbleiben. Bei den Isoformen 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 konnte keine NIS in unmittelbarer Umgebung berechnet werden. Bei 5-LOp12 konnte die nächste NIS R518 mit 19,78 Å berechnet werden und ist somit ebenso nicht in unmittelbarer Umgebung.

Ein weiterer Versuch, die alternativen 5-LO-Proteine in den Zellkern zu translozieren, lag darin, eine Isoform-Mutante herzustellen. Das S523 der mCherry-getaggten Isoformen wurde dabei in Alanin (A) mutiert, um so eine Phosphorylierung an dieser Stelle zu verhindern. Auch diese wurden stabil in HEK293T-Zellen integriert. Zunächst wurden die Proteine ohne vorherige Behandlung betrachtet. Die Visualisierung zeigte, dass alle Isoformen weiterhin im Zytosol lokalisiert sind. Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Serins 523 nicht alleine für die zytosolische Lokalisation verantwortlich sein kann. Als Behandlung diente wiederum der Exportin-Inhibitor Leptomycin B sowie die Kombination aus einem PKC-Aktivator und einem PKA-Inhibitor (Abb. 34 und 36). Jedoch verblieben auch hier die Proteine weiterhin im Zytosol. Häfner et al. konnten bezüglich der 5-LO Δ 4 Aussagen über die strukturelle Veränderung machen. Mittels DSF-Messungen (*Differential Scanning fluorimetry*) konnte gezeigt werden, dass diese Isoform eine um 15 °C geringere Schmelztemperatur der katalytischen Domäne im Vergleich zum 5-LO-WT besitzt [266]. Dies spricht für eine konformationelle Änderung der katalytischen Domäne. Die Schmelztemperatur der C21d lag etwa 10 °C unter der des 5-LO-WT und spricht auch für eine leichte strukturelle Veränderung des Proteins. Da es nicht möglich war, die anderen beiden Isoformen löslich zu exprimieren und somit keine Strukturuntersuchungen durchgeführt

werden konnten, kann über die strukturellen Abweichungen im Vergleich zum 5-LO-WT keine klare Aussage getroffen werden.

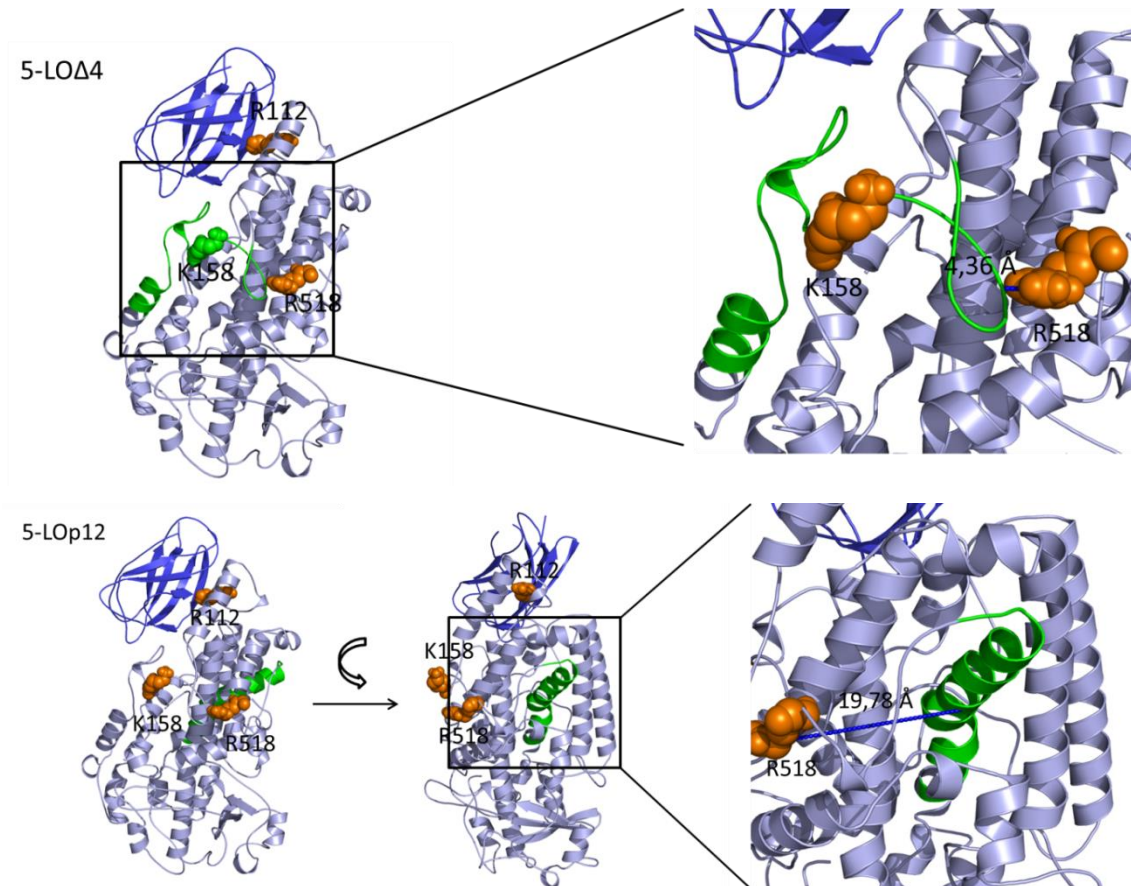


Abbildung 53: Strukturelle Darstellung der 5-LO-Isoformen (fehlende Sequenzen in grün) mit nukleären Importsequenzen (orange).

Abstandsmessungen sind in blau dargestellt, die Angaben sind in Å. Die C21d ist in blau, die katalytische Domäne in grau gefärbt. Die Abstandsmessungen wurden mit Hilfe der Software PyMOL berechnet.

5.4.2 Translokation des 5-LO-WT aus dem Nukleus in das Zytosol und Untersuchung des Einflusses der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität nach Stimuli-Behandlung

Da die Isoformen auch durch verschiedenste Stimuli im Zytosol verblieben, wurden nun Reagenzien eingesetzt, welche eine Translokation des WT in das Zytosol verursachen sollten. Dafür wurden unter anderem ein p38-Inhibitor (SB203580) und ein CaMKII-Inhibitor (KN-93) eingesetzt. Durch die p38- und CaMKII-Inhibierung sollte die Phosphorylierung an S271 verhindert werden, wodurch der 5-LO-WT nicht mehr im

Nukleus vorhanden sein sollte [278]. Um einen additiven Effekt auszulösen, wurden beide Reagenzien außerdem simultan eingesetzt. Durch die Behandlung mit dem p38-Inhibitor S203580 konnte keine Veränderung der Lokalisation des WT beobachtet werden. Setzte man diesen jedoch mit einem CaMKII-Inhibitor ein, so konnte eine Translokation des 5-LO-WT in das Zytosol detektiert werden. Die Inkubationszeit von KN-93 variierte von 2-6 h, während SB203580 konstant 30 min inkubierte (Abb. 38). Nach Betrachtung der Zellen zeigte sich, dass nach 2 bzw. 4 h die Translokation nicht bei allen Zellen erreicht wurde. Nur bei einer Inkubationszeit von 6 h konnte eine 100 %ige Translokationseffizienz erzielt werden. Somit zeigte sich, dass die beiden Reagenzien einen additiven Effekt ausüben. Dies deutet darauf hin, dass die nukleäre Lokalisation der 5-LO-WT von sowohl p38 MAPKs als auch von CaMKII reguliert wird. Leider sahen die Zellen mit zunehmender Inkubationszeit morphologisch stark verändert aus. Aufgrund dessen wurden weitere Stimuli getestet, bei denen es sich um sogenannte Stressstimuli handelte. Es wurde H₂O₂ und Sorbitol verwendet, um so einen zellulären Stress auszulösen. Durch Sorbitol konnte eine leichte Translokation des Proteins aus dem Zellkern beobachtet werden, jedoch zeigte sich nun eine Verteilung des WT in der gesamten Zelle, statt lediglich im Zytosol. Durch die Behandlung mit H₂O₂ wurde eher eine Translokation des Proteins um den Zellkern/an die Kernmembran erreicht, zeigte jedoch ebenso keine Verteilung im Zytosol. Hanaka et al. zeigten denselben Effekt [39]. Wird die Zelle durch exogene Reize Stress ausgesetzt, z. B. durch Cytokine, Endotoxine oder zahlreicher anderer Stressstimuli, so kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionskaskaden innerhalb der Zelle. Unter anderem werden MAPKs und bestimmte MKs aktiviert, die eine Translokation des Proteins aus dem Zellkern verursachen können [39].

Auch hier sollte eine Mutante des 5-LO-WT zu einer vollständigen Translokation in das Zytosol weiterhelfen. Dabei wurde S271 zu Alanin (A) mutiert, wodurch die Phosphorylierung an diesem Serin blockiert wird. Die GFP-5-LO-S271A-Mutante wurde ebenfalls mit Hilfe der Sleeping Beauty-Methode stabil in HEK293T-Zellen integriert. Erste Beobachtungen zeigten, dass das Protein nun nicht mehr im Nukleus lokalisiert ist, sondern eine Lokalisation in der gesamten Zelle aufweist (siehe Abb. 45). Durch die Verteilung des Proteins in der Zelle wird deutlich, dass die Phosphorylierung an S271 starken Einfluss auf die Lokalisation hat. Durch Stimulation der Zelle mit Ca²⁺-Ionophor erkennt man eine deutliche Translokation des 5-LO-S271A an die

Kernmembran. Dies sowie die Aktivitätsdaten in Abbildung 44 zeigen, dass die Mutante ebenfalls aktiv ist und für weitere Untersuchungen verwendet werden kann. Außerdem ist erkennbar, dass keine der Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 durch die Ionophor-Behandlung transloziert. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die 5-LO keine Dimerisierung mit den Isoformen eingeht, da ansonsten ebenfalls ein roter Ring um den Zellkern zu erkennen wäre. Um die Menge der 5-LO-Mutante im Zytosol zu erhöhen, wurden auch hier wiederum Stimuli eingesetzt. Dafür diente der Stresstimulus Sorbitol und die Kombination aus p38-Inhibitor und CaMKII-Inhibitor (KN-93 + SB203580) (Abb. 46). Dies führte zu einer Translokation der 5-LO ins Zytosol, sodass nun alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert waren und der mögliche Einfluss der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität untersucht werden konnte. Die Translokation der 5-LO-S271A-Mutante zeigt auch hier, dass der Einfluss von p38 und somit von MAPKs und verschiedener MKs von großer Bedeutung ist. Allerdings wird auch hier die widersprüchliche Diskussion über die Phosphorylierung an S271 deutlich. Dieses Serin wird von einigen Arbeitsgruppen als die ‚aktivierende Phosphorylierung‘ beschrieben, wonach die 5-LO laut dieser Theorie in den Nukleus translozieren sollte [43,45–47]. Die Ergebnisse in Abbildung 46 nach Behandlung mit KN-93 und SB203580 entsprechen auch dieser Theorie, da sowohl der CaMKII-Inhibitor als auch der p38-Inhibitor für eine Blockierung der MAPK und somit auch der MK2/3 sorgen (Abb. 54). Die 5-LO verbleibt deshalb aufgrund ausbleibender Phosphorylierung an S271 im Zytosol. Dies konnte auch durch die Ergebnisse in Abbildung 46 belegt werden. Die Ergebnisse nach Behandlung mit Sorbitol und auch die Ergebnisse von Hanaka et al. zeigen das Gegenteil [39]. Laut Hanaka et al. soll es mittels Stresstimulus zur Aktivierung der MAPK und der MKs und somit auch zur Phosphorylierung an S271 kommen, jedoch wird es dort als eine Voraussetzung für den nukleären Export dargestellt. Auch diese Theorie konnten die Ergebnisse in Abbildung 46 beweisen. Da der nukleäre Import und Export der 5-LO bis heute nicht eindeutig geklärt ist, bedarf es noch weitere Untersuchungen.

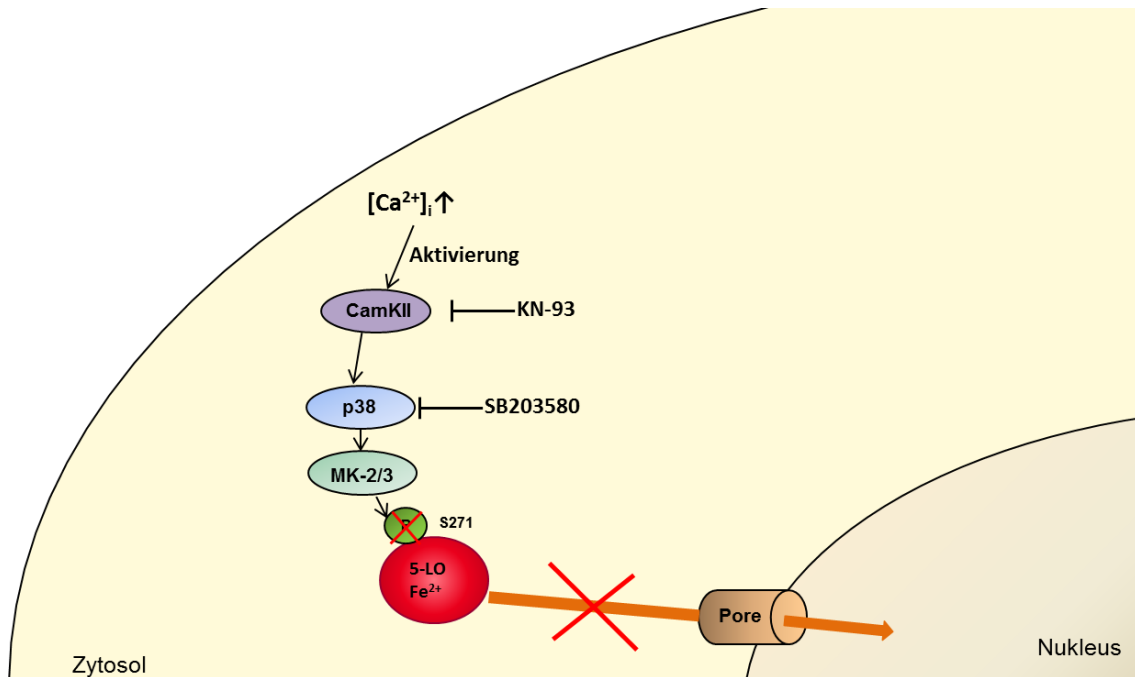


Abbildung 54: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen CamKII und MK2/3

Für weitere Testungen der Phosphorylierungen wurden der 5-LO-WT und deren Isoformen 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 mittels Western Blot und spezifischer anti-Phospho-5-LO-Antikörpern analysiert. Nach Auswertung der Ergebnisse erkennt man, dass 5-LO-WT eine schwache Phosphorylierung an S271 aufweist, jedoch keine an S523 (Abb. 48). Dies stimmt mit vorigen Veröffentlichungen überein und entspricht der nukleären Lokalisation der 5-LO [264]. Die Isoformen 5-LOp12 und 5-LO Δ 13 zeigen eine relativ starke Phosphorylierung an S271, während die 5-LO Δ 4 hingegen schwach phosphoryliert ist. Die alternative 5-LO-Spleißvariante 5-LOp12 ist ebenfalls sehr stark an S523 phosphoryliert, wodurch dessen zytoplasmische Lokalisation erklärt werden kann. Im Vergleich dazu zeigen 5-LO Δ 4 und 5-LO Δ 13 keine Phosphorylierung an dieser Stelle. Wie bereits dargestellt, fehlt bei der Isoform 5-LO Δ 4 die NIS um K158 und ist möglicherweise aus diesem Grund im Zytosol lokalisiert. Allein et al. veröffentlichten bereits, dass 5-LO Δ 13 eine starke Phosphorylierung sowohl an S523 als auch S271 aufweist, was jedoch widersprüchlich zu unseren Ergebnissen für S523 ist [264]. Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Methode zur Generierung von stabil transfizierten Zellen sein. Allein et al. benutzten Geneticin während der stabilen Transfektion, wohingegen in dieser Arbeit eine stabile Integration in das Genom mit Hilfe der Transposase stattfand. Die kontinuierliche Zugabe von Geneticin könnte einen

Zellstress verursachen und dadurch eine Hochregulation der 5-LO-Kinasen auslösen. Außerdem wurde in der Veröffentlichung von Allain et al. die Isoform 5-LO Δ 13 mit FLAP kotransfiziert, was bei den Experimenten hier nicht der Fall war und ebenfalls Einfluss haben könnte. Interessanterweise ist 5-LOp12 sowohl an S271 als auch an S523 sehr stark phosphoryliert. Auch wenn die Phosphorylierungsstelle S523 sehr nahe an der fehlenden Sequenz der 5-LOp12 (530-553) liegt, scheint diese anhand der Ergebnisse dennoch zugänglich für die PKA zu sein. Überraschenderweise scheint die Phosphorylierung in kotransfizierten Zellen deutlich hochreguliert zu sein. Betrachtet man jedoch die 5-LO-Proteinmenge mit Hilfe des 5-LO-Antikörpers, so erkennt man außerdem, dass die Proteinmenge ansteigt. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine Hochregulation der Phosphorylierung oder der Proteinmenge handelt, wurde ein P2A-Linker zwischen die 5-LO und den GFP-Tag kloniert. Dieser führt zu einer getrennten Translation von GFP und 5-LO, wodurch die Proteine auf einem Western Blot voneinander getrennt werden konnten. Die 5-LO sollte nun wieder auf der gewohnten Höhe von 78 kDa und die mCherry-getaggten Isoform weiterhin auf einer Höhe von ca. 100 kDa zu finden sein. Es wurde wiederum mit spezifischen Phospho-Antikörpern und mit einem 5-LO-Antikörper detektiert. Leider kann über die Phosphorylierung des 5-LO-WT an S523 keine Aussage getroffen werden, da dieser auf der Höhe der unspezifischen Banden des Antikörpers liegen. Betrachtet man das Ergebnis der S271-Phosphorylierung, so ist zu erkennen, dass die Phosphorylierung der kotransfizierten Zellen mit 5-LO-WT-Plasmid und den Isoform-Plasmiden im Vergleich zu den Isoformen alleine ansteigt, die des WT bleibt gleich (Abb. 49). Die Detektion mittels 5-LO-Antikörper zeigt ebenfalls einen Anstieg der Isoform-Proteinmenge. Insofern könnte man rückschließen, dass der erhöhte Phosphorylierungsstatus mit der erhöhten Proteinmenge korreliert. Bei der Visualisierung der S523-Phosphorylierung erkennt man jedoch lediglich einen leichten Anstieg der Phosphorylierung der Isoformen, wohingegen ein starker Anstieg der Proteinmenge verzeichnet wurde. Somit scheint die Stärke der Phosphorylierung nicht von der Proteinmenge abhängig zu sein, sondern wird durch die Anwesenheit des 5-LO-WT tatsächlich beeinflusst.

5.5 Aktivitätsuntersuchungen der stabil transfizierten 5-LO-S271A-Mutante nach Zugabe eines p38- und CamKII-Inhibitors

Da durch den Einsatz des p-38-Inhibitors SB203580 und des CamKII-Inhibitors KN-93 alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert waren (siehe Abb. 46), wurde der mögliche Einfluss der Isoformen auf die 5-LO-Aktivität untersucht. Dafür wurden mit den stabil integrierten Zellen Aktivitätsassays durchgeführt. Auch hier wurden die Zellen mit Sorbitol und p38-/CaMKII-Inhibitor behandelt. Es konnte hier kein signifikanter Einfluss auf die Produktbildung detektiert werden, lediglich eine leichte Erhöhung der Aktivität, die mit der steigenden 5-LO-Proteinmenge korreliert (Abb.47). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die alternativen Spleiß-Konstrukte Einfluss auf die Proteinexpression ausüben, jedoch nicht auf die 5-LO-Produktbildung.

6 Zusammenfassung

Die humane 5-LO ist das Schlüsselenzym in der LT-Biosynthese. LTs sind wichtige Entzündungsmediatoren und sind in einer Vielzahl von Krankheiten involviert, u. a. Asthma, Atherosklerose, rheumatische Arthritis, Sepsis, allergischen Reaktionen und in vielen Krebsarten. Die Struktur der 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 78 kDa. Sie ist in zwei Domänen unterteilt: die kleinere C2-ähnliche regulatorische Domäne (C2ld) und der größeren katalytischen Domäne. Die 5-LO besitzt NIS und NES, die für die zelluläre Lokalisation der 5-LO verantwortlich sind. Außerdem wird die Lokalisation noch von Phosphorylierungsstellen reguliert, die auf der katalytischen Domäne identifiziert werden konnten. 2011 konnten Häfner et al. zeigen, dass die 5-LO in der Lage ist Homodimere zu bilden.

Wie für die meisten anderen humanen Gene konnten auch bei der 5-LO alternative Spleißvarianten identifiziert werden. Schon 1992 konnten die ersten unterschiedlich gespleißten Transkripte in Hirntumoren und differenzierten HL-60-Zellen gefunden werden [262]. Später konnten weitere Isoformen in verschiedenen Zelllinien entdeckt werden [263,266,267].

In der vorliegenden Arbeit wurden die alternativen Spleißvarianten 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 untersucht und charakterisiert. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression des 5-LO-WT und deren Isoformen sowohl in B- und T-Zelllinien als auch primären B- und T-Zellen, monozytären Zelllinien und primäre Monozyten aus Patientenproben (RA und Sepsis) untersucht. Es wurde festgestellt, dass das Expressionsprofil der 5-LO-Varianten zellspezifisch ist. Im Vergleich zu den T-Zellen konnte in B-Zelllinien ein höheres Expressionslevel detektiert werden. Des Weiteren zeigte sich interessanterweise ein stark erhöhtes Expressionslevel in primären Monozyten von RA- und Sepsis-Patienten.

Untersuchungen der 5-LO-Aktivität ergaben unterschiedliche Ergebnisse, abhängig von der Transfektionsmethode. Als transiente Transfektion diente die Calciumphosphat-Methode. Für die stabile Integration der HEK293T-Zellen wurde die Sleeping Beauty-Methode gewählt. Hierfür wurden Proteine mit einem GFP bzw. mCherry-Tag (GFP-5-LO-WT, mCherry Δ 13, mCherry Δ 4, mCherry Δ p12) verwendet, um diese mittels Konfokalmikroskop visualisieren zu können. Nach transients Transfektion konnte eine Inhibition der 5-LO-Aktivität nach Kotransfektion mit jeweils einer Isoform gemessen

werden. Nach stabiler Integration jedoch zeigte sich eine Steigerung der 5-LO-Produktbildung. Mit Hilfe von Western Blots wurden Expressionskontrollen angefertigt und die Menge des 5-LO-WT quantifiziert. In transient transfizierten Zellen wurde eine Erniedrigung der Expression des 5-LO-WT bestimmt, wohingegen in stabil integrierten Zellen ein Anstieg des 5-LO-WT als auch der Isoformen beobachtet werden konnte. Einerseits könnte dies einem Artefakt der Transfektionmethode zugrunde liegen, andererseits könnte es ein Hinweis darauf sein, dass sich die Proteine gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen.

Ebenso wurde die Lokalisation der 5-LO und deren Isoformen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die 5-LO überwiegend im Zellkern lokalisiert ist, während alle alternativen Protein-Isoformen im Zytosol zu finden waren. Durch Ionophor-Behandlung wurde eine Translokation des 5-LO-WT an die Kernmembran detektiert, die Isoformen verblieben im Zytosol. Überraschenderweise konnte beobachtet werden, dass die Spleißvariante 5-LO Δ 13 mit höherer Ionophor-Konzentration ebenso in der Lage ist an die Kernmembran zu translozieren. Um eine mögliche Interaktion der 5-LO mit den Isoformen zu untersuchen, sollten alle Proteine im selben Zellkompartiment lokalisiert sein. Dafür wurden verschiedene Stimuli und Mutationen getestet. Mit der Mutante GFP-5-LO-S271A und dem Stressstimulus Sorbitol und den CaMKII/p38-Inhibitoren KN-93/SB203580 konnte eine Translokation in das Zytosol erreicht werden. Die Ergebnisse der anschließenden Aktivitätsassays zeigten, dass die Isoformen keinen Einfluss auf die Aktivität der 5-LO ausüben.

Des Weiteren wurden die Phosphorylierungen an S523 und S271 von 5-LO-WT, 5-LO Δ 13, 5-LO Δ 4 und 5-LOp12 untersucht. Es wurde herausgefunden, dass die 5-LO-Proteine unterschiedliche Phosphorylierungsmuster aufweisen. Während 5-LO-WT und 5-LO Δ 4 eine schwache Phosphorylierung an S271 aufzeigen, konnte eine starke Phosphorylierung der 5-LO Δ 13 und 5-LOp12 detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigte lediglich die Isoform 5-LOp12 eine sehr starke Bande an der Phosphorylierungsstelle S523. Bei beiden Phosphorylierungen konnten deutlich stärkere Signale nach Kotransfektion gemessen werden. Durch Klonierung eines P2A-Linkers zwischen 5-LO und des GFP-Tags, konnten die Isoformen vom 5-LO-WT in Western Blots voneinander getrennt werden. Dies zeigte, dass es zu einer Hochregulation der Expression der alternativen 5-LO-Varianten nach Kotransfektion mit dem WT führte, aber auch, dass die stärkere Phosphorylierung nach Kotransfektion unabhängig von der Proteinmenge ist.

References

- [1] H. Kuhn, B.J. Thiele, The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance, *FEBS letters* 449 (1) (1999) 7–11.
- [2] A.R. Brash, Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate, *The Journal of biological chemistry* 274 (34) (1999) 23679–23682.
- [3] H. Porta, M. Rocha-Sosa, Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?, *Microbiology (Reading, England)* 147 (Pt 12) (2001) 3199–3200.
- [4] H. THEORELL, R.T. HOLMAN, A. AKESON, Crystalline lipoxidase, *Acta chemica Scandinavica* 1 (6) (1947) 571–576.
- [5] M. Hamberg, B. Samuelsson, Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9) (1974) 3400–3404.
- [6] T. Matsumoto, C.D. Funk, O. Rådmark, J.O. Hoog, H. Jörnvall, B. Samuelsson, Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (1) (1988) 26–30.
- [7] A.R. Brash, W.E. Boeglin, M.S. Chang, Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (12) (1997) 6148–6152.
- [8] W.E. Boeglin, R.B. Kim, A.R. Brash, A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12) (1998) 6744–6749.
- [9] T. Izumi, S. Hoshiko, O. Rådmark, B. Samuelsson, Cloning of the cDNA for human 12-lipoxygenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (19) (1990) 7477–7481.
- [10] E. Sigal, C.S. Craik, E. Highland, D. Grunberger, L.L. Costello, R.A. Dixon, J.A. Nadel, Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase, *Biochemical and biophysical research communications* 157 (2) (1988) 457–464.
- [11] R.A. Creelman, J.E. Mullet, BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS, *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 48 (1997) 355–381.
- [12] A. Andreou, I. Feussner, Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism, *Phytochemistry* 70 (13-14) (2009) 1504–1510.

Zusammenfassung

- [13] S.T. Prigge, J.C. Boyington, B.J. Gaffney, L.M. Amzel, Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases, *Proteins* 24 (3) (1996) 275–291.
- [14] C.D. Funk, S. Hoshiko, T. Matsumoto, O. Rådmark, B. Samuelsson, Characterization of the human 5-lipoxygenase gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (8) (1989) 2587–2591.
- [15] O. Werz, 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology, *Current drug targets. Inflammation and allergy* 1 (1) (2002) 23–44.
- [16] S. Hoshiko, O. Rådmark, B. Samuelsson, Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (23) (1990) 9073–9077.
- [17] E.S. Silverman, J. Du, G.T. de Sanctis, O. Rådmark, B. Samuelsson, J.M. Drazen, T. Collins, Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 19 (2) (1998) 316–323.
- [18] M. Brungs, O. Rådmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D₃, retinoic acid, DMSO and TGF beta, *Biochemical and biophysical research communications* 205 (3) (1994) 1572–1580.
- [19] D. Steinhilber, O. Rådmark, B. Samuelsson, Transforming growth factor beta upregulates 5-lipoxygenase activity during myeloid cell maturation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13) (1993) 5984–5988.
- [20] E. Mougey, J.E. Lang, H. Allayee, W.G. Teague, A.J. Dozor, R.A. Wise, J.J. Lima, ALOX5 polymorphism associates with increased leukotriene production and reduced lung function and asthma control in children with poorly controlled asthma, *Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 43 (5) (2013) 512–520.
- [21] J.M. Drazen, C.N. Yandava, L. Dube, N. Szczerback, R. Hippensteel, A. Pillari, E. Israel, N. Schork, E.S. Silverman, D.A. Katz, J. Drajesk, Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment, *Nature genetics* 22 (2) (1999) 168–170.
- [22] K.H. In, K. Asano, D. Beier, J. Grobholz, P.W. Finn, E.K. Silverman, E.S. Silverman, T. Collins, A.R. Fischer, T.P. Keith, K. Serino, S.W. Kim, G.T. de Sanctis, C. Yandava, A. Pillari, P. Rubin, J. Kemp, E. Israel, W. Busse, D. Ledford, J.J. Murray, A. Segal, D. Tinkleman, J.M. Drazen, Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription, *The Journal of clinical investigation* 99 (5) (1997) 1130–1137.

- [23] O. Rådmark, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity, *Trends in biochemical sciences* 32 (7) (2007) 332–341.
- [24] J. Uhl, N. Klan, M. Rose, K.-D. Entian, O. Werz, D. Steinhilber, The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation, *The Journal of biological chemistry* 277 (6) (2002) 4374–4379.
- [25] A. Ponton, J.P. Thirion, P. Sirois, Repression of the 5-lipoxygenase gene by c-myc overexpression in differentiated HL-60 cells, *Prostaglandins* 53 (1) (1997) 49–58.
- [26] J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, C.M. Dubois, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases 5-lipoxygenase gene transcription and protein expression in human neutrophils, *Blood* 85 (12) (1995) 3719–3726.
- [27] D. Steinhilber, M. Brungs, O. Werz, I. Wiesenberg, C. Danielsson, J.P. Kahlen, S. Nayeri, M. Schrader, C. Carlberg, The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes, *The Journal of biological chemistry* 270 (13) (1995) 7037–7040.
- [28] N. Klan, S. Seuter, N. Schnur, M. Jung, D. Steinhilber, Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity, *Biological chemistry* 384 (5) (2003) 777–785.
- [29] K. Ahmad, C. Katryniok, B. Scholz, J. Merkens, D. Löscher, R. Marschalek, D. Steinhilber, Inhibition of class I HDACs abrogates the dominant effect of MLL-AF4 by activation of wild-type MLL, *Oncogenesis* 3 (2014) e127.
- [30] M. Brungs, O. Rådmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1) (1995) 107–111.
- [31] B. Gilbert, K. Ahmad, J. Roos, C. Lehmann, T. Chiba, S. Ulrich-Ruckert, L. Smeenk, S. van Heeringen, T.J. Maier, B. Groner, D. Steinhilber, 5-Lipoxygenase is a direct p53 target gene in humans, *Biochimica et biophysica acta* 1849 (8) (2015) 1003–1016.
- [32] J.W. Woods, M.J. Coffey, T.G. Brock, I.I. Singer, M. Peters-Golden, 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation, *The Journal of clinical investigation* 95 (5) (1995) 2035–2046.
- [33] X.S. Chen, T.A. Naumann, U. Kurre, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, C.D. Funk, cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase, *The Journal of biological chemistry* 270 (30) (1995) 17993–17999.

- [34] T.G. Brock, R.3. Paine, M. Peters-Golden, Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells, *The Journal of biological chemistry* 269 (35) (1994) 22059–22066.
- [35] T.G. Brock, J.A. Anderson, F.P. Fries, M. Peters-Golden, P.H. Sporn, Decreased leukotriene C4 synthesis accompanies adherence-dependent nuclear import of 5-lipoxygenase in human blood eosinophils, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 162 (3) (1999) 1669–1676.
- [36] M. Peters-Golden, R.W. McNish, Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation, *Biochemical and biophysical research communications* 196 (1) (1993) 147–153.
- [37] S.M. Jones, M. Luo, A.M. Healy, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein, *The Journal of biological chemistry* 277 (41) (2002) 38550–38556.
- [38] S.M. Jones, M. Luo, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Identification of two novel nuclear import sequences on the 5-lipoxygenase protein, *The Journal of biological chemistry* 278 (12) (2003) 10257–10263.
- [39] H. Hanaka, T. Shimizu, T. Izumi, Stress-induced nuclear export of 5-lipoxygenase, *Biochemical and biophysical research communications* 338 (1) (2005) 111–116.
- [40] H. Hanaka, T. Shimizu, T. Izumi, Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase, *The Biochemical journal* 361 (Pt 3) (2002) 505–514.
- [41] S. Markoutsas, D. Surun, M. Karas, B. Hofmann, D. Steinhilber, B.L. Sorg, Analysis of 5-lipoxygenase phosphorylation on molecular level by MALDI-MS, *The FEBS journal* 281 (8) (2014) 1931–1947.
- [42] M. Luo, S.M. Jones, S.M. Phare, M.J. Coffey, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523, *The Journal of biological chemistry* 279 (40) (2004) 41512–41520.
- [43] O. Werz, E. Burkert, L. Fischer, D. Szellas, D. Dishart, B. Samuelsson, O. Rådmark, D. Steinhilber, Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (11) (2002) 1441–1443.
- [44] O. Werz, D. Szellas, D. Steinhilber, O. Rådmark, Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2), *The Journal of biological chemistry* 277 (17) (2002) 14793–14800.

- [45] O. Werz, J. Klemm, B. Samuelsson, O. Rådmark, 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10) (2000) 5261–5266.
- [46] M. Luo, S.M. Jones, N. Flamand, D.M. Aronoff, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase, *The Journal of biological chemistry* 280 (49) (2005) 40609–40616.
- [47] M. Luo, S.M. Jones, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (21) (2003) 12165–12170.
- [48] P. Borgeat, B. Samuelsson, Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (5) (1979) 2148–2152.
- [49] T. Hammarberg, P. Provost, B. Persson, O. Rådmark, The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity, *The Journal of biological chemistry* 275 (49) (2000) 38787–38793.
- [50] T. Hammarberg, O. Rådmark, 5-lipoxygenase binds calcium, *Biochemistry* 38 (14) (1999) 4441–4447.
- [51] O. Rådmark, B. Samuelsson, Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity, *Biochemical and biophysical research communications* 338 (1) (2005) 102–110.
- [52] A. Hatzelmann, M. Schatz, V. Ullrich, Involvement of glutathione peroxidase activity in the stimulation of 5-lipoxygenase activity by glutathione-depleting agents in human polymorphonuclear leukocytes, *European journal of biochemistry* 180 (3) (1989) 527–533.
- [53] N.D. Chasteen, J.K. Grady, K.I. Skorey, K.J. Neden, D. Riendeau, M.D. Percival, Characterization of the non-heme iron center of human 5-lipoxygenase by electron paramagnetic resonance, fluorescence, and ultraviolet-visible spectroscopy: redox cycling between ferrous and ferric states, *Biochemistry* 32 (37) (1993) 9763–9771.
- [54] O. Werz, D. Steinhilber, Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells. The presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells, *European journal of biochemistry* 242 (1) (1996) 90–97.
- [55] D. Riendeau, D. Denis, L.Y. Choo, D.J. Nathaniel, Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation, *The Biochemical journal* 263 (2) (1989) 565–572.
- [56] A.H. Pande, D. Moe, K.N. Nemeč, S. Qin, S. Tan, S.A. Tatulian, Modulation of human 5-lipoxygenase activity by membrane lipids, *Biochemistry* 43 (46) (2004) 14653–14666.

- [57] T. Puustinen, M.M. Scheffer, B. Samuelsson, Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles, *Biochimica et biophysica acta* 960 (3) (1988) 261–267.
- [58] O. Werz, Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin, *Planta medica* 73 (13) (2007) 1331–1357.
- [59] P.P. McDonald, S.R. McColl, P.H. Naccache, P. Borgeat, Studies on the activation of human neutrophil 5-lipoxygenase induced by natural agonists and Ca²⁺ ionophore A23187, *The Biochemical journal* 280 (Pt 2) (1991) 379–385.
- [60] M. Pouliot, P.P. McDonald, E. Krump, J.A. Mancini, S.R. McColl, P.K. Weech, P. Borgeat, Colocalization of cytosolic phospholipase A₂, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils, *European journal of biochemistry* 238 (1) (1996) 250–258.
- [61] A. Wong, M.N. Cook, J.J. Foley, H.M. Sarau, P. Marshall, S.M. Hwang, Influx of extracellular calcium is required for the membrane translocation of 5-lipoxygenase and leukotriene synthesis, *Biochemistry* 30 (38) (1991) 9346–9354.
- [62] C.C. Leslie, Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A₂, Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids 70 (4) (2004) 373–376.
- [63] M.A. Gijon, D.M. Spencer, C.C. Leslie, Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A(2), *Advances in enzyme regulation* 40 (2000) 255–268.
- [64] R.A. Dixon, R.E. Diehl, E. Opas, E. Rands, P.J. Vickers, J.F. Evans, J.W. Gillard, D.K. Miller, Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis, *Nature* 343 (6255) (1990) 282–284.
- [65] M. Abramovitz, E. Wong, M.E. Cox, C.D. Richardson, C. Li, P.J. Vickers, 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase, *European journal of biochemistry* 215 (1) (1993) 105–111.
- [66] J.A. Mancini, M. Abramovitz, M.E. Cox, E. Wong, S. Charleson, H. Perrier, Z. Wang, P. Prasit, P.J. Vickers, 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein, *FEBS letters* 318 (3) (1993) 277–281.
- [67] C.A. Rouzer, T. Matsumoto, B. Samuelsson, Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (4) (1986) 857–861.
- [68] N. Ueda, S. Kaneko, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids, *The Journal of biological chemistry* 261 (17) (1986) 7982–7988.

- [69] C.A. Rouzer, B. Samuelsson, The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase, *FEBS letters* 204 (2) (1986) 293–296.
- [70] U. Schwenk, E. Morita, R. Engel, J.M. Schroder, Identification of 5-oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic acid as a novel and potent human eosinophil chemotactic eicosanoid, *The Journal of biological chemistry* 267 (18) (1992) 12482–12488.
- [71] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science (New York, N.Y.)* 294 (5548) (2001) 1871–1875.
- [72] T. Shimizu, T. Izumi, Y. Seyama, K. Tadokoro, O. Rådmark, B. Samuelsson, Characterization of leukotriene A4 synthase from murine mast cells: evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12) (1986) 4175–4179.
- [73] R.C. Murphy, S. Hammarström, B. Samuelsson, Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9) (1979) 4275–4279.
- [74] J.Z. Haeggström, Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis, *The Journal of biological chemistry* 279 (49) (2004) 50639–50642.
- [75] S.A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M.F. Browner, The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, *Nature structural biology* 4 (12) (1997) 1003–1009.
- [76] J. Hemak, D. Gale, T.G. Brock, Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme, *Journal of molecular modeling* 8 (4) (2002) 102–112.
- [77] N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, M.T. Waight, D.B. Neau, W.E. Boeglin, A.R. Brash, M.E. Newcomer, The structure of human 5-lipoxygenase, *Science (New York, N.Y.)* 331 (6014) (2011) 217–219.
- [78] M. Rakonjac Ryge, M. Tanabe, P. Provost, B. Persson, X. Chen, C.D. Funk, A. Rinaldo-Matthis, B. Hofmann, D. Steinhilber, T. Watanabe, B. Samuelsson, O. Rådmark, A mutation interfering with 5-lipoxygenase domain interaction leads to increased enzyme activity, *Archives of biochemistry and biophysics* 545 (2014) 179–185.
- [79] J.H. Hurley, S. Misra, Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29 (2000) 49–79.
- [80] S. Kulkarni, S. Das, C.D. Funk, D. Murray, W. Cho, Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase, *The Journal of biological chemistry* 277 (15) (2002) 13167–13174.
- [81] C. Hörnig, D. Albert, L. Fischer, M. Hörnig, O. Rådmark, D. Steinhilber, O. Werz, 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid

Zusammenfassung

- binding site within the N-terminal C2-like domain, *The Journal of biological chemistry* 280 (29) (2005) 26913–26921.
- [82] M. Rakonjac, L. Fischer, P. Provost, O. Werz, D. Steinhilber, B. Samuelsson, O. Rådmark, Coactosin-like protein supports 5-lipoxygenase enzyme activity and up-regulates leukotriene A4 production, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35) (2006) 13150–13155.
- [83] X.S. Chen, C.D. Funk, The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation, *The Journal of biological chemistry* 276 (1) (2001) 811–818.
- [84] A.H. Pande, S. Qin, S.A. Tatulian, Membrane fluidity is a key modulator of membrane binding, insertion, and activity of 5-lipoxygenase, *Biophysical journal* 88 (6) (2005) 4084–4094.
- [85] V. Dincbas-Renqvist, G. Pepin, M. Rakonjac, I. Plante, D.L. Ouellet, A. Hermansson, I. Goulet, J. Doucet, B. Samuelsson, O. Rådmark, P. Provost, Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain, *Biochimica et biophysica acta* 1789 (2) (2009) 99–108.
- [86] J. Esser, M. Rakonjac, B. Hofmann, L. Fischer, P. Provost, G. Schneider, D. Steinhilber, B. Samuelsson, O. Rådmark, Coactosin-like protein functions as a stabilizing chaperone for 5-lipoxygenase: role of tryptophan 102, *The Biochemical journal* 425 (1) (2009) 265–274.
- [87] T. Hammarberg, Y.Y. Zhang, B. Lind, O. Rådmark, B. Samuelsson, Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase, *European journal of biochemistry* 230 (2) (1995) 401–407.
- [88] T. Hammarberg, S. Kuprin, O. Rådmark, A. Holmgren, EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide, *Biochemistry* 40 (21) (2001) 6371–6378.
- [89] Y.Y. Zhang, O. Rådmark, B. Samuelsson, Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (2) (1992) 485–489.
- [90] C.A. Rouzer, B. Samuelsson, On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (18) (1985) 6040–6044.
- [91] O. Rådmark, Arachidonate 5-lipoxygenase, Prostaglandins & other lipid mediators 68-69 (2002) 211–234.
- [92] A.-K. Häfner, M. Cernescu, B. Hofmann, M. Ermisch, M. Hörnig, J. Metzner, G. Schneider, B. Brutschy, D. Steinhilber, Dimerization of human 5-lipoxygenase, *Biological chemistry* 392 (12) (2011) 1097–1111.

- [93] D.K. Miller, J.W. Gillard, P.J. Vickers, S. Sadowski, C. Leveille, J.A. Mancini, P. Charleson, R.A. Dixon, A.W. Ford-Hutchinson, R. Fortin, Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production, *Nature* 343 (6255) (1990) 278–281.
- [94] B.P. Kennedy, R.E. Diehl, Y. Boie, M. Adam, R.A. Dixon, Gene characterization and promoter analysis of the human 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), *The Journal of biological chemistry* 266 (13) (1991) 8511–8516.
- [95] P.J. Jakobsson, R. Morgenstern, J. Mancini, A. Ford-Hutchinson, B. Persson, Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily, *American journal of respiratory and critical care medicine* 161 (2 Pt 2) (2000) S20-4.
- [96] J.W. Woods, J.F. Evans, D. Ethier, S. Scott, P.J. Vickers, L. Hearn, J.A. Heibin, S. Charleson, I.I. Singer, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes, *The Journal of experimental medicine* 178 (6) (1993) 1935–1946.
- [97] A.K. Mandal, P.B. Jones, A.M. Bair, P. Christmas, D. Miller, T.-t.D. Yamin, D. Wisniewski, J. Menke, J.F. Evans, B.T. Hyman, B. Bacskai, M. Chen, D.M. Lee, B. Nikolic, R.J. Soberman, The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (51) (2008) 20434–20439.
- [98] A.K. Mandal, J. Skoch, B.J. Bacskai, B.T. Hyman, P. Christmas, D. Miller, T.-t.D. Yamin, S. Xu, D. Wisniewski, J.F. Evans, R.J. Soberman, The membrane organization of leukotriene synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (2004) 6587–6592.
- [99] P.J. Vickers, 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP), *Journal of lipid mediators and cell signalling* 12 (2-3) (1995) 185–194.
- [100] P.J. Jakobsson, D. Steinhilber, B. Odlander, O. Rådmark, H.E. Claesson, B. Samuelsson, On the expression and regulation of 5-lipoxygenase in human lymphocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8) (1992) 3521–3525.
- [101] D. Steinhilber, 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity, *Pharmaceutica acta Helvetiae* 69 (1) (1994) 3–14.
- [102] A.D. Ferguson, B.M. McKeever, S. Xu, D. Wisniewski, D.K. Miller, T.-T. Yamin, R.H. Spencer, L. Chu, F. Ujjainwalla, B.R. Cunningham, J.F. Evans, J.W. Becker, Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein, *Science (New York, N.Y.)* 317 (5837) (2007) 510–512.
- [103] J. Gillard, A.W. Ford-Hutchinson, C. Chan, S. Charleson, D. Denis, A. Foster, R. Fortin, S. Leger, C.S. McFarlane, H. Morton, L-663,536 (MK-886) (3-1-(4-chlorobenzyl)-

Zusammenfassung

- 3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 67 (5) (1989) 456–464.
- [104] C.A. Rouzer, A.W. Ford-Hutchinson, H.E. Morton, J.W. Gillard, MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes, *The Journal of biological chemistry* 265 (3) (1990) 1436–1442.
- [105] J.F. Evans, A.D. Ferguson, R.T. Mosley, J.H. Hutchinson, What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases, *Trends in pharmacological sciences* 29 (2) (2008) 72–78.
- [106] P. Borgeat, B. Samuelsson, Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid, *The Journal of biological chemistry* 254 (8) (1979) 2643–2646.
- [107] O. Rådmark, C. Malmsten, B. Samuelsson, D.A. Clark, G. Goto, A. Marfat, E.J. Corey, Leukotriene A: stereochemistry and enzymatic conversion to leukotriene B, *Biochemical and biophysical research communications* 92 (3) (1980) 954–961.
- [108] B. Samuelsson, Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science (New York, N.Y.)* 220 (4597) (1983) 568–575.
- [109] O. Rådmark, T. Shimizu, H. Jörnvall, B. Samuelsson, Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties, *The Journal of biological chemistry* 259 (20) (1984) 12339–12345.
- [110] J.F. Medina, J. Haeggström, M. Kumlin, O. Rådmark, Leukotriene A4: metabolism in different rat tissues, *Biochimica et biophysica acta* 961 (2) (1988) 203–212.
- [111] F. Fitzpatrick, J. Haeggström, E. Granström, B. Samuelsson, Metabolism of leukotriene A4 by an enzyme in blood plasma: a possible leukotactic mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (17) (1983) 5425–5429.
- [112] J.Y. Fu, J. Haeggström, P. Collins, J. Meijer, O. Rådmark, Leukotriene A4 hydrolase: analysis of some human tissues by radioimmunoassay, *Biochimica et biophysica acta* 1006 (1) (1989) 121–126.
- [113] T. Izumi, T. Shimizu, Y. Seyama, N. Ohishi, F. Takaku, Tissue distribution of leukotriene A4 hydrolase activity in guinea pig, *Biochemical and biophysical research communications* 135 (1) (1986) 139–145.
- [114] C.D. Funk, O. Rådmark, J.Y. Fu, T. Matsumoto, H. Jörnradmark, T. Shimizu, B. Samuelsson, Molecular cloning and amino acid sequence of leukotriene A4 hydrolase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (19) (1987) 6677–6681.

Zusammenfassung

- [115] J.A. Mancini, J.F. Evans, Cloning and characterization of the human leukotriene A4 hydrolase gene, *European journal of biochemistry* 231 (1) (1995) 65–71.
- [116] B. Malfroy, H. Kado-Fong, C. Gros, B. Giros, J.C. Schwartz, R. Hellmiss, Molecular cloning and amino acid sequence of rat kidney aminopeptidase M: a member of a super family of zinc-metallohydrolases, *Biochemical and biophysical research communications* 161 (1) (1989) 236–241.
- [117] J.Z. Haeggström, A. Wetterholm, R. Shapiro, B.L. Vallee, B. Samuelsson, Leukotriene A4 hydrolase: a zinc metalloenzyme, *Biochemical and biophysical research communications* 172 (3) (1990) 965–970.
- [118] J.F. Medina, A. Wetterholm, O. Rådmark, R. Shapiro, J.Z. Haeggström, B.L. Vallee, B. Samuelsson, Leukotriene A4 hydrolase: determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (17) (1991) 7620–7624.
- [119] J.Z. Haeggström, A. Wetterholm, B.L. Vallee, B. Samuelsson, Leukotriene A4 hydrolase: an epoxide hydrolase with peptidase activity, *Biochemical and biophysical research communications* 173 (1) (1990) 431–437.
- [120] A. Wetterholm, J.Z. Haeggström, Leukotriene A4 hydrolase: an anion activated peptidase, *Biochimica et biophysica acta* 1123 (3) (1992) 275–281.
- [121] A. Wetterholm, L. Macchia, J.Z. Haeggström, Zinc and other divalent cations inhibit purified leukotriene A4 hydrolase and leukotriene B4 biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes, *Archives of biochemistry and biophysics* 311 (2) (1994) 263–271.
- [122] L. Orning, J. Gierse, K. Duffin, G. Bild, G. Krivi, F.A. Fitzpatrick, Mechanism-based inactivation of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by leukotriene A4. Mass spectrometric and kinetic characterization, *The Journal of biological chemistry* 267 (32) (1992) 22733–22739.
- [123] J.F. Evans, D.J. Nathaniel, R.J. Zamboni, A.W. Ford-Hutchinson, Leukotriene A3. A poor substrate but a potent inhibitor of rat and human neutrophil leukotriene A4 hydrolase, *The Journal of biological chemistry* 260 (20) (1985) 10966–10970.
- [124] M.M. Thunnissen, P. Nordlund, J.Z. Haeggström, Crystal structure of human leukotriene A(4) hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation, *Nature structural biology* 8 (2) (2001) 131–135.
- [125] E. Diez, S. Mong, Purification of a phospholipase A2 from human monocytic leukemic U937 cells. Calcium-dependent activation and membrane association, *The Journal of biological chemistry* 265 (24) (1990) 14654–14661.
- [126] E.A. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2, *The Journal of biological chemistry* 269 (18) (1994) 13057–13060.

Zusammenfassung

- [127] D.A. Six, E.A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization, *Biochimica et biophysica acta* 1488 (1-2) (2000) 1–19.
- [128] C.C. Leslie, Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2, *The Journal of biological chemistry* 272 (27) (1997) 16709–16712.
- [129] C.O.3. Bingham, K.F. Austen, Phospholipase A2 enzymes in eicosanoid generation, *Proceedings of the Association of American Physicians* 111 (6) (1999) 516–524.
- [130] F. Alonso, P.M. Henson, C.C. Leslie, A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine, *Biochimica et biophysica acta* 878 (2) (1986) 273–280.
- [131] C.C. Leslie, D.R. Voelker, J.Y. Channon, M.M. Wall, P.T. Zelarney, Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from a macrophage cell line, RAW 264.7, *Biochimica et biophysica acta* 963 (3) (1988) 476–492.
- [132] J.D. Sharp, D.L. White, X.G. Chiou, T. Goodson, G.C. Gamboa, D. McClure, S. Burgett, J. Hoskins, P.L. Skatrud, J.R. Sportsman, Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2, *The Journal of biological chemistry* 266 (23) (1991) 14850–14853.
- [133] R.M. Kramer, J.D. Sharp, Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), *FEBS letters* 410 (1) (1997) 49–53.
- [134] A. Tay, P. Maxwell, Z. Li, H. Goldberg, K. Skorecki, Isolation of promoter for cytosolic phospholipase A2 (cPLA2), *Biochimica et biophysica acta* 1217 (3) (1994) 345–347.
- [135] J.D. Sharp, D.L. White, Cytosolic PLA2: mRNA levels and potential for transcriptional regulation, *Journal of lipid mediators* 8 (3) (1993) 183–189.
- [136] K.I. Hulkower, W.C. Hope, T. Chen, C.M. Anderson, J.W. Coffey, D.W. Morgan, Interleukin-1 beta stimulates cytosolic phospholipase A2 in rheumatoid synovial fibroblasts, *Biochemical and biophysical research communications* 184 (2) (1992) 712–718.
- [137] C.S. Ramesha, D.L. Ives, Detection of arachidonoyl-selective phospholipase A2 in human neutrophil cytosol, *Biochimica et biophysica acta* 1168 (1) (1993) 37–44.
- [138] T. Nakamura, L.L. Lin, S. Kharbanda, J. Knopf, D. Kufe, Macrophage colony stimulating factor activates phosphatidylcholine hydrolysis by cytoplasmic phospholipase A2, *The EMBO journal* 11 (13) (1992) 4917–4922.
- [139] L.L. Lin, A.Y. Lin, D.L. DeWitt, Interleukin-1 alpha induces the accumulation of cytosolic phospholipase A2 and the release of prostaglandin E2 in human fibroblasts, *The Journal of biological chemistry* 267 (33) (1992) 23451–23454.

- [140] J.Y. Channon, C.C. Leslie, A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7, *The Journal of biological chemistry* 265 (10) (1990) 5409–5413.
- [141] A.R. Schievella, M.K. Regier, W.L. Smith, L.L. Lin, Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum, *The Journal of biological chemistry* 270 (51) (1995) 30749–30754.
- [142] E.A. Nalefski, L.A. Sultzman, D.M. Martin, R.W. Kriz, P.S. Towler, J.L. Knopf, J.D. Clark, Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain, *The Journal of biological chemistry* 269 (27) (1994) 18239–18249.
- [143] M.G. de Carvalho, A.L. McCormack, E. Olson, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, J.R. Yates, C.C. Leslie, Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes, *The Journal of biological chemistry* 271 (12) (1996) 6987–6997.
- [144] Z.H. Qiu, M.A. Gijon, M.S. de Carvalho, D.M. Spencer, C.C. Leslie, The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages, *The Journal of biological chemistry* 273 (14) (1998) 8203–8211.
- [145] L.L. Lin, M. Wartmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth, R.J. Davis, cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell* 72 (2) (1993) 269–278.
- [146] K.S. Chen, P. Manian, T. Koeuth, L. Potocki, Q. Zhao, A.C. Chinault, C.C. Lee, J.R. Lupski, Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome, *Nature genetics* 17 (2) (1997) 154–163.
- [147] P. Provost, B. Samuelsson, O. Rådmark, Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5) (1999) 1881–1885.
- [148] P. Provost, J. Doucet, T. Hammarberg, G. Gerisch, B. Samuelsson, O. Rådmark, 5-Lipoxygenase interacts with coactosin-like protein, *The Journal of biological chemistry* 276 (19) (2001) 16520–16527.
- [149] P. Provost, J. Doucet, A. Stock, G. Gerisch, B. Samuelsson, O. Rådmark, Coactosin-like protein, a human F-actin-binding protein: critical role of lysine-75, *The Biochemical journal* 359 (Pt 2) (2001) 255–263.
- [150] D. Basavarajappa, M. Wan, A. Lukic, D. Steinhilber, B. Samuelsson, O. Rådmark, Roles of coactosin-like protein (CLP) and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in cellular leukotriene biosynthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (31) (2014) 11371–11376.
- [151] L. Liu, Z. Wei, Y. Wang, M. Wan, Z. Cheng, W. Gong, Crystal structure of human coactosin-like protein, *Journal of molecular biology* 344 (2) (2004) 317–323.

- [152] J.F. Penrose, J. Spector, M. Baldasaro, K. Xu, J. Boyce, J.P. Arm, K.F. Austen, B.K. Lam, Molecular cloning of the gene for human leukotriene C4 synthase. Organization, nucleotide sequence, and chromosomal localization to 5q35, *The Journal of biological chemistry* 271 (19) (1996) 11356–11361.
- [153] D.W. Nicholson, M.W. Klemba, D.M. Rasper, K.M. Metters, R.J. Zamboni, A.W. Ford-Hutchinson, Purification of human leukotriene C4 synthase from dimethylsulfoxide-differentiated U937 cells, *European journal of biochemistry* 209 (2) (1992) 725–734.
- [154] B.K. Lam, J.F. Penrose, G.J. Freeman, K.F. Austen, Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16) (1994) 7663–7667.
- [155] D.W. Nicholson, A. Ali, J.P. Vaillancourt, J.R. Calaycay, R.A. Mumford, R.J. Zamboni, A.W. Ford-Hutchinson, Purification to homogeneity and the N-terminal sequence of human leukotriene C4 synthase: a homodimeric glutathione S-transferase composed of 18-kDa subunits, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (5) (1993) 2015–2019.
- [156] P.F. Weller, C.W. Lee, D.W. Foster, E.J. Corey, K.F. Austen, R.A. Lewis, Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (24) (1983) 7626–7630.
- [157] D.W. MacGlashan JR, R.P. Schleimer, S.P. Peters, E.S. Schulman, G.K. Adams, H.H. Newball, L.M. Lichtenstein, Generation of leukotrienes by purified human lung mast cells, *The Journal of clinical investigation* 70 (4) (1982) 747–751.
- [158] D.W. MacGlashan JR, S.P. Peters, J. Warner, L.M. Lichtenstein, Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release: releasability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-links, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 136 (6) (1986) 2231–2239.
- [159] T. Yoshimoto, R.J. Soberman, B. Spur, K.F. Austen, Properties of highly purified leukotriene C4 synthase of guinea pig lung, *The Journal of clinical investigation* 81 (3) (1988) 866–871.
- [160] D.J. Welsch, D.P. Creely, S.D. Hauser, K.J. Mathis, G.G. Krivi, P.C. Isakson, Molecular cloning and expression of human leukotriene-C4 synthase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (21) (1994) 9745–9749.
- [161] I. Schmidt-Krey, Y. Kanaoka, D.J. Mills, D. Irikura, W. Haase, B.K. Lam, K.F. Austen, W. Kuhlbrandt, Human leukotriene C(4) synthase at 4.5 Å resolution in projection, *Structure (London, England 1993)* 12 (11) (2004) 2009–2014.
- [162] D. Martinez Molina, A. Wetterholm, A. Kohl, A.A. McCarthy, D. Niegowski, E. Ohlson, T. Hammarberg, S. Eshaghi, J.Z. Haeggström, P. Nordlund, Structural basis for

- synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase, *Nature* 448 (7153) (2007) 613–616.
- [163] T. Yoshimoto, R.J. Soberman, R.A. Lewis, K.F. Austen, Isolation and characterization of leukotriene C4 synthetase of rat basophilic leukemia cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (24) (1985) 8399–8403.
- [164] M.K. Bach, J.R. Brashler, D.R. Morton JR, Solubilization and characterization of the leukotriene C4 synthetase of rat basophil leukemia cells: a novel, particulate glutathione S-transferase, *Archives of biochemistry and biophysics* 230 (2) (1984) 455–465.
- [165] H. Ago, Y. Kanaoka, D. Irikura, B.K. Lam, T. Shimamura, K.F. Austen, M. Miyano, Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis, *Nature* 448 (7153) (2007) 609–612.
- [166] E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, G.J. Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* 409 (6818) (2001) 363–366.
- [167] H. Zhang, F.A. Kolb, V. Brondani, E. Billy, W. Filipowicz, Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP, *The EMBO journal* 21 (21) (2002) 5875–5885.
- [168] H. Zhang, F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III, *Cell* 118 (1) (2004) 57–68.
- [169] P. Provost, D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson, O. Rådmark, Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer, *The EMBO journal* 21 (21) (2002) 5864–5874.
- [170] M.J. Charng, D. Zhang, P. Kinnunen, M.D. Schneider, A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor, *The Journal of biological chemistry* 273 (16) (1998) 9365–9368.
- [171] J.U. Wurthner, D.B. Frank, A. Felici, H.M. Green, Z. Cao, M.D. Schneider, J.G. McNally, R.J. Lechleider, A.B. Roberts, Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone, *The Journal of biological chemistry* 276 (22) (2001) 19495–19502.
- [172] T. Rolland, M. Tasan, B. Charlotheaux, S.J. Pevzner, Q. Zhong, N. Sahni, S. Yi, I. Lemmens, C. Fontanillo, R. Mosca, A. Kamburov, S.D. Ghiassian, X. Yang, L. Ghamsari, D. Balcha, B.E. Begg, P. Braun, M. Brehme, M.P. Broly, A.-R. Carvunis, D. Convery-Zupan, R. Corominas, J. Coulombe-Huntington, E. Dann, M. Dreze, A. Dricot, C. Fan, E. Franzosa, F. Gebreab, B.J. Gutierrez, M.F. Hardy, M. Jin, S. Kang, R. Kiros, G.N. Lin, K. Luck, A. MacWilliams, J. Menche, R.R. Murray, A. Palagi, M.M. Poulin, X. Rambout, J. Rasla, P. Reichert, V. Romero, E. Ruysinck, J.M. Sahalie, A. Scholz, A.A. Shah, A. Sharma, Y. Shen, K. Spirohn, S. Tam, A.O. Tejada, S.A. Trigg, J.-C. Twizere, K. Vega, J. Walsh, M.E. Cusick, Y. Xia, A.-L. Barabasi, L.M. Iakoucheva, P. Aloy, J. de Las Rivas, J.

Zusammenfassung

- Tavernier, M.A. Calderwood, D.E. Hill, T. Hao, F.P. Roth, M. Vidal, A proteome-scale map of the human interactome network, *Cell* 159 (5) (2014) 1212–1226.
- [173] W.S. Powell, F. Gravelle, S. Gravel, Metabolism of 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid and other 5(S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes, *The Journal of biological chemistry* 267 (27) (1992) 19233–19241.
- [174] Y. Zhang, A. Styhler, W.S. Powell, Synthesis of 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by human monocytes and lymphocytes, *Journal of leukocyte biology* 59 (6) (1996) 847–854.
- [175] J.T. O'Flaherty, J. Nishihira, 5-Hydroxyeicosatetraenoate promotes Ca²⁺ and protein kinase C mobilization in neutrophils, *Biochemical and biophysical research communications* 148 (2) (1987) 575–581.
- [176] J.T. O'Flaherty, A.G. Rossi, 5-hydroxyicosatetraenoate stimulates neutrophils by a stereospecific, G protein-linked mechanism, *The Journal of biological chemistry* 268 (20) (1993) 14708–14714.
- [177] E.J. Goetzl, F.F. Sun, Generation of unique mono-hydroxy-eicosatetraenoic acids from arachidonic acid by human neutrophils, *The Journal of experimental medicine* 150 (2) (1979) 406–411.
- [178] G.J. Sturm, R. Schuligoi, E.M. Sturm, J.F. Royer, D. Lang-Loidolt, H. Stammberger, R. Amann, B.A. Peskar, A. Heinemann, 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent chemoattractant for human basophils, *The Journal of allergy and clinical immunology* 116 (5) (2005) 1014–1019.
- [179] W.S. Powell, D. Chung, S. Gravel, 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid is a potent stimulator of human eosinophil migration, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 154 (8) (1995) 4123–4132.
- [180] J.T. O'Flaherty, M. Kuroki, A.B. Nixon, J. Wijkander, E. Yee, S.L. Lee, P.K. Smitherman, R.L. Wykle, L.W. Daniel, 5-Oxo-eicosanoids and hematopoietic cytokines cooperate in stimulating neutrophil function and the mitogen-activated protein kinase pathway, *The Journal of biological chemistry* 271 (30) (1996) 17821–17828.
- [181] C.E. Myers, J. Ghosh, Lipoygenase inhibition in prostate cancer, *European urology* 35 (5-6) (1999) 395–398.
- [182] J. Ghosh, C.E. Myers, Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22) (1998) 13182–13187.
- [183] X.Z. Ding, C.A. Kuszynski, T.H. El-Metwally, T.E. Adrian, Lipoygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human

- pancreatic cancer cells, *Biochemical and biophysical research communications* 266 (2) (1999) 392–399.
- [184] I. Avis, S.H. Hong, A. Martinez, T. Moody, Y.H. Choi, J. Trepel, R. Das, M. Jett, J.L. Mulshine, Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (11) (2001) 2007–2009.
- [185] T.D. Foley, 5-HPETE is a potent inhibitor of neuronal Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity, *Biochemical and biophysical research communications* 235 (2) (1997) 374–376.
- [186] C.E. Jones, S. Holden, L. Tenailon, U. Bhatia, K. Seuwen, P. Tranter, J. Turner, R. Kettle, R. Bouhelal, S. Charlton, N.R. Nirmala, G. Jarai, P. Finan, Expression and characterization of a 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid receptor highly expressed on human eosinophils and neutrophils, *Molecular pharmacology* 63 (3) (2003) 471–477.
- [187] T. Hosoi, Y. Koguchi, E. Sugikawa, A. Chikada, K. Ogawa, N. Tsuda, N. Suto, S. Tsunoda, T. Taniguchi, T. Ohnuki, Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o), *The Journal of biological chemistry* 277 (35) (2002) 31459–31465.
- [188] C. Brink, S.-E. Dahlén, J. Drazen, J.F. Evans, D.W.P. Hay, G.E. Rovati, C.N. Serhan, T. Shimizu, T. Yokomizo, International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the oxoeicosanoid receptor, *Pharmacological reviews* 56 (1) (2004) 149–157.
- [189] B. Samuelsson, S.E. Dahlén, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, C.N. Serhan, Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects, *Science (New York, N.Y.)* 237 (4819) (1987) 1171–1176.
- [190] S.E. Dahlén, P. Hedqvist, S. Hammarström, B. Samuelsson, Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi, *Nature* 288 (5790) (1980) 484–486.
- [191] J.M. Drazen, K.F. Austen, R.A. Lewis, D.A. Clark, G. Goto, A. Marfat, E.J. Corey, Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (7) (1980) 4354–4358.
- [192] S.E. Dahlén, G. Hansson, P. Hedqvist, T. Björck, E. Granström, B. Dahlén, Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C4, D4, and E4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (6) (1983) 1712–1716.
- [193] A.C. Peatfield, P.J. Piper, P.S. Richardson, The effect of leukotriene C4 on mucin release into the cat trachea in vivo and in vitro, *British journal of pharmacology* 77 (3) (1982) 391–393.
- [194] S.J. Coles, K.H. Neill, L.M. Reid, K.F. Austen, Y. Nii, E.J. Corey, R.A. Lewis, Effects of leukotrienes C4 and D4 on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa, *Prostaglandins* 25 (2) (1983) 155–170.

Zusammenfassung

- [195] J.D. Lundgren, J.H. Shelhamer, M.A. Kaliner, The role of eicosanoids in respiratory mucus hypersecretion, *Annals of allergy* 55 (1) (1985) 5-8, 11.
- [196] Z. Marom, J.H. Shelhamer, M.K. Bach, D.R. Morton, M. Kaliner, Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro, *The American review of respiratory disease* 126 (3) (1982) 449–451.
- [197] D.C. Underwood, R.R. Osborn, S.J. Newsholme, T.J. Torphy, D.W. Hay, Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody, *American journal of respiratory and critical care medicine* 154 (4 Pt 1) (1996) 850–857.
- [198] F. Braccioni, S.C. Dorman, P.M. O'byrne, M.D. Inman, J.A. Denburg, K. Parameswaran, A.J. Baatjes, R. Foley, G.M. Gauvreau, The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects, *The Journal of allergy and clinical immunology* 110 (1) (2002) 96–101.
- [199] S.P. Allen, A.H. Chester, P.J. Piper, A.P. Sampson, E.S. Akl, M.H. Yacoub, Effects of leukotrienes C4 and D4 on human isolated saphenous veins, *British journal of clinical pharmacology* 34 (5) (1992) 409–414.
- [200] F. Michelassi, L. Landa, R.D. Hill, E. Lowenstein, W.D. Watkins, A.J. Petkau, W.M. Zapol, Leukotriene D4: a potent coronary artery vasoconstrictor associated with impaired ventricular contraction, *Science (New York, N.Y.)* 217 (4562) (1982) 841–843.
- [201] J. Lamoureux, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, Leukotriene D4 enhances immunoglobulin production in CD40-activated human B lymphocytes, *The Journal of allergy and clinical immunology* 117 (4) (2006) 924–930.
- [202] S. Nicosia, V. Capra, G.E. Rovati, Leukotrienes as mediators of asthma, *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 14 (1) (2001) 3–19.
- [203] C.E. Heise, B.F. O'Dowd, D.J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D.S. Im, R. Stocco, J.N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D.L. Williams JR, Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M.K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C.P. Austin, S.R. George, G.P. O'Neill, K.M. Metters, K.R. Lynch, J.F. Evans, Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor, *The Journal of biological chemistry* 275 (39) (2000) 30531–30536.
- [204] W. Busse, M. Kraft, Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: strategic target for therapy, *Chest* 127 (4) (2005) 1312–1326.
- [205] D.J. Figueroa, R.M. Breyer, S.K. Defoe, S. Kargman, B.L. Daugherty, K. Waldburger, Q. Liu, M. Clements, Z. Zeng, G.P. O'Neill, T.R. Jones, K.R. Lynch, C.P. Austin, J.F. Evans, Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes, *American journal of respiratory and critical care medicine* 163 (1) (2001) 226–233.

- [206] K.R. Lynch, G.P. O'Neill, Q. Liu, D.S. Im, N. Sawyer, K.M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D.J. Figueroa, Z. Zeng, B.M. Connolly, C. Bai, C.P. Austin, A. Chateaufneuf, R. Stocco, G.M. Greig, S. Kargman, S.B. Hooks, E. Hosfield, D.L. Williams JR, A.W. Ford-Hutchinson, C.T. Caskey, J.F. Evans, Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor, *Nature* 399 (6738) (1999) 789–793.
- [207] M. Thivierge, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 167 (5) (2001) 2855–2860.
- [208] C. Thompson, A. Cloutier, Y. Bosse, M. Thivierge, C. Le Gouill, P. Larivee, P.P. McDonald, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, CysLT1 receptor engagement induces activator protein-1- and NF-kappaB-dependent IL-8 expression, *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35 (6) (2006) 697–704.
- [209] H.E. Claesson, S.E. Dahlén, Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs, *Journal of internal medicine* 245 (3) (1999) 205–227.
- [210] C.N. Serhan, A. Radin, J.E. Smolen, H. Korchak, B. Samuelsson, G. Weissmann, Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis, *Biochemical and biophysical research communications* 107 (3) (1982) 1006–1012.
- [211] C.-H. Woo, H.-J. You, S.-H. Cho, Y.-W. Eom, J.-S. Chun, Y.-J. Yoo, J.-H. Kim, Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis, *The Journal of biological chemistry* 277 (10) (2002) 8572–8578.
- [212] G. Larfars, F. Lantoiné, M.A. Devynck, J. Palmblad, H. Gyllenhammar, Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4, and D4 in human polymorphonuclear leukocytes, *Blood* 93 (4) (1999) 1399–1405.
- [213] S.E. Dahlén, J. Bjork, P. Hedqvist, K.E. Arfors, S. Hammarström, J.A. Lindgren, B. Samuelsson, Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6) (1981) 3887–3891.
- [214] C.-H. Woo, M.-H. Yoo, H.-J. You, S.-H. Cho, Y.-C. Mun, C.-M. Seong, J.-H. Kim, Transepithelial migration of neutrophils in response to leukotriene B4 is mediated by a reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase-linked cascade, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 170 (12) (2003) 6273–6279.
- [215] E.J. Goetzl, W.C. Pickett, The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs), *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 125 (4) (1980) 1789–1791.
- [216] A.W. Ford-Hutchinson, M.A. Bray, M.V. Doig, M.E. Shipley, M.J. Smith, Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes, *Nature* 286 (5770) (1980) 264–265.

- [217] P. Borgeat, P.H. Naccache, Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄, *Clinical biochemistry* 23 (5) (1990) 459–468.
- [218] T. Ternowitz, T. Herlin, K. Fogh, Human monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotactic and chemokinetic responses to leukotriene B₄ and FMLP, *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section C, Immunology* 95 (2) (1987) 47–54.
- [219] J. Bjork, P. Hedqvist, K.E. Arfors, Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes, *Inflammation* 6 (2) (1982) 189–200.
- [220] R.M. Palmer, R.J. Stepney, G.A. Higgs, K.E. Eakins, Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leucocytes of different species, *Prostaglandins* 20 (2) (1980) 411–418.
- [221] F. Meier, E. Gross, K.N. Klotz, T. Ruzicka, Leukotriene B₄ receptors on neutrophils in patients with psoriasis and atopic eczema, *Skin pharmacology the official journal of the Skin Pharmacology Society* 2 (2) (1989) 61–67.
- [222] C. Shimbori, N. Shiota, H. Okunishi, Pranlukast, a cysteinyl leukotriene type 1 receptor antagonist, attenuates the progression but not the onset of silica-induced pulmonary fibrosis in mice, *International archives of allergy and immunology* 158 (3) (2012) 241–251.
- [223] R. de Caterina, A. Mazzone, D. Giannessi, R. Sicari, W. Pelosi, G. Lazzarini, A. Azzara, R. Forder, F. Carey, D. Caruso, Leukotriene B₄ production in human atherosclerotic plaques, *Biomedica biochimica acta* 47 (10-11) (1988) S182-5.
- [224] J. Wilborn, M. Bailie, M. Coffey, M. Burdick, R. Strieter, M. Peters-Golden, Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *The Journal of clinical investigation* 97 (8) (1996) 1827–1836.
- [225] P. Sharon, W.F. Stenson, Enhanced synthesis of leukotriene B₄ by colonic mucosa in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 86 (3) (1984) 453–460.
- [226] M.J. Coffey, S.M. Phare, S. Cinti, M. Peters-Golden, P.H. Kazanjian, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates reduced 5-lipoxygenase metabolism in peripheral blood monocytes and neutrophils in acquired immunodeficiency syndrome, *Blood* 94 (11) (1999) 3897–3905.
- [227] M.J. Coffey, S.M. Phare, P.H. Kazanjian, M. Peters-Golden, 5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 157 (1) (1996) 393–399.

- [228] L. Flamand, P. Borgeat, R. Lalonde, J. Gosselin, Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans, *The Journal of infectious diseases* 189 (11) (2004) 2001–2009.
- [229] J.H. Dwyer, H. Allayee, K.M. Dwyer, J. Fan, H. Wu, R. Mar, A.J. Lusic, M. Mehrabian, Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis, *The New England journal of medicine* 350 (1) (2004) 29–37.
- [230] E.M. Davidson, S.A. Rae, M.J. Smith, Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis, *Annals of the rheumatic diseases* 42 (6) (1983) 677–679.
- [231] M.A. Bray, A.W. Ford-Hutchinson, M.J. Smith, Leukotriene B4: an inflammatory mediator in vivo, *Prostaglandins* 22 (2) (1981) 213–222.
- [232] R.J. Griffiths, E.R. Pettipher, K. Koch, C.A. Farrell, R. Breslow, M.J. Conklyn, M.A. Smith, B.C. Hackman, D.J. Wimberly, A.J. Milici, Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (2) (1995) 517–521.
- [233] C. Garcia, B.F. Boyce, J. Gilles, M. Dallas, M. Qiao, G.R. Mundy, L.F. Bonewald, Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo, *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (11) (1996) 1619–1627.
- [234] H. Ohnishi, N. Miyahara, E.W. Gelfand, The role of leukotriene B(4) in allergic diseases, *Allergology international official journal of the Japanese Society of Allergology* 57 (4) (2008) 291–298.
- [235] W.-G. Tong, X.-Z. Ding, M.S. Talamonti, R.H. Bell, T.E. Adrian, LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways, *Biochemical and biophysical research communications* 335 (3) (2005) 949–956.
- [236] V.R. Narala, R.K. Adapala, M.V. Suresh, T.G. Brock, M. Peters-Golden, R.C. Reddy, Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist, *The Journal of biological chemistry* 285 (29) (2010) 22067–22074.
- [237] P.R. Devchand, H. Keller, J.M. Peters, M. Vazquez, F.J. Gonzalez, W. Wahli, The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control, *Nature* 384 (6604) (1996) 39–43.
- [238] J. Stankova, G. Dupuis, N. Gagnon, M. Thivierge, S. Turcotte, M. Rola-Pleszczynski, Priming of human monocytes with leukotriene B4 enhances their sensitivity in IL-2-driven tumor necrosis factor-alpha production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors, *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 150 (9) (1993) 4041–4051.

- [239] K.A. Yamaoka, B. Dugas, N. Paul-Eugene, J.M. Mencia-Huerta, P. Braquet, J.P. Kolb, Leukotriene B4 enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes, *Cellular immunology* 156 (1) (1994) 124–134.
- [240] T. Yokomizo, K. Kato, K. Terawaki, T. Izumi, T. Shimizu, A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders, *The Journal of experimental medicine* 192 (3) (2000) 421–432.
- [241] T. Yokomizo, T. Izumi, K. Chang, Y. Takuwa, T. Shimizu, A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis, *Nature* 387 (6633) (1997) 620–624.
- [242] T. Okuno, T. Yokomizo, T. Hori, M. Miyano, T. Shimizu, Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8, *The Journal of biological chemistry* 280 (37) (2005) 32049–32052.
- [243] T. Okuno, T. Ishitani, T. Yokomizo, Biochemical characterization of three BLT receptors in zebrafish, *PloS one* 10 (3) (2015) e0117888.
- [244] T. Yokomizo, K. Kato, H. Hagiya, T. Izumi, T. Shimizu, Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2, *The Journal of biological chemistry* 276 (15) (2001) 12454–12459.
- [245] E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chisoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, S.E. Scherer, J.B. Bouck, E.J. Sodergren, K.C. Worley, C.M. Rives, J.H. Gorrell, M.L. Metzker, S.L. Naylor, R.S. Kucherlapati, D.L. Nelson, G.M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D.R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H.M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R.W. Davis, N.A. Federspiel, A.P. Abola, M.J. Proctor, R.M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D.R. Cox, M.V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G.A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B.A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W.R. McCombie, M. de La Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R.

Zusammenfassung

- Agarwala, L. Aravind, J.A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D.G. Brown, C.B. Burge, L. Cerutti, H.C. Chen, D. Church, M. Clamp, R.R. Copley, T. Doerks, S.R. Eddy, E.E. Eichler, T.S. Furey, J. Galagan, J.G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L.S. Johnson, T.A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W.J. Kent, P. Kitts, E.V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T.M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J.V. Moran, N. Mulder, V.J. Pollara, C.P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A.F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y.I. Wolf, K.H. Wolfe, S.P. Yang, R.F. Yeh, F. Collins, M.S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K.A. Wetterstrand, A. Patrinos, M.J. Morgan, P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y.J. Chen, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (6822) (2001) 860–921.
- [246] P. Liao, T.F. Yong, M.C. Liang, D.T. Yue, T.W. Soong, Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles, *Cardiovascular research* 68 (2) (2005) 197–203.
- [247] J.M. Johnson, J. Castle, P. Garrett-Engele, Z. Kan, P.M. Loerch, C.D. Armour, R. Santos, E.E. Schadt, R. Stoughton, D.D. Shoemaker, Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays, *Science (New York, N.Y.)* 302 (5653) (2003) 2141–2144.
- [248] C. Ben-Dov, B. Hartmann, J. Lundgren, J. Valcarcel, Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing, *The Journal of biological chemistry* 283 (3) (2008) 1229–1233.
- [249] D.L. Black, Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing, *Annual review of biochemistry* 72 (2003) 291–336.
- [250] D.D. Covert, T.T. Le, P.E. McAndrew, J. Strasswimmer, T.O. Crawford, J.R. Mendell, S.E. Coulson, E.J. Androphy, T.W. Prior, A.H. Burghes, The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy, *Human molecular genetics* 6 (8) (1997) 1205–1214.
- [251] M. Fujimaru, A. Tanaka, K. Choeh, N. Wakamatsu, H. Sakuraba, G. Isshiki, Two mutations remote from an exon/intron junction in the beta-hexosaminidase beta-subunit gene affect 3'-splice site selection and cause Sandhoff disease, *Human genetics* 103 (4) (1998) 462–469.
- [252] I. D'Souza, P. Poorkaj, M. Hong, D. Nochlin, V.M. Lee, T.D. Bird, G.D. Schellenberg, Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10) (1999) 5598–5603.
- [253] D.H. Llewellyn, G.A. Scobie, A.J. Urquhart, S.D. Whatley, A.G. Roberts, P.R. Harrison, G.H. Elder, Acute intermittent porphyria caused by defective splicing of porphobilinogen deaminase RNA: a synonymous codon mutation at -22 bp from the 5' splice site causes skipping of exon 3, *Journal of medical genetics* 33 (5) (1996) 437–438.

- [254] S. Das, B. Levinson, S. Whitney, C. Vulpe, S. Packman, J. Gitschier, Diverse mutations in patients with Menkes disease often lead to exon skipping, *American journal of human genetics* 55 (5) (1994) 883–889.
- [255] I. Santisteban, F.X. Arredondo-Vega, S. Kelly, M. Debre, A. Fischer, J.L. Perignon, B. Hilman, J. elDahr, D.H. Dreyfus, E.W. Gelfand, Four new adenosine deaminase mutations, altering a zinc-binding histidine, two conserved alanines, and a 5' splice site, *Human mutation* 5 (3) (1995) 243–250.
- [256] Y. Hasegawa, H. Kawame, H. Ida, T. Ohashi, Y. Eto, Single exon mutation in arylsulfatase A gene has two effects: loss of enzyme activity and aberrant splicing, *Human genetics* 93 (4) (1994) 415–420.
- [257] A.V. Philips, L.T. Timchenko, T.A. Cooper, Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy, *Science (New York, N.Y.)* 280 (5364) (1998) 737–741.
- [258] E. Lara-Pezzi, J. Gomez-Salinerio, A. Gatto, P. Garcia-Pavia, The alternative heart: impact of alternative splicing in heart disease, *Journal of cardiovascular translational research* 6 (6) (2013) 945–955.
- [259] G. Biamonti, M. Catillo, D. Pignataro, A. Montecucco, C. Ghigna, The alternative splicing side of cancer, *Seminars in cell & developmental biology* 32 (2014) 30–36.
- [260] R.M. Hagen, M.R. Ladomery, Role of splice variants in the metastatic progression of prostate cancer, *Biochemical Society transactions* 40 (4) (2012) 870–874.
- [261] W. Qian, F. Liu, Regulation of alternative splicing of tau exon 10, *Neuroscience bulletin* 30 (2) (2014) 367–377.
- [262] R.J. Boado, W.M. Pardridge, H.V. Vinters, K.L. Black, Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in human brain tumors: evidence for the expression of a multitranscript family, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (19) (1992) 9044–9048.
- [263] L.H. Boudreau, J. Bertin, P.P. Robichaud, M. Laflamme, R.J. Ouellette, N. Flamand, M.E. Surette, Novel 5-lipoxygenase isoforms affect the biosynthesis of 5-lipoxygenase products, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (3) (2011) 1097–1105.
- [264] E.P. Allain, L.H. Boudreau, N. Flamand, M.E. Surette, The Intracellular Localisation and Phosphorylation Profile of the Human 5-Lipoxygenase Delta13 Isoform Differs from That of Its Full Length Counterpart, *PloS one* 10 (7) (2015) e0132607.
- [265] A.K. Singh, R. Kumar, A.A. Shukla, G. Hariprasad, S.S. Chauhan, S. Dey, Identification and molecular characterization of a novel splice variant of human 5-lipoxygenase gene, *Molecular biology reports* 41 (12) (2014) 8255–8260.

Zusammenfassung

- [266] A.-K. Häfner, K. Beilstein, P. Graab, A.-K. Ball, M.J. Saul, B. Hofmann, D. Steinhilber, Identification and Characterization of a New Protein Isoform of Human 5-Lipoxygenase, *PloS one* 11 (11) (2016) e0166591.
- [267] M.J. Ochs, B.L. Sorg, L. Pufahl, M. Grez, B. Suess, D. Steinhilber, Post-transcriptional regulation of 5-lipoxygenase mRNA expression via alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay, *PloS one* 7 (2) (2012) e31363.
- [268] M.J. Ochs, B. Suess, D. Steinhilber, 5-lipoxygenase mRNA and protein isoforms, *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 114 (1) (2014) 78–82.
- [269] E. Kowarz, D. Löscher, R. Marschalek, Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines, *Biotechnol J* 10 (4) (2015) 647–653.
- [270] Z. Ivics, P.B. Hackett, R.H. Plasterk, Z. Izsvak, Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells, *Cell* 91 (4) (1997) 501–510.
- [271] R.E. Kingston, C.A. Chen, H. Okayama, Calcium phosphate transfection, *Curr Protoc Immunol* Chapter 10 (2001) Unit 10.13.
- [272] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970) 680–685.
- [273] N.S. Kosower, E.M. Kosower, B. Wertheim, W.S. Correa, Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide, *Biochemical and biophysical research communications* 37 (4) (1969) 593–596.
- [274] K.-R. Erlemann, J. Rokach, W.S. Powell, Oxidative stress stimulates the synthesis of the eosinophil chemoattractant 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by inflammatory cells, *The Journal of biological chemistry* 279 (39) (2004) 40376–40384.
- [275] A. Hatzelmann, V. Ullrich, Regulation of 5-lipoxygenase activity by the glutathione status in human polymorphonuclear leukocytes, *European journal of biochemistry* 169 (1) (1987) 175–184.
- [276] N. Flamand, M. Luo, M. Peters-Golden, T.G. Brock, Phosphorylation of serine 271 on 5-lipoxygenase and its role in nuclear export, *The Journal of biological chemistry* 284 (1) (2009) 306–313.
- [277] N. Kudo, N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E.P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, S. Horinouchi, Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (16) (1999) 9112–9117.
- [278] G. Fredman, L. Ozcan, S. Spolitu, J. Hellmann, M. Spite, J. Backs, I. Tabas, Resolvin D1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene B4 synthesis by inhibiting a

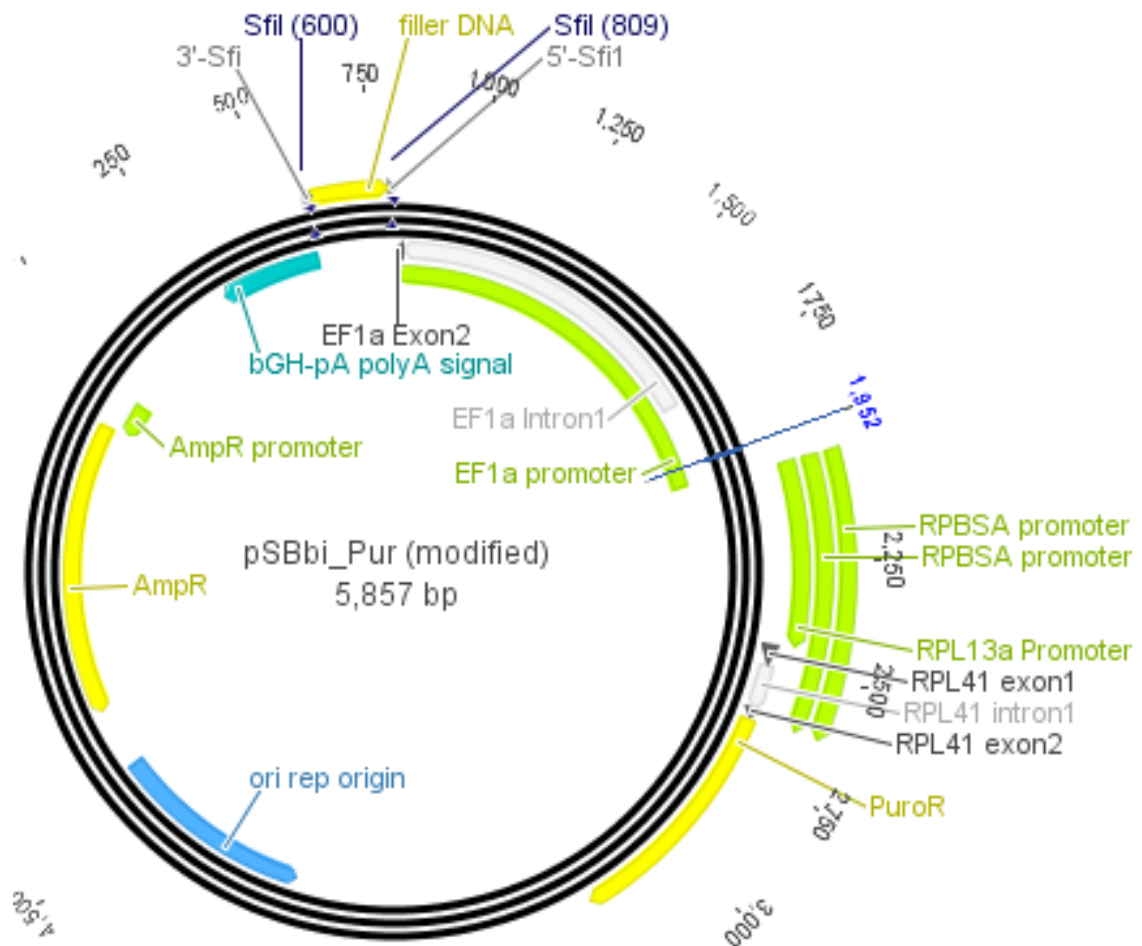
- calcium-activated kinase pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (40) (2014) 14530–14535.
- [279] O. Werz, E. Burkert, B. Samuelsson, O. Rådmark, D. Steinhilber, Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes, *Blood* 99 (3) (2002) 1044–1052.
- [280] J.M. Cook-Moreau, Y. El-Makhour Hojeij, G. Barriere, H.C. Rabinovitch-Chable, K.S. Faucher, F.G. Sturtz, M.A. Rigaud, Expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in T lymphocytes, *Immunology* 122 (2) (2007) 157–166.
- [281] S. Busch, E. Auth, F. Scholl, S. Huenecke, U. Koehl, B. Suess, D. Steinhilber, 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 194 (4) (2015) 1646–1653.
- [282] R. Spanbroek, R. Grabner, K. Lotzer, M. Hildner, A. Urbach, K. Ruhling, M.P.W. Moos, B. Kaiser, T.U. Cohnert, T. Wahlers, A. Zieske, G. Plenz, H. Robenek, P. Salbach, H. Kuhn, O. Rådmark, B. Samuelsson, A.J.R. Habenicht, Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (3) (2003) 1238–1243.
- [283] K.R. Gheorghe, M. Korotkova, A.I. Catrina, L. Backman, E. af Klint, H.-E. Claesson, O. Rådmark, P.-J. Jakobsson, Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids, *Arthritis research & therapy* 11 (3) (2009) R83.
- [284] S. Gupta, M. Srivastava, N. Ahmad, K. Sakamoto, D.G. Bostwick, H. Mukhtar, Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma, *Cancer* 91 (4) (2001) 737–743.
- [285] A. Hoque, S.M. Lippman, T.-T. Wu, Y. Xu, Z.D. Liang, S. Swisher, H. Zhang, L. Cao, J.A. Ajani, X.-C. Xu, Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention, *Carcinogenesis* 26 (4) (2005) 785–791.
- [286] M. Halle, T. Christersdottir, M. Back, Chronic adventitial inflammation, vasa vasorum expansion, and 5-lipoxygenase up-regulation in irradiated arteries from cancer survivors, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (11) (2016) 3845–3852.
- [287] M. Romano, J. Claria, Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (14) (2003) 1986–1995.
- [288] Y.-N. Ye, E.S.-L. Liu, V.Y. Shin, W.K.-K. Wu, C.-H. Cho, Contributory role of 5-lipoxygenase and its association with angiogenesis in the promotion of inflammation-

Zusammenfassung

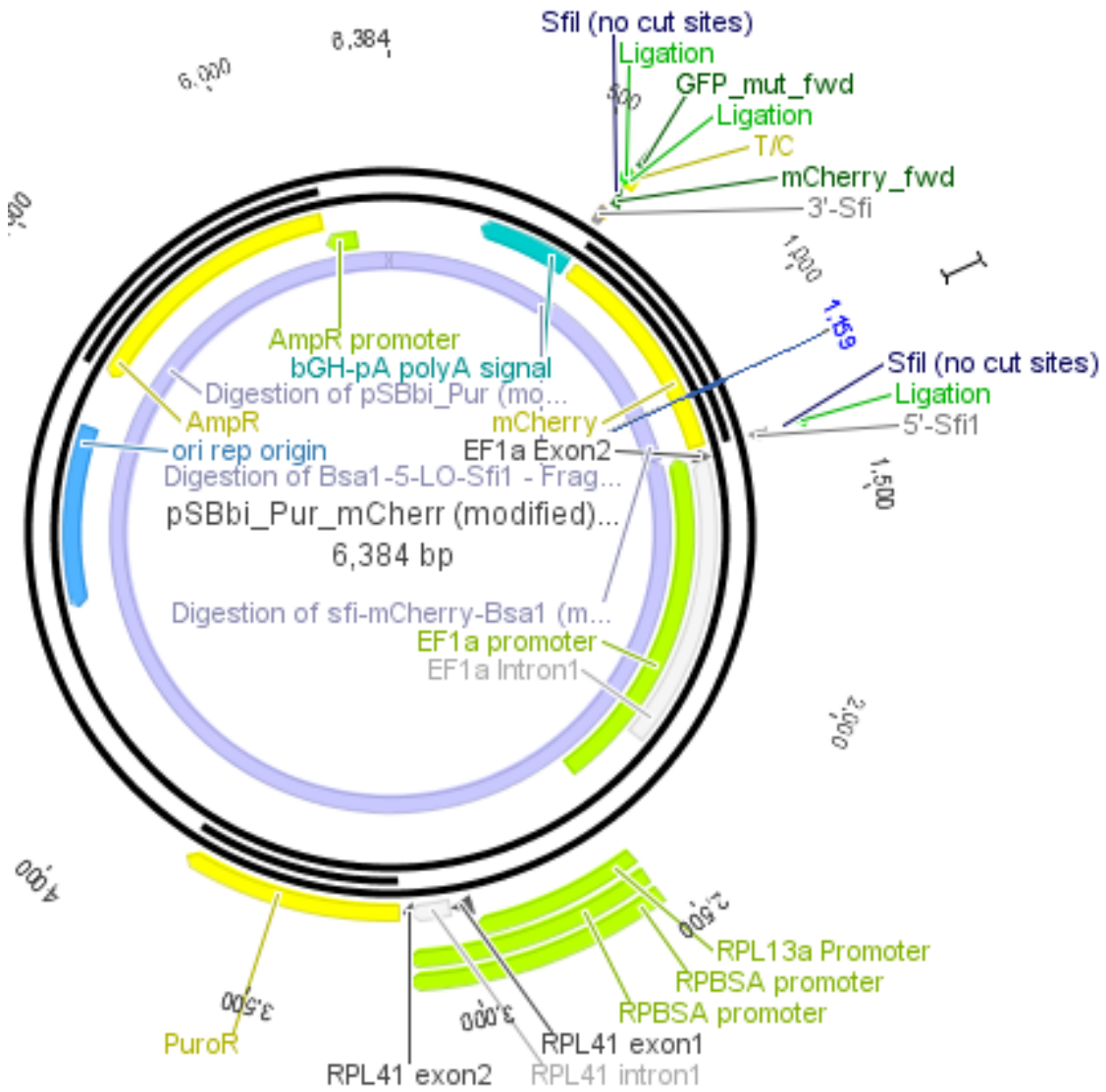
- associated colonic tumorigenesis by cigarette smoking, *Toxicology* 203 (1-3) (2004) 179–188.
- [289] A.W. Ford-Hutchinson, M. Gresser, R.N. Young, 5-Lipoxygenase, *Annual review of biochemistry* 63 (1994) 383–417.
- [290] M.S. Sheikh, A.J. Fornace JR, Regulation of translation initiation following stress, *Oncogene* 18 (45) (1999) 6121–6128.
- [291] S.E.F. Tran, A. Meinander, T.H. Holmström, A. Rivero-Müller, K.M. Heiskanen, E.K. Linnau, M.J. Courtney, D.D. Mosser, L. Sistonen, J.E. Eriksson, Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis, *Cell death and differentiation* 10 (10) (2003) 1137–1147.
- [292] C. Vogel, G.M. Silva, E.M. Marcotte, Protein expression regulation under oxidative stress, *Molecular & cellular proteomics MCP* 10 (12) (2011) M111.009217.
- [293] O. Kowal-Bielecka, O. Distler, M. Neidhart, P. Kunzler, J. Rethage, M. Nawrath, A. Carossino, T. Pap, U. Müller-Ladner, B.A. Michel, S. Sierakowski, M. Matucci-Cerinic, R.E. Gay, S. Gay, Evidence of 5-lipoxygenase overexpression in the skin of patients with systemic sclerosis: a newly identified pathway to skin inflammation in systemic sclerosis, *Arthritis and rheumatism* 44 (8) (2001) 1865–1875.
- [294] T.G. Brock, R.W. McNish, M.B. Bailie, M. Peters-Golden, Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence, *The Journal of biological chemistry* 272 (13) (1997) 8276–8280.

Anhang

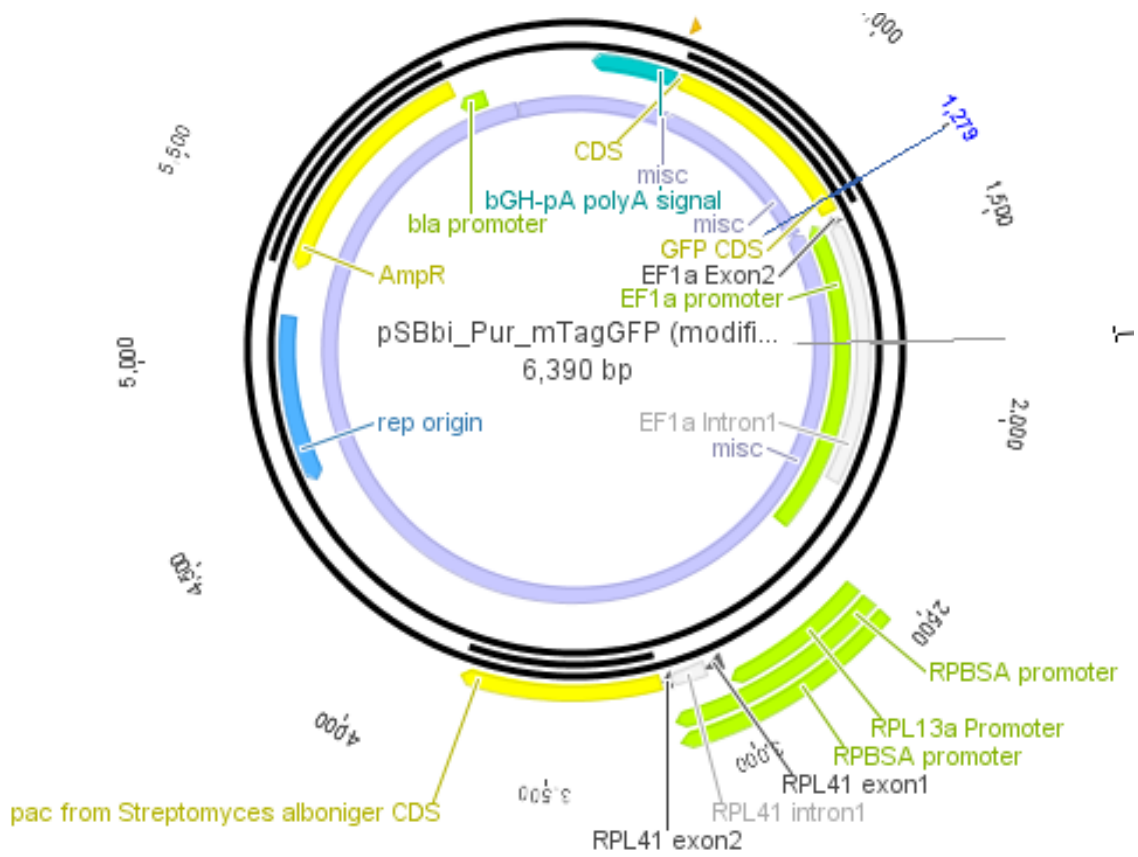
A1 Vektorkarte pSBbi-Puromycin



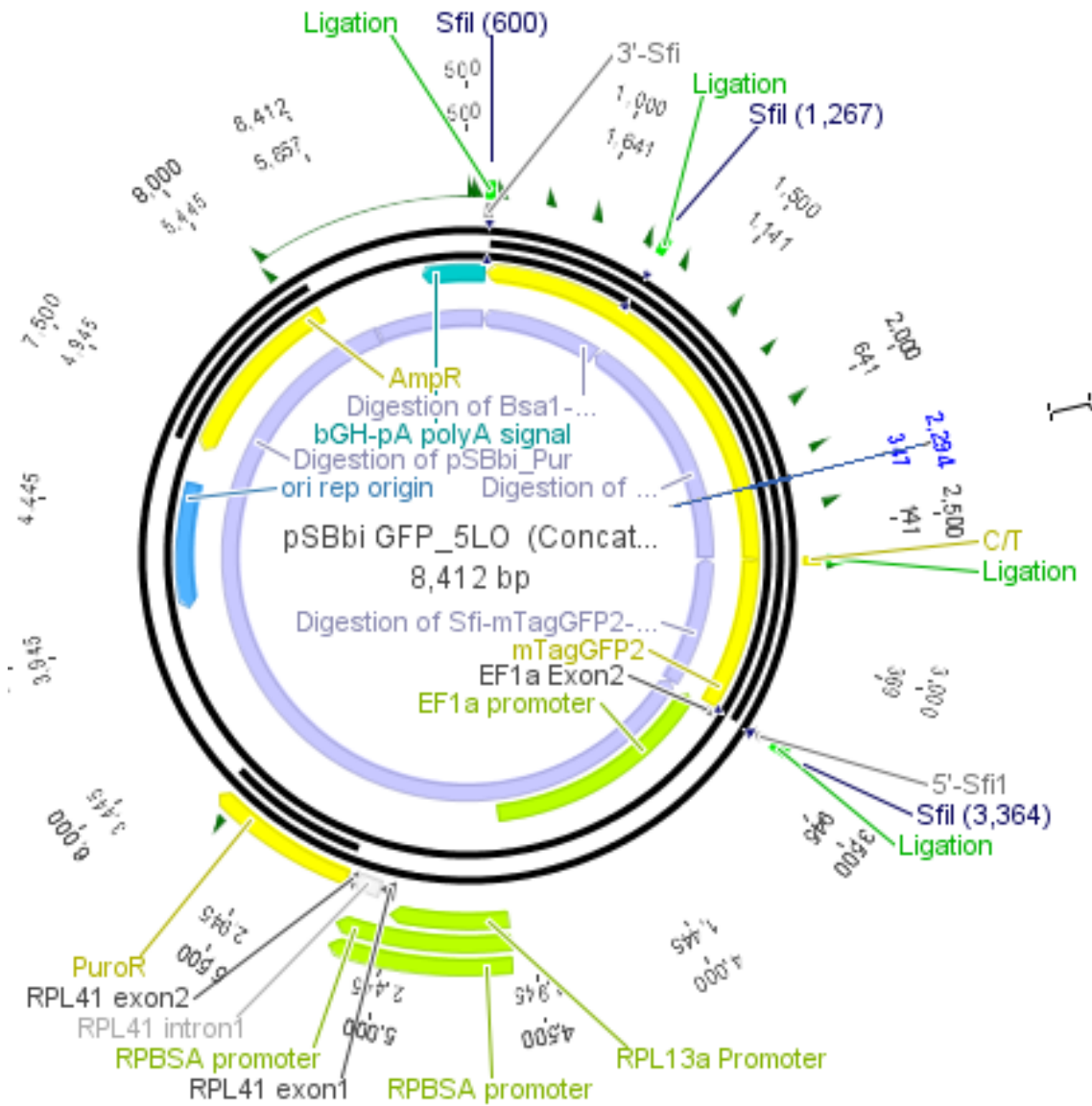
A2 Vektorkarte pSBbi-Puromycin-mCherry



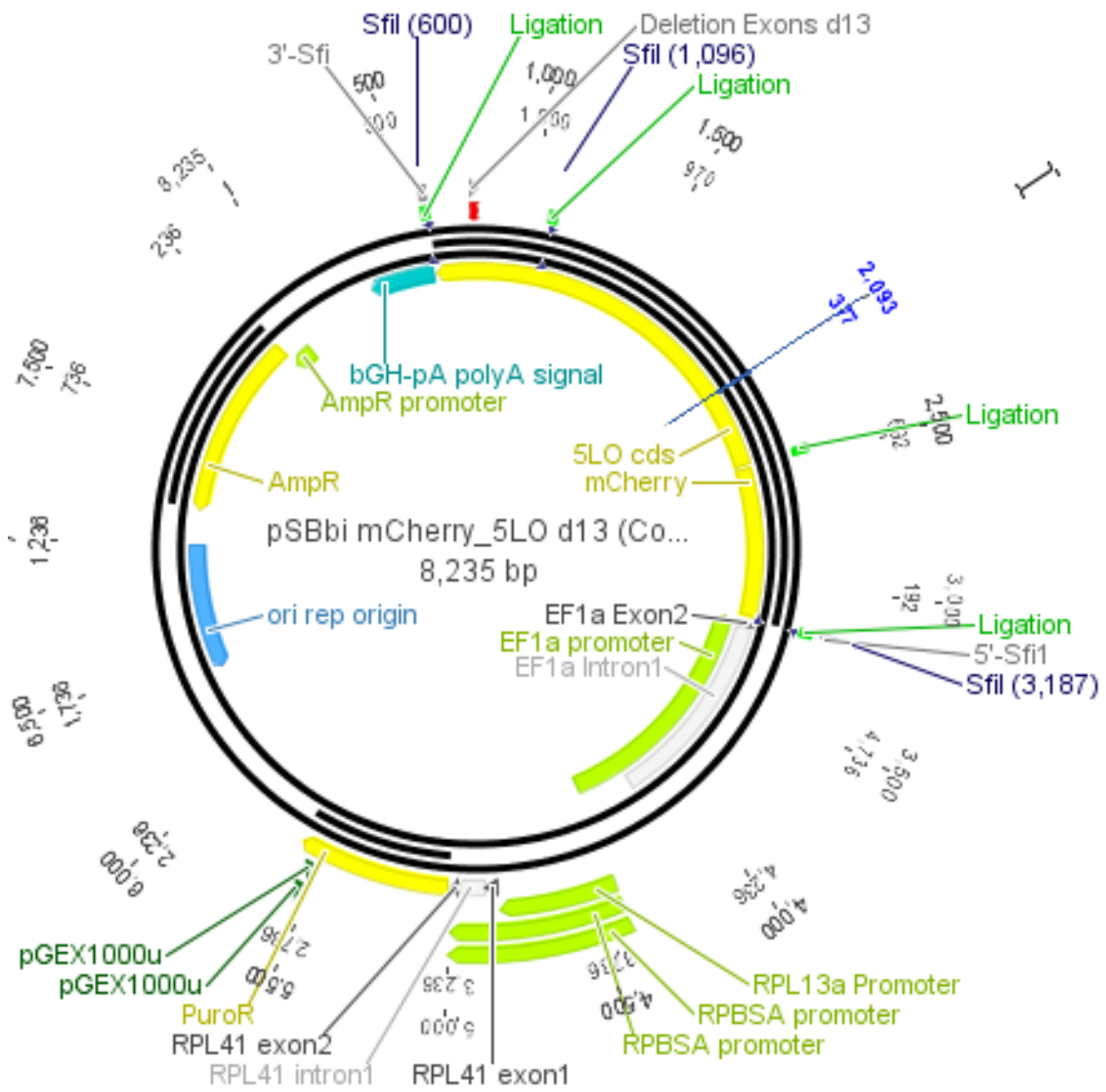
A3 Vektorkarte pSBbi-Puromycin-GFP



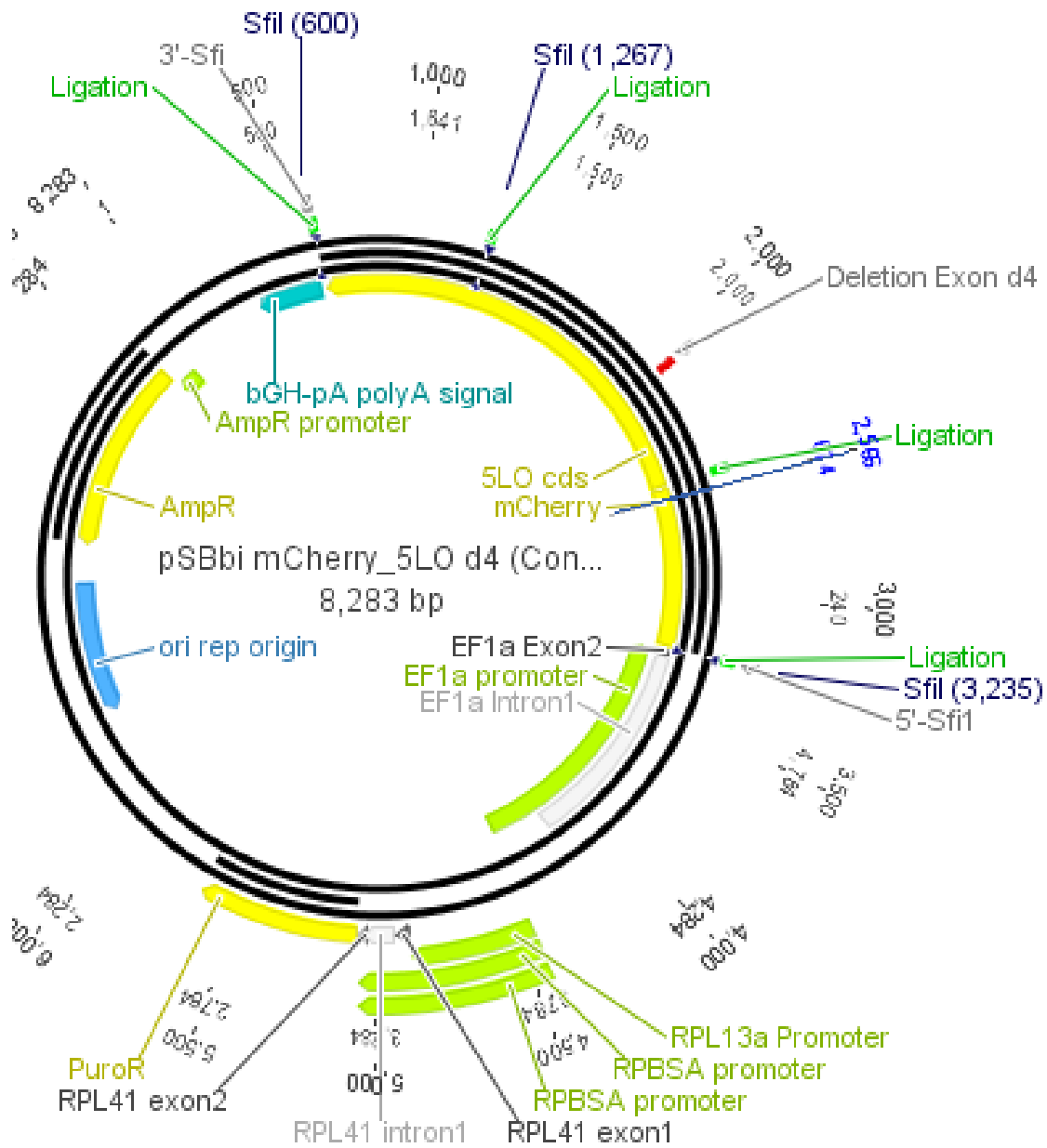
A4 Vektorkarte pSBbi-GFP-5-LO



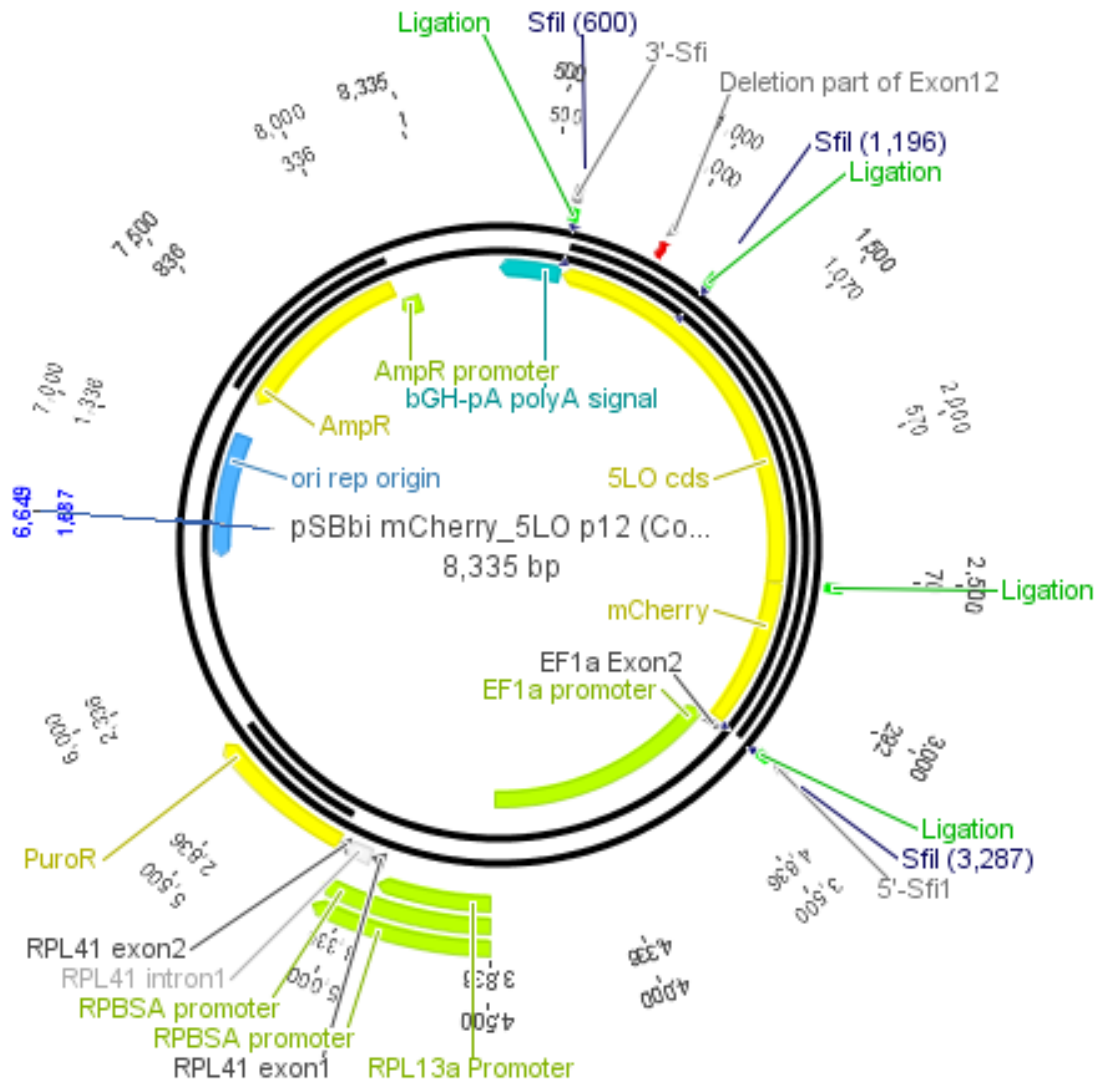
A5 Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LO Δ 13



A6 Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LO Δ 4



A7 Vektorkarte pSBbi- mCherry-5-LOp12



A8 Klinische Daten der untersuchten Sepsis-Patienten

	Patient	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	Resultat	Clinical score (SAPS II)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Infektionsquelle*	Ursprung der Sepsis
Gesunde Probanden	Mittelwert [†] (n=6)	3/3	51 \pm 3.3	-	-	13 \pm 3.1	2.66 \pm 0.34	26 \pm 0.8	0.78 \pm 0.04	12.9 \pm 1.8	none	-
Sepsis-Patienten	1	W	52	überlebt	68	154	11414	62	3.22	73	(+)/f	abdominal
	2	W	34	überlebt	n.v.	14	6935	74	2.29	47	(+)/f	abdominal
	3	W	58	überlebt	n.v.	74	223	29	1.35	53	(-)	abdominal
	4	M	56	überlebt	54	46	2167	46	1.77	66	(-)	abdominal
	5	M	58	überlebt	27	20	150	29	1.48	95	f	pulmonal
	6	M	55	überlebt	53	206	50000	184	2.71	92	(-)/(+)	abdominal
	Mittelwert [†] (n=6)	-	52 \pm 3.4	-	-	86 \pm 29	11815 \pm 7160	71 \pm 22	2.14 \pm 0.27	71 \pm 7	-	-

*grampositiv (+), gramnegativ (-), fungal (f), n.v. nicht verfügbar

[†]Werte sind als Mittelwert dargestellt (MW \pm SEM)

[‡]Abkürzungen: M/W = männlich/weiblich; SAPS = *Simplified Acute Physiology Score*

A9 Klinische Daten der untersuchten RA-Patienten

	Patient	Geschlecht (M/W)	Alter (Jahre)	CRP (mg/dl)	RF (IU/ml)	TJC	SJC	DAS28
Gesunde Probanden	Mittelwert [‡] (n=6)	3/3	51±3.3	-	-	-	-	-
RA- Patienten	1	W	45	0.1	23.1	8	2	4.5
	2	M	72	1.8	<7.5	6	0	4.0
	3	M	67	2.2	9.4	13	2	5.6
	4	W	75	0.3	11	3	2	3.9
	5	W	76	0	<7.5	5	2	3.0
	6	M	61	0.9	10	10	2	4.4
	Mittelwert [‡] (n=6)	-	66±12	-	-	-	-	-

[‡]Abkürzungen: M/W = männlich/weiblich; CRP = C-reaktives Protein; RF = Rheumafaktor; TJC = *tender joint count*; SJC = *swollen joint count*; DAS28 = *disease activity score of 28 joints*.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Ann-Katrin Ball, dass die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle Ausführungen, welche anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Ann-Katrin Ball

Offenbach, den 24.10.2017