

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Anette Grözinger
aus Kattowitz

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2004

**CHARAKTERISIERUNG VON EPIDERMIS-TYP-LIPOXYGENASEN
MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER e-LOX-3**

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Friedrich Marks

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg, im Dezember 2003

Kurzfassung

Epidermis-Typ-Lipoxygenasen bilden zusammen mit den konventionellen Isoenzymen die Familie der Säuger-Lipoxygenasen. Als Dioxygenasen katalysieren sie die stereo- und regiospezifische Insertion molekularen Sauerstoffs in 1,4-cis,cis-Pentadienstrukturen, wie sie in mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten sind. Die Metabolite der konventionellen Lipoxygenasen dienen als primäre oder sekundäre Mediatoren in Signalkaskaden innerhalb und außerhalb des Ursprungsgewebes.

In der vorliegenden Arbeit wurden die epidermalen Lipoxygenasen, insbesondere die e-LOX-3, näher charakterisiert. Während für die epidermalen Enzyme im Vergleich zu konventionellen Lipoxygenasen geringe Enzymaktivitäten mit typischen Lipoxygenase-substraten, wie Arachidonsäure, nachgewiesen wurden, war die e-LOX-3 inaktiv. Weitere Untersuchungen bestätigten jüngste Befunde, wonach e-LOX-3 eine Hydroperoxid-isomerase ist. In eukaryotischen Zellen exprimiertes e-LOX-3-Protein metabolisierte 12(R)- und 15(S)-HPETE zu Epoxyalkoholen, die durch HPLC und Massenspektrometrie identifiziert wurden.

Der e-LOX-3 und ihren Produkten scheint eine kritische Rolle bei der Fettzellendifferenzierung zuzukommen. Zwei Modellsysteme der Adipogenese, 3T3-L1-Zellen und Retinoblastom-defiziente MEFs, bei denen die Hemmung der Adipozytendifferenzierung durch Transduktion des Transkriptionsfaktors ADD-1 aufgehoben werden konnte, wurden verwendet. ADD-1 wird eine Rolle bei der Kontrolle der Synthese eines Liganden für PPAR γ , einem Schlüsselfaktor der späten Fettzellendifferenzierung, zugesprochen. Die Bildung dieses Faktors, der in das Medium abgegeben wird, kann durch LOX-Inhibitoren unterdrückt werden. Als dafür verantwortliche LOX wurde in beiden Zelllinien die e-LOX-3 nachgewiesen. In der Tat wurde in Medien ADD-1 induzierter Rb^{-/-} MEFs Produkte isoliert, die den von e-LOX-3 gebildeten Epoxyalkoholen nach analytischen und massenspektrometrischen Befunden sehr ähnlich waren. Diese Ergebnisse weisen die e-LOX-3 Produkte als mögliche, physiologische Liganden des Transkriptionsfaktors PPAR γ aus, dem eine essentielle Rolle bei der Fettzellendifferenzierung zukommt. Damit wurden erstmalig Evidenzen für eine physiologische Funktion der e-LOX-3 und ihrer Produkte erhalten.

Abstract

Epidermis-derived lipoxygenases belong together with conventional isoenzymes to the mammalian lipoxygenase family. As dioxygenases they catalyse stereo- and regiospecific insertion of molecular oxygen in 1,4-cis,cis-pentadienes like contained in polyunsaturated fatty acids. Metabolites of conventional lipoxygenases serve as primary or secondary mediators in signal transduction pathways inside and outside the prototypical tissue of their occurrence.

Aim of this work was the characterisation of epidermal lipoxygenases focussed on e-LOX-3. With typical LOX substrates like arachidonic acid, epidermal enzymes were found to have a low enzymatic activity, compared to conventional lipoxygenases, and e-LOX-3 showed no activity. Further investigations confirmed recent findings according to which e-LOX-3 acts as a hydroperoxidisomerase. In eucaryotic cells expressed e-LOX-3 metabolised 12(R)- and 15(S)-HPETE to epoxyalcohols which were identified by HPLC and mass spectrometry.

e-LOX-3 and its products are believed to play a critical role in the fat cell differentiation. Two model systems were used, 3T3-L1 cells and retinoblastoma deficient MEF, in which inhibition of adipocyte differentiation was suspended by transduction of transcription factor ADD-1. ADD-1 is assigned a role in controlling the synthesis of a PPAR γ ligand, a pivotal factor of late adipocyte differentiation. Formation of this factor, which is released to the medium, is suppressed by LOX inhibitors. e-LOX-3 was detected in both cell lines as the responsible LOX. In fact, products were isolated from media ADD-1 induced Rb^{-/-} MEF which were akin to e-LOX-3 formed epoxyalcohols according to HPLC and mass spectrometry analysis.

These results indicate e-LOX-3 products as possible physiological ligands of PPAR γ which plays an essential role in adipocyte differentiation.

For the first time, evidences for a physiological function of e-LOX-3 and its products were achieved.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND KENNTNISSTAND.....	1
1.1	DER ARACHIDONSÄURE-STOFFWECHSEL UND DIE LIPOXYGENASEN	1
1.2	KATALYSEZYKLUS DER LIPOXYGENASEREAKTION.....	3
1.3	NOMENKLATUR UND STRUKTUR DER LIPOXYGENASEN.....	4
1.4	PHYLOGENETISCHE EINTEILUNG DER LIPOXYGENASEN.....	4
1.5	LIPOXYGENASEN UND IHRE FUNKTION	6
1.5.1	<i>Die konventionellen Lipoxxygenasen</i>	6
1.5.2	<i>Die epidermalen Lipoxxygenasen</i>	8
1.6	ARACHIDONSÄURE-STOFFWECHSEL UND ADIPOGENESE	10
1.6.1	<i>Zelluläre Grundlagen der Fettzellendifferenzierung</i>	10
1.6.2	<i>Rolle des Arachidonsäure-Stoffwechsel bei der Fettzellendifferenzierung</i>	11
1.6.3	<i>Prädipozytäre Zellsysteme</i>	12
2	PROBLEMSTELLUNG	14
3	MATERIAL	15
3.1	GERÄTE	15
3.2	LABORCHEMIKALIEN	16
3.3	MEMBRANEN UND FILME.....	17
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN UND KITS	17
3.5	OLIGONUKLEOTIDE.....	17
3.6	VEKTOREN.....	18
3.7	ANTIKÖRPER.....	18
3.8	PROTEINEXPRESSION UND -ANALYTIK	18
3.9	LIPIDANALYTIK	18
3.10	SUBSTRATE FÜR AKTIVITÄTSTEST	19
3.11	HPLC-ANLAGE	19
3.12	HPLC-STANDARDS	20
3.13	MASSENSPEKTROMETRIE.....	20
3.14	ORGANISMEN.....	20
3.14.1	<i>Kompetente Bakterien</i>	20
3.14.2	<i>Zelllinien</i>	20
3.15	ZELLKULTURMATERIALIEN.....	21

4	METHODEN	22
4.1	DNA-TECHNIKEN.....	22
4.1.1	<i>Allgemeines</i>	22
4.1.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	28
4.1.3	<i>Klonierung</i>	30
4.2	RNA-TECHNIKEN	33
4.3	PROTEIN-TECHNIKEN	36
4.3.1	<i>Allgemeines</i>	36
4.3.2	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	37
4.3.3	<i>Western-Blot-Methode</i>	40
4.3.4	<i>Proteindetektion durch Antigen-Antikörper-Reaktion</i>	42
4.3.5	<i>Proteinisolierung unter denaturierenden Bedingungen</i>	46
4.3.6	<i>Proteinisolierung unter nativen Bedingungen</i>	46
4.3.7	<i>Proteinexpression in M15[pREP4]-Bakterien</i>	47
4.3.8	<i>Reinigung von Proteinen aus Bakterienzellen</i>	48
4.3.9	<i>Bestimmung der LOX-Aktivität</i>	49
4.3.10	<i>Bestimmung der e-LOX-3-Aktivität</i>	50
4.3.11	<i>Lipid-Analytik</i>	51
4.3.12	<i>HPLC-Technik</i>	53
4.4	ZELLKULTUR-TECHNIKEN	56
4.4.1	<i>Allgemeines</i>	56
4.4.2	<i>Transfektion der HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA</i>	59
4.4.3	<i>Transduktion der Zellen mit retroviralen Vektor</i>	61
4.4.4	<i>Differenzierungstest</i>	61
5	ERGEBNISSE.....	63
5.1	VERGLEICH DER ENZYMAKTIVITÄTEN EPIDERMALER UND KONVENTIONELLER LIPOXYGENASEN	63
5.1.1	<i>Eukaryotisches Expressionssystem</i>	63
5.1.2	<i>Prokaryontisches Expressionssystem</i>	65
5.1.3	<i>Massenspektrometrische Charakterisierung epidermaler Lipoxygenasen</i>	72
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMAKTIVITÄT DER e-LOX-3	76
5.2.1	<i>Produkte der e-LOX-3</i>	76
5.2.2	<i>Massenspektrometrische Charakterisierung der e-LOX-3-Produkte</i>	82

5.3	FUNKTION DER e-LOX-3 UND IHRER PRODUKTE BEI DER ADIPOGENESE	87
5.3.1	<i>Grundlagen der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen</i>	87
5.3.2	<i>Grundlagen der Differenzierung der Rb-/- Mausembryofibroblasten</i>	89
5.3.3	<i>Lipoxygenasen und Fettzellendifferenzierung der 3T3-L1 und Rb-/- MEFs</i>	90
5.3.4	<i>Suche nach e-LOX-3 Produkten in konditionierten Medien differenzierender Adipozyten</i>	95
6	DISKUSSION	103
6.1	VERGLEICH DER ENZYMAKTIVITÄTEN EPIDERMALER UND KONVENTIONELLER LIPOXYGENASEN	103
6.2	MASSENSPEKTROMETRISCHE IDENTIFIZIERUNG EPIDERMALER LOX	104
6.3	ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNG DER e-LOX-3	105
6.4	ADIPOGENESE UND IHRE TRANSKRIPTIONELLE REGULATION.....	109
7	ZUSAMMENFASSUNG	114
8	AUSBLICK	115
9	LITERATURVERZEICHNIS	116
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	130
11	TABELLENVERZEICHNIS	134
12	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	135
13	DANK	137

1 EINLEITUNG UND KENNNTNISSTAND

Fettsäuren sind energiereiche Moleküle mit bedeutenden zellulären Funktionen. Als eine Molekülklasse mit gemeinsamer Grundstruktur wird ihre Vielfalt durch Kettenlänge und Sättigungsgrad bestimmt. Langkettige Fettsäuren mit sechzehn oder mehr Kohlenstoffatomen können in gesättigter und, je nach Anzahl der Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, in einfach oder mehrfach ungesättigter Form vorliegen. Die häufigste, einfach ungesättigte Fettsäure ist Ölsäure. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA = polyunsaturated fatty acids) können in zwei Hauptklassen unterteilt werden. Entsprechend der Position der ersten Doppelbindung werden sie als n-3, z. B. γ -Linolsäure, oder n-6 ungesättigte Fettsäuren, z. B. Linolsäure und Arachidonsäure, bezeichnet. Bis vor einigen Jahren wurden Fettsäuren hauptsächlich als Energielieferanten und als strukturelle Bestandteile zellulärer Membranen betrachtet, deren Viskosität und Kanal- oder Rezeptorfunktion sie beeinflussten. Untersuchungen der letzten zehn Jahre veränderten diese Sicht grundsätzlich. Seitdem gelten Fettsäuren und ihre Metabolite auch als bedeutende Signalmoleküle mit endokrinen und parakrinen Funktionen.

1.1 Der Arachidonsäure-Stoffwechsel und die Lipoxygenasen

Zu den wichtigsten Vertretern dieser Signalmoleküle in Säugern zählen die durch Oxygenierung von Arachidonsäure gebildeten Eicosanoide. Die Oxygenierung erfolgt durch Mitglieder von drei Enzymfamilien, nämlich Cytochrom P450-haltigen Monooxygenasen, Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen.

Eine Übersicht des Arachidonsäurestoffwechsels in Säugern wird in Abb. 1 gezeigt. In Zellen liegt Arachidonsäure in veresterter Form in der sn2-Position von Lipiden vor und wird nach Phospholipase A₂-katalysierter Hydrolyse den metabolisierenden Enzymen als Substrat zur Verfügung gestellt. Die Mobilisierung der Arachidonsäure bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Stoffwechselwege, da in unbeeinflussten Zellen die Konzentration der freien Säure mit weniger als 10^{-6} mol/l in der Regel unter den K_m -Werten der umsetzenden Enzyme liegt [Irvine, 1982]. Die Freisetzung der Fettsäure kann sowohl endogen durch Hormone oder Wachstumsfaktoren, als auch exogen, wie z. B. durch chemische Reizung mit Phorbolster TPA [Marks et al., 1995] oder Verwundung [Marks und Fürstenberger, 1983] ausgelöst werden.

Einige Isoenzyme der größten der drei Enzymfamilien, der Cytochrom P450-haltiger Monoxygenasen, bilden aus Arachidonsäure als Zwischenprodukte die cis-Epoxyeicosatriensäuren (EETn). Durch Hydrolyse entstehen aus diesen Epoxiden die α,β -Dihydroxyeicosatriensäuren (DiHETE). Neben dieser Epoxidierungsreaktion können die Monoxygenasen auch die Hydroxylierung der Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatriensäuren, z. B. zu 19(S)- oder 20(S)-HETE, katalysieren [Schwartzman et al., 1995].

Die Cyclooxygenasen (COX), auch als Prostaglandin H-Synthasen (PGHS) bezeichnet, bilden zwei Isoenzyme 1 und 2. In ihrer namensgebenden Cyclooxygenase-Aktivität wird die Oxidation der Arachidonsäure zum zyklischen Endoperoxid PGG₂ katalysiert, das durch die Peroxidase-Aktivität desselben Enzyms zu PGH₂ reduziert wird. Zu den durch spezifische Synthasen gebildeten Produkten von PGH₂ gehören die Prostaglandine D₂, E₂, F_{2 α} und I, sowie die Thromboxane [Marks und Fürstenberger, 1999].

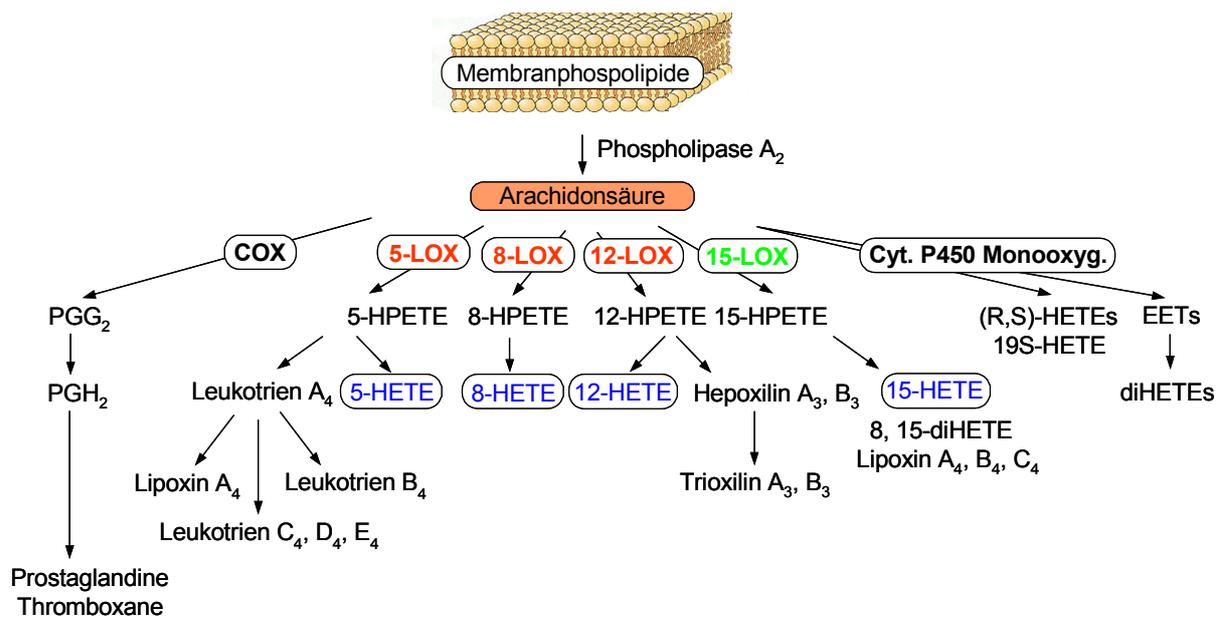


Abb. 1 Arachidonsäurestoffwechsel in Säugern: Einteilung in die Familie der Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Cytochrom P450 Monoxygenasen

Weite Verbreitung in der Tier- und Pflanzenwelt findet auch die Enzymfamilie der Lipoxygenasen. Als Dioxygenasen katalysieren sie mit Hilfe eines Nicht-Häm-Eisen(III)-Ions die stereo- und regiospezifische Insertion molekularen Sauerstoffs in 1,4-cis,cis-Pentadienstrukturen, wie sie in mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie der Arachidonsäure, enthalten sind.

1.2 Katalysezyklus der Lipoxygenasereaktion

Der Reaktionszyklus der von Lipoxygenasen katalysierten Oxidation ist schematisch in Abb. 2 dargestellt. Die Initiation der Reaktion erfolgt durch Übergang des Eisenions im katalytischen Zentrum der Lipoxygenase von der Oxidationsstufe +II zu +III. Ausgehend von Arachidonsäure als Substrat wird im ersten Schritt des Katalysezyklus, einhergehend einer Reduktion des Fe^{3+} -Ions, ein Proton der Methylengruppe unter Bildung eines Bisallylradikals abgespalten (A). Molekularer Sauerstoff greift im Anschluß daran antarafacial an Position 1 oder 5 der mesomeriestabilisierten Pentadienylradikalstruktur an (B), wobei eine Peroxyradikal entsteht. Den letzten Schritt des Katalysezyklus bildet die Protonenaufnahme (C) mit anschließender Freisetzung der Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE) als Primärprodukt [Willis, 1987; Brash, 1999].

In Folgereaktionen werden HPETEn entweder durch Glutathion-abhängige Peroxidasen zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEn) reduziert oder wie im Fall der 5-Lipoxygenase durch Hydrolyse oder Glutathion (GSH)-Addition an das intermediär gebildete 5,6-Epoxid (Leukotrien A_4) in Leukotriene überführt [Denzlinger, 1996]. Weitere Produkte sind Hepoxiline [Pace-Asciak et al., 1983] und Trioxiline [Pace-Asciak et al., 1986].

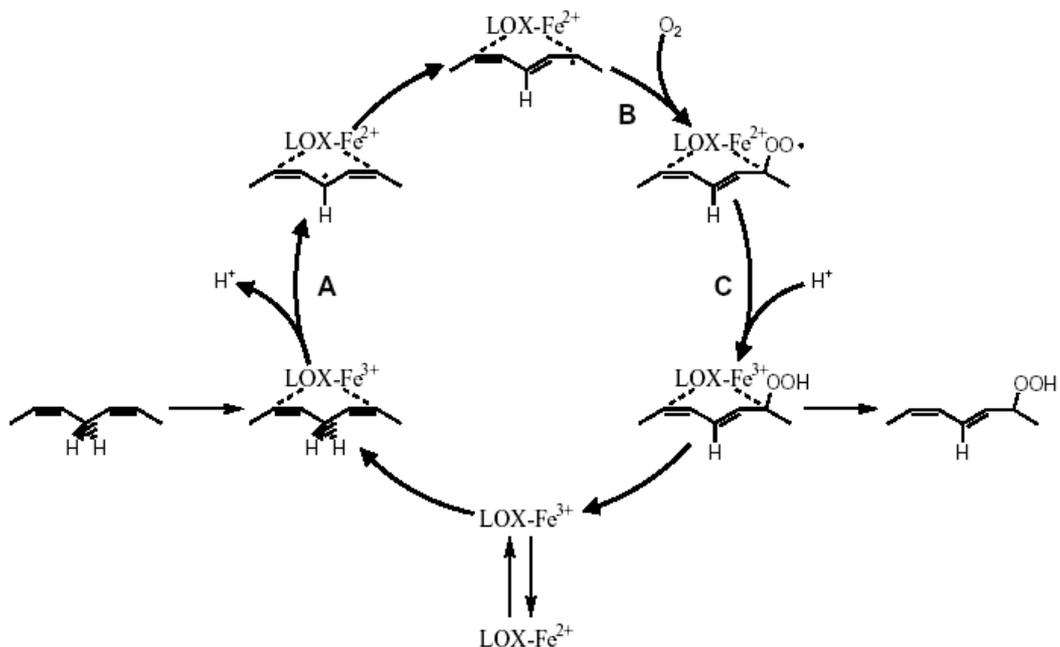


Abb. 2 Der Katalysezyklus der Lipoxygenasereaktion [Übersicht: Kühn, 1999].

Abstraktion eines Protons der bisallylischen Methylengruppe (A) mit anschließendem antarafacialen Angriff eines Sauerstoffmoleküls (B), im folgenden Anlagerung eines Protons unter Bildung der 1-Hydroperoxy-2-trans,4-cis-pentadienstruktur (C)
Katalyse der Ein-Elektronen-Übergänge erfolgt durch Wechsel der Oxidationsstufe des Eisenions zwischen +II und +III.

1.3 Nomenklatur und Struktur der Lipoxygenasen

Die Nomenklatur der Lipoxygenasefamilie erfolgt entsprechend der Regio- und Enantioselektivität des Sauerstoffeinbaus in die Kohlenstoffkette der Arachidonsäure im Tierreich und der Linolsäure im Pflanzenreich. Die Säuger 5-, 8-, 12- und 15-LOX bilden aus Arachidonsäure die 5-, 8-, 12- und 15-HPETE_n, während sie Linolsäure zu 9- und 13-Hydroperoxyoctadiensäuren (HPODE_n) umsetzen. In Pflanzen und Säugern überwiegen die Lipoxygenasen, die Produkte mit S-Konfiguration herstellen.

In ihrer Struktur weisen die Lipoxygenasen zwei separate Domänen auf [Gillmor et al., 1997], im N-terminalen Bereich eine β -Barrel-Domäne mit Homologie zur C-terminalen Domäne in pankreatischen Säugerlipasen, im carboxyterminalen Bereich eine katalytische Domäne mit Substratbindungstasche und Koordinationsstellen für das Eisenatom. Drei der fünf im konservierten Lipoxygenase-Motiv His-(X)₄-His-(X)₄-His-(X)₁₇-His-(X)₈-His enthaltenen Histidinreste sind an der Bindung des Eisenions beteiligt. Weitere Koordinationsstellen werden von einem Histidin- oder Aspartat-Rest sowie der Carboxylgruppe des endständigen Isoleucins besetzt [Prigge et al., 1996].

1.4 Phylogenetische Einteilung der Lipoxygenasen

Aufgrund von Sequenzhomologien, die innerhalb der einzelnen Isoenzyme zwischen 40 und 90 Prozent liegt, wird diese Lipoxygenasefamilie in konventionelle und Epidermis-Typ Lipoxygenasen unterteilt (Abb. 3). Dabei besitzen die analogen Isoenzyme bei verschiedenen Tierarten eine größere Ähnlichkeit als die verschiedenen Isoenzyme innerhalb einer Tierart.

Zu den konventionellen Lipoxygenasen gehören drei Subfamilien, der 5S-Lipoxygenasen, der Blutplättchen-Typ 12S- und der 15S/112S-, die vor allem die Vertreter der Leukozyten-Typ Lipoxygenasen umfaßt.

Die Epidermis-Typ Lipoxygenasen bilden eine Gruppe von Isoenzymen mit unterschiedlicher Regio- und Enantioselektivität, die überwiegend in der Epidermis exprimiert werden. Diese Gruppe umfaßt die 12R-LOX und die e-LOX-3, die in Epithelien des Menschen und der Maus identifiziert wurden, und die 8S-LOX, die beim Menschen nicht vorkommt und dort zu der 15S-LOX-2 ortholog ist. Außerhalb dieser Gruppe wird die Epidermis-Typ 12S-LOX (e12S-LOX) eingeordnet, deren Proteinexpression bisher nur in der Maus nachgewiesen werden konnte. Beim Menschen wird die e12S-LOX in nicht funktionsfähiger Form als Pseudogen exprimiert [Sun et al., 1998]. Strukturell ist sie näher mit den konventionellen 15S/112S-Lipoxygenasen verwandt.

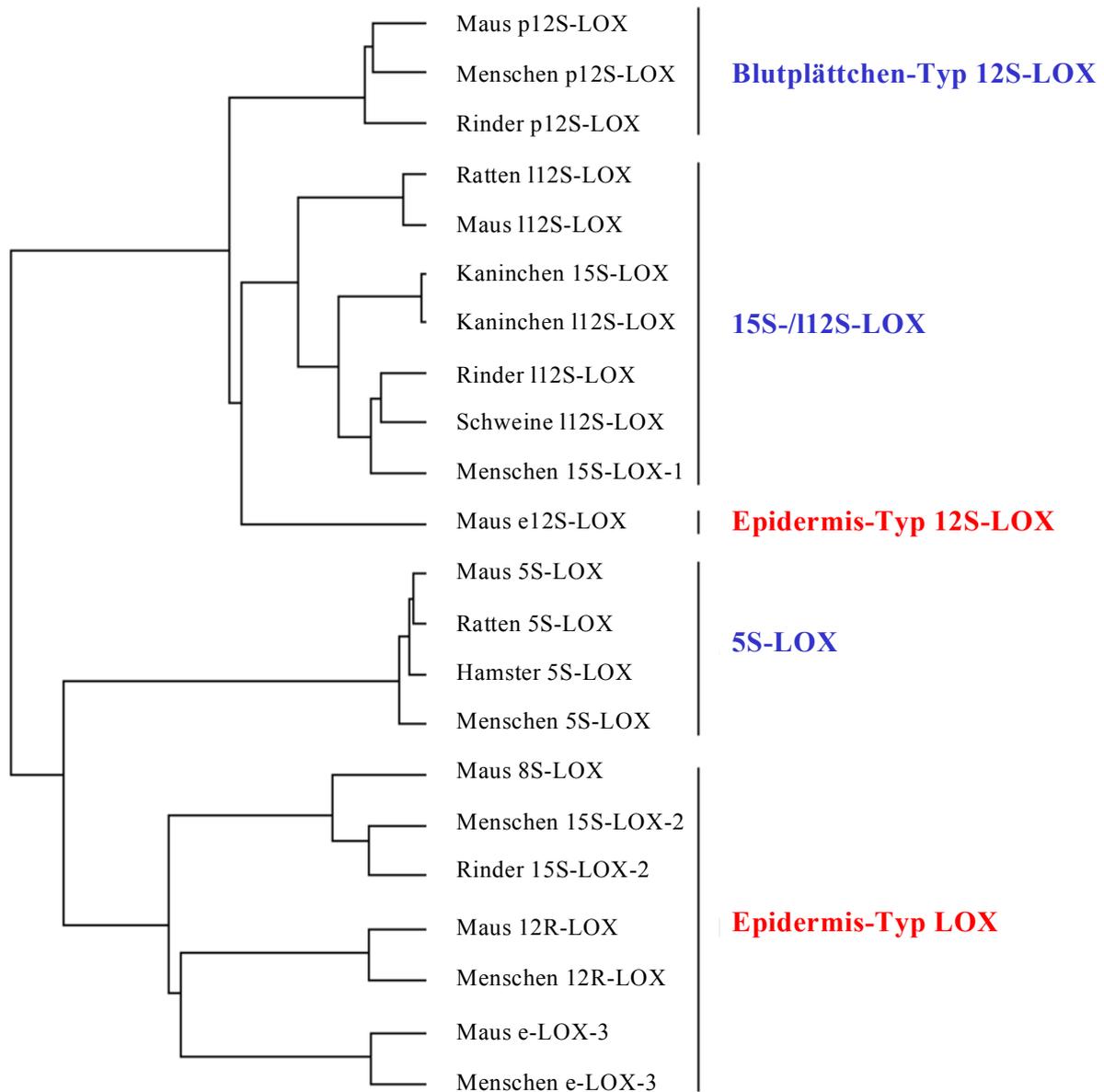


Abb. 3 Phylogenetischer Stammbaum der Säuger-Lipoxygenasen. Unterteilung dieser Enzymfamilie in die konventionellen (blau), zu denen die Blutplättchen-Typ 12S-, die 15S- und Leukozyten-Typ 12S- und die 5S-LOX gehören, und die Epidermis-Typ Lipoxygenasen (rot)

1.5 Lipoxygenasen und ihre Funktion

1.5.1 Die konventionellen Lipoxygenasen

Die erste im Tierreich gefundene 12-Lipoxygenase wurde aus Thrombozyten von Rindern isoliert und wird deshalb als Blutplättchen-Typ 12S-LOX (p12S-LOX) bezeichnet. Inzwischen konnte sie in vielen Geweben und Arten nachgewiesen werden. Ihr Hauptprodukt 12(S)-HETE [Bürger et al., 2000], das durch Umsetzung des Primärproduktes 12(S)-HPETE mit z. B. Peroxidasen entsteht, zeigt ein breites Spektrum biologischer Wirkungen [Yamamoto, 1992]. Eine erhöhte Produktbildung konnte bislang bei Asthma und Arteriosklerose sowie bei Parkinsonschen Erkrankung [Li et al., 1997] nachgewiesen werden. Die Rolle von 12(S)-HETE bei der Krebsentstehung und Metastasenbildung steht im Zusammenhang mit der Stimulation der Attraktion von Tumorzellen durch Endothelzellen, die subendotheliale Matrix und an Fibronectin. Diesem Metaboliten wird auch eine Wirkung auf Tumorzellmobilität und Invasivität zugesprochen. Zusätzlich stimuliert 12(S)-HETE die Tumorangio-genese [Honn et al., 1994]. Der mögliche Mechanismus der Wirkung von 12(S)-HETE wird wahrscheinlich über Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und damit verbundener spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie den Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptoren, vermittelt [Yu et al., 1995].

Neben der Blutplättchen-Typ 12S-LOX konnte in Menschen, Rindern und Nagern eine weitere 12-LOX, die Leukozyten-Typ 12S-LOX (l12S-LOX), nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Blutplättchen-Typ bildet die l12S-LOX mit Arachidonsäure zwei Produkte, 12(S)-HPETE und 15(S)-HPETE, in einem Mengenverhältnis von 9 zu 1 [Bürger et al., 2000]. Bezüglich des Produktspektrums und der Proteinsequenz ist die l12S-LOX näher zur 15-LOX-1 verwandt als zur Blutplättchen-Typ 12S-LOX [Funk, 1993] und wird daher in die Subfamilie der 15S/l12S-LOX eingeordnet. Darüber hinaus kann die l12S-LOX durch Austausch zweier Aminosäuren in eine 15-Lipoxygenase umgewandelt werden [Suzuki et al., 1994]. In Pankreaszellen spielt dieses Enzym eine Rolle bei der Glucose-stimulierten Insulinsekretion. Bei prä-diabetischen Ratten, einem Modell des menschlichen Typ 2 Diabetes mellitus, findet sich die l12S-LOX überexprimiert [Bleich et al., 1998].

Die 15S-LOX-1 aus Retikulozyten des Menschen und Kaninchens [Rapoport et al., 1979] kloniert wird wegen der Bildung von 12(S)-HETE neben dem Hauptprodukt 15(S)-HETE als ortholog zur Leukozyten-Typ 12S-LOX angesehen [Kühn et al., 1999]. Eine Besonderheit der 15S-LOX-1 ist, daß sie auch in Phospholipiden veresterte Arachidonsäure und Linolsäure oxidiert. Damit wird ein Signal zum Membranabbau gesetzt, der im Zusammenhang mit dem

Abbau von intrazellulären Organellen bei der Differenzierung von Epithelzellen der Linse, sowie der Erythrozyten- und der Keratinozytenreifung steht [Rapoport et al., 1986; Schewe et al., 1991]. Wegen ihrer Fähigkeit, Plasmalipoproteine zu oxidieren, wird der 15S-LOX-1 auch eine Rolle bei der Entstehung artherosklerotischer Läsionen zugesprochen [Folchik et al., 1995].

Ein weiterer Vertreter der 12-Lipoxygenasen ist die Epidermis-Typ 12S-LOX (e12S-LOX) [van Dijk et al., 1995; Funk et al., 1996, Kinzig et al., 1997], die konstitutiv in allen Schichten der Mausepidermis exprimiert wird. Das rekombinate Enzym bildet aus Arachidonsäure ausschließlich 12(S)-HETE und setzt auch Linolsäure und deren Methylester um [Siebert, 2001]. Die e12S-LOX ist durch ihre Sequenz und ihre Fähigkeit, veresterte Fettsäuren zu oxidieren, den 15S/12S-Lipoxygenasen ähnlicher als den epidermalen Isoenzymen. Im Vergleich zur Leukozyten- und Blutplättchen-Typ 12S-LOX ist ihre katalytische Aktivität aber sehr gering [Bürger et al., 2000; Siebert et al., 2001]. Im Verlauf der chemischen Karzinogenese in der Maushaut wird die Expression dieser Lipoxygenase abgeschaltet. Dem Enzym oder seinen Produkten könnte also eine antikarzinogene Wirkung zugesprochen werden. In der Tat führt die konstitutive Expression des Enzyms in der Maushaut zu einer verminderten Tumorbildung [Müller et al., 2002].

Zu den bestcharakterisierten Säuger-Lipoxygenasen gehört die 5S-LOX, welche die Oxidation der Arachidonsäure zu 5(S)-HPETE und deren weitere Umsetzung zum Leukotrien A₄ (LTA₄) katalysiert. In einer 5S-LOX-unabhängigen Reaktion wird LTA₄, ein instabiles Epoxid, zum Leukotrien B₄ hydrolysiert oder durch Konjugation mit Glutathion zum Leukotrien C₄ umgesetzt. Im weiteren Verlauf können aus LTC₄ in einer γ -Glutamyltransferase- und Dipeptidasereaktion die Leukotriene D₄ und E₄ gebildet werden [Iversen et al., 2000]. Die Aktivität der 5S-LOX ist von der Anwesenheit eines 18kDa großen, membran-gebundenen 5S-LOX-aktivierenden Proteins (FLAP) abhängig [Miller et al., 1990], das durch seine hohe Affinität zu ungesättigten Fettsäuren eine Rolle bei der Substratpräsentation spielt [Woods et al., 1993]. Das breite Wirkungsspektrum der aus der 5S-LOX-Reaktion gebildeten Leukotriene reicht von der Beteiligung an Entzündungsprozessen bis zur Kontraktion glatter Muskeln in Bronchien, Gallen- und Harnblase [Denzlinger, 1996]. Leukotriene gelten daher als Mediatoren allergischer und inflammatorischer Reaktionen, insbesondere Asthma bronchiale. Die Lipoxine können aus LTA₄ durch weitere Umsetzung mit einer 15-LOX gebildet werden [Clarkson et al., 1998]. Sie wirken vielen durch Leukotriene hervorgerufenen Reaktionen entgegen und könnten als endogene Inhibitoren der Entzündungsreaktionen angesehen werden [Brady et al., 1996].

1.5.2 Die epidermalen Lipoxygenasen

8S-Lipoxygenase und ihre Metabolite 8(S)-HPETE/ 8(S)-HETE können in der suprabasalen Schicht der Mausepidermis nachgewiesen werden. Ihre mRNA- und Proteinexpression wird durch topische Applikation des tumorpromovierenden Phorbolesters TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) induziert. Bei der chemischen Karzinogenese in der Mauhaut wurde eine Korrelation zwischen der Akkumulation von 8- und 12-HETE und promutagenen Ethenoaddukten in der DNA gefunden [Nair et al., 2000]. 8(S)-HPETE/ 8(S)-HETE, aber auch die entsprechenden 12S-LOX-Metabolite zeigen in der Tat klastogene Effekte in vitro [Bürger et al., 1999]. Diese genotoxische Aktivität der LOX-Produkte könnte mit der im Verlauf der Tumorentwicklung auftretenden genomischen Instabilität in Zusammenhang stehen. Darüber hinaus beeinflusst 8(S)-HETE die Genregulation durch Bindung an und Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR α (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptors α) [Sohlenius et al., 1995; Muga et al., 2000]. Als Orthologes zur murinen 8S-LOX wurde die 15S-LOX-2 aus menschlichen Haarfollikeln und Cornea kloniert [Brash et al., 1997]. Das Enzym katalysiert die spezifische Oxidation der Arachidonsäure zur 15(S)-HPETE. Ihre Expression ist auf wenige Gewebe, wie Haut, Prostata, Lunge und Cornea, beschränkt. Im Adenokarzinom der Prostata wird eine Reduktion der 15S-LOX-2-Expression und der 15(S)-HETE-Bildung beobachtet [Shappell et al., 1999], die auf eine antikarzinogene Wirkung 15S-LOX-2 schließen läßt [Bhatia et al., 2003]. 15(S)-HETE wirkt wahrscheinlich durch Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über spezifische Transkriptionsfaktoren wie PPAR γ [Hsi et al., 2002].

Zu den Mitgliedern der epidermalen Lipoxygenasen gehören auch die e-LOX-3 und die 12R-LOX, die beide aus muriner und menschlicher Haut kloniert wurden [Krieg et al., 1999; Boeglin et al., 1998; Kinzig et al., 1999; Krieg, 2001]. Im menschlichen Genom auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert, bilden beide Lipoxygenasen zusammen mit der 15-LOX-2 einen 100 kb langen Gencluster [Krieg et al., 2001]. Eine ähnliche Clusterbildung wird auch im Fall der murinen e-LOX-3 und 12R-LOX beobachtet, die zusammen mit den 12S-Lipoxygenasen in einer zentralen Region des Chromosoms 11 gefunden wurden.

Diese Clusterbildung der menschlichen bzw. murinen LOX-Gene weist auf die Möglichkeit eines gemeinsamen Ursprungsgens hin [Funk et al., 1996]. Die Verwandtschaft der Säuger-Lipoxygenasen zeigt sich auch in einer 40-90 %igen Sequenzidentität und der hoch konservierten Genorganisation mit Exon-Intron-Übergängen an exakt korrespondierenden Positionen [Krieg et al., 2001].

Innerhalb der Lipoxygenasefamilie bilden e-LOX-3 und 12R-LOX eine eigene Strukturklasse. Ihre Besonderheit zeigt sich auf genomischer Ebene durch Einbau eines Introns (4a) in das vierte Exon. Dadurch weisen beide Enzyme im Gegensatz zu anderen Lipoxygenasen insgesamt 15 Exons und 14 Introns auf. Das zusätzliche Exon kodiert für eine Sequenz von 41 Aminosäuren bei der e-LOX-3 und einer prolinreichen Domäne von 31 Aminosäuren bei der 12R-LOX, die zwischen dem N-terminalen β -Barrel und der C-terminalen katalytischen Domäne der LOX-Proteine eingebaut sind. Dadurch besitzen die e-LOX-3 mit 711 und die 12R-LOX mit 701 Aminosäuren ein höheres Molekulargewicht als die anderen Säuger-Lipoxygenasen. In einer Molecular-Modelling-Analyse auf Grundlage der Röntgenstrukturdaten der Kaninchen 15-LOX-1 konnte gezeigt werden, daß die zusätzliche Domäne als flexibler Arm vor dem Eingang der Substratbindungstasche liegt. Diese Extradomäne scheint für die korrekte Funktion der 12R-LOX notwendig zu sein, da eine entsprechende Deletionsmutante katalytisch inaktiv war [Siebert, 2001]. Abgesehen davon konnte aber die Funktion dieser Insertion noch nicht ermittelt werden.

Die 12R-LOX bildet als bisher einzige bekannte Säuger-Lipoxygenase Produkte mit R-Chiralität [Krieg et al., 1999; Boeglin et al., 1998]. Während die menschliche 12R-LOX Arachidonsäure als Substrat zum 12(R)-HPETE Produkt umsetzt, bevorzugt das Mausenzym Arachidonsäuremethylester als Substrat. Als Hauptprodukt dieser Reaktion entsteht dabei der entsprechende Methylester von 12(R)-HETE. Insgesamt zeigt die murine 12R-LOX nur eine geringe enzymatische Aktivität [Krieg et al., 1999]. Die Expression der 12R-Lipoxygenase in den höheren, stärker differenzierten Schichten der Epidermis [Heidt et al., 2000] weist auf eine Beteiligung des Enzyms an der terminalen Differenzierung von Keratinozyten hin. Unterstützt wird diese Vermutung durch Akkumulation der 12R-LOX und ihres Metaboliten 12(R)-HETE in psoriatischen Hautschuppen und bei anderen hyperproliferativen Dermatosen [Baer et al., 1991; Baer et al., 1995].

Im Gegensatz zu den anderen Lipoxygenasen ist über die e-LOX-3 nur wenig bekannt, da das Enzym weder Arachidonsäure oder Linolsäure noch deren Methylester umsetzt. Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen den beiden Lipoxygenasen e-LOX-3 und 12R-LOX wurde in genetischen Studien einer kongentialen Ichthyoseform gefunden, in denen Mutationen in einem der beiden LOX-Gene zum gleichen Phänotyp führten. Diese Beobachtung legt nahe, daß beide Lipoxygenasen dem gleichen Signalweg angehören könnten [Jobard et al., 2002]. Es besteht jedoch noch großer Forschungsbedarf zur funktionellen Charakterisierung dieser epidermalen Lipoxygenase.

1.6 Arachidonsäure-Stoffwechsel und Adipogenese

Das Fettgewebe dient nicht nur der Regulierung der Energiebalance in der Körperhomöostase, sondern ist auch als sekretorisches Organ an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Fehlregulationen der adipösen Gewebemasse verursachen Fettleibigkeit und Lipoatrophie, die mit kardiovaskulären Krankheiten und Diabetes in Verbindung stehen [Must et al., 1999].

In Bezug auf den weltweiten, dramatischen Anstieg der Fettleibigkeit und des Typ 2 Diabetes mellitus ist ein detailliertes Verständnis der Bildung dieses Gewebes notwendig. Dem Arachidonsäurestoffwechsel scheint eine wichtige Rolle bei diesem Prozeß zu zukommen.

1.6.1 Zelluläre Grundlagen der Fettzellendifferenzierung

Änderungen in der adipösen Gewebemasse resultieren aus veränderter Größe und/oder Anzahl der Adipozytenzellen. Die Zellzahl wird über ein komplexes Wechselspiel zwischen Proliferation und Differenzierung reguliert. Die Differenzierung der Fibroblasten-ähnlichen Präadipozyten zu Adipozyten, die prä- und postnatal stattfindet, wird Adipogenese genannt.

Eine Vielzahl von Zellkulturmodellen, einschließlich Präadipozyten-Zelllinien und primären Kulturen aus stromalen, vaskulären Vorläuferzellen werden zur Untersuchung der Adipogenese verwendet [Gregoire et al., 1998].

Der erste Schritt stellt eine Umwandlung der Zellform von der fibroblastischen in die sphärische Form dar. Diese geht einher mit quantitativen und qualitativen Veränderungen der Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zytoskelettbestandteile. So ist z. B. die proteolytische Degradation der stromalen, extrazellulären Matrix durch die Plasminogenkaskade für die Veränderung der Zellform, die Expression Adipozyten-spezifischer Gene und die Lipidakkumulation erforderlich [Selvarajan et al., 2001]. Vor der adipösen Umwandlung findet ein für die Fettzellendifferenzierung erforderlicher Wachstumsstop statt, der in der Zellkultur durch Kontaktinhibition erreicht wird. Anschließend müssen die Präadipozyten zur Fortführung der Differenzierung eine Kombination mitogener und adipogener Signale erhalten, die von der verwendeten Zelllinie abhängig ist [Gregoire et al., 1998]. Bei Verwendung eines Serum-haltigen Mediums kann eine Standardmischung, bestehend aus Insulin, dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason (DEX) und dem Phosphodiesteraseinhibitor Methylisobutylxanthin (MIX), verwendet werden. Nach Induktion der postkonfluenten Präadipozyten findet normalerweise mindestens eine DNA-Replikation und Zellverdoppelung statt.

Anschließend verlassen die Präadipozyten den Zellzyklus und treten in die terminale Differenzierung unter Ausbildung der Adipozyten-spezifischen Morphologie ein [Shao et al., 1997].

1.6.2 Rolle des Arachidonsäure-Stoffwechsel bei der Fettzellendifferenzierung

Bei der Adipogenese wird den über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren eine wichtige Funktion zugesprochen. So konnte in Ob 1771 Zellen, einer Zelllinie aus Maus-Fettgewebe, ein proadipogener Effekt der Arachidonsäure nachgewiesen werden. Dieser Effekt wird auf COX-abhängigem Weg über Prostacyclin (PGI_2) vermittelt, das den cAMP Spiegel erhöht und damit die Differenzierung dieser Zellen stimuliert [Catalioto et al., 1991; Gaillard et al., 1989; Negrel et al., 1989].

Auf eine aus Mausembryonen gewonnene Präadipozytenlinie 3T3-L1 [Green et al., 1974] übt die Arachidonsäure dagegen eine antiadipogene Wirkung aus, die auf einer COX-abhängigen Prostaglandinproduktion beruht [Jump et al., 1999]. In der Tat hemmen Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, E_2 und D_2 die Fettzellendifferenzierung in diesem Modell. Als effizientester Inhibitor vermittelt Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ diesen Effekt über spezifische Wechselwirkungen mit FP Rezeptoren [Casimir et al., 1996]. FP-Rezeptoren aktivieren eine Signalkaskade, bei der es zu einer transienten Erhöhung des intrazellulären Calciums kommt [Nakao et al., 1993]. Zudem können die Rezeptoren über einen zweiten Signalweg die MAP-Kinase aktivieren, welche den Transkriptionsfaktor PPAR γ phosphoryliert und damit die Adipogenese hemmt [Reginato et al., 1998].

In den 3T3-L1-Präadipozyten können beide COX-Isoformen nachgewiesen werden [Yan et al., 2003]. Innerhalb der ersten Stunden nach Induktion der Zelldifferenzierung wird eine transiente Steigerung der COX-2-Expression gefunden, die aber im Verlauf der adipogenen Differenzierung wieder abnimmt [Petersen et al., 2003]. Durch Arachidonsäuregabe wird die COX-2-Expression aufrechterhalten, welche die Adipogenese über Bildung von Prostaglandinen hemmt. Bei einer zusätzlichen Gabe von Indomethacin, einem nicht selektiven COX-Inhibitor, wird die COX-Aktivität inhibiert und die Differenzierungshemmung wieder aufgehoben.

Über die Rolle der Lipoxygenasen bei der Fettzellendifferenzierung existieren nur geringe Kenntnisse. Bisherige Untersuchungen basieren hauptsächlich auf Inhibitorversuchen mit NDGA, einem unspezifischen Hemmstoff des Lipoxygenasewegs. So hemmt NDGA die hormonell induzierte Differenzierung primärer Rattenpräadipozyten [Shillabeer et al., 1998].

Jüngste Untersuchungen zeigen auch für die murine 3T3-L1-Zelllinie, zu der NDGA oder der spezifische 12/15-LOX-Inhibitor Baicalein zugegeben wird, eine vollständige Hemmung der Differenzierung [Madsen et al., 2003]. In 3T3-L1-Adipozyten verursacht NDGA über die Hemmung der LPL-Aktivität (LPL = Heparin-freisetzbare Lipoproteinlipase) eine Reduzierung der Lipidakkumulation [Park et al., 2001] und hindert zusätzlich die Fähigkeit von Arachidonsäure, die Glucoseaufnahme zu stimulieren [Nugent et al., 2001]. Demnach scheint der intakte LOX-Weg für die Fettzellendifferenzierung dieser Zellen notwendig zu sein. Weitgehende Unklarheit besteht aber zur Zeit darüber, welche LOX-Isoform und welcher LOX-Metabolit an der Fettzellendifferenzierung beteiligt sind.

Um diese Fragen beantworten zu können, werden in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Beteiligung von Lipoxygenasen bei der Fettzellendifferenzierung zwei verschiedene Präadipozytensysteme verwendet. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.6.3 Präadipozytäre Zellsysteme

1.6.3.1 Murine 3T3-L1-Präadipozyten

Die murinen, embryonalen 3T3-L1-Präadipozyten gelten als ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen der zellulären Differenzierung und Entwicklung [Green et al., 1974, 1975 und 1976]. Sie wurden aus 17-19 Tage alten Embryonen der Swiss-albino-Mäuse gewonnen und stellen reine, klonale Präadipozyten dar [Rosen et al., 2000]. Mit geeigneten Stimuli differenzieren diese Zellen in Kultur zu Adipozyten [Student et al., 1980; Cornelius et al., 1994].

Die Injektion von 3T3-L1-Zellen in Mäuse führt zur Bildung von Fettpolstern, die nicht von normalem, adiposem Gewebe unterscheidbar sind [Green et al., 1979]. Diese morphologisch den Fibroblasten ähnlichen Zellen sind demnach zur adipösen Umwandlung bestimmt und bilden ein Zellsystem, das In-vivo-Verhältnisse widerspiegelt.

1.6.3.2 Rb^{-/-} Mausembryofibroblasten

Die Retinoblastom-Gen defizienten MEF-Zellen (Rb^{-/-} MEFs) wurden aus der Lunge 13 Tage alter Mausembryonen gewonnen, bei denen das Retinoblastom-Gen durch Insertion des Hygromycinresistenzgens ausgeschaltet worden war.

Das Retinoblastom-Protein ist als Zellzyklusregulator an zahlreichen Prozessen beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung vieler Zelllinien [Herwig et al., 1997].

Die Rb-defizienten, primären Fibroblasten stellen somit ein attraktives Modell zur Untersuchung der Rb-Funktion bei der Kontrolle der Differenzierung dar. In diesen Zellen ist die adipose Umwandlung gehemmt, kann aber durch Expression des Retinoblastom-Gens induziert werden [Chen et al., 1996]. Als ein weiterer Agonist der Rb-/- MEF-Differenzierung wird der Adipozyten-Determinierungs- und Differenzierungsfaktor 1 (ADD-1) in Betracht gezogen.

2 PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der neuen Klasse der Epidermis-Typ Lipoxygenasen, insbesondere der e-LOX-3, und die Untersuchung ihrer Rolle bei der Fettzellendifferenzierung anhand zweier zellulärer Modellsysteme.

Dazu soll die enzymatische Aktivität der epidermalen Lipoxygenasen, mit Fokus auf der e-LOX-3, mit der konventioneller Isoenzyme verglichen werden. Zur weiteren Charakterisierung soll die e-LOX-3 anhand von Enzymaktivitätsmessungen auf ihre Substratspezifität untersucht und die gebildeten Produkte analytisch bestimmt und identifiziert werden. Parallel dazu soll die Rolle der Lipoxygenasen bei der Adipogenese untersucht werden.

3 MATERIAL

3.1 Geräte

Adsorbex SPU Probenaufreinigungsstation	Merck, Darmstadt
Bakterieninkubator	Infors, Bottingen, Schweiz
Bakterienschüttler	Infors, Bottingen, Schweiz
Biofuge B	Heraeus, Hanau
Burtschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer Twin	Renner, Dannstadt
Elisa-Reader	Biotek Instr., Winooski, USA
Entwickler-Maschine Curix 60	Agfa-Gevaert, München
Feinwaage 2004 MP	Sartorius, Göttingen
Heizbad	GFL, Hannover-Vinnhorst
Heizblock 5320	Eppendorf, Hamburg
Horizontal-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Horizontalschüttler Variospeed	Renner, Dannstadt
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Laborwasserbad	B. Braun, Melsungen
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
Netzgerät PHERO-stab. 500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
PH-Meter 646, digital	Methrom, Herisau, Schweiz
Röntgenfilmkassetten	Kodak, Rochester, N. Y., USA
	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Speedvac Vakuumkonzentrator	Bachofer, Reutlingen
Sequenzierungsgerät ABI Prism 310	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler	Biozym, Hess. Oldendorf
Transfer Blotkammer SDI	CTI, Idstein
Überkopfschüttler	Heidolph, Kehlheim
UV-Transilluminator	UVP, San Gabriel, CA, USA
Vortex Genie 2	Bender&Hohbein, Bruchsal
Wasserbadschüttler	GFL, Hannover-Vinnhorst

3.2 Laborchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (Qualex Gold)	AGS, Heidelberg
Amidoschwarz	Sigma, Steinhausen
Amino- ϵ -capronsäure	Sigma, Steinhausen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Steinhausen
Aprotinin	Sigma, München
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg
Ethanol, f. Chromatographie	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylacetat, f. Chromatographie	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-(β -aminoethyl)- N, N, N', N'-tetraacetat (EGTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
n-Hexan, f. Chromatographie	Merck, Darmstadt
2-Propanol, f. Chromatographie	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
Milchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinhausen
Natriumormiat	Merck, Darmstadt
N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinhausen
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Steinhausen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasser, f. Chromatographie	Fluka, Neu-Ulm

Nicht aufgeführte Chemikalien, wie Lösungsmittel, Säuren, Laugen und Salze wurden von Roth, Karlsruhe, Merck, Darmstadt, Fluka, Neu-Ulm, oder Sigma, München, in p. a.-Qualität bezogen.

3.3 Membranen und Filme

Immobilon PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Whatman 3 MM Filterpapier	Bender&Hobein, Bruchsal
Fuji medical X-Ray Röntgenfilme	Der Photoshop, Heidelberg
Kodak Ektapress Gold II PJC 135-60	Der Photoshop, Heidelberg

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Advantage HF Polymerase	Clontech, Heidelberg
Big Dye Sequencing Kit	PE Biosystems, Weiterstadt
DNA-Größenstandard pUC 19 DNA/MspI	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DNA-Ligantion Kit	Stratagene, Heidelberg
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Mammalian Transfection Kit	Stratagene, Heidelberg
Nukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
QIAEX-DNA-Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIA prep Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIA prep Spin Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIA Proteinexpression und Reinigung Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
SYBER Green Mastermix	Applied Biosystems
TA-Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

3.5 Oligonukleotide

e-LOX-3:	5'-AGTGGGCAGCATGACTTt-3'
	5'-GAAGGCTGCGATGCTCT-3'
112S-LOX:	5'-TCATGAATCGGTACGTGG-3'
	5'-GTCGCGTCCTTGGTTT-3'
p12S-LOX:	5'-CCAGACATGGTACCTATA-3'
	5'-CAGTCCTAGGGCTGAC-3'
TBP:	5'-ACCCTTCACCAATGACTCCTATG-3'
	5'-TAGATGACGGCAGCAAATCGC-3'
1764:	5'-CTCGAGCGCATGCGTCAAGTACAACAAGATCCT-3'
	5'-GACTCACAGTAGTCAATGGAACGTACGCGAGCTC-3'

3.6 Vektoren

pQE 30	Qiagen, Hilden
pQE 80-L	Qiagen, Hilden
pcDNA 3.1 und pcDNA 3.1- β -Gal	Invitrogen, Leek, Niederlande

3.7 Antikörper

Kaninchen anti-8LOX	Brash et al., Nashville, USA
Kaninchen anti-Mensch 12 LOX	Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland
Kaninchen anti-12R-LOX-Peptid (SA5846)	EurogenTek, Herstal, Belgien
Kaninchen anti-e-LOX-3-Peptid (SA5847)	EurogenTek, Herstal, Belgien
Kaninchen anti-m8-Peptid (SA6166)	EurogenTek, Herstal, Belgien
Kaninchen anti-e12S-LOX-Peptid (SA6168)	EurogenTek, Herstal, Belgien
Ziege anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	Tropix, Bedford, MA, USA

3.8 Proteinexpression und -analytik

ECL Reagenz	Amersham Pharmacia, Freiburg
GF-Vorfilter	Sartorius AG, Göttingen
High Molecular Weight Marker SDS 6H	Sigma, Steinhausen
Millex-GS (0,22 μ m) Filtereinheit	Millex, Molsheim, Frankreich
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Poly-Prep Chromatography Columns (0,8 X 4 cm)	BioRad, Herkules, CA, USA
QIAexpress Expression System	Qiagen, Hilden
Western-Light Chemiluminescent Detection System	Tropix, Bedford, MA, USA

3.9 Lipidanalytik

Autosampler Vials	Neolab-Migge, Heidelberg
Bördelappen	Agilent (GGA, Moers)
Hecht Assistent Reagenzgläser	Neolab-Migge, Heidelberg
Octadecyl-Silica-Säulen	ICT, Bad Homburg, Deutschland
Reacti-Vials	Neolab-Migge, Heidelberg
Vial Inserts (wide opening)	Agilent (GGA, Moers)

3.10 Substrate für Aktivitätstest

Arachidonsäure	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Linolsäure	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Arachidonsäuremethylester	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Linolsäuremethylester	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
15(S)-HPETE	Cayman, Chemicals, USA
12(R,S)-HPETE	Reatec, Weiterstadt

3.11 HPLC-Anlage

Firma Kontron (jetzt Biotech Kontron, Neufahrn, Deutschland)

Software KromaSystem 2000, V1.6D, später ersetzt durch V1.8.

3.11.1 Komponenten der HPLC-Anlage

3.11.1.1 CP-HPLC (SYS1)

Binäres Pumpensystem, 2 Pumpen 420 mit Pumpenköpfen bis 2ml/min

Handinjektionsventil mit 20µl Probenschleife

UV-Detektor 432, später ersetzt durch Dual Wavelength UV-Detektor 430

3.11.1.2 RP/SP-HPLC (SYS2)

Binäres Pumpensystem, 2 Pumpen 420 / 422 mit Pumpenköpfen bis 2ml/min

Autosampler 360

Handinjektionsventil mit 20µl Probenschleife

6fach Säulenschaltung (Kronlab, Sinsheim, Deutschland)

Dual Wavelength UV-Detektor 430, später ersetzt durch Diodenarraydetektor 540+

3.11.1.3 HPLC-Säulen

Zorbax Sil (25 x 0,46cm, 5µm Partikelgr.) Bischoff, Stuttgart, Deutschland

YMC Pack ODS-AM (25 x 0,46cm, 5µm P.) YMC Europe, Schermbeck, Deutschland
mit 1cm Vorsäule

Chiracell OB (25 x 0,46cm, 5µm P.) Baker Instruments Corp., Deerfield, IL, USA

3.12 HPLC-Standards

Alle HPLC-Standards wurden von der Firma Reatec, Weiterstadt, Deutschland als ethanolische Lösungen mit der Konzentration 0,1mg/ml bezogen.

5(R, S)-HETE	5(R)-HETE	5(S)-HETE
8(R, S)-HETE	8(R)-HETE	8(S)-HETE
12(R, S)-HETE	12(R)-HETE	12(S)-HETE
15(R, S)-HETE	15(R)-HETE	15(S)-HETE
9(R)-HODE	9(S)-HODE	
13(R)-HODE	13(S)-HODE	

3.13 Massenspektrometrie

Die nanoESI-Untersuchungen der HPLC-Fractionen erfolgten in der Zentralen Spektroskopie der DKFZ in der Arbeitsgruppe von Prof. Lehmann.

Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000: Finnigan, San Jose, CA, USA

NanoESI Quelle: EMBL, Heidelberg

Kollisionsgas: Argon (2,5 mTorr)

Spannung der nanoESI-Nadel: 400-700 V

Massenspektrometrische Untersuchungen von LOX-Proteinen mittels MALDI-TOF wurden einerseits in der Arbeitsgruppe von Prof. Lehmann, andererseits in der Gruppe von Dr. Schnölzer durchgeführt.

MALDI Massenspektrometer REFLEX II: Bruker Daltonik GmbH, Bremen

3.14 Organismen

3.14.1 Kompetente Bakterien

One Shot (TOP 10)	Invitrogene, Leek, Niederlande
Sure 2supercompetent cells	Stratagene, Heidelberg
M15[pREP4]	Qiagen, Hilden

3.14.2 Zelllinien

HEK 293-Zellen	FlowLab
3T3-L1-Präadipozyten	Prof. Kristiansen, Odense, DK
Rb-/- MEF	Prof. Kristiansen, Odense, DK

3.15 Zellkulturmaterialien

Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinhausen
DMEM	Flow Laboratories, Meckenheim
EMEM	BioWhittaker, Berlin
FKS	Gibco RCC, Basel, Schweiz
$K_3[Fe(CN)_6]$	Merck, Darmstadt
$K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O$	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Penicillin/ Streptomycin (10000 U/ ml)	Biochrom, Berlin

4 METHODEN

4.1 DNA-Techniken

4.1.1 Allgemeines

4.1.1.1 Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Messung der optischen Dichte

Die Bestimmung der DNA-Konzentration konnte aufgrund ihrer UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers erfolgen. Aufgrund der linearen Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration entspricht die OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA.

Daraus resultiert die Formel:

$$c \text{ [pg/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50$$

Der Reinheitsgrad der DNA ergibt sich aus dem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀, der bei reinen Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

4.1.1.2 Konzentrationsbestimmung durch Vergleich mit einem DNA-Standard

DNA-Proben, deren Konzentration zur akkuraten Messung im UV/VIS-Spektrometer zu gering war, wurden im Elektrophoreseverfahren abgeschätzt. Dazu wurden unterschiedliche Volumen der jeweiligen Probe und des Standards mit bekannter Konzentration in einem Agarose-Flachbett-Gel elektrophoretisch getrennt. Im UV-Licht konnte aufgrund des Vergleiches der Bandenintensität die Konzentration bestimmt werden.

4.1.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe der Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen. Verwendet wurden Agarose-Flachbett-Gele unterschiedlicher Größe (15 cm x 10 cm und 15 cm x 30 cm), in denen entsprechend der zu erwartenden Fragmentgrößen die Agarosekonzentrationen zwischen 0,7 bis 1,4 % variiert wurden. In dem als Gel- und Laufpuffer verwendeten 1x TBE-Puffer wurde die gewünschte Agarosemenge unter zur Hilfenahme eines Mikrowellengerätes durch kurzzeitiges Aufkochen aufgelöst.

Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung je 100 ml Gelvolumen (Endkonz. 1 µg/ml) wurde diese Lösung in eine abgedichteten Horizontalgelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Das erstarrte und in die mit 1x TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresegelkammer eingesetzte Agarose-Flachbett-Gel konnte dann zur Analyse von DNA-Fragmenten verwendet werden. Den Gelauftrag vorbereitend wurden die Proben mit Gelladepuffer versetzt. Die Laufbedingungen der Elektrophorese variierten nach Gelgröße zwischen 1-2 Stunden bei einer angelegten Spannung von 10 V/cm. Der in die DNA interkallierende Farbstoff Ethidiumbromid dient durch seine Fluoreszenz im UV-Licht zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente im Agarose-Flachbett-Gel, wodurch das DNA-Bandenmuster auf einem Film festgehalten werden kann.

1x TBE-Puffer

100 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in TE-Puffer

TE-Puffer

20 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7-8

Gelladepuffer

50 % Glycerol, 15 mM EDTA, 0,15 % Bromphenolblau, 0,15 % Xylencyanol, pH 7,4

1kb- und puc-Marker

1 µl Marker (MBI Fermentas), 2 µl Gelladepuffer, 7 µl H₂O

4.1.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Die zur Transformation von Plasmid-DNA notwendigen, kompetenten Bakterien wurden aus dem in Glycerin konservierten E. coli-Stamm M15[pREP4] der Firma QIAGEN gewonnen. Die Auswahl der gewünschten Bakterien erfolgte mit Hilfe von Selektions-Agarplatten über Nacht bei 37 °C. Eine Einzelkolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und unter Selektionsbedingungen bei 37 °C in einer Flüssigkultur von 10 ml vermehrt. Diese Übernachtskultur wurde 1:100 verdünnt und zur optimalen, optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 unter Selektionsdruck vermehrt. Die Ernte der Bakterien erfolgte nach Abkühlen auf Eis durch Zentrifugieren bei 4000 x g und 4 °C für 5 min (4500 rpm, Beckmanzentrifuge).

Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in 30 ml eiskaltem TFB 1-Puffer resuspendiert und für weitere 90 min auf Eis belassen. Zur Applikation des Lagerungspuffers TFB 2 wurden die Bakterien erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml des eiskalten Puffers TFB 2 resuspendiert. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte als Aliquots bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

LB-Medium

10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl in H_2O , autoklavieren
oder entsprechend 25 g/l Luria Broth Base in H_2O , autoklavieren

LB-Agar

10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, 12 g/l Agar in H_2O , autoklavieren
oder entsprechend 37 g/l Luria Agar in H_2O , autoklavieren

Zusatz zum Selektionsmedium

25 mg/l Kanamycin

TFB 1-Puffer

100 mM RbCl, 50 mM MnCl_2 , 30 mM CH_3COOK , 10 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin,
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, steril filtrieren (Filter: $0,2\text{ }\mu\text{m}$)

TFB 2-Puffer

10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin,
pH 6,8 mit KOH einstellen, steril filtrieren (Filter: $0,2\text{ }\mu\text{m}$)

4.1.1.5 Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Effizienz bzw. der Kompetenz der Bakterien wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Plasmid-DNA transformiert und unter Selektionsdruck auf Agarplatten kultiviert. Die Transformationseffizienz ergibt sich aus der Berechnung des Verhältnisses zwischen Kolonienzahl und der für die Transformation eingesetzten Menge an Plasmid-DNA, ausgedrückt in Kolonien pro Mikrogramm Plasmid. Eine ausreichende Effizienz der Bakterien ist bei 10^6 bis 10^7 Kolonien pro μg DNA gegeben.

4.1.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

4.1.1.6.1 M15-Bakterien

Für die Transformation wurden 100 µl dieser Bakterien auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 10-100 ng der einzubringenden Plasmid-DNA für die Proteinexpression (Kap. 4.3.7) vermischt und für 20 min auf Eis belassen. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C zur Aufnahme der Plasmid-DNA in das Bakterium wurde 500 µl Psi Broth-Medium zugefügt und für 75 min bei 37 °C geschüttelt. Aliquots zwischen 50 und 200 µl wurden für die Auswahl der gewünschten Kolonien auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Psi broth-Medium

LB-Medium, 4 mM MgSO₄, 10 mM KCl, autoklavieren

Zusatz zu Selektions-Agarplatten

25 mg/l Kanamycin und 100 mg/l Carbenicillin (Ampicillin-Derivat)

4.1.1.6.2 One Shot-Bakterien

Ein 50 µl Aliquot der kompetenten One Shot Top 10-Bakterien der Firma Invitrogen wurde auf Eis aufgetaut, 10-100 ng der Plasmid-DNA zugegeben und für 30 min auf Eis belassen. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 30 sec mit anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis. Die Bakteriensuspension wurde mit 250 µl SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C unter horizontalem Schütteln kultiviert. Zur Selektion wurde 50 bis 200 µl des Transformationsansatzes auf vorbereiteten Selektions-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Selektions-Agarplatten ermöglichten durch vorherige Applikation von 40 µl einer zweiprozentigen X-Gal-Lösung die „Blau-Weiß-Selektion“ [Maniatis et al., 1989] basierend auf der Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes in das lacZ-Gen. Durch die Insertion wird dieses für β-Galactosidase kodierende Gen inaktiviert und die Blaufärbung der Kolonie durch Umsetzung des X-Gal zu β-Galactose und dem blauen, schwer löslichen Indigofarbstoff verhindert.

SOC-Medium

2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, lagerbar bei + 4°C

X-Gal-Lösung

2 % 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid (X-Gal) in Dimethylformamid,
lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

4.1.1.7 Kultivierung von Bakterien zur Klonierung von DNA

Die zu kopierende Fremd-DNA wurde in einen bakteriellen Plasmidvektor mit gewünschten Replikationsursprung, Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und Antibiotikaresistenz kloniert und in die Bakterienzelle durch Transformation eingefügt. Zur Vervielfältigung der extrachromosomalen DNA wurden die Bakterien in Selektions-Flüssigkultur oder auf Selektions-Agarplatten kultiviert.

LB-Medium

10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl in H_2O , autoklavieren
oder entsprechend 25 g/l Luria Broth Base in H_2O , autoklavieren

LB-Agar

10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl, 12 g/l Agar in H_2O , autoklavieren
oder entsprechend 37 g/l Luria Agar in H_2O , autoklavieren

Zusätze zum Selektionsmedium

25 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Carbenicillin

4.1.1.8 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab

Basierend auf der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly [1979] konnte mit dem QIAprep Spin Columns Kit der Firma Qiagen kleine Mengen rekombinater Plasmid-DNA (bis zu 20 μg) zu deren Charakterisierung gewonnen werden. Dabei beruht die Aufreinigung auf der Bindung der DNA an ein Silikagel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen und damit möglichen Abtrennung von Membran- und Organellfragmenten.

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde zur Ernte der Bakterien 5 min bei 1000 x g zentrifugiert (5000 rpm, Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JLA-10.500), das entstandene Pellet in 250 μl P 1-Puffer resuspendiert und zur Bakterienlyse 5 min bei Raumtemperatur mit 250 μl P 2-Puffer behandelt. Die Präzipitation erfolgte nach Zugabe von 350 μl N 3-Puffer durch fünfminütige Inkubation auf Eis.

Zur Abtrennung der DNA von Zellrückständen wurde 10 min bei 1400 x g (13000 rpm, Zentrifuge Biofuge 13) zentrifugiert und die klaren Überstände auf die Säulen aufgetragen. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute wurden die Säulen mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen und die DNA mit 50-100 µl EB-Puffer unter Verwendung der Zentrifuge eluiert.

Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde spektrometrisch gemessen und die Reinheit durch einen Restriktionsverdau bestimmt.

4.1.1.9 Plasmidpräparation in großem Maßstab

Große Mengen Plasmid-DNA konnten mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits des Herstellers Qiagen gewonnen werden. Nach alkalischer Lyse der Bakterien band die DNA bei geringen Salzkonzentrationen an eine Anionenaustauschsäule und wurde durch hohe Salzkonzentrationen eluiert.

Eine 400 ml Übernachtskultur wurde zur Ernte der Bakterien für 15 min bei 4 °C und 6000 x g (5700 rpm, Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JLA-10.500) zentrifugiert und das Pellet in 10 ml P 1-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml P 2-Puffer und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 10 ml eiskaltem P 3-Puffer wurde durch vorsichtiges Umdrehen der Gefäße gemischt, das Lysat in eine Filterkartusche überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde über diese Filterkartusche auf eine mit 10 ml QBT-Puffer voräquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule überführt und zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die gereinigte Plasmid-DNA konnte mit 15 ml QF-Puffer in ein Corex-Reagenzglas eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol durch Zentrifugieren für 30 min bei 15000 x g (9500 rpm, Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JS-13.1) und 4 °C gefällt werden. Nach Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut bei 15000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl EB-Puffer resuspendiert. Nach Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm erfolgte die Lagerung der DNA bei -20 °C.

P 1-Puffer

50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A, pH 8,0

P 2-Puffer

200 mM NaOH, 1 % SDS

P 3-Puffer

3 M CH₃COOK, pH 5,5

QBT-Puffer

750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton X-100, pH 7,0

QC-Puffer

1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Isopropanol, pH 7,0

QF-Puffer

1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % Isopropanol, pH 8,5

EB-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8,5

4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion als in vitro-Technik dient zur exponentiellen Amplifikation einer Nukleotidsequenz, die an beiden entgegengesetzten Strangenden durch zwei komplementär zueinander gelegene Primer festgelegt wird. Basierend auf der Verwendung von DNA-Polymerase kann die DNA-Matrize in wiederholten Replikationsrunden kopiert werden.

Der Einsatz von Oligonukleotidprimern ermöglicht zusätzlich das Einführen von Nukleotiden in das Produkt oder auch die Modifikation der Enden des DNA-Fragments in Form von neuen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.



Abb. 5 Amplifikation von DNA mit der PCR-Technik: erster Zyklus

4.1.2.1 Amplifikation und Modifizierung von DNA mit PCR-Technik

Zur Vervielfältigung einer festgelegten Nukleotidsequenz kam die Taq DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zum Einsatz.

In einer Standardreaktion wurden als DNA-Matrize 1 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10x Taq Polymerase-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid), jeweils 2 µl des 5'- und des 3'-spezifischen Primers (10 pmol/µl) mit 38,5 µl H₂O auf ein Gesamtvolumen von 49,5 µl gebracht und vermischt. Für den Reaktionsstart wurde zuletzt 0,5 µl Taq DNA-Polymerase zugefügt. Die Bedingungen für die Standardamplifikation in Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) lauteten: Beginnend fünfmündige Denaturierung der DNA bei 95 °C, anschließend 30 Zyklen für 1,5 min bei 94 °C (Denaturierung), Annealing bei 56 °C für 1,5 min und für die eigentliche Polymerase-Reaktion 72 °C für 2,5 min (Elongation). Die Wahl der Annealingtemperatur war abhängig von der Länge und dem Schmelzpunkt des Primerpaares. Zum Abschließen aller unvollständigen Elongationsreaktionen wurde nach dem letzten Zyklus die Reaktionsansätze für weitere 10 min bei 72 °C gehalten.

Durch die verwendete Taq DNA-Polymerase, die eine Templat-unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, wurden am 3'-Ende der amplifizierten DNA-Produkte ein zusätzliches Desoxyadenosin eingefügt.

In der Tab. ? wurden die verwendeten PCR-Programme festgehalten.

Programme	TAQ 56	HF 60
Initiale Denaturierung	95 °C, 5:00 min	94 °C, 0:15 min
Denaturierung	94 °C, 1:30 min	94 °C, 0:10 min
Annealing	56 °C, 1:30 min	60 °C, 1:30 min
Elongation	72 °C, 2:30 min	68 °C, 4:00 min
Zyklenzahl	30	30

Tab. 1 *Verwendete PCR-Programme*

Die Analyse der PCR-Reaktion (5 µl der Ansätze) erfolgte im Agarosegel mittels Gelelektrophorese. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Gelextraktion der Banden mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraktions-Kits (Qiagen) aufgereinigt (Kapitel ??) und konnten in den bakteriellen Vektor pQE 80-L subkloniert werden.

10x Taq Polymerase-Puffer:

0,2 mg BSA/ml, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Triton-X100, 10 mM Tris/HCl, pH 9,0

4.1.2.2 Quantitative Real-time PCR

Bei der Real-time PCR kann die Amplifikation der Zielsequenz in Echtzeit gemessen werden. Aus der erhaltenen Reaktionskinetik kann im Vergleich mit einer Eichkurve (TBP-Standard) auf die Templatmoleküle zurückgerechnet werden. Zur Messung der Amplifikation wird als Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen verwendet, der nur an doppelsträngige DNA bindet und bei entsprechender Anregung charakteristische Strahlung emittiert. Die Steigerung der Strahlungsintensität ist damit direkt proportional zur gebildeten Produktmenge.

Für die Real-time PCR wurde 1,5 µl der aus der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA (Kap. 4.2.1.3) verwendet und mit 300 nM des jeweiligen Primers und 23,5 µl SYBER Green Mastermix versetzt. Das Temperaturprogramm bestand aus einer 10 minütigen Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 15 sec Denaturierung bei 95 °C, Annealing für 30 sec bei 60 °C und Elongation für 1 min bei 72 °C. Nach einer Ramptime von 45 sec wurde für 30 sec bei 78 °C inkubiert. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Analyse der Schmelzkurven überprüft. Die LOX-Kopienzahl wurde mit Hilfe des Haushaltsgens TBP normalisiert. Die Expression dieses Gens wurde in analoger Weise wie die LOX-Expression bestimmt.

4.1.3 Klonierung

4.1.3.1 Restriktionsverdau der DNA

Die zur Analyse der DNA verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend der Herstellerdaten eingesetzt. In einer Standardreaktion wurde zum Schneiden 1 µg Plasmid-DNA in dem für die Restriktionsenzyme optimalen Puffer verdünnt und in 5- bis 10-facher Enzymmenge (5-10 U) für 1-2 Stunden inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde nach dem Aktivitätsoptimum der Restriktionsendonukleasen gewählt.

4.1.3.2 DNA-Isolierung nach QIAquick-Gel-Extraktion-Kit (QIAGEN)

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen beruht auf einer modifizierten Methode von Vogelstein und Gillespie [1979], bei der nach Schmelzen der Agarose die Nukleinsäuren in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen spezifisch an Silikagel adsorbieren und bei niedrigerer Salzkonzentration und einer basischen Umgebung von pH 7,5 bis 8,0 eluiert werden können. Nach der Agarosegelelektrophorese wurde die zu extrahierende DNA-Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt.

Je 100 mg Agarosegelbände wurden 300 µl QG-Solubilisationspuffer hinzugefügt und für 10 min bei 50 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Lösen der Agarose sollte zur optimalen Bindung der DNA an das Silikagel-Säulenmaterial der pH-Wert unterhalb von 7,5 liegen (gelbe Farbe des im Puffer enthaltenen Indikators). Bei DNA-Fragmenten unterhalb von 500 bp bzw. oberhalb von 4 kb wurden je 100 mg Agarosegelbände 100 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach Binden des DNA-Ansatzes an das Silicasäulenmaterial wurde dieser zusätzlich, beim Einsetzen für empfindliche Anwendungen, mit QG-Solubilisierungspuffer gereinigt und mit 750 µl PE-Waschpuffer gewaschen. Störende Spuren des PE-Waschpuffers wurden durch zweimaliges Zentrifugieren für 1 min bei 1500 x g (13000 rpm, Zenrifuge Biofuge 13) entfernt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30-50 µl EB-Puffer.

4.1.3.3 SAP-Behandlung linearisierter Vektoren

Um eine Religation der durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Klonierungsvektoren zu unterbinden, wurden die 5'-terminalen Phosphatreste durch die Behandlung mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt. Bei der Dephosphorylierung wurden 1-10 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 10x SAP-Puffer und H₂O auf ein Volumen von 15-80 µl verdünnt und mit 1-8 µl SAP (1U/µl) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Inkubation bei 65 °C für 15 min. Die Ligation mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit dem Ligationskit (enthält das Enzym T4 DNA-Ligase) des Herstellers Stratagene durchgeführt (Kap. 4.1.3.5).

10x SAP-Puffer

0,5 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, pH 8,5

4.1.3.4 TOPO TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die in der Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten DNA-Fragmente besaßen bei Verwendung der Taq-Polymerase an den 3'-terminalen Enden ein zusätzliches Desoxyadensin, wodurch sie direkt in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert werden konnten, der linearisiert mit einem 3'-überhängenden Desoxythymidin vorlag. Die TA-Klonierung erfolgte mittels des TOPO TA-Cloning-Kits der Firma Invitrogen. In der Ligationsreaktion wurden 10 ng PCR-Produkt (0,5 bis 2 µl des PCR-Ansatzes), 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und 1 µl pCRII-TOPO-Vektor mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt und nach vorsichtigem Mischen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zugabe der Salzlösung führt bei der Klonierungsreaktion zu einer gesteigerten Transformationseffizienz, die auf das Verhindern der erneuten Bindung der Topoisomerase I und damit möglichen Schneiden des Ligationsproduktes zurückzuführen ist.

Zur Transformation in One Shot-Bakterien (kompetente *E. coli* Bakterien) wurden 2 µl des Ligationsansatzes verwendet und diese nach der in Kapitel 4.1.3.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Rekombinante Plasmide konnten mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion [Maniatis et al., 1989] auf Carbenicillin und X-Gal enthaltenden Selektions-Agarplatten identifiziert werden, da die Insertion der zu klonierenden DNA-Fragmente im lacZ-Gen stattfindet und die Blaufärbung der Kolonie verhindert.

4.1.3.5 Ligation

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Fragmente in linearisierte Klonierungsvektoren erfolgte mittels der in Kap 3.4 beschriebenen Kits nach Angaben des Herstellers. Bei möglicher Religation des eingesetzten Klonierungsvektors wurden die 5'-terminalen Phosphatreste durch SAP-Dephosphorylierung (Kap. 4.1.3.3) entfernt.

4.1.3.6 DNA-Sequenzierung

Basierend auf der Dideoxy-Methode von Sanger et al. [1977] wurde die DNA-Sequenzierung mit Hilfe des Big Dye Kits des Herstellers Perkin Elmer durchgeführt. Am Beginn der Reaktion wurde die doppelsträngige DNA denaturiert, um die Hybridisierung der Primer an die zu sequenzierende DNA (Annealing) und die folgende Elongation (Polymerase-Reaktion) zu ermöglichen. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Dideoxy-terminatoren, die mit dem Überschuß an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) um den Einbau in den DNA-Strang konkurrieren, konnte die Elongationsreaktion gleichzeitig abgebrochen und markiert werden. Dabei waren an den vier Dideoxy-NTPs unterschiedliche Farbstoffe kovalent gebunden, die bei Anregung mit einem Laser Licht verschiedener Wellenlängen emittierten. Dadurch konnte die Reaktion mit den vier Terminatoren in einem Gefäß durchgeführt werden. Die automatisierte Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit Hilfe der Kapillarelektrophorese und Laser-gestützter Detektion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Fragmente in einem ABI Prism 310 (Perkin Elmer). In der DNA-Sequenzierungsreaktion wurde entsprechend der Größe der zu sequenzierenden Fragmente 0,3-1,2 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 2 µl Reaktionsmix mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt, verlief die Reaktion abhängig von der Primerlänge im Thermocycler nach in der Tab. ? beschriebenen Bedingungen.

Reaktionsmix

modifizierte Taq DNA-Polymerase, dNTPs, an Fluoreszenzfarbstoffe gebundene ddNTPs, 5x Reaktionspuffer

Tab. 2 Temperaturprogramme der Sequenzierungsreaktion

Primerlänge [Basen]	18-20	20-24
Denaturierung	96 °C, 0:15 min	96 °C, 0:15 min
Annealing	55 °C, 0:08 min	58 °C, 0:08 min
Elongation	60 °C, 0:01 min	60 °C, 0:01 min
Zyklenzahl	30	30

Nach Reaktionsende wurde 90 µl Wasser und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) zugegeben und die DNA mit 250 µl Ethanol unter Zentrifugieren bei 1400 x g (13000 rpm, Zentrifuge Biofuge 13) präzipitiert. Das Waschen des Sedimentes erfolgte durch zweimaliges Resuspendieren in 70 %iger Ethanollösung mit anschließendem Zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat 10 min an Luft getrocknet, wonach es in 20 µl TSR-Puffer (Template Suppressor Reagent) zur möglichen, längeren Lagerung bei – 20 °C aufgenommen wurde. Vor der Analyse wurde die Probe für 3 min bei 95 °C denaturiert und in die speziellen Analysegefäße überführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte im Genetic Analyzer ABI Prism 310.

4.2 RNA-Techniken

4.2.1 Allgemeines

4.2.1.1 RNA-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zum Testen der Qualität und Konzentration der RNA wurde diese mit Hilfe eines 1,2 % Agarose-Flachbettgels elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein 30 ml Gel wurde die entsprechende Menge Agarose zusammen mit den Salzlösungen, bestehend aus 20 mM MOPS (pH 7), 5 mM Natriumacetat (pH 5,5) und 1 mM EDTA (pH 7,2) in 26 ml DEPC-H₂O unter Kochen aufgelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde 6,5 % Formaldehyd unter Schütteln zugegeben und diese Lösung in eine abgedichteten Horizontalgelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Das erstarrte und in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresegelkammer eingesetzte Agarose-Flachbett-Gel konnte dann zur Analyse von RNA-Fragmenten verwendet werden. Den Gelauftrag vorbereitend wurden die RNA-Proben im Vakuum getrocknet und in

Probenpuffer gelöst. Anschließend wurden sie für 5 min bei 65 °C erhitzt und dann für mindestens 15 min auf Eis belassen. Die gelösten Proben wurden mit Gelladepuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 µg/µl) versetzt und aufgetragen. Die Laufbedingungen der Elektrophorese für ein 30 ml betragen bei einer angelegten Spannung von 10 V/cm etwa eine Stunde.

DEPC-H₂O

0,1 % Diethylpyrocarbonat, autoklaviert

Probenpuffer

50 % deionisiertes Formamid, 6 % Formaldehyd, 20 mM MOPS, pH 7,
0,5 mM Natriumacetat, pH 5,5, 1 mM EDTA, pH 7,2 mit DEPC-Wasser verdünnen

Laufpuffer

20 mM MOPS, pH 7, 5 mM Natriumacetat, pH 5,5, 1 mM EDTA, pH 7,2, bidest. H₂O

Gelladepuffer

50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol, bei -20° C lagern

4.2.1.2 RNA-Isolierung aus adherenten Zellen

Die Extraktion von RNA aus Zellen erfolgte nach der Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform Methode. Das Guanidiniumisothiocyanat und das N-Laurylsarcosin dient dabei zur Lyse der Zellen und zersetzt Nukleoproteinkomplexe, wodurch die RNA frei von Proteinen in Lösung gehen kann. Kontaminationen werden anschließend durch saure Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol abgetrennt.

Zur Extraktion wurden das Zellmedium entfernt und 1 ml kalte GTC-Lösung auf den Zellen verteilt. Die Ernte der Zellen erfolgte mit einem sterilen Zellschaber. Anschließend wurde das Zelllysats in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 30 sec zur Vervollständigung der Lyse gemischt. Das Ansäuern des Lysats erfolgte mit 0,1 ml 2 M Natriumacetatlösung (pH4,0). Zur Isolierung der RNA wurde 1 ml einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Suspension (im Verhältnis von 125:24:1) zugegeben, 10 sec gemischt und 15 min auf Eis belassen. Zur Phasentrennung in eine RNA enthaltende, wässrige Phase, sowie eine Interphase mit großen DNA-Stücken und Proteinen und die untere, organische Phase wurde für 10 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Nach Überführen der wässrigen, RNA haltigen Phase in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß wurde diese Lösung zur RNA-Präzipitation mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und für mindestens 5 min bei -20 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte das Zentrifugieren bei 4 °C und 10.000 x g für 10 bis 20 min. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment kurz getrocknet und anschließend in 0,5 ml GTC-Lösung gelöst. Zur vollständigen Lösung kann das Sediment kurz bei 65 °C erhitzt werden. Die RNA wurde erneut mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und nach Zentrifugation der Überstand verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit 0,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Sediment für einige Minuten getrocknet. Das RNA-Sediment wurde mit 100 µl DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und Konzentration analog Kap. 4.1.1.1 bestimmt und die Qualität der isolierten Gesamt-RNA im Agarosegel (Kap. 4.2.1.1) überprüft.

GTC-Lösung

4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % N-Lauroylsarcosin, pH 7,0, steril filtrieren, vor Licht schützen, bei 4 °C lagern (ungefähr 3 Monate haltbar)
kurz vor Verwendung 72 µl β-Mercaptoethanol je 10 ml Lösung zugeben

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

125:24:1 gepuffert mit 42 mM Natriumcitrat, pH 4,3-4,7

4.2.1.3 Reverse Transkription der gereinigten RNA (cDNA Synthese)

Für die Herstellung der einzelsträngigen cDNA aus Gesamt-RNA durch reverse Transkription wurde 3 µg der RNA-Probe auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl in DEPC-Wasser verdünnt. Davon wurde 1 µg mit 1 µl Oligos und 7 µl DEPC-Wasser für 5 min bei 85 °C inkubiert und anschließend auf Eis belassen. Zur RNA-Probe wurde 11 µl Premix und 3 µl Moloney murine Leukämievirus Reverse Transkriptase zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Wasser wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Premix

5 µl 5x 1st Strand Buffer, 2,5 µl 100 mM DTT, 1 µl RNAGuard (ca. 40 U), 2,5 µl dNTP Mix

4.3 Protein-Techniken

4.3.1 Allgemeines

4.3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Messung der optischen Dichte

Die Bestimmung der Protein-Konzentration konnte aufgrund deren UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers erfolgen. Durch die lineare Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration entspricht die OD_{280} von 1 einer Konzentration von 1,8 mg/ml Protein.

Daraus resultiert die Formel: $c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{280} \times \text{Verdünnung} \times 1,8$

4.3.1.2 Bestimmung des Titers von Bakteriensuspensionen

Die spektrometrische Feststellung des Titers erfolgte durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm.

4.3.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [1979] basiert auf der Stabilisierung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250, der im sauren Milieu in anionischer Form vorliegt, durch ionische Wechselwirkungen mit den kationischen Aminogruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin im Protein. Weitere Stabilisierung erfährt der gebildete Komplex durch hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte mit Histidin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninresten [Comptom und Jones, 1985], wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschiebt und in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration eine intensive Blaufärbung verursacht.

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Protein Assay Kits des Herstellers BioRad durchgeführt. Vergleichend mit einer Standardreihe (0-10 μg) des Rinder-Serumalbumins (Stammkonz. 1mg/ml) wurden 2-6 μl der zu bestimmenden Proteinlösung eingesetzt und mit 990 μl des Bradford-Reagenz (Stocklösung 1:4 verdünnt) auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 200 μl eines Ansatzes in eine Mikrotiterplatte pipettiert und seine Absorption im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardwerte des Rinder-Serumalbumins wurde eine Eichgerade bestimmt und der Umrechnungsfaktor der optischen Dichte zu μg Gesamtprotein für die Bestimmung der Proteinkonzentration errechnet.

4.3.1.4 Präzipitation und Denaturierung von Proteinen

Die Präzipitation von Proteinen erfolgte mittels Zugabe des dreifachen Volumens an Aceton zu wäßrigen Lösungen. Nach Lagerung bei -20 °C für mindestens 3 Stunden und Zentrifugation bei $11000 \times g$ (10000 rpm, Zentrifuge Biofuge 13) und 4 °C für 15 min wurden die Protein-Sedimente in $50\ \mu\text{l}$ 1x Laemmli-Sample-Puffer (1x LSB) aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Dabei bilden die einzelnen Polypeptidketten einen Komplex mit den im Laemmli-Sample-Puffer enthaltenen, negativ geladenen Natriumdodecylsulfatmolekülen (SDS) und können als SDS-Proteinkomplex durch ein poröses Polyacrylamidgel (Kap. 4.3.2) wandern. Zusätzlich im 1x Laemmli-Sample-Puffer enthalten ist das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken zwischen Proteinuntereinheiten spaltet und somit die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekularmasse ermöglicht.

1x Laemmli-Sample-Puffer (1x LSB)

10 % Glycerin, 3 % SDS, 62,5 mM Tris, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau, pH 6,8

4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung wurden Proteine nach der Laemmli-Methode [1972] unter denaturierenden Bedingungen in der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das diskontinuierliche Polyacrylamid-Gesamtgel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, deren Konzentration entsprechend der zu erwartenden Proteingröße variiert werden kann (verwendete Konzentrationen in Tab. 3).

Tab. 3 *Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Bestandteile	7,5 % Trenngel	4 % Sammelgel
Wasser	19,6 ml	12,5 ml
4x Lower Tris	10 ml	—
4x Upper Tris	—	5 ml
AA/Bis-AA (37,5:1; 30%)	10 ml	2,7 ml
TEMED	40 μl	40 μl
10 % APS	450 μl	60 μl

Beginnend wurde die 7,5%ige Trenngellösung in eine mit Agarose abgedichtete Vertikalgelkammer gegossen und mit einer Wasserschicht nach oben hin vor Austrocknung geschützt. Nach Ende der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser mittels eines Filterpapiers entfernt und nach Einsetzen des Kammes das Sammelgel in die Vertikalgelkammer pittetiert. Das fertige, diskontinuierliche Gel konnte in die Elektrophoresekammer gespannt werden, in der als Elektrophoreselaufpuffer 1x SDS-Page-Puffer (aus einer 10x SDS-Page-Stocklösung verdünnt) verwendet wurde. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 1x Laemmli-Sample-Puffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min denaturiert (Kap. 4.3.1.4). Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte über Nacht bei konstanter Stromstärke von 10 mA. Das isolierte Trenngel wurde anschließend der Coomassie- (Kap. 4.3.2.1) oder Silberfärbung (Kap. 4.3.2.2) zugeführt oder dem Western-Blot (Kap. 4.3.3) mit anschließender Antikörperdetektion (Kap. 4.3.4) unterzogen.

4x Upper Tris

500 mM Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8

4x Lower Tris

1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8

10x SDS-Page-Stocklösung

25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3-8,8 (nicht einstellen)

SDS-6H-Proteinmarker

in 1,5 ml 1 x LSB aufnehmen, bei – 20 °C lagern

4.3.2.1 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Das Polyacrylamid-Trenngel wurde zur Färbung der Proteinbanden über Nacht bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt und anschließend zur Fixierung des Protein-Farbstoff-Komplexes mehrfach mit essigsaurer Entfärbelösung gewaschen.

Vor der Aufbewahrung wurde das gefärbte Gel auf ein 3MM Whatman Filterpapier gelegt und zur Trocknung im Gelvakuumtrockner (BioRad) für 90 min bei 80 °C behandelt.

Färbelösung

50 % Methanol, 0,05 % Coomassie brilliant blue R-250

Entfärbelösung

45 % Methanol, 10 % Eisessig, 45 % Wasser

4.3.2.2 Silberfärbung von Protein in Polyacrylamid-Gelen

Diese sensitive Methode zur Färbung von Proteinen beruht auf der Wechselwirkung des Reduktionsmittels Dithiothreitol mit den Proteinen. Bei Zugabe der Silberfärbelösung entstehen durch Reduktion der darin enthaltenen Silberionen an den Proteinbanden Silberkeime.

An diesen wird nach Waschen mit der reduzierenden Entwicklerlösung bevorzugt weiteres Silbersalz zu elementarem Silber reduziert und dadurch die Proteinbanden sichtbar gemacht.

Für die Fixierung wurde das Polyacrylamidgel für zwei Stunden in 50 % Methanol geschwenkt und anschließend dreimal für 20 min in Wasser gewaschen. Nachdem das Gel in der Mikrowelle für 1 min in Dithiothreitol-Lösung (5 µg/ml H₂O) erwärmt und zweimal für 5 min mit Wasser gewaschen wurde, erfolgte die 15-minütige Behandlung mit Silberfärbelösung. Nach zweimaligem Waschen des Gels für fünf Minuten mit Wasser wurde die Entwicklerlösung bis zum Erscheinen der Proteinbanden zugegeben, anschließend sofort mehrmals mit Wasser gewaschen und mit 10 % Essigsäure für eine Stunde fixiert. Die Lagerung erfolgte nach Trocknen des Polyacrylamid-Gels auf einem 3MM Whatman Filterpapier im Gelvakuumtrockner bei 80°C für 90 min.

Silberfärbelösung

0,8 g AgNO₃, 4 ml Wasser

direkt vor Gebrauch in

180 µl 10 M NaOH, 1,5 ml konz. NH₃-Lösung, 94 ml Wasser

Entwicklerlösung

1 ml 1% Zitronensäure, 180 µl 37% Formaldehyd, 200 ml Wasser

4.3.2.3 Ponceau-Färbung von Proteinen

Die Ponceau-Färbung dient der reversiblen Färbung von Proteinbanden auf Western-Blot-Membranen, wie Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen. Dazu wurde die Membran zuerst für eine Minute in der Ponceau-Färbelösung und anschließend zur Erkennung der Proteinbanden in Wasser geschwenkt.

Nach Markieren der Markerproteine mit einem Kugelschreiber wurde die Membran vollständig durch Waschen mit einer 1x TBS/T-Lösung entfärbt. Anschließend konnte die weitere Immunodetektion (Kap. 4.3.4) erfolgen.

Ponceau-Färbelösung

0,5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure, vor Licht geschützt lagern

4.3.2.4 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen

Zur Ladekontrolle wurden Proteinbanden auf Western-Blot-Membranen entsprechend der Ponceau-Färbung mit dem Farbstoff Amidoschwarz reversibel gefärbt. Nach Entfernen der Salze aus der Blotting-Prozedur durch fünfminütiges Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Membran für fünf Minuten mit Amidoschwarz-Färbelösung behandelt. Zum Entfernen des Hintergrundes wurde anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und die Markerproteine gekennzeichnet. Dann wurde die Membran der Immunodetektion nach der ECL- (Kap. 4.3.4.1) oder Tropix-Methode (Kap. 4.3.4.2) zugeführt.

Amidoschwarz-Färbelösung

10 % konz. Essigsäure, 25 % Isopropanol, 1 % Amidoschwarz

4.3.3 Western-Blot-Methode

In der Western-Blot-Methode werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Polyacrylamid-Trenngel zum späteren immunologischen Nachweis auf eine geeignete Membran transferiert. Entsprechend der modifizierten Methode von Tombin [1975] und Kyshe-Andersen [1984] werden die Proteine nach dem Halbtrockenverfahren durch eine Kombination aus Kapillar- und elektrochemischen Kräften auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran übertragen.

Für die Blot-Apparatur wurden fünfzehn auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Whatman 3 MM Filterpapiere und eine dementsprechend geschnittene PVDF-Membran (Millipore) benötigt. Ausgehend von der Anode wurde der Blot für den Proteintransfer folgendermaßen aufgebaut: sechs Lagen in Anodenpuffer 1 getränktes Whatman 3 MM Papier, drei in Anodenpuffer 2 äquilibrierte Papierlagen, die in Ethanol voräquilibrierte PVDF-Membran in Anodenpuffer 2 getränkt, das in Kathodenpuffer gelagerte Polyacrylamid-Gel und zuletzt sechs Lagen in Kathodenpuffer getränktes Whatman 3 MM Papier. Zur Vermeidung von Kriechströmen während des Transfers wurde die überschüssige Puffermenge von der Anodenplatte entfernt.

Nach Auflegen der Kathode wurde der Aufbau mit einem Gewicht von einem Kilogramm beschwert und der Protein-Transfer durch Anlegen einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA pro cm}^2$ Gelfläche senkrecht zur Auflagefläche über 1,5 h vollzogen.

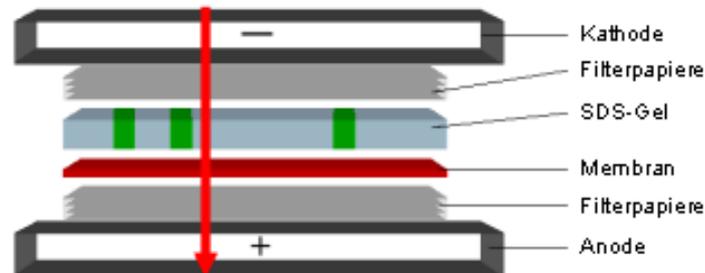


Abb. 6 Schematische Zeichnung eines Western-Blot-Aufbaus

Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran für eine Minute mit der Ponceau-Rot- oder mit Amidoschwarz-Färbelösung behandelt, deren Farbstoff Ponceau-Rot oder Amidoschwarz im sauren Milieu an Proteine bindet (Kap. 4.3.2.3). Nach Markierung der Markerproteine und Entfärbung der Membran mit einer 1x TBS/T-Lösung wurde zur Detektion spezifischer Proteine die Antikörper-Antigen-Reaktion verwendet (Kap. 4.3.4).

Anodenpuffer 1

0,3 M Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4

Anodenpuffer 2

25 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer

25 mM Tris/HCl, 40 mM 2-Amino- ϵ -capronsäure, pH 9,4

10x TBS-Stocklösung

20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

1x TBS/T-Lösung

Verdünnung aus der 10x TBS-Lösung mit anschließender Zugabe von 0,05 % Tween 20

4.3.4 Proteindetektion durch Antigen-Antikörper-Reaktion (Immunoblotting)

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Antikörper-Antigen-Reaktion nach der „Sandwich“-Methode eingesetzt, die durch Verwendung von zwei aufeinander abgestimmten Antikörpern die Empfindlichkeit der Antigen-Detektion beträchtlich erhöht. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das Antigen des gelelektrophoretisch getrennten Proteins und markiert dieses für den an einen Marker gekoppelten zweiten Antikörper. Die Bindung des zweiten Antikörpers an den Antigen-Antikörper-Komplex ermöglicht die Detektion des Proteinsignals durch eine Lumineszenzreaktion im Fall des Peroxidase-konjugierten und des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpers (Kap. 3.7). Die Lichtemission wird durch Exposition eines Autoradiographiefilmes festgehalten. Die Detektion erfolgt generell in vier Schritten, der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, der Bindung des ersten Antikörpers an das exponierte Antigen, die Anlagerung des zweiten, an einen Marker gekoppelten Antikörpers an den ersten Antikörper und die entsprechende Nachweisreaktion.

4.3.4.1 Immuno-Blot nach der ECL-Methode

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Protein-Transfer-Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in einer fünfprozentigen Milchpulver-Lösung in 1x TBS/T blockiert und anschließend zweimal für 10 min in 1x TBS/T-Lösung gewaschen. Der erste Antikörper wurde in einer fünfprozentigen Milchpulver-Lösung in den angegebenen Verdünnungen (Tab. 4) gelöst und die Transfer-Membran in dieser Lösung zur Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Behandlung mit dem Marker gekoppelten, zweiten Antikörper erfolgte in der in Tab. 4 genannten Verdünnung für 45 min bei Raumtemperatur. Nach jeder Inkubation wurde viermal für 10 min mit 1x TBS/T-Lösung gewaschen.

Tab. 4 Verdünnungen des ersten und zweiten Antikörpers

<i>Erster Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Zweiter Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
Kaninchen-anti-8-LOX ¹⁾	1:10000	Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:2500
Kaninchen-anti-m8-LOX (SA 6166)	1:7500		1:1000
Kaninchen-anti-h12-LOX ²⁾	1:6000		1:1000
Kaninchen-anti-12R-LOX (SA 5844)	1:5000		1:1000
Kaninchen-anti-e-LOX-3 (SA 5847)	1:5000		1:1000
Kaninchen-anti-e12-LOX (SA 6168)	1:5000		1:1000

¹⁾Detektion der menschlichen 5-LOX und der menschlichen e-LOX-3; ²⁾Detektion der Kaninchen 15S-LOX-1

<i>Nachweis mit erstem Antikörper</i>	<i>p 12S</i>	<i>l 12S</i>	<i>e 12S</i>	<i>8S</i>	<i>12R</i>	<i>e-LOX-3</i>
Kaninchen-anti-8-LOX	–	–	–	+	(+)	+
Kaninchen-anti-m8-LOX (SA 6166)	–	–	–	+	–	–
Kaninchen-anti-h12-LOX	+	+	+	(+)	+	–
Kaninchen-anti-12R-LOX (SA 5844)	–	–	–	–	+	–
Kaninchen-anti-e-LOX-3 (SA 5847)	–	–	–	–	–	+
Kaninchen-anti-e12-LOX (SA 6168)	–	–	+	–	–	–

Tab. 5 Kreuzreaktionen der verwendeten ersten Antikörper

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des ECL-Chemilumineszenz-Reagenz der Firma Amersham nach den Angaben des Herstellers. In diesem Reagenz wird zur Erzeugung der Lichtemission mit dem Peroxidase/Wasserstoffperoxid-System die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert. In einer unverzüglich nach der Oxidation folgenden Reaktion geht das Luminol in einen angeregten Zustand über, der unter Emission von Lichtenergie wieder verlassen wird.

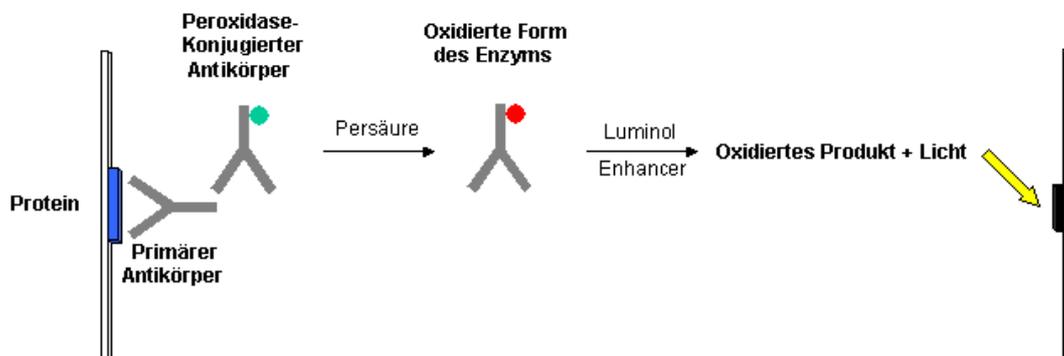


Abb. 7 Schematische Darstellung der verstärkten Chemilumineszenzreaktion

Eine verstärkte Chemilumineszenz (ECL) wird durch Zugabe eines Enhancers wie Phenol zur Oxidationsreaktion des Luminols erreicht, wodurch eine Steigerung der Emissionszeit des Lichts und der Lichtausbeute um das 1000-fache erreicht werden kann. Die maximale Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm kann durch Exposition eines Autoradiographiefilmes (sensitiv bei dieser Wellenlänge) detektiert werden, wobei sich die Expositionszeit nach der Signalstärke richtete und zwischen 30 s und 15 min betrug.

4.3.4.2 Immuno-Blot nach der Tropix-Methode

Das Protokoll nach der Tropix-Methode wurde zur sensitiveren Immunodetektion der murinen e12S-LOX verwendet. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Kap. 4.3.3) wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Casein enthaltenden Blockierlösung geschwenkt. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4 °C die Detektion des Antigens mit dem Maus e12S-LOX spezifischen, ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1 zu 5000 in Verdünnungspuffer. Nach zweimaligem Waschen der Membran für 20 min mit Blockierlösung wurde für eine Stunde mit dem mit alkalischer Phosphatase konjugierten, zweiten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnung 1:1000 in Verdünnungspuffer). Durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 30 min in Blockierlösung konnte der überschüssige Anteil des zweiten Antikörpers entfernt werden. Anschließend wurde zweimal für 5 min in 1x Assaypuffer geschwenkt. Zur Ermittlung der immunodetektierten Proteine wurde die Membran für 5 min in CSPD-Substratlösung behandelt. Durch die am zweiten Antikörper gebundene, alkalische Phosphatase wird das CSPD-Substrat unter Bildung eines Licht emittierenden Dioxethananion dephosphoryliert. Die Lichtemission wurde durch Exposition eines Röntgenfilms für 5 sec bis 10 min detektiert.

Blockierlösung

1x PBS, 0,2 % I-Block (Casein), 0,1 % Tween 20

Waschpuffer

1x PBS, 0,1 % Tween 20

Verdünnungspuffer

Blockierlösung:Waschpuffer (1:1)

10 x Assaypuffer

200 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9,8, mit Wasser verdünnen

CSPD-Substratlösung

Nitro-Block in 0,25 mM CSPD-Lösung

4.3.4.3 Entfernung der Antikörper von Western-Blot-Membranen (Stripping)

Zur Detektion von Proteinen auf bereits mit Antikörpern behandelten Membranen konnten diese nach drei unterschiedlichen Methoden, der NaOH-, der SDS- und der SDS/ β -Mercaptoethanol-Methode, entfernt werden. Anschließend wurde die Membran nach dem ECL- oder dem Tropix-Protokoll blockiert oder konnte bei +4 °C gelagert werden.

4.3.4.3.1 NaOH-Methode

Nachdem die Membran über Nacht mit einer 1x TBS/T-Lösung und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen wurde, erfolgte die Behandlung für 5 min mit 0,2 molarer Natriumhydroxid-Lösung bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit Wasser und einer 1x TBS/T-Lösung wurde die Membran der Immunodetektion zugeführt.

4.3.4.3.2 SDS-Methode

Bei dieser Methode wurde die Membran mit der SDS-haltigen Stripping-Lösung 1 für zehn Minuten gekocht und anschließend mit einer 1x PBS-Lösung gewaschen.

Stripping-Lösung 1

62,5 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, pH 6,7

4.3.4.3.3 SDS/ β -Mercaptoethanol-Methode

Zur Entfernung der Antikörper wurde die Membran unter Schütteln für 30 min bei 50 °C mit der Stripping-Lösung 2 behandelt. Nach zweimaligen Waschen der Membran für 15 min mit einer 1x PBS-Lösung konnte mit der Immunodetektion fortgefahren werden.

Stripping-Lösung 2

62,5 mM Tris/HCl, 0,2 % SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol, pH 6,7

4.3.5 Proteinisolierung unter denaturierenden Bedingungen aus 3T3-L1- und MEF-Zellen

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen zunächst zweimal mit 5 ml je 10 cm Zellkulturschale mit einer bei +4 °C gelagerten 1x TBS-Lösung gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung wurden die Zellen in 400µl Lysepuffer aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 sec gemischt. Zur Vervollständigung der Lyse wurde für 3 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nachdem das Lysat auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wurde es für 15 min mit 1 µl Benzonase je 10 cm Schale inkubiert. Die Trennung der Proteine von Zellrückständen erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 min. Das Zellysate wurde bei -80°C zur weiteren Analyse aufbewahrt.

50x Complete

1 Tablette in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen, bei – 20 °C lagern

Lysepuffer

50 mM Tris/HCl, 10% Glycerin, 2,5 % SDS, 10 mM DTE, 10 mM β-Glycerophosphat, 10 mM NaF, 0,1 mM Natriumorthovanadat, pH 6,8, bei – 20 °C lagern
1mM PMSF und 1x Complete vor Verwendung frisch zusetzen

4.3.6 Proteinisolierung unter nativen Bedingungen aus HEK 293-Zellen

Zur Gewinnung der zytosolischen Proteine wurden die HEK 293-Zellen einmal mit 5 ml einer 1x PBS-Lösung je 10cm Kulturschale gewaschen und die Zellen anschließend in 300 µl Homogenisierungspuffer je 3 Schalen aufgenommen. Nach dem Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung (10 Pulse, periodisch 40 %, 50 % Leistung) wurden die zytosolischen Proteine durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 x g und 4 °C von anderen Zellbestandteilen separiert. Aus dem proteinhaltigen Überstand wurden 2 µl für die Proteinbestimmung (Kap. 4.3.1.3) verwendet. Anschließend konnte der LOX-Aktivitätstest (Kap. 4.3.9 und Kap. 4.3.10) und die Western-Blot-Analyse (Kap. 4.3.3) durchgeführt werden.

Homogenisierungspuffer

50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4
10 µl Leupeptin (Konz.: 5 µg/µl) je ml Puffer frisch zugeben

4.3.7 Proteinexpression in M15[pREP4]-Bakterien

Zur kontrollierten Proteinexpression wurden die Lipoxygenase cDNA in den pQE-Vektor kloniert (Kap. 3.6) und in dem E. coli-Stamm M15[pREP4] exprimiert. Die Regulation erfolgt im Wirtstamm durch eine konstitutive Expression des lac-Repressorproteins über das low-copy Plasmid pREP4. Entsprechend besitzt der pQE-Vektor ein Promotor-Operator Element bestehend aus dem T5 Promotor und zwei lac-Operator-Sequenzen, die eine erhöhte Bindung des gebildeten lac-Repressorproteins und damit eine effiziente Repression des T5 Promotors ermöglichen. Zusätzlich vermittelt das β -Lactamase-Gen in dem pQE-Vektor eine Carbenicillinresistenz. Die Induktion der Expression der entsprechenden Lipoxygenase erfolgt durch Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactose), das spezifisch an das lac-Repressorprotein bindet und diese inaktiviert.

Zur effektiven Proteinreinigung (Kap. 4.3.8) besitzt der pQE-Vektor sechs Histidin-Einheiten, die als Polylinker am N-Terminus der für die Lipoxygenasen kodierenden Sequenz kloniert wurden.

Die Kultivierung der LOX-transformierten M15-Bakterien erfolgte zunächst als 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37 °C unter den entsprechenden Selektionsbedingungen. Diese Übernachtskultur wurde anschließend in einer Verdünnung von 1 zu 80 im entsprechenden Selektions-Flüssigmedium verdünnt und bis zur einer optischen Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert, die dem Wachstumsoptimum entspricht. Zur Induktion der Proteinexpression wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM (aus einer 1 M Stocklösung) zugegeben und die Bakterienkultur zwei Stunden unter Schütteln bei 37 °C wachsen gelassen. Zur Proteingewinnung (Kap. 4.3.8) wurden die Bakterien für 10 min bei 4 °C und 6000 x g (5700 rpm, Zentrifuge Beckman J2-21, Rotor JLA-10.500) geerntet.

LB-Medium

10 g/l Pepton 140, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl in H₂O, autoklavieren
oder entsprechend 25 g/l Luria Broth Base in H₂O, autoklavieren

Zusätze zum Selektionsmedium

25 mg/l Kanamycin, 100 mg/l Carbenicillin

IPTG-Stocklösung

1 M IPTG in Wasser gelöst, steril filtrieren (Filter: 0,2 μ m), Lagerung bei -20°C

4.3.8 Reinigung von Proteinen aus Bakterienzellen

Zur effektiven Proteinreinigung liegt am N-Terminus der in den M15-Bakterien exprimierten Lipoxygenasen als Polylinker sechs Histidin-Einheiten. Aufgrund deren Affinität an Nickel-NTA (Nitrilotriessigsäure)-Agarose konnten die LOX-Proteine unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch aufgereinigt werden, wobei mit einer aufsteigenden Imidazolkonzentration als Verdrängungsreagenz gearbeitet wurde.

Das aus einer 400 ml Flüssigkultur gewonnene Bakteriensediment wurde in 200 ml 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung resuspendiert und anschließend durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 6000 x g und 4 °C in der Beckman J2-21 Zentrifuge (Rotor JLA-10.500) geerntet. Zur Homogenisierung wurde das Bakterienpellet in dem fünffachen Volumen Lysepuffer resuspendiert und unter dauerhaften Eiskühlung 5 min im Ultraschall behandelt (periodisch 40 %, 100 % Leistung). Als Kontrolle der Gesamtproteinmenge erfolgte eine Probenentnahme aus dem Homogenat. Nach der 11000 x g-Zentrifugation für 20 min bei 4 °C (4000 rpm, Rotor: 70,1 Tsi 1) und 90-minütigem Rotieren bei 100000 x g in der Beckman-Ultrazentrifuge (37000 rpm) wurden erneut Proteinkontrollen entnommen. Der 100000 x g-Überstand wurde zur weiteren Proteinreinigung über die Nickel-NTA-Säule verwendet. Zur Entfernung möglicher Bakterienrückstände wurde der Überstand über einen zweifachen Filter (0,45 µm) gereinigt. Die Proteinreinigung vorbereitend wurde 1/5 des Bakteriengewichtes an Ni-NTA-Agarose zweimal mit 5 ml Wasser und einmal mit 5 ml Lysepuffer gewaschen. Das Filtrat wurde anschließend zur Proteinbindung an die Agarose bei 4 °C für eine Stunde in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Applizieren der inkubierten Agarose in eine Säule wurde der Durchlauf zur Proteinkontrolle gesammelt und die Säule mit einem 10-fachen Agarosevolumen des Waschpuffers gewaschen, wobei 1,5 ml Fraktionen aufgefangen wurden. Das Eluieren der LOX-Proteine erfolgte durch 5-faches Aufgeben von 500 µl Elutionspuffer auf die Säule. Die Proben wurden zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Lysepuffer

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0, bei 4 °C lagern

Waschpuffer

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerin, pH 8,0, bei 4 °C lagern

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 10 % Glycerin, pH 8,0, bei 4 °C lagern

4.3.9 Bestimmung der LOX-Aktivität

Zur LOX-Aktivitätsbestimmung zytosolisches Protein Arachidonsäure, Linolsäure oder den jeweiligen Methylestern inkubiert. Das Verhältnis der eingesetzten, zytosolischen Protein- zur entstandenen Produktmenge ergibt die Höhe der Aktivität. Die Quantifizierung der entsprechenden Produkte erfolgte mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Im Aktivitätstest wurde 50 –1000 µg der zytosolischen Gesamtproteinmenge in 250 µl LOX-Inkubationspuffer gelöst und mit 5 µl 5 mM Substrat (Endkonzentration: 100µM) für 12 min bei 37 °C inkubiert. Für die optimale Sauerstoffzufuhr wurden die Reaktionsgefäße während der gesamten Inkubationszeit geschüttelt. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Ansäuern der Reaktionslösung mit 40 µl 1 M Natriumformiat von pH 3,1. Zur Reduktion der entstandenen Hydroperoxide zu den korrespondierenden, hydroxylierten Produkten wurde der Ansatz nach Zugabe von 20 µl Trimethylphosphit für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführen der Reaktionslösung wurde die Reaktionsgefäße mit 250 µl LOX-Inkubationspuffer und zweimal mit 1 ml Ethylacetat f. Chr. nachgespült. Die Extraktion der Produkte erfolgte durch 10 sekündiges Mischen der entstandenen Suspension mit anschließendem Zentrifugation für fünf Minuten bei 4000 x g und 4 °C in einer Beckman-Untertischzentrifuge. Die obere, organische Produktphase wurde abgenommen und die untere Phase in analoger Weise erneut mit 2 ml Ethylacetat f. Chr. extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden in der Speedvac unter Vakuum zur Trockene eingengt und zur weiteren Analyse (Kap. 4.3.12) in dem jeweiligen HPLC-Laufpuffer aufgenommen.

Substrat

Fettsäuren und ihre –methylester in Ethanol f. Chr. gelöst, bei –20 °C lagern

LOX-Inkubationspuffer

50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4

10 µg/ml Leupeptin (frisch zugesetzt)

Stoppuffer

1 M Natriumformiat mit Ameisensäure auf pH 3,1 eingestellt

4.3.10 Bestimmung der e-LOX-3-Aktivität

Die e-LOX-3 weist im Gegensatz zu den anderen, bekannten Lipoxygenasen eine besondere Substratspezifität auf. Als Edukte werden die Zwischenprodukte der Lipoxygenasen, die 12- und 15-Hydroperoxyeicosatriensäure (12- und 15-HPETE), verwendet. Aufgrund der Säurelabilität der Substrate und der entstehenden Produkte, der Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (Hydroxy-ETrEn), wurde ein alternativer Aktivitätstest durchgeführt, der auf den Schritt des Reaktionsstopps durch Ansäuern verzichtet.

Zur Vorbereitung des Aktivitätstests wurde 42 µl Substrates 12- oder 15-HPETE in einem 2 ml Reaktionsgefäß im Vakuum zur Trockene einrotiert und in 5 µl Ethanol f. Chr. aufgenommen. Zum Testen der e-LOX-3-Aktivität wurde 250 µg Gesamtprotein (in 250 µl LOX-Inkubationspuffer gelöst) zugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration des Substrats betrug dabei 50 µM. Zur erforderlichen Sauerstoffzufuhr wurden die Reaktionsgefäße während der gesamten Inkubationszeit geschüttelt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Methanol f. Chr. (= 2,5 vol). Nach Überführen des Reaktionsansatzes in ein Duran-Zentrifugenglas wurden die Lipide durch Zugabe von 1,5 ml Dichlormethan und 1 ml Wasser f. Chr. mit anschließendem Vermischen für 30 sec extrahiert. Zur Trennung der Phasen wurde für 5 min bei 2700 xg und 4 °C in der Beckman-Untertischzentrifuge zentrifugiert und die untere, lipidhaltige Phase entnommen. Diese organische Phase wurde in der Speedvac unter Vakuum zur Trockene eingeengt und zur weiteren Analyse (Kap. 4.3.12) in dem jeweiligen HPLC-Laufpuffer aufgenommen.

Substrat

12(R,S)-HPETE oder 15(S)-HPETE in Ethanol f. Chr. gelöst, bei -80 °C lagern

LOX-Inkubationspuffer

50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,4

10 µg/ml Leupeptin (frisch zugesetzt)

4.3.11 Lipid-Analytik

Eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden existieren zur Gewinnung von Lipiden, wie den Di- und Triglyceriden, den Phospholipiden und den freien Fettsäuren. Diese Lipidanalytik setzt den Fokus auf die Extraktion der freien Fettsäuren als Produkte des Lipoxygenaseweges, ihre Trennung und Charakterisierung.

4.3.11.1 Extraktion von Gesamtlipiden

Der Gewinnung von Gesamtlipidextrakten aus Gewebematerial dient die modifizierte Methode von Bligh&Dyer mit variablen Verhältnis der Lösungsmittel Methanol und Dichlormethan.

Für die Lipidextraktion war eine Menge von 100-300 mg Gewebe ausreichend. Die Proben wurden unter Stickstoffkühlung im Dismembrator für 30 sec bei 2500 rpm zerkleinert. Nach Aufnehmen des pulverisierten Gewebes in 1ml Methanol wurde unter zur Hilfenahme des Douncer für eine und für weitere zwei Minuten nach Zugabe von 2 ml Dichlormethan homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Duran-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C und 1500 x g in der Beckman-Untertischzentrifuge zentrifugiert. Der lipidhaltige Überstand wurde abgenommen und das Sediment für drei Minuten mit 3 ml Methanol:Chloroform (2:1) und jeweils zwei Minuten mit 2 ml Chloroform und mit 1 ml Methanol extrahiert. Zwischen jedem Extraktionsschritt wurde zum vollständigen Separieren der Geweberückstände von der organischen Phase für 10 min bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Die vereinigten, organischen Überstände wurden 30 sec mit ¼ ihres Volumens mit 0,88 %iger Kaliumchloridlösung ausgeschüttelt. Nach der dreißigminütiger Zentrifugation bei 4°C und 1500 x g wurde die lipidhaltige, organische Phase abgenommen und unter Vakuum in der Speedvac zur Trockene eingeeengt. Die Lagerung der Extrakte für die weitere Analyse erfolgte bei -80 °C

4.3.11.2 Festphasenextraktion nach Powell

Diese chromatographische Methode nach Powell [1982] erlaubt mit Hilfe von Octadecyl-Silica-Säulen eine Trennung freier Fettsäuren von komplexeren Lipiden und Salzen.

Die getrockneten Lipidextrakte wurden in 750 µl Ethanol aufgenommen und mit 4,25 ml 0,1 molarer Natriumformiatlösung von pH 3,1 versetzt. Die Extraktapplikation vorbereitend wurden die Octadecyl-Säulchen mit Hilfe von Unterdruck bei einem Fluß von etwa 1 ml/min mit 5 ml Ethylacetat gewaschen und mit jeweils 5 ml Ethanol und Wasser äquilibriert.

Nach Probenaufgabe wurden die Säulen mit 5 ml 15 % Ethanol und 5 ml Wasser bei konstantem Fluß gewaschen. Vor dem Wechsel der Polarität der Laufmittel wurde für 30 sec Unterdruck angelegt und anschließend 5 ml n-Hexan appliziert. Die Elution der freien Fettsäuren erfolgte mit 5 ml Ethylacetat.

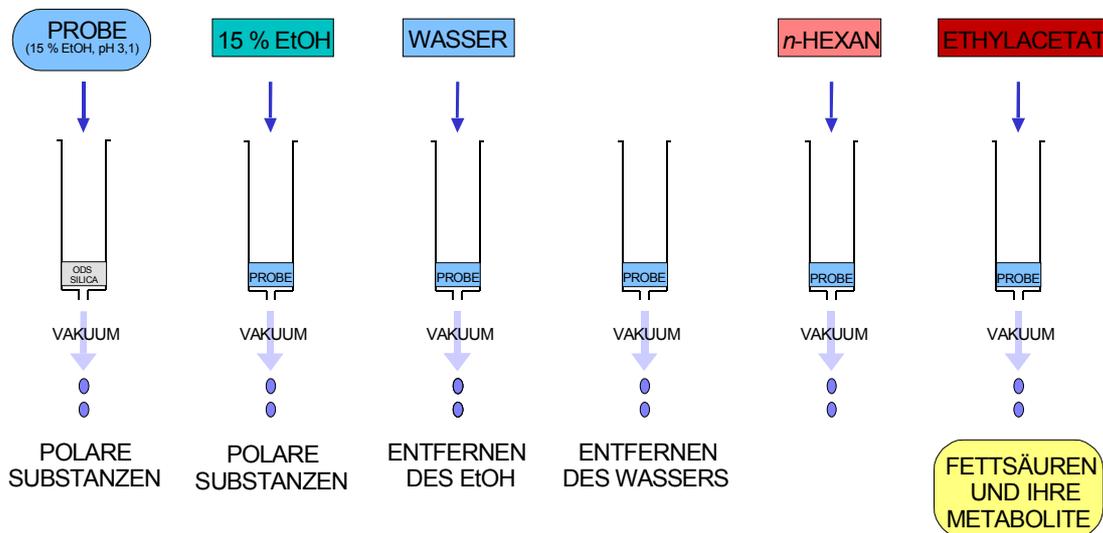


Abb. 8 Schematischer Ablauf der Extraktion freier Fettsäuren nach Powell

Für die weitere Analyse wurden die Extrakte im Vakuum in der Speedvac zur Trockene eingengt und danach in dem entsprechenden HPLC-Laufmittel aufgenommen (Kap. 4.3.12).

4.3.11.3 Lipidextraktion aus Zellkulturmedium

Zur Extraktion von Lipiden wurde das Medium aus den Differenzierungstests der 3T3-L1- und MEF-Zelllinien (Kap. 4.4.4) mit 0,1 molarer Natriumformiatlösung von pH 3,1 angesäuert. Nach zweimaliger Extraktion des Mediums mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat wurde jeweils für 10 min bei 4 °C und 2700 x g in der Beckman-Untertischzentrifuge zentrifugiert. Die lipidhaltige, organische Phase wurde gesammelt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockene eingengt. Zur weiteren Analyse wurde der Extrakt in 25 µl RP-HPLC Laufmittel aufgenommen (Kap. 4.3.12).

4.3.12 HPLC-Technik

Als Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bezeichnet, kann durch Variieren der stationäre Phase in den Säulen und der Laufmittel eine Vielzahl unterschiedlicher Proben, auch in kleinen Mengen, in relativ kurzer Zeit analysiert werden.

Die chromatographische Trennung der Lipidextrakte (Kap. 4.3.11) wurde in der HPLC-Anlage der Firma Kontron mit dem Online-Datenerfassungssystem KromaSystem 2000 durchgeführt. Als chromatographische Trennsysteme standen die Reversed- (RP-HPLC), die Straight- (SP-HPLC) und die Chiral-Phase (CP-HPLC) für die Analyse zur Verfügung (Tab. 6).

<i>HPLC-Trennsystem</i>	<i>Säulenart</i>	<i>Laufmittelsystem</i>	<i>Laufzeit [min]</i>	<i>Fluß [ml/min]</i>
<i>RP-HPLC 1</i>	YMC-Pack ODS-AM (C18 endcapped)	MeOH : H ₂ O : AcOH		
		86 : 14 : 0,01	35	0,5
		90 : 10 : 0,01	25	
		86 : 14 : 0,01	30	
<i>RP-HPLC 2</i>	YMC-Pack ODS-AM (C18 endcapped)	MeOH : H ₂ O : AcOH		
		82 : 18 : 0,01	40	0,5
		90 : 10 : 0,01	25	
		82 : 18 : 0,01	25	
<i>SP-HPLC</i>	Zorbax Sil	n-Hexan:iPr:AcOH:H ₂ O		
		98 : 2 : 0,1 : 0,025	35-55	1,0
<i>CP-HPLC 1</i>	Chiracell OB	n-Hexan : iPr : AcOH		
		99 : 1 : 0,05	35-60	0,5
<i>CP-HPLC 2</i>	Chiracell OB	n-Hexan : iPr : AcOH		
		97,5 : 2,5 : 0,05	35-60	0,5

Tab. 6 HPLC-Trennsysteme: RP-, SP- und CP-HPLC und ihre Laufbedingungen

Zur Probenaufgabe wurden die getrockneten Lipidextrakte zuerst der RP-HPLC zur Analyse zugeführt, anschließend konnten die Produktfraktionen weiter in der SP-HPLC chromatographisch aufgetrennt werden. Die Bestimmung der Produktchiralität fand in der CP-HPLC statt. Die Identifikation und Quantifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeit (Tab. 7) und des Integrals über den Peak mit denen parallel chromatographierter, authentischer Standards. Zusätzlich wurden neue Lipoxygenaseprodukte durch massenspektrometrische Analyse (Kap. 4.3.13) charakterisiert.

Tab. 7 Retentionszeiten der LOX-Standards in den einzelnen HPLC-Trennsystemen

<i>HPLC-Trennsystem</i>	<i>LOX-Produktstandard</i>	<i>Retentionszeit</i>	<i>Druck [mbar]</i>
<i>RP-HPLC 1</i>	13-HODE	16,2	80
	9-HODE	16,5	
	15-HETE	17,7	
	12-HETE	19,8	
	8-HETE	20,2	
	5-HETE	23,3	
<i>RP-HPLC 2</i>	8-Hydroxy-11,12-epoxy-EET	16,5	90
	10-Hydroxy-11,12-epoxy-EET	17,1	
	13-Hydroxy-14,15-epoxy-EET	18,5	
	13-HODE	16,3	
	9-HODE	16,6	
	15-HETE	17,9	
	12-HETE	19,7	
	8-HETE	20,3	
	5-HETE	23,1	
<i>SP-HPLC</i>	12-HETE	10,6	45
	15-HETE	12,8	
	13-HODE	16,4	
	9-HODE	25,9	
	8-HETE	27,4	
	5-HETE	48,0	
<i>CP-HPLC 1</i>	15S-HETE	28	15
	15R-HETE	35	
	13S-HODE	40	
	13R-HODE	52	
	12R-HETE	21	
	12S-HETE	26	
<i>CP-HPLC 2</i>	5R-HETE	23	15
	5S-HETE	51	
	12R-HETE	13	
	12S-HETE	16	
	8S-HETE	22	
	8R-HETE	28	
	13S-HODE	18	
	13R-HODE	22	
	9S-HODE	29	
	9R-HODE	48	

4.3.13 ESI-Tadem-Massenspektrometrie

Die Elektrosprayionisations-Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht die Analyse der HPLC-chromatographisch getrennten Substanzen nach der erwarteten Molekülmasse. Dazu wurden die getrockneten Lipide in einer Endkonzentration von 1 µg/µl in Ethanol gelöst. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in dem Tripel-Quadropol-ESI-MS-MS (TSQ 7000, Thermoquest, San Jose, CA) mit nanoESI-Quelle (EMBL, Heidelberg) bei einer Sprühspannung von 400 – 700 V. Als Kollisionsgas wurde Argon bei einem Druck von 2mTorr verwendet. Nach Aufnahme eines Gesamtionenspektrums über den Massenbereich von 20 bis 1000 konnte das Ion der erwarteten Molekülmasse isoliert und dessen Fragmentationenspektrum gemessen werden.

Die Substanzklasse der Hydroxyfettsäuren weist entsprechend ihrer möglichen Bruchstellen charakteristische Fragmentationen auf. Beschrieben wurden die Decarboxylierung (m/z 44), die Wasserabspaltung (m/z 18) und Fragmentationen, die aus der Spaltung in α -Stellung zur Hydroxylgruppe entstanden sind [Wheelan et al., 1993; Nakamura et al., 1997].

4.4 Zellkultur-Techniken

4.4.1 Allgemeines

4.4.1.1 Kultivierungsbedingungen

4.4.1.1.1 Medium für die HEK 293-Zelllinie

4 x EMEM-Medium (BioWhittaker)
2 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin
100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin

4.4.1.1.2 Medium für die 3T3-L1-Zelllinie

für die Selektion:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
10 % Rinderserum
62,5 mg/ml Penicillin
100 mg/ml Streptomycin
2 µg/ml Puromycin (Sigma)

für die Differenzierung:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
10 % fötales Kälberserum (FKS)
62,5 mg/ml Penicillin
100 mg/ml Streptomycin
1 mM Dexamethason (Sigma)
1 mg/ml Insulin (Novo Nordisk A/S)
0,5 mM Methylisobutylxanthin MIX (Sigma)

4.4.1.1.3 Medium für die primären MEF-Zellen

für die Selektion:

AmnioMax basal medium (Life Technologies, Inc.)

7,5 % Rinderserum

7,5 % AmnioMax-C100 supplement

2 mM L-Glutamin

62,5 mg/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

2 µg/ml Puromycin (Sigma)

für die Differenzierung:

AmnioMax basal medium (Life Technologies, Inc.)

7,5 % fötales Kälberserum (FKS)

7,5 % AmnioMax-C100 supplement

2 mM L-Glutamin

62,5 mg/ml Penicillin

100 mg/ml Streptomycin

1 µM Dexamethason (Sigma)

5 µg/ml Insulin (Novo Nordisk A/S)

0,5 mM Methylisobutylxanthin MIX (Sigma)

Die HEK 293-Zelllinie wurde in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid bei 37 °C kultiviert, währenddessen die 3T3-L1-Zellen zum Wachstum eine 10 %ige CO₂-Konzentration benötigen. Die Kultivierung der primären MEF-Zellen erfolgte bei 37 °C und einem 5 %igen CO₂-Gehalt.

4.4.1.2 **Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer**

Die Zählung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop in der Neubauerzählkammer, die in 16 Quadrate unterteilt ist, wobei jedes Quadrat einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Nach Bildung des Mittelwertes der Zellzählung aus vier Quadraten multipliziert mit dem Faktor 10⁴ kann die Zellanzahl pro Milliliter angegeben werden. Entsprechende Verdünnungen durch Färbelösungen müssen berücksichtigt werden [Lindl et al., 1987].

4.4.1.3 Passagieren von HEK 293-Zellen

Zur Stammerhaltung oder für Versuchszwecke wurden die Zellen nach Erreichen einer Monolayerschicht passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit zweimal mit 1x PBS-Lösung gewaschen und mit einer Trypsinlösung (2,5 ml pro 100er Zellkulturflasche) für 5 min bei 37 °C und einer fünfprozentigen CO₂-Konzentration im Brutschrank inkubiert. Nachdem die abgelösten Zellen in 4 ml Kulturmedium aufgenommen wurden, konnte die Zellzahl mittels der Neubauerzählkammer bestimmt werden. Die gewünschte Zellzahl wurde in Zellkulturflaschen oder –schalen überführt, die frisches, 37 °C warmes Zellkulturmedium enthielten. Zur Kultivierung wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert.

4.4.1.4 Passagieren von 3T3-L1- und MEF-Zellen

Für die Stammerhaltung und für die Selektion wurden beide Zelltypen bis zu einer maximalen Konfluenz von 50 % kultiviert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel erfolgte, und anschließend passagiert. Nach Entfernen des Nährmediums wurden die Zellen dazu einmal mit 1x PBS-Lösung gewaschen und mit einer Trypsinlösung behandelt. Die Trypsinierung erfolgte für 2 min bei 37 °C und dem Zellen entsprechenden CO₂-Gehalt. Das vollständige Lösen der Zellen wurde durch Klopfen der Schalen erreicht. Nach Aufnehmen der Zellen im frischen, 37 °C warmen Zellkulturmedium wurden die Zellen mit einer zehnpromzentigen Konfluenz ausgesät. Dagegen wurden die Zellen für den Differenzierungstest (Kap. ?) bis zur Bildung einer Monolayerschicht kultiviert.

Die primären MEF-Zellen wurden bis zur maximal zehnten Passage verwendet und anschließend für die Zellkultur neue, kryokonservierte Zellen aufgetaut (Kap. 4.4.1.5).

1x PBS-Lösung

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,2

Trypsinlösung:

0,125% Trypsin, 0,05% EDTA in 1x PBS-Lösung

4.4.1.5 Erhaltung der Stamm-/Zellkultur

Aufgrund ihrer normalerweise endlichen Lebensdauer sollten Zellkulturen zu ihrer Erhaltung in einer möglichst niedrigen Passagennummer in flüssigem Stickstoff bei -196 °C konserviert werden. Zum Einfrieren wurde als Konservierungsmedium das Wachstumsmedium mit 10 % DMSO als Gefrierschutz verwendet und die Zellzahl auf $2-8 \times 10^6$ Zellen pro ml Konservierungsmedium eingestellt. Aliquots von jeweils 1-1,8 ml wurden in Kryogefäße aufgeteilt und für zwei Stunden bei 4 °C gelagert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Schritten von einem Grad pro Minute. Ein Zellvitalitätstest wurde nach 2-4 Tagen durchgeführt. Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C . Vor der Reaktivierung wurde das DMSO durch Zentrifugieren der Zellen bei $1000 \times g$ für 10 min bei Raumtemperatur entfernt, das Zellsediment in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium überführt und im Brutschrank unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Erfolgreiche Reaktivierung zeigte sich durch Konfluenz der Zellen innerhalb von 3-7 Tagen.

4.4.2 Transfektion der HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA

4.4.2.1 Calciumphosphat-Methode

Beruhend auf der Calciumphosphat-Methode von Chen und Okayama [1988] konnte mit dem Mammalian Transfection Kit des Herstellers Stratagene HEK 293-Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert werden. Das Einbringen der dabei gebildeten DNA-Calciumphosphatpräzipitate erfolgte durch Endozytose der Zelle. Zur Bildung der DNA-Calciumphosphatpräzipitate wurde $10\text{ }\mu\text{g}$ der zu transfizierenden Plasmid-DNA in einem Volumen von $215\text{ }\mu\text{l}$ H_2O vorgelegt, mit $25\text{ }\mu\text{l}$ der S 1-Lösung und $250\text{ }\mu\text{l}$ der S 2-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Für die Transfektion wurden $1,4 \times 10^6$ HEK 293-Zellen pro 100 mm Kulturschale ausgesät und bei 37 °C und 5 %igem CO_2 -Gehalt bis zur Subkonfluenz (24 Stunden) inkubiert. Nach einmaligen Waschen der Zellen mit 1x PBS-Lösung wurde 5 ml 37 °C -warmes Kultivierungsmedium zugesetzt und die Transfektionslösung tropfenweise unter Schwenken der Kulturschale zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation der HEK 293-Zellen bei 37 °C und einer fünfprozentigen CO_2 -Konzentration im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen einmal mit 5 ml 1x PBS-Lösung gewaschen und 10 ml frisches Kultivierungsmedium zugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank. Für die Transfektionskontrolle wurde der Plasmidvektor pcDNA3- β -Gal (Kap. 3.6) verwendet.

S 1-Lösung

2,5 M CaCl₂

S 2-Lösung

50 mM N, N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan-sulfonsäure, 280 mM NaCl,

1,5 mM NaH₂PO₄, pH 6,95

4.4.2.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz in HEK 293-Zellen

Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte durch parallele Transfektion eines β -Galactosidase-Expressionsplasmids, dessen Aktivität in den transfizierten Zellen durch Anfärben nachgewiesen wurde. Zellen, die dieses pcDNA3- β -Gal Plasmid aufnehmen, können aufgrund der β -Galactosidase-Expression das applizierte X-Gal zu D-Galactose und 5-Brom-4-chlor-indol umsetzen. Bei Zugabe einer Mischung auf Ferri- und Ferrocyaniden wird aus dem Indol durch Oxidation das Indoxyl gebildet, das durch Selbstkopplung ein blaues, in der Zelle präzipitierendes Indigoderivat bildet [Pearson et al., 1963; Marks, 1976]. Zur Applikation der Färbelösung wurden die mit pcDNA3- β -Gal transfizierten Zellen nach einer Transfektionszeit von 48 Stunden mit 5 ml 1x-PBS-Lösung gewaschen und mit 10 ml Ethanol für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Die frisch vorbereitete Färbelösung für eine 60 mm Kulturschale besteht aus 3 ml 1x PBS-Lösung, 15 μ l X-Gal (20 mg/ml DHF), 30 μ l einer 0,5 M K₄[Fe(CN)₆]-Lösung, 30 μ l einer 0,5 M K₃[Fe(CN)₆]-Lösung und 6 μ l einer 1 M MgCl₂-Lösung. Nach Waschen der fixierten Zellen mit 5 ml 1x PBS-Lösung wurde die Färbelösung zugegeben und für 1-4 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂-Konzentration inkubiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz über die Zellzahl erfolgte unter dem Mikroskop.

X-Gal-Stammlösung:

2 % (w/v) in Dimethylformamid, lichtgeschützt bei – 20 °C lagern

K₃[Fe(CN)₆]-Lösung

500 mM K₃[Fe(CN)₆], lichtgeschützt bei + 4 °C lagern

K₄[Fe(CN)₆]-Lösung

500 mM K₄[Fe(CN)₆] · 3 H₂O, lichtgeschützt bei + 4 °C lagern

MgCl₂-Lösung

1 M MgCl₂ · 6 H₂O, bei + 4 °C lagern

4.4.3 Transduktion der Zellen mit retroviralen Vektor

Die MEF- und die 3T3-L1-Zellen wurden wegen ihrer geringen Transfektionseffizienz über ein retrovirales System mit dem pBabe-Vektor infiziert.

4.4.3.1 Virusproduktion

Die Virusproduktion zur Übertragung bestimmter Erbinformationen erfolgte in der Phoenix Verpackungszelllinie, die nach der Calciumphosphatmethode bei einer Konfluenz von 50 % mit speziellen Vektoren transfiziert wurde. Die Phoenix-Zellen produzieren Viren, die nicht zur Replikation befähigt sind und ausschließlich Mauszellen infizieren. Nach 48 h wird der Virenüberstand durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g geerntet und die 3T3-L1- und MEF-Zellen mit den Viren transduziert (Kap. 4.4.3.2).

4.4.3.2 Transduktion der Zellen

Zur Transduktion wurden 50 % konfluente MEF- oder 3T3-L1-Zellen verwendet und mit dem Virenüberstand, der in einem Volumen frischem Kulturmedium (DMEM, 10 % Rinderserum) verdünnt wurde, in Gegenwart von 6 µg/ml Polybren behandelt. Am folgenden Tag wurden die Zellen entsprechend ihrer weiteren Verwendung geteilt und unter Selektionsdruck mit 2 µg/ml Puromycin kultiviert. Als Negativkontrolle wurden nicht transduzierte Zellen dementsprechend mit 2 µg/ml Puromycin behandelt. Nach Tod der Kontrollzellen wurden die resistenten Zellen geerntet und für den Differenzierungstest (Kap. 4.4.4) ausgesät.

4.4.4 Differenzierungstest

Für den Differenzierungstest wurden die selektierten Zellen bis zur Konfluenz in Kulturmedium (DMEM mit Rinderserum) mit Zugabe von 2 µg/ml Puromycin kultiviert und dabei jeden zweiten Tag das Kulturmedium erneuert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde frisches Kulturmedium ohne Puromycin verwendet und die Zellen in diesem Medium für zwei weitere Tage kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung in den zwei Tage postkonfluenten Zellen (Tag 0 des Differenzierungstests) wurde Nährmedium, das fötales Kalbserum, Dexamethason, Insulin und Methylisobutylxanthin (MIX) enthält, zugegeben. Zusätzlich konnte am Tag 0 die Gabe von Arachidonsäure, Linolsäure oder dem entsprechenden Volumen DMSO als Kontrolle erfolgen. Für die Lipidanalytik wurden die Zellen und das konditionierte Medium am Tag 2 der Differenzierung gesammelt.

Zusätzlich wurden am Tag 2 zur Kontrolle der Differenzierung Zellen zur Adipogenese durch Wechsel zum insulin- und fötales Kalbserum-enthaltenden Kulturmedium (5 µg/ml für 3T3-L1 und 1µg/ml Insulin für MEF) stimuliert. Vom Tag vier bis acht wurden die Zellen im FKS-haltigen Nährmedium kultiviert und am Tag sechs das Medium erneuert. Die effektive Zelldifferenzierung wurde durch die Lipidfärbung mit Oil Red O gezeigt (Kap. 4.4.4.1).

4.4.4.1 Oil-Red-O-Färbung

Der Nachweis differenzierter, lipidhaltiger Zellen erfolgte durch die Oil-Red-O-Färbung. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer 1x PBS-Lösung gewaschen und danach für eine Stunde in 3,7 % igem Formaldehyd fixiert. Für die Lipidfärbung wurden die Zellen für eine Stunde mit der Oil-Red-O-Färbelösung behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und konnten anschließend photographiert werden.

Oil-Red-O-Färbelösung

0,3 % Oil Red O, 60 ml Isopropanol, 40 ml Wasser

vor Gebrauch über ein Papierfilter filtrieren

5 ERGEBNISSE

5.1 Vergleich der Enzymaktivitäten epidermaler und konventioneller Lipoxygenasen

Die Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Lipoxygenasen wurde mit rekombinanten Proteinen vorgenommen, die mittels zweier unterschiedlicher Expressionssysteme erhalten wurden. Zur Expression im eukaryotischen System wurde der pcDNA 3.1 Vektor verwendet, der eine starke Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors in vielen Zellarten ermöglichte. Im Gegensatz zum bakteriellen System konnten auf diese Weise posttranslationale Modifikationen der exprimierten Proteine erhalten werden. In das zweite, prokaryotische Expressionssystem wurden die Lipoxygenasen mit einem N-terminalen Histidin-Polylinker kloniert, über den nach induzierter Expression eine Aufreinigung des entstandenen, rekombinanten Proteins mit Hilfe der Affinitätschromatographie vorgenommen wurde (Kap. 4.3.8). Die Messung der Aktivität der Lipoxygenasen wurde nach Standardprotokoll (Kap. 4.3.9) durch Zugabe des Proteinextrakts zum jeweiligen Substrat in hypotonischem Puffer durchgeführt. Nach erfolgter Umsetzung wurden die Lipidprodukte der Lipoxygenasen aus der Reaktionslösung extrahiert und durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie analysiert (Kap. 4.3.12). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte aus dem Verhältnis der gebildeten Produktmenge zur eingesetzter Enzymmenge.

5.1.1 Eukaryotisches Expressionssystem

Zur Expression des rekombinanten Proteins wurden menschliche, embryonale Nierenzellen (HEK 293) mit der in den pcDNA 3.1 Vektor klonierten, für die Lipoxygenasen kodierenden Sequenz transient transfiziert (Kap. 4.4.2.1). Die Ernte der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Transfektionseffizienz wurde für jede experimentelle Serie durch β -Galaktosidase-Färbung bestimmt (Kap. 4.4.2.2). Sie betrug zwischen 30 und 40 %. Für die Enzymtests wurde ein 10.000 x g Überstand der durch Ultraschall gewonnenen Zellextrakte verwendet. Der Nachweis der rekombinanten Proteine im Überstand erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Anhand der Signalstärke konnte ein etwa vergleichbarer Anteil rekombinanter Proteine bei gleicher Transfektionseffizienz abgeschätzt werden. Gleiche Mengen rekombinanter Proteinextrakte wurden mit Substrat unter den in Kap. 4.3.9 angegebenen Reaktionsbedingungen umgesetzt und die extrahierten Lipidprodukte mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie analysiert.

Die Identifikation und Quantifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten und Signalstärken mit parallel chromatographierten, authentischen Standards. Die Produktmenge aus der nicht-enzymatischen Umsetzung der Substrate wurde parallel mit einer Vektorkontrolle analog dem Standardprotokoll (Kap. 4.3.9) bestimmt und von der Produktmenge aus der Lipoxygenaseinkubation substrahiert. Die spezifischen Aktivitäten der Lipoxygenasen sind in Tab. 8 aufgeführt.

<i>LOX</i>	<i>Substrat</i>	<i>Spezifische Aktivität [ng/μg]</i>
m p12S-LOX	Aa	64,3
m l12S-LOX	Aa	3,5
rb 15S-LOX	Aa	113,3
m e12S-LOX	LaOMe	0,004
m 8S-LOX	Aa	1,7
h 15S-LOX-2	Aa	4,5
m 12R-LOX	AaOMe	0,28
h 12R-LOX	AaOMe	0,004
	Aa/ La/	
h/m e-LOX-3	AaOMe/	n. m.
	LaOMe	

Tab. 8 Spezifische Aktivitäten ausgewählter konventioneller (blau) und epidermaler Lipoxygenasen (rot).

Expression der Proteine erfolgte nach transienter Transfektion der LOX-Plasmid-DNA in der HEK 293-Zelllinie (Kap. 4.4.2.1); Gewinnung und Bestimmung des Proteingehaltes der für den Aktivitätstest verwendeten, zytosolischen Fraktion wurde entsprechend Kap. 4.3.6 und Kap. 4.3.1.3 vorgenommen; für den Aktivitätstest wurde 250 μ g der jeweiligen zytosolischen Fraktion verwendet und mit dem im Diagramm vermerkten Substrat umgesetzt (Kap. 4.3.9)

Substrate: Arachidonsäure (Aa); Arachidonsäuremethylester (AaOMe); Linolsäure (La); Linolsäuremethylester (LaOMe); n.m. (nicht meßbar)

m = Maus, h = Mensch, rb = Kaninchen

Die konventionellen Isoformen zeigten eine wesentlich höhere Enzymaktivität als die epidermalen Lipoxygenasen. Bei Umsetzung mit Arachidonsäure als Substrat lagen die spezifischen Aktivitäten der Kaninchen 15S- und der murinen Blutplättchen-Typ 12S-LOX etwa um 30- bzw. 20-fach über den Wert der murinen Leukozyten-Typ 12S-Lipoxygenase. Mit gleichem Substrat zeigte die murine 8S-LOX im Vergleich zu ihrem orthologen Isoenzym, der menschlichen 15S-LOX-2, eine um ein Drittel niedrigere spezifische Aktivität.

Die Epidermis-Typ 12S-LOX wies zusammen mit der menschlichen und murinen 12R-LOX, die bevorzugt in der Epidermis exprimiert wird, nur eine geringe katalytische Effizienz auf.

Als weitere, epidermale Lipoxygenasen wurde die menschliche und die murine e-LOX-3 untersucht. Mit keinem der bekannten LOX-Substrate konnte mit der e-LOX-3 eine Aktivität nachgewiesen werden.

5.1.2 Prokaryontisches Expressionssystem

Die Expression und Anreicherung der gering aktiven Lipoxygenasen wurde mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems vorgenommen (Kap. 4.3.7 und Kap. 4.3.8). Dazu wurde die für die Lipoxygenasen kodierende Sequenz in den bakteriellen Vektor pQE-80L kloniert (Kap. 4.1.3), der die Expression eines Proteins mit N-terminalen Histidinpolylinker ermöglichte. Nach Transformation und Selektion erfolgte die IPTG-kontrollierte Induktion der Proteinexpression. Zur weiteren Aufreinigung der Lipoxygenasen wurden das hergestellte Bakterienhomogenat bei 100.000 x g zentrifugiert. Die im Überstand vorhandenen, mit einem Histidin-Polylinker exprimierten Proteine wurden daraufhin an die Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarose (Ni-NTA Agarose) gebunden und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Abbildung 4.3.8 zeigt schematisch die Schritte der Proteinexpression und-reinigung.

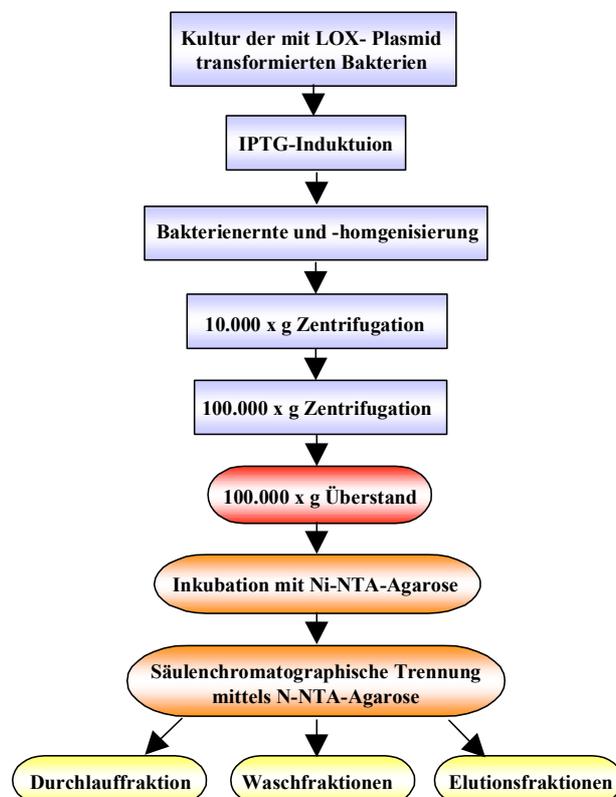


Abb. 9 Schematische Darstellung der Proteinexpression und -reinigung von epidermalen Lipoxygenasen aus Bakterien.

5.1.2.1 Expression und Aufreinigung der murinen 8S-Lipoxygenase

Zum Nachweis der Anreicherung der Lipoxygenase wurden die während der Expression und –aufreinigung entnommenen Proben einer Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung unterzogen. Abb. 10 zeigt, daß ein Protein mit einem der m 8S-Lipoxygenase vergleichbaren Molekulargewicht von ca. 76 kDa in geringer Menge bereits in den Extrakten vor der IPTG-Induktion sichtbar war (Spur 1). Größere Mengen fanden sich in den Überständen der einzelnen Extraktionsschritte (Spuren 4 und 5) und eine deutliche Anreicherung war in den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie (Spuren 9 und 10) zu sehen.

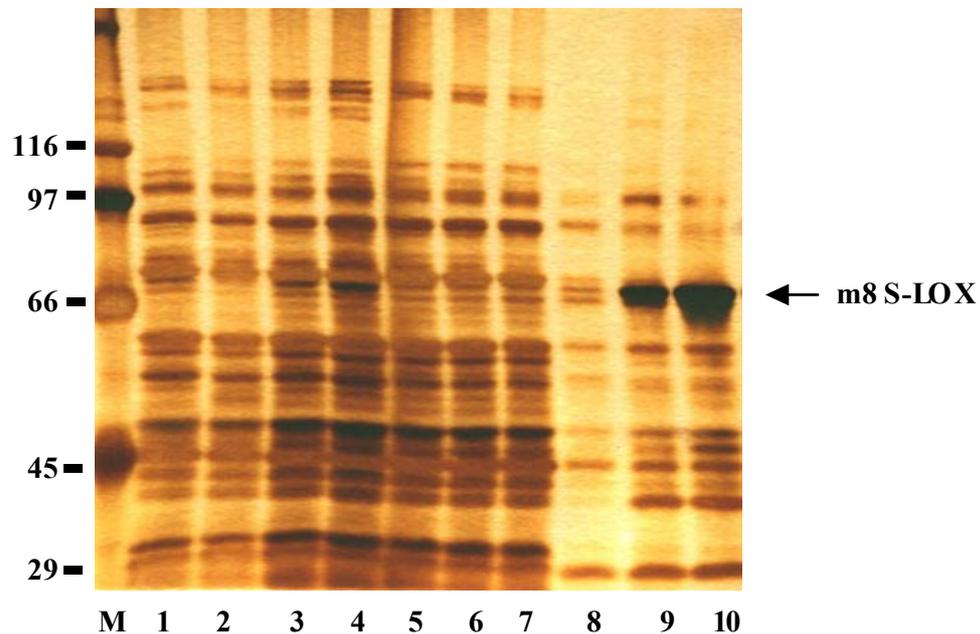


Abb. 10 Aufreinigung rekombinanter m 8S-Lipoxygenase:

Gezeigt ist ein Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Extrakten und Fraktionen der anschließenden Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kap. 4.3.8).

10 µg Gesamtprotein wurden geladen; die Gelelektrophorese und anschließende Silberfärbung erfolgte entsprechend Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.2.2

M (SDS-6H Marker; Einheit: kDA); 1 (Extrakt vor IPTG-Induktion); 2 (Extrakt nach IPTG-Induktion, 2h); 3 (Überstand nach Homogenisierung); 4 (Überstand nach 10.000 x g Zentrifugation); 5 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 6 (Durchlauf der Ni-NTA Säule); 7 (1. Waschfraktion); 8 (2. Waschfraktion); 9 (1. Elutionsfraktion); 10 (2. Elutionsfraktion)

Nach dem Nachweis der m 8S-LOX durch Immunodetektion (Kap. 4.3.4) wurden ausgewählte Fraktionen dem Aktivitätstest unterzogen. Die massenspektrometrische Charakterisierung erfolgte aus der zweiten Elutionsfraktion (Kap. 4.3.14).

5.1.2.2 Untersuchung der spezifischen Aktivität der m 8S-LOX während ihres Aufreinigungsprozesses

Zur Untersuchung der spezifischen Aktivität der m 8S-LOX wurden ausgewählte Fraktionen der Aufreinigungsprozedur dem Aktivitätstest unterzogen. Die Umsetzung erfolgte nach dem Standardprotokoll mit Arachidonsäure als Substrat unter Zugabe von 10 µg Gesamtprotein der jeweiligen Fraktion (Kap. 4.3.9).

Abb. 11 zeigt die jeweilige Aktivität der einzelnen, während der Anreicherungsprozedur entnommenen Proben. Im bakteriellen Gesamthomogenat wurde eine spezifische Aktivität von ca. 3 ng/µg gemessen. Eine etwa zehnfache Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität konnte nach Aufreinigung mittels der Affinitätschromatographie nachgewiesen werden.

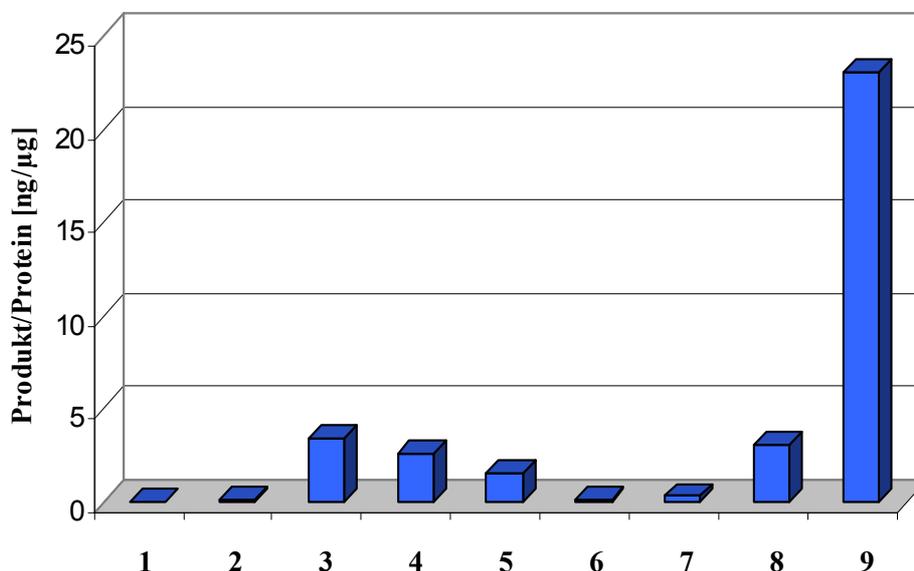


Abb. 11 Spezifische Aktivität der m 8S-LOX-Fractionen.

Für den Aktivitätstest wurde 10 µg Gesamtprotein mit Arachidonsäure als Substrat verwendet (Kap. 4.3.9); die Analyse der Produkte und ihrer Mengen erfolgte durch RP-HPLC (Kap.4.3.12)

1 (Kultur vor IPTG-Induktion); 2 (Kultur zwei Stunden nach IPTG-Induktion); 3 (Überstand nach Homogenisierung); 4 (Überstand nach 10.000 x g Zentrifugation); 5 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 6 (Durchlauf der Nickel-NTA Säule); 7 (Waschfraktion); 8 (1. Elutionsfraktion); 9 (2. Elutionsfraktion)

Das erfolgreiche Expressions- und Aufreinigungssystem unter Erhaltung der Aktivität sollte auf andere epidermale Lipoxygenasen übertragen werden. Untersucht wurden die murine e12S-, 12R- und die e-LOX-3.

5.1.2.3 Expression und Reinigung der murinen e12S-Lipoxygenase

Die murine e 12S-LOX konnte im bakteriellen Expressionssystem nur in geringem Maß als lösliches Protein isoliert werden. Der größte Teil befand sich in der unlöslichen Sedimentfraktion (Abb. 12, Spur 7). Eine Aufreinigung des löslichen Proteins über die Affinitätschromatographie war jedoch auch hier möglich. Die 1. Elutionsfraktion (Abb. 12, Spur 11) zeigte einen Anteil von ca. 30 % des Proteins mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 75 kDa.

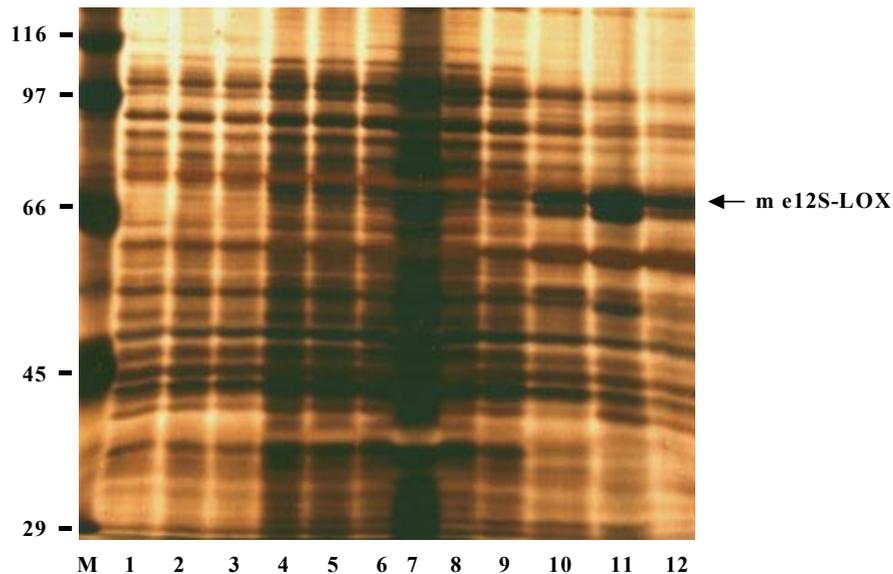


Abb. 12 Aufreinigung rekombinanter m e12S-Lipoxygenase.

Gezeigt ist ein Silber-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Extrakten und Fraktionen der anschließenden Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kap. 4.3.8).

10 µg Gesamtprotein wurden geladen; die Gelelektrophorese und anschließende Silberfärbung erfolgte entsprechend Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.2.2

M (SDS-6H Marker; Einheit: kDa); 1 (Kultur vor IPTG-Induktion); 2 (Kultur nach einstündiger IPTG-Induktion); 3 (Kultur nach zweistündiger IPTG-Induktion); 4 (Überstand nach Homogenisierung); 5 (Überstand nach 10.000 x g Zentrifugation); 6 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 7 (Sediment der 100.000 x g Zentrifugation); 8 (Durchlauf der Ni-NTA Säule); 9 (Waschfraktion); 10 (1.Elutionsfraktion); 11 (2.Elutionsfraktion); 12 (3.Elutionsfraktion)

5.1.2.4 Untersuchungen der spezifischen Aktivität der murinen e12S-LOX während der Reinigungsprozedur

Der Nachweis des rekombinanten m e12S-LOX-Proteins in Proben, die während der Anreicherungsprozedur entnommen wurden, erfolgte durch die Immunoblotanalyse (Kap. 4.3.4). Aus diesen Proben wurde eine repräsentative Auswahl getroffen und auf ihre spezifischen Aktivitäten untersucht (Kap. 4.3.9). Das Ergebnis ist in der Abb. 13 dargestellt.

Eine 12-Lipoxygenase-Aktivität konnte in den Bakterienextrakten nach IPTG-Induktion gemessen werden. In der löslichen Proteinfraction der 100.000 x g Überstände war, wie aufgrund des geringen Anteils des rekombinaten Enzyms zu erwarten, nur noch eine geringe Enzymaktivität nachweisbar. Die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie wiesen eine gering erhöhte spezifische Aktivität auf, obwohl diese Fraktionen einen deutlich höheren Anteil an rekombinaten Protein enthielt (vgl. Abb. 12).

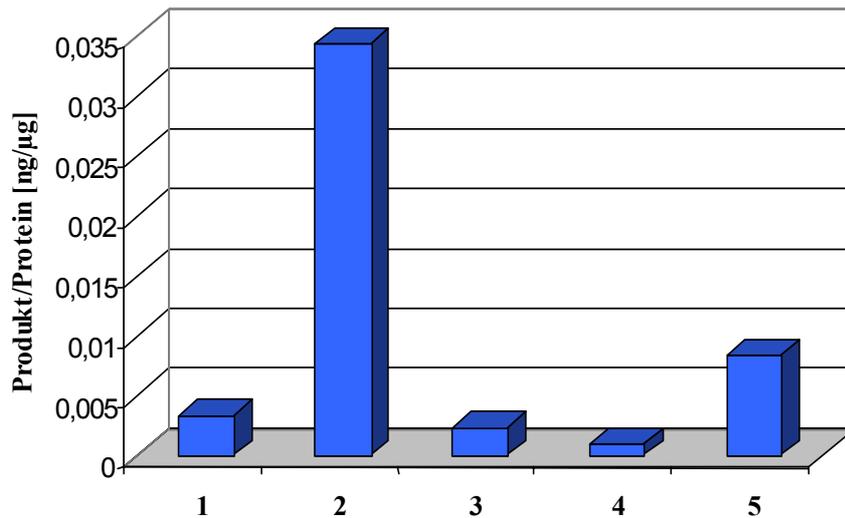


Abb. 13 Spezifische Aktivität der *m e12S-LOX*-Fraktionen.

Für den Aktivitätstest wurde 40 µg Gesamtprotein mit Linolsäuremethylester als Substrat verwendet (Kap.4.3.9); die Analyse der Produkte und ihrer Mengen erfolgte durch RP-HPLC (Kap.4.3.12)

1 (Kultur vor IPTG-Induktion); 2 (Kultur nach zweistündiger IPTG-Induktion); 3 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 4 (Waschfraktion); 5 (2. Elutionsfraktion)

Zu weiteren Untersuchung wurde die zweite Elutionsfraktion massenspektrometrisch charakterisiert (Kap. 4.3.14).

5.1.2.5 Expression und Aufreinigung der murinen 12R- und e-LOX-3

Beide epidermale Lipoxygenasen wurden gemäß dem Standardprotokoll in Bakterien exprimiert und gereinigt (Kap. 4.3.7 und Kap. 4.3.8). Abb. 14 zeigt die Coomassie-Färbung der gelelektrophoretisch getrennten Proteine der Anreicherungsschritte der murinen 12R-LOX. Ein Protein des erwarteten Molekulargewichts war nach IPTG-Induktion (Abb. 14, Spur 4) als schwache Coomassie-Bande erkennbar. Im Verlauf der Anreicherung konnte nach der 100.000 x g Zentrifugation größere Teile dieses Proteins in der unlöslichen Fraktion (Abb. 14, Spur 6) gefunden werden.

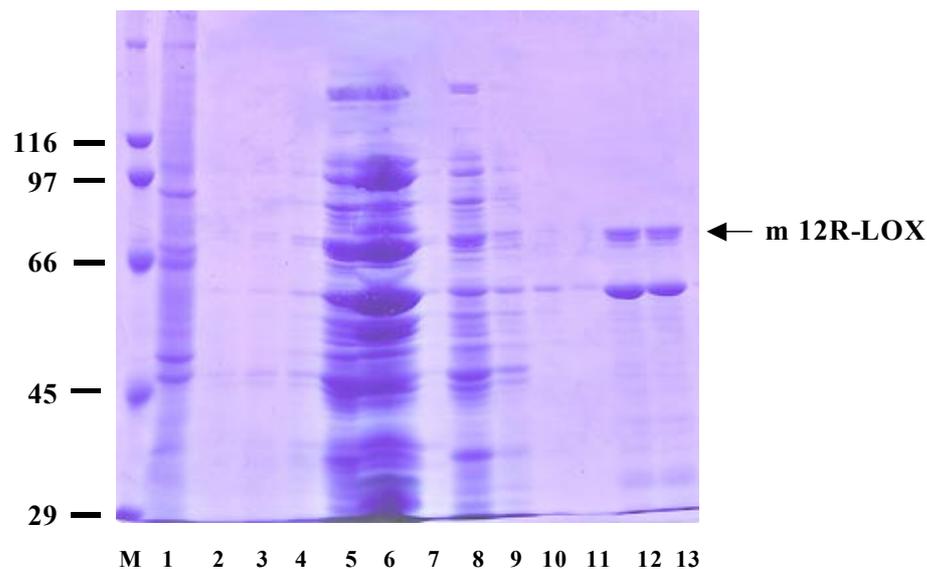


Abb. 14 Aufreinigung rekombinanter *m 12R-Lipoxygenase*.

Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Extrakten und Fraktionen der anschließenden Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kap. 4.3.8).

50 μ g Gesamtprotein wurden geladen; die Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung erfolgte entsprechend Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.2.1

M (SDS-6H Marker; Einheit: kDa): 1 (Proteinextrakt aus HEK Zellen (Positivkontrolle für Western-Blot) transient mit *m 12R-LOX* transfiziert); 2 (Kultur vor IPTG-Induktion); 3 (Kultur nach IPTG-Induktion, 1h); 4 (Kultur nach IPTG-Induktion, 2h); 5 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 6 (Sediment der 100.000 x g Zentrifugation); 7 (Durchlauf der Nickel-NTA Säule); 8 (1. Waschfraktion); 9 (2. Waschfraktion); 10 (3. Waschfraktion); 11 (1. Elutionsfraktion); 12 (2. Elutionsfraktion); 13 (3. Elutionsfraktion)

Ein hoher Anteil des im 100.000 x g Überstand nachweisbaren Enzyms konnte an die Nickel-NTA-Agarose gebunden und anschließend in zwei Fraktionen eluiert werden (Spur 12 und 13). Das Protein besaß danach eine Reinheit von etwa 50 %. Die Proteinbande aus der zweiten Elutionsfraktion (Spur 12) wurde massenspektrometrisch charakterisiert (Kap. 4.3.13).

Daneben wurde ein niedermolekulares Protein exprimiert und aufgereinigt, das sowohl im Bakterienextrakt, als auch in den Elutionsfraktionen zu finden war. Möglicherweise ist es ein Degradationsprodukt oder das aufgrund eines frühzeitigen Kettenabbruchs nicht vollständig exprimierte Protein.

Ein entsprechendes Proteinverteilungsmuster wurde nach der Expression der murinen e-LOX-3 beobachtet (Abb. 15). Ein Protein des erwarteten Molekulargewichtes konnte größtenteils im Sediment der 100.000 x g Zentrifugation gefunden werden (Spur 6). Aus dem zur weiteren Reinigung verwendeten Überstand band nur ein geringer Proteinanteil an die Nickel-NTA Agarose und konnte anschließend eluiert werden. Die Menge des eluierten Proteins (Spur 12) war aber für eine massenspektrometrische Analyse ausreichend (Kap. 4.3.13).

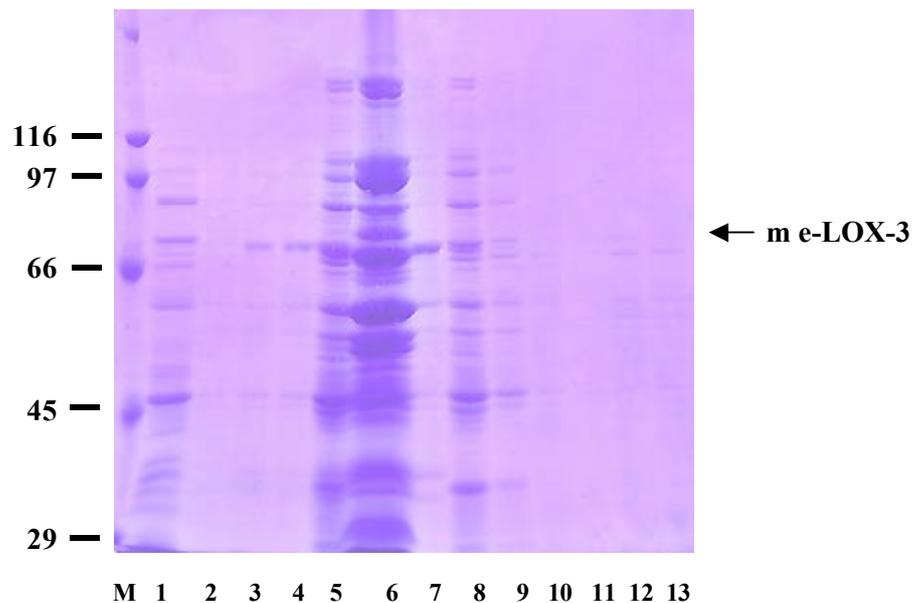


Abb. 15 Aufreinigung rekombinanter m e-LOX-3.

Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* Extrakten und Fraktionen der anschließenden Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kap. 4.3.8).

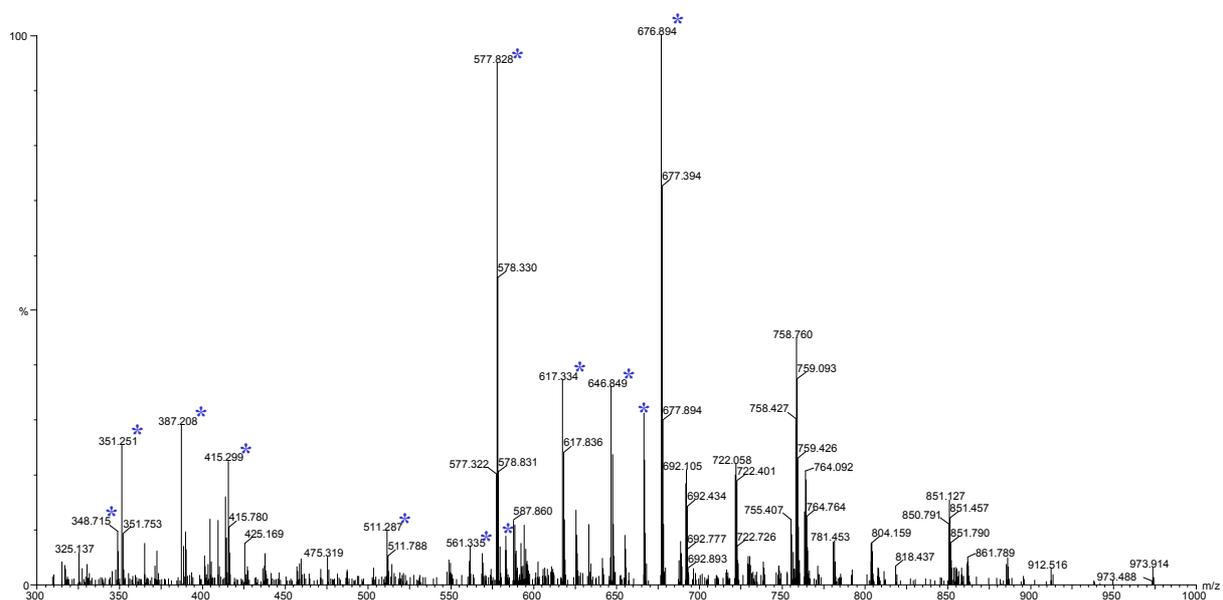
50 µg Gesamtprotein wurden geladen; die Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung erfolgte entsprechend Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.2.1

M (SDS-6H Marker; Einheit: kDa): 1 (Proteinextrakt aus HEK Zellen (Positivkontrolle für Western-Blot) transient mit m e-LOX-3 transfiziert); 2 (Kultur vor IPTG-Induktion); 3 (Kultur nach IPTG-Induktion, 1 h); 4 (Kultur nach IPTG-Induktion, 2h); 5 (Überstand nach 100.000 x g Zentrifugation); 6 (Sediment der 100.000 x g Zentrifugation); 7 (Durchlauf der Nickel-NTA Säule); 8 (1. Waschfraktion); 9 (2. Waschfraktion); 10 (3. Waschfraktion); 11 (1. Elutionsfraktion); 12 (2. Elutionsfraktion); 13 (3. Elutionsfraktion)

5.1.3 Massenspektrometrische Charakterisierung der epidermalen Lipoxygenasen

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Charakterisierung wurden die Silber- oder Coomassie-gefärbten Proteine dem standardisierten Trypsinverdau im Gel unterzogen [Kinter et al., 2000] und der Überstand mit den proteolytischen Peptiden chromatographisch entsalzt. Die so erhaltenen Proteinfragmente wurde mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Zur Identifizierung wurden die erhaltenen Fragmentmassen mit theoretischen Spaltungen von Proteinen in der Mascot Datenbank abgeglichen.

5.1.3.1 Massenspektrometrische Identifizierung der murinen 8S-Lipoxygenase



```

1  MAKCRVRVST GEACGAGTWD KVSIVGTH GESPLVPLDH LGKEFSAGAE EDFEVTLPQD
61  VGTVLMRLRVH KAPPEVSLPL MSFRSDAWFC RWFELEWLPG AALHFPCYQW LEGAGELVLR
121  EGAAK VSWQD HHP TLQDQRQ KELESRQKMY SWKTYIEGWP RCLDHETVKD LDLNIKYSAM
181  KNAKFFKAH SAYTELKVKG LLDRTGLWRS LREMRLFNF RKTPAAEYVF AHWQEDAFFA
241  SQFLNGINPV LIRCHSLPN NFPVTDEMVA PVLGPGTSLQ AELEKGSFL VDHGILSGVH
301  TNILNGKPQF SAAPMTLLHQ SSGSGPLLP IAIQLKQTPGP DNPFLPSSD TWDWLLAKTW
361  VRNSEFYIHE AVTHLLHAHL IPEVFALATL RQLPRCHPLF KLLIPHIRYT LHINTLAREL
421  LVAPGKLIDK STGLGTGGFS DLIKRNMEQL NYSVLCLPED IRARGVEDIP GYYRDDGMQ
481  IWGAIKSFVS EIVSIYPSD TSVQDDQELQ AWWREIFSEG FLGRESSGMP SLLDTREALV
541  QYITMVIFTC SAKHAAVSSG QFDCVWMPN LPPTMQLPPP TSKGQARPES FIATLPVNS
601  SSYHIALWL LSAEPGDQRP LGHYPDEHFT EDAPRRSVAA FQRKLIQISK GIRERNRGLA661
LPYTYLDPPL IENSVI

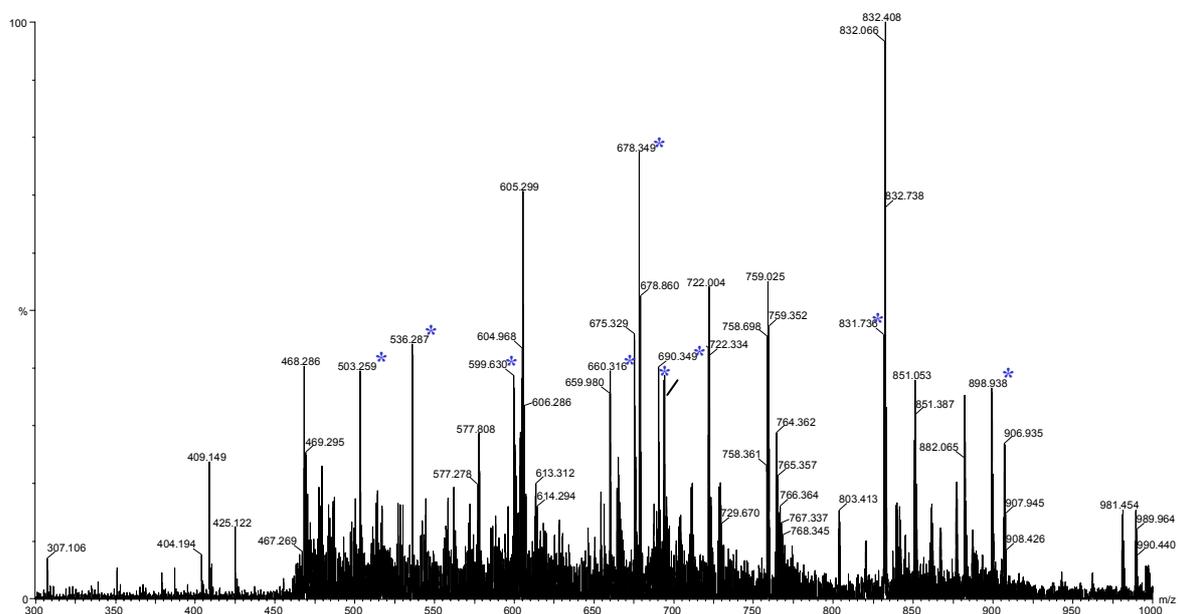
```

Abb. 16 MALDI-TOF-Massenspektrum der m 8S-LOX. Das Protein wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Bande aus der zweiten Elutionsfraktion ausgeschnitten (Kap. 5.1.2.1, Abb. 10) und dem Trypsinverdau im Gel mit anschließender Entsatzung unterzogen; Identifizierung des Proteins erfolgte aus den durch Endoprotease Trypsin erhaltenen Peptiden unter Verwendung der Mascot Datenbank; mit Stern gekennzeichnet: mit der LOX-Aminosäuresequenz übereinstimmende Peptidfragmente; unteres Bild: in blau gekennzeichnet die identifizierten Peptide der Aminosäuresequenz der m 8S-LOX

In dem Massenspektrum (Abb. 16) konnten zwölf, zum Teil überlappende, über die Aminosäuresequenz der m 8S-LOX verteilten Peptidfragmente gefunden werden. Die murine 8 S-Lipoxygenase konnte durch Vergleich dieser Peptide mit dem theoretischen Spaltungsmuster dieser Lipoxygenase eindeutig identifiziert werden.

5.1.3.2 Massenspektrometrische Identifizierung der murinen e12S-Lipoxygenase

Neun, im Massenspektrum (Abb. 17) enthaltene Peptidstücke konnten im Vergleich mit der Aminosäuresequenz der murinen e12S-LOX in der Mascot Datenbank dieser Lipoxygenase zugeordnet und die Lipoxygenase dadurch eindeutig identifiziert werden.



1 MVKYKILVAT GDSVFAGSAN LVHLWLVGEH GEADLGKQLR PLLGRKTELE VDVPLHLGRL
 61 LAVKLRKQKG LLDSDFWCKS ITVQGPQTQG EAFPCYSWV QGKETICLTE GTALKVTDIT
 121 QNLFKRYREQ ELENRRNVYR WGSWKEGLIL PIAGSTERDL PRNQRFMKDK DLDFSLSLVK
 181 ELKNFAIKGT LDFVSRVQKL EDYQKVPHT KTALPERVRG SWKEDALFGY QFLNGANPML
 241 LRRSMRLPAR LVLPPGMEDV QTQLEKELKA GSLFEVDFSL LDGVKPNIII FKQYVVTAPL
 301 VMLKLQPDGR LLPMVIQLQP PRHGCPPPLL FLPSDPPMAW LLAKIWVRSS DFQLHQLQSH
 361 LLRGHMAEV ISVATMRSPL SLHPIYKLLA PHFRYTMEIN TLARNNLVSE WGIFDLVVST
 421 GSGGHVDILQ RATSCLTYRS FCPDDLADR GLVGVKSSLY AQDALRLWEI ISRYVERMVE
 481 LFYRSDTDVK EPELQVWCR EVTEVGLLGA QDRGFPLSLE SRAELCRFVA MCIFTCTGQH
 541 ASTHLGQLDW YAWIPNGPCT MRKPPPISKD VTERDIVDSL PCLQQARMQI TVTKFLGRRQ
 601 PVMVALGQHK EEFYSGPRPR DVLKQFQEEL AIMDKIEIVR NASLDLPYEVY LRPSLVENSV
 661 TI

Abb. 17 MALDI-TOF-Massenspektrum der m e12S-LOX. Das Protein wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Bande aus der zweiten Elutionsfraktion ausgeschnitten (Kap. 5.1.2.3, Abb. 12) und dem Trypsinverdau im Gel mit anschließender Entsalzung unterzogen; Identifizierung des Proteins erfolgte aus den durch Endoprotease Trypsin erhaltenen Peptiden unter Verwendung der Mascot Datenbank; mit Stern gekennzeichnet: mit der LOX-Aminosäuresequenz übereinstimmende Peptidfragmente; unteres Bild: in blau gekennzeichnet die identifizierten Peptide der Aminosäuresequenz der m e12S-LOX

5.1.3.3 Massenspektrometrische Identifizierung der murinen 12R-Lipoxygenase

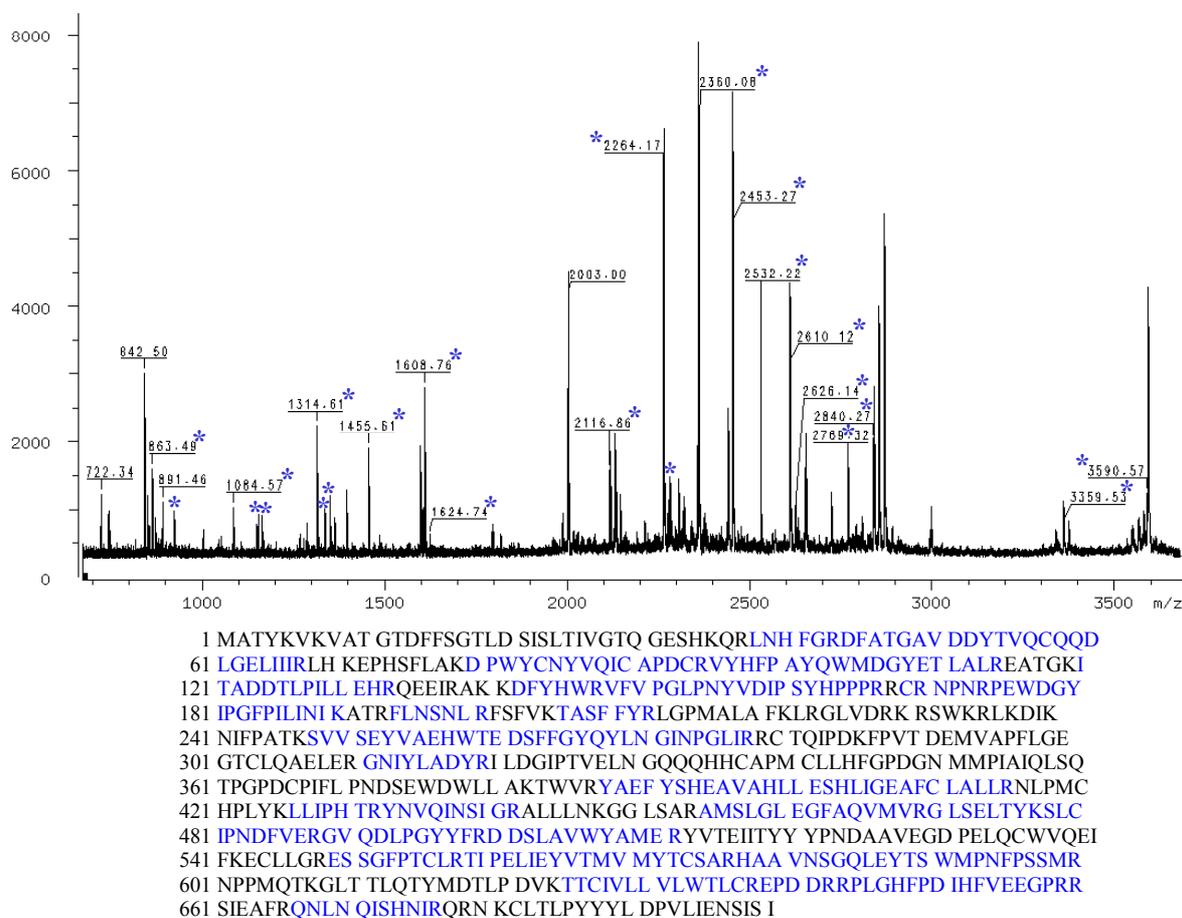
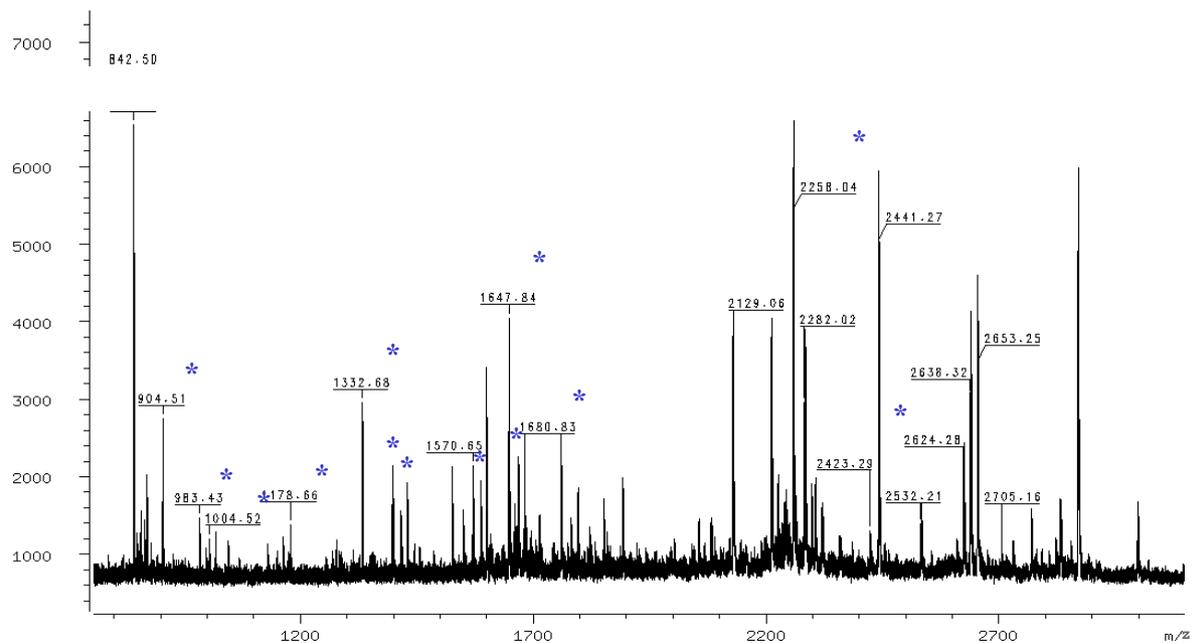


Abb. 18 MALDI-TOF-Massenspektrum der m 12R-LOX. Das Protein wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Bande aus der zweiten Elutionsfraktion ausgeschnitten (Kap. 5.1.2.5, Abb. 14) und dem Trypsinverdau im Gel mit anschließender Entsalzung unterzogen; Identifizierung des Proteins erfolgte aus den durch Endoprotease Trypsin erhaltenen Peptiden unter Verwendung der ProFound Datenbank; mit Stern gekennzeichnet: mit der LOX-Aminosäuresequenz übereinstimmende Peptidfragmente; unteres Bild: in blau gekennzeichnet die identifizierten Peptide der Aminosäuresequenz der m 12R-LOX

Im Maldi-TOF-Massenspektrum (Abb. 18) wurden 28 mit der Aminosäuresequenz der m 12R-LOX übereinstimmende Peptide gefunden, die einen Hauptanteil (52 %) dieser Sequenz abdeckten und damit die murine 12R-LOX eindeutig identifizierten.

5.1.3.4 Massenspektrometrische Identifizierung der murinen e-LOX-3

Im Massenspektrum (Abb. 19) konnten nach der ProFound Datenbanksuche von 47 gefundenen 16 Peptidstücke der murinen e-LOX-3 zugeordnet werden. Diese Fragmente identifizierten das hauptsächlich in der ausgeschnittenen Bande enthaltene Protein als die murine e-LOX-3.



1 MAVYRLCVTT GSYLKAGTLD NIYATLVGTC GESPKQKLDL R VGRDFASGSV QKYKVR**CEAE**
 61 **LGEILLRL**LH KERFAFFCKD **PWYCSR**ICV T APDGS AVHFP CYQWIDGYCT VELRPGTART
 121 **ICQDSLPL**LL DHRKRELRR QECYRWKIFA **PGFPRM**VDVS **SFQEMESDKK** FALTKTVPCA
 181 EQDDNSGNRY LPGFPM**KIDI** **PSSLHME**PNI RYSATK**TASL** **IFNALPASFG** MKIRGLLDRK
 241 GSWKRLDDIR **NIFWCHK**TFT SEYVTEHWCE DSFFGYQYLN GVPV**MLHCL** SSLPSKLPVT
 301 **NDMVAP**LLGP **GTCLQTE**LER GHIFLADYWI LAEAPVHCIN SLQQYVTAPL CLLWLN**PQGV**
 361 LLPLAIQLSQ TPGPESPIFL PTDCELDWLL AKTWVRN**SEF** LVHEN**NTHFL** CTHLLCEAFS
 421 MATLRQLPLC HPVYK**LLLP**H **TRYTLQ**VNTI ARATLLNP**DG** LVDK**VTSIGR** QGLIYLMSTG
 481 LAHFTYTD**FC** LPDSIRAR**GV** **LTIPNY**HYRD DGLKI**WAAIE** **RFVSEIVSYY** YPSDASVQ**QD**
 541 CELQAWVGEI FAQAF**LGRES** SGFP**SRLCTP** GELVKYLTAI IFNCSAQ**HAA** FNSGQHDFGA
 601 WMPNAPSSMR **QPPPQTK**GDT **TMKSYL**DTLP EVNTTCR**NLL** **LFWLVSQ**EPK **DQRPLG**TYPD
 661 **EHFTEE**APRQ SIAAFQ**NCLA** QISKDIRERN QSLALPYAYL DP**PLIENS**VS I

Abb. 19 MALDI-TOF-Massenspektrum der m e-LOX-3. Das Protein wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Bande aus der zweiten Elutionsfraktion ausgeschnitten (Kap. 5.1.2.5, Abb. 15) und dem Trypsinverdau im Gel mit anschließender Entsalzung unterzogen; Identifizierung des Proteins erfolgte aus den durch Endoprotease Trypsin erhaltenen Peptiden unter Verwendung der ProFound Datenbank; mit Stern gekennzeichnet: mit der LOX-Aminosäuresequenz übereinstimmende Peptidfragmente; unteres Bild: in blau gekennzeichnet die identifizierten Peptide der Aminosäuresequenz der m e-LOX-3

5.2 Charakterisierung der Enzymaktivität der e-LOX-3

Bisher konnte weder mit prototypischen Lipoxygenasesubstraten, wie Arachidon- und Linolsäure, noch mit komplexeren Lipiden eine Enzymaktivität der e-LOX-3 nachgewiesen werden [Kinzig et al., 1999]. Auch unter Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme wurde keine katalytische Aktivität der e-LOX-3 beobachtet. In genetischen Studien einer kongentialen Ichthyoseform wurden Hinweise auf eine funktionelle Verbindung zwischen den beiden Lipoxygenasen e-LOX-3 und 12R-LOX gefunden. Mutationen in einem der beiden LOX-Gene führten zum gleichen Phänotyp. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, daß beide Lipoxygenasen dem gleichen Signalweg angehören bzw. daß das Produkt der einen Lipoxygenase das Substrat des anderen Isoenzym darstellen könnte [Jobard et al., 2002]. Die Arbeitsgruppe um Alan Brash konnte inzwischen tatsächlich zeigen, daß die e-LOX-3 Produkte der Reaktion anderer Lipoxygenasen als Substrate verwendet und diese zu Expoyalkoholen umlagert [Yu et al., 2003]. Diese für Säuger-Lipoxygenasen untypische Reaktion weist die e-LOX-3 als eine Hydroperoxyisomerase aus.

Wie im nächsten Kapitel ausführlich behandelt, kann der e-LOX-3 bei der Differenzierung der Fettzellen eine wichtige Rolle zugeordnet werden. Ziel war es, die Expression und die Produkte der e-LOX-3 bei diesem Prozeß zu charakterisieren. Als Basis wurde zunächst die enzymatische Aktivität der e-LOX-3 mit verschiedenen Hydroperoxiden als Substrate untersucht und die gebildeten Produkte analytisch charakterisiert.

5.2.1 Produkte der e-LOX-3

Die bei der enzymatischen Umsetzung der Hydroperoxide mit e-LOX-3 entstehenden Produkte, die Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (Hydroxy-ETrEs), besitzen eine säurelabile, funktionelle Gruppe. Im Gegensatz zum standardisierten LOX-Enzymtest wurde deshalb zur Extraktion dieser säurelabilen Produkte aus der Reaktionslösung das modifizierte Verfahren nach Bligh&Dyer (Kap. 4.3.10) verwendet. Der gewonnene Gesamtlipidextrakt wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei einer Wellenlänge von 205 nm, die dem Absorptionsmaximum der gebildeten Hydroxyepoxyprodukte entspricht, untersucht. Die Identifizierung und Quantifizierung der Produkte erfolgte durch den Vergleich mit analog chromatographierten, authentischen Standards. Zur Identifizierung wurden die Produkte als HPLC-Fractionen isoliert und ihre strukturellen Eigenschaften mit Hilfe der Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie bestimmt.

5.2.1.1 Produkte der Umsetzung von 15(S)-HPETE mit e-LOX-3

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die menschliche e-LOX-3 eine höhere spezifische Enzymaktivität aufwies als das analoge murine Isoenzym. Für die folgenden Experimente wurde deshalb das menschliche Enzym verwendet, das als rekombinantes Protein in HEK 293 Zellen exprimiert wurde. Der Aktivitätstest erfolgte mit 10.000 x g Überstände zellulärer Extrakte, die entsprechend der im Kap. 4.3.6 beschriebenen Methode hergestellt wurden.

Im e-LOX-3-Enzymtest wurde als erstes Substrat 15(S)-HPETE eingesetzt. Nach Lipidextraktion der Produkte erfolgte die Analyse durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei einer Wellenlänge von 205 nm.

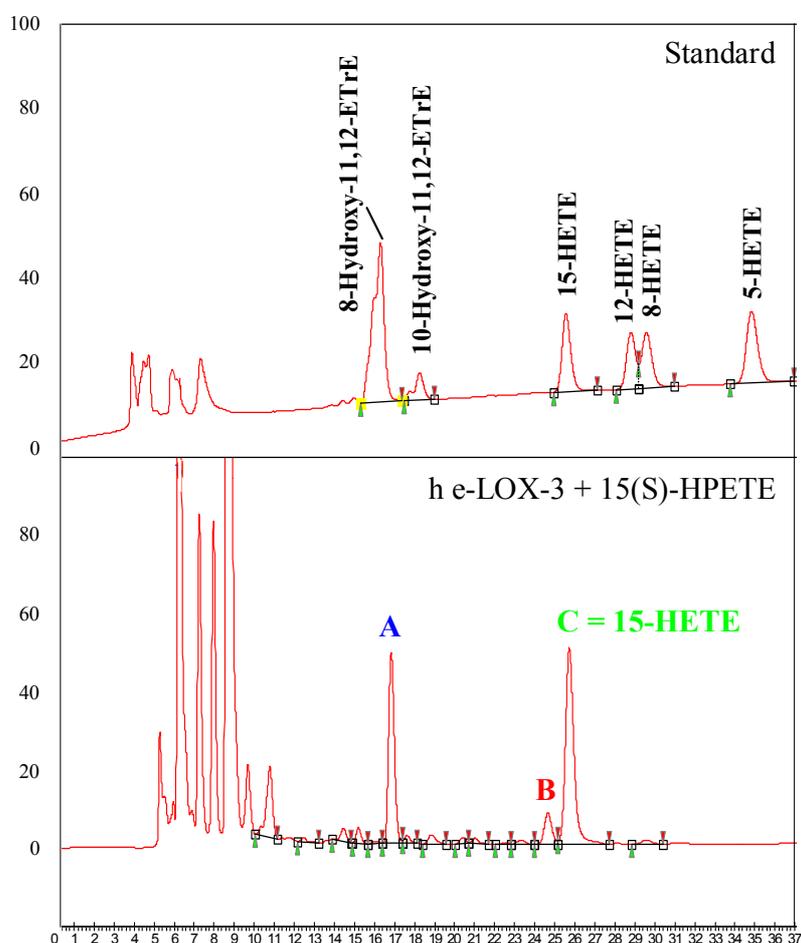


Abb. 20 Reversed-Phase HPLC der Produkte der h e-LOX-3 nach Inkubation mit 15(S)-HPETE.

Laufmittelverteilung: Methanol, Wasser, Essigsäure (82:18:0,01); x-Achse: Retentionszeit [min]; y-Achse: Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm [mAU]
Gezeigt sind der Lauf der authentischen Standards 8-Hydroxy- und 10-Hydroxy-11,12-epoxy-eicosatriensäuren (Hydroxy-EtrE) und der 15-, 12-, 8- und 5-Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETE) (oben) und der Lauf des Lipidextrakts aus dem Aktivitätstest der menschlichen e-LOX-3 mit dem Substrat 15(S)-HPETE (unten) analog Kap. 4.3.10.

Als käuflich Referenzsubstanzen für Epoxyalkohole standen lediglich racemische Gemische der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure (Hepoxilin A₃) und der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure (Hepoxilin B₃) zur Verfügung. Abb. 20 zeigt das Chromatogramm des Standardlaufs (oben) und des Probenlauf der Umsetzung von 15(S)-HPETE mit e-LOX-3 (unten) in der RP-HPLC.

Im Chromatogramm des Lipidextrakts aus dem Aktivitätstests der e-LOX-3 konnten drei Produkte A, B und C unterschieden werden. Das Produkt C wurde als 15-HETE identifiziert. Seine Bildung aus dem Substrat erfolgte nicht aus der enzymatischen Reaktion der e-LOX-3 mit 15-HPETE, sondern über die im Zytosol vorhandenen Peroxidasen [Krieg et al., 1999].

Die Signale A und B wiesen eine Retentionszeit von 16,9 (A) bzw. 24,8 (B) min auf und wurden in einem Verhältnis von 4 zu 1 gebildet. Das Nebenprodukt B besaß eine Absorption bei einer Wellenlänge von 300 nm, die für keto-konjugierte Systeme charakteristisch ist, und war auch bezüglich der Retentionszeit mit der von anderen Autoren beschriebenen 15-KETE aus der Umsetzung von 15(S)-HPETE mit e-LOX-3 identisch [Yu et al., 2003]. Das Hauptprodukt A wies ein ähnliches Laufverhalten wie der Standard der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure auf, zeigte jedoch Unterschiede im Absorptionsverhalten. Neben der für Epoxyalkohole charakteristischen Absorption bei 205 nm, wies das Produkt A auch eine Absorption bei 235 nm auf. Zur näheren Untersuchung wurde dieses Produkt isoliert und in der Straight-Phase-HPLC (SP-HPLC) chromatographisch analysiert. Abb. 21 zeigt das Chromatogramm des Standardlaufs (oben) und des nach der SP-HPLC isolierten Produkts A (unten).

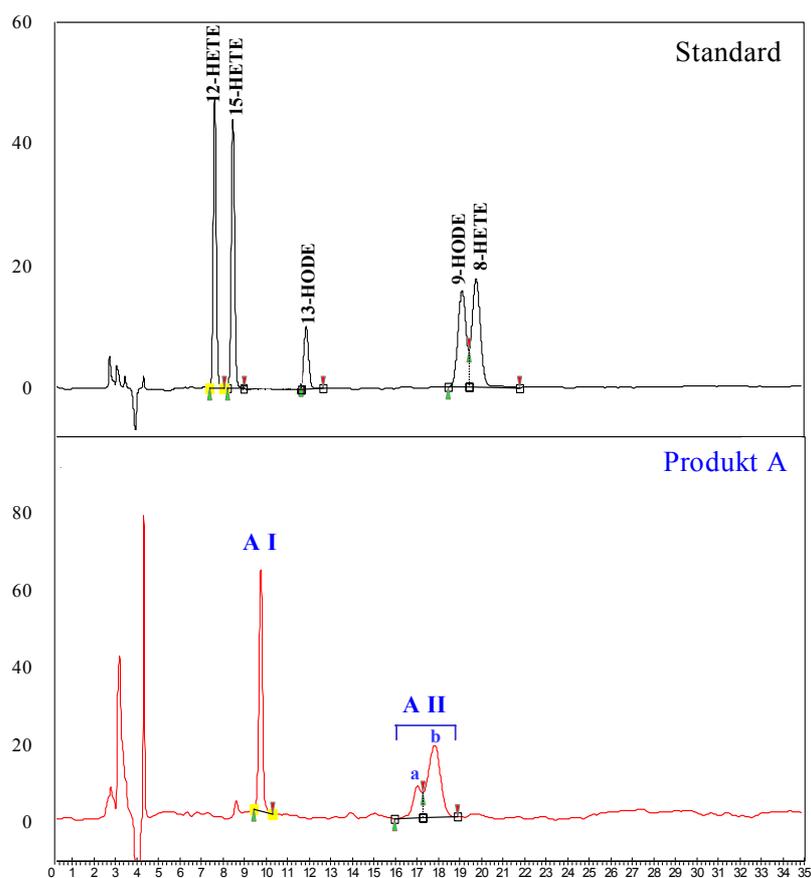


Abb. 21 Straight-Phase HPLC von Produkt A der *e*-LOX-3 nach Inkubation mit 15(S)-HPETE.

Laufmittelverteilung: *n*-Hexan; Isopropanol; Wasser, Essigsäure (98:2:0,1:0,025);
x-Achse: Retentionszeit [min]; *y*-Achse: Absorption bei 205 nm [mAU]

Gezeigt sind der Lauf der authentischen Standards 15-, 12- und 8-Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETE) und 9- und 13-Hydroxyoctadienyldiensäuren (HODE) (oben) und der Lauf des aus der Reversed-Phase HPLC isolierten Produkts A des Aktivitätstests der *h e*-LOX-3 mit 15(S)-HPETE (unten).

In der Straight-Phase HPLC zeigte sich, daß das Produkt A aus drei Komponenten bestand. Die erste Komponente besaß eine Retentionszeit von 9,8 und wurde als Fraktion A I gesammelt. Die beiden anderen Bestandteile, die in dem SP-HPLC System nicht getrennt werden konnten, wurden als Fraktion A II aufgefangen. Während die Komponente A IIb mit der Retentionszeit von 17,9 min neben der Absorption bei 205 nm auch eine bei 235 nm zeigt, weist die Komponente A IIa mit einer Retentionszeit von 17,2 min eine für Epoxyalkohole typische Absorption bei 205 nm auf. Zur weiteren Charakterisierung der Fraktionen A I und A II wurden beide massenspektrometrisch untersucht (Kap. 5.2.2).

5.2.1.2 Produkte der Umsetzung von 12(R,S)-HPETE mit e-LOX-3

Als weiteres Substrat der e-LOX-3 wurde 12(R,S)-HPETE verwendet. Der Enzymtest wurde analog zur 15(S)-HPETE-Umsetzung durchgeführt und aufgrund der Säurelabilität der erwarteten Produkte die Lipidprodukte mittels des modifizierten Verfahrens nach Bligh&Dyer extrahiert (Kap. 4.3.10). Die Analyse des Gesamtlipidextrakts erfolgte mit Hilfe der RP-HPLC und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 205 nm.

Abb. 22 zeigt das Chromatogramm des Standardlaufs (oben) und des Probenlaufs nach Umsetzung von 12(R,S)-HPETE mit e-LOX-3 (unten).

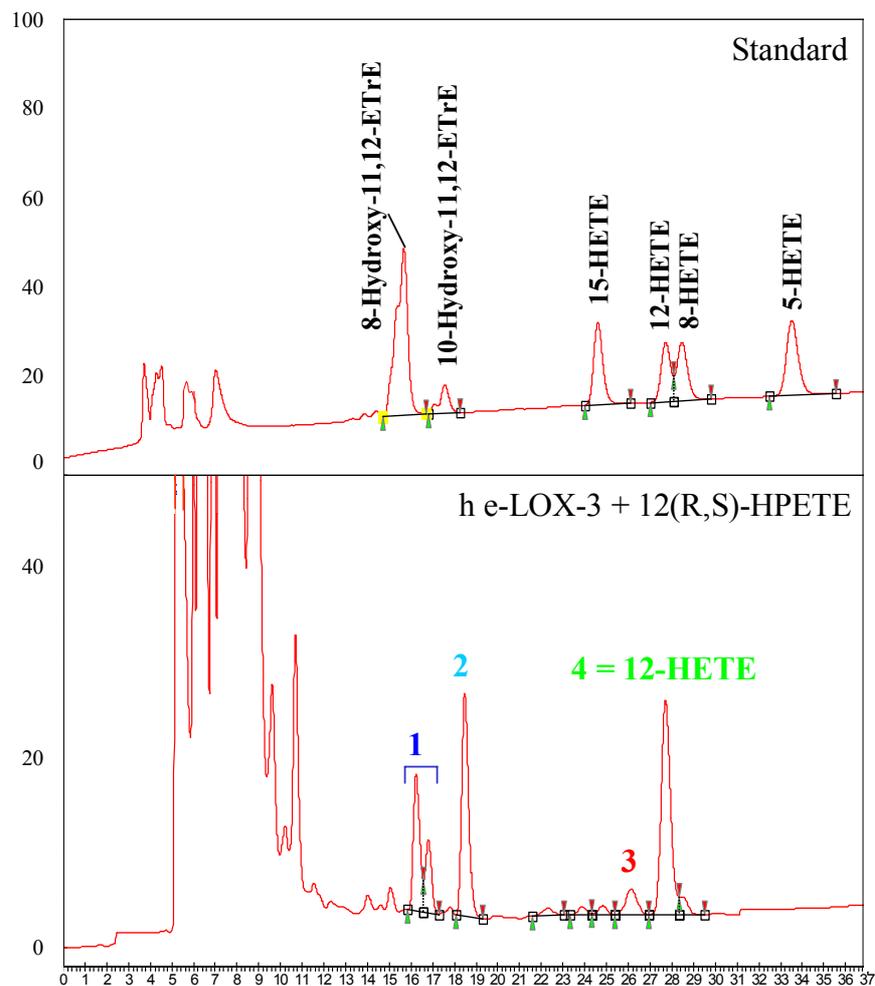


Abb. 22 Reversed-Phase HPLC der Produkte der h e-LOX-3 nach Inkubation mit 12(R,S)-HPETE.

Laufmittelverteilung: Methanol, Wasser, Essigsäure (82:18:0,01); x-Achse: Retentionszeit [min]; y-Achse: Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm [mAU]
Gezeigt sind der Lauf der authentischen Standards 8-Hydroxy- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäuren (Hydroxy-EtrE) und der 15-, 12-, 8- und 5-Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETE) (oben) und der Lauf der Lipidextrakte aus dem Aktivitätstest der menschlichen e-LOX-3 mit dem Substrat 12(R,S)-HPETE (unten).

Im Reversed Phase-Chromatogramm des Gesamtlipidextrakts konnten vier Signale, mit 1 bis 4 bezeichnet, unterschieden werden. Das Signal 4 mit einer Retentionszeit von 27,7 min wurde als 12-HETE identifiziert. 12-HETE wurde ähnlich wie 15-HETE bei der Umsetzung von 15-HPETE durch Peroxidasespaltung gebildet (Kap. 5.2.1.1) und stellte kein e-LOX-3-Produkt dar. Die Signale 1, 2 und 3 konnten als e-LOX-3-Produkte angesehen werden. Das Produkt 3 entsprach dem bereits beschriebenen 12-KETE [Yu et al., 2003]. Das Produkt 2 zeigte eine vergleichbare Retentionszeit und ein ähnliches Absorptionsmaximum bei 205 nm wie der Standard 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure. Die Fraktion 1 erschien als ein doppeltes Signal und koeluierte mit der Referenz 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure. Zur massenspektrometrischen Untersuchung (Kap. 5.2.2) wurden die Produkte 1 und 2 isoliert.

5.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung der e-LOX-3 Produkte

5.2.2.1 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure als Produkt der e-LOX-3

Die massenspektrometrische Untersuchung der Fraktion A I und A II aus dem Aktivitätstest der menschlichen e-LOX-3 mit 15(S)-HPETE erfolgte in der Zentralen Spektroskopie des DKFZ in der Arbeitsgruppe von Prof. Lehmann.

Mittels eines ESI-Massenspektrometers unter Verwendung eines Tripelquadrupols wurde das Gesamtnegativionenspektrum (ESI-MS) beider Fraktionen gemessen. Das Spektrum der Fraktion A I zeigte keine Fragmente, die einem Reaktionsprodukt von 15(S)-HPETE zugeordnet werden konnten.

Im Gesamtnegativionenspektrum der Fraktion A II tritt dagegen ein dominantes Ion der erwarteten Molekülmasse von m/z 335 auf. In Abb. 24 ist das ESI-MS der Fraktion A II und das ESI-MS/MS des Molekülions mit m/z 335 dargestellt.

Die beiden Fragmentierungsmuster des Substrats 15-HPETE und der Fraktion A II aus der ESI-MS/MS wiesen keine Gemeinsamkeiten auf (nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, daß es sich bei dem in der Fraktion A II enthaltenen Produkt nicht um das Edukt handelte.

Das ESI-MS/MS Spektrum der Fraktion A II zeigte durch Wasser- und CO_2 Abspaltung entstandene Fragmente bei m/z 317, 299, 273 und 255. Zudem waren Fragmente zu finden, die durch α -Spaltung zur Hydroxylgruppe (m/z 223, 193) und durch Spaltung der C-C-Epoxid-Bindung des erwarteten Produkts, der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosa-triensäure, entstanden sein könnten (Abb. 23).

Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich also bei dem in dieser Fraktion A II enthaltenen Produkt um 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure.

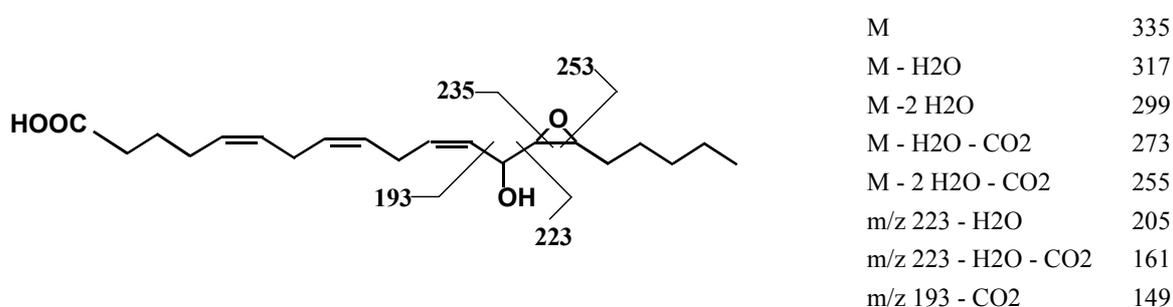


Abb. 23 Darstellung der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.

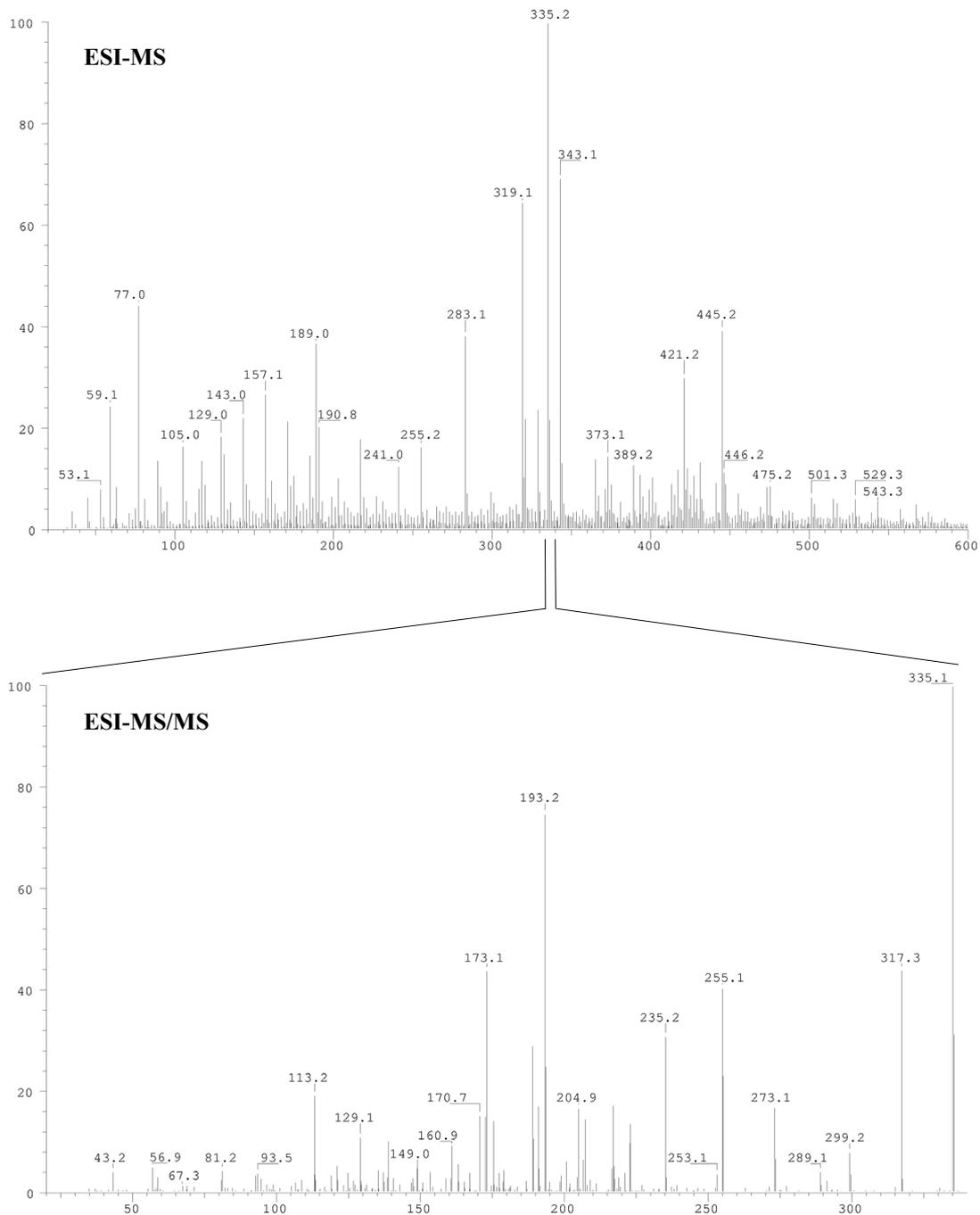


Abb. 24 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 15(S)-HPETE durch die menschliche *e*-LOX-3.

5.2.2.2 8- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure als Produkte der e-LOX-3

Die isolierten Fraktionen 1 und 2 aus dem Aktivitätstest der menschlichen e-LOX-3 mit 12(S,R)-HPETE wurden unter Verwendung des ESI-Massenspektrometers analysiert (Kap. 4.3.13). In den Abb. 26 und Abb. 28 ist das Gesamtnegativionenspektrum (ESI-MS, oben) der Fraktionen 1 und 2 gezeigt. Das jeweils aus beiden Fraktionen isolierte Fragmentation mit m/z 335 wurde einer weiteren massenspektrometrischen Analyse (ESI-MS/MS) unterzogen (Abb. 26 und 28, unten).

Beide ESI-MS/MS Spektren zeigten durch Wasser- und CO_2 -Abspaltung entstandene Fragmente bei m/z 317, 299, 273 und 255. Weitere Fragmente wurden durch α -Spaltung zur Hydroxylgruppe und C-C-Spaltung in dem Epoxid beider Hydroxyepoxyeicosatriensäuren gebildet. Die Fragmentationen der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure sind in Abb. 25 und Abb. 27 gezeigt. Nach massenspektrometrischer Analyse war das Produkt 1 also mit 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und das Produkt 2 mit 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure identisch.

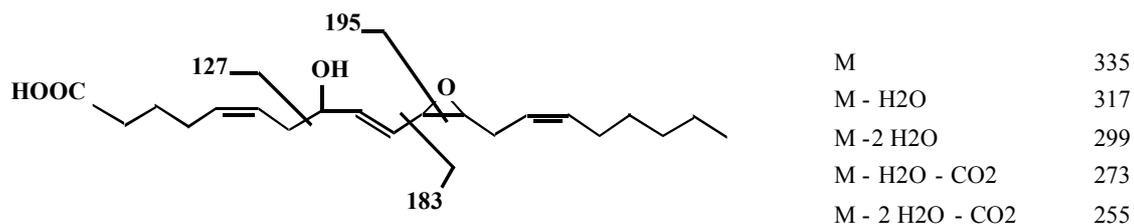


Abb. 25 Darstellung der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.

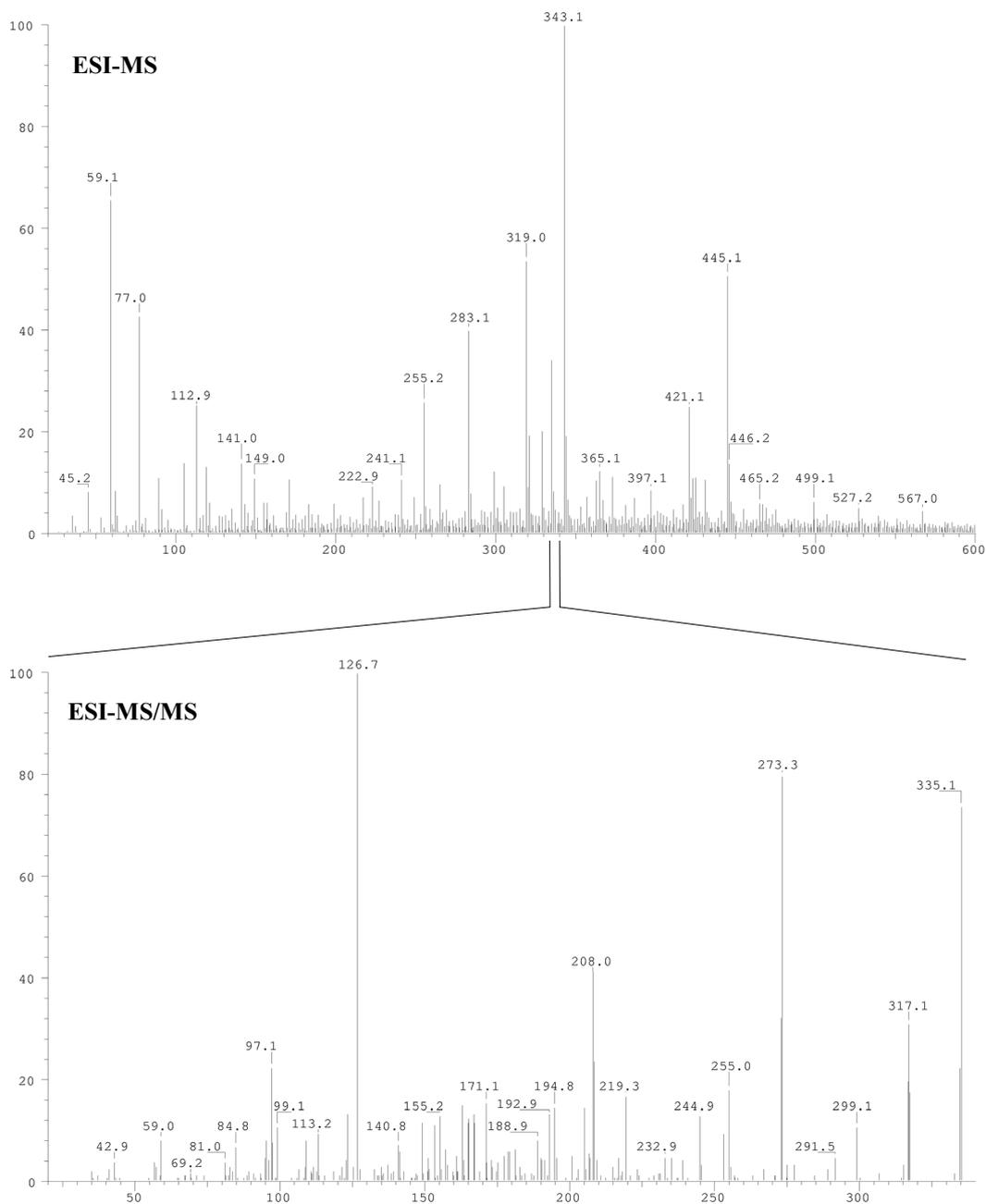


Abb. 26 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 12(R,S)-HPETE durch die menschliche e-LOX-3.

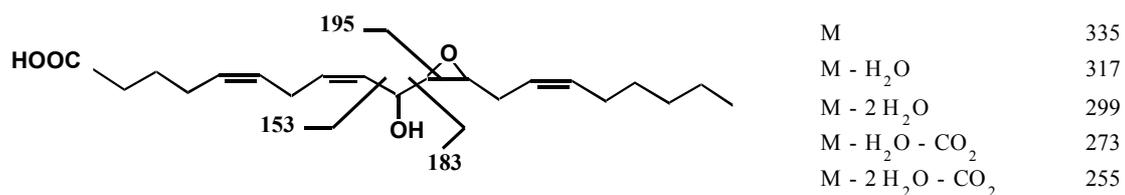


Abb. 27 Darstellung der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.

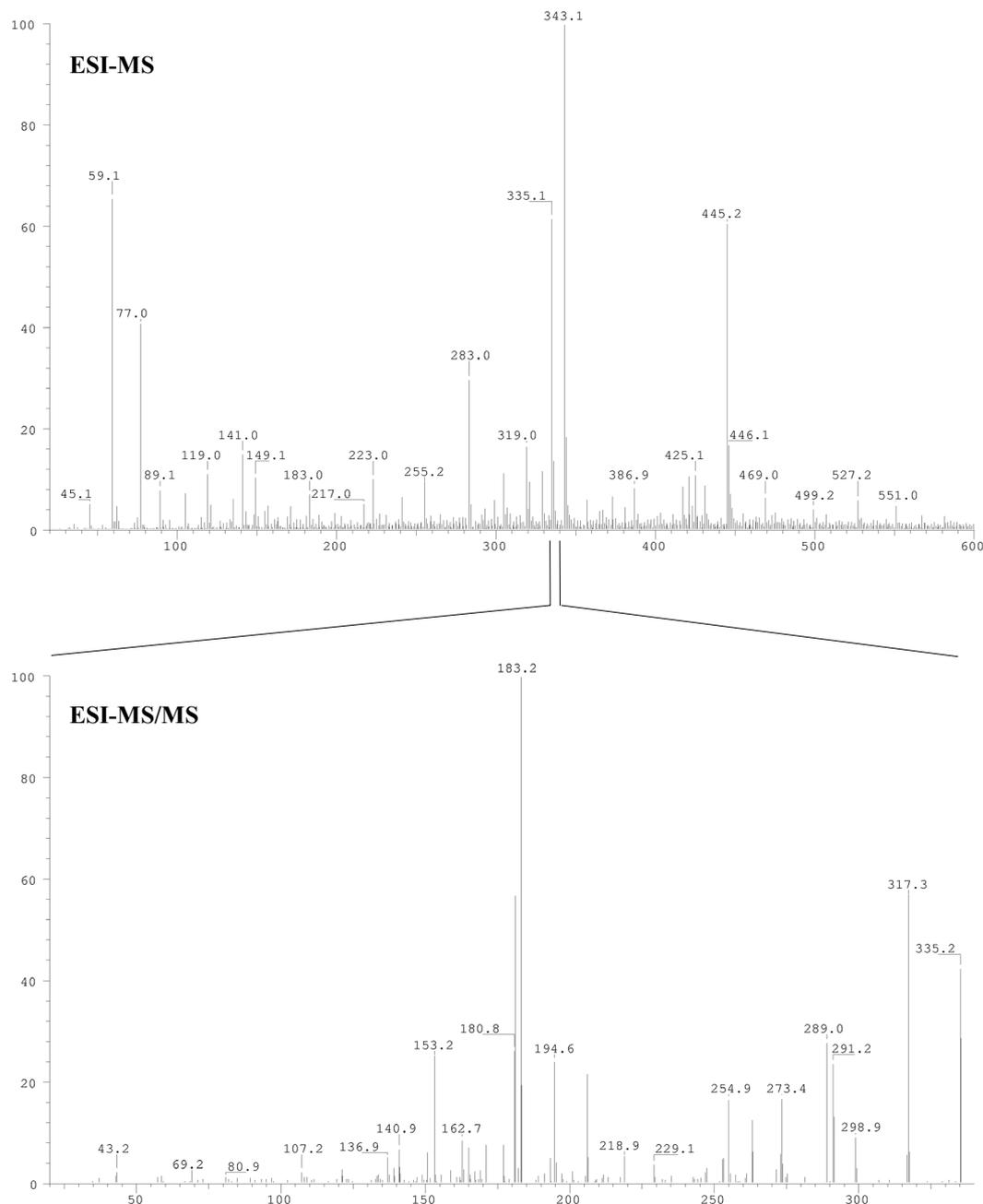


Abb. 28 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 12(R,S)-HPETE durch die menschliche e-LOX-3.

5.3 Funktion der e-LOX-3 und ihrer Produkte bei der Adipogenese

Zur Untersuchung der Rolle der Lipoxygenasen bei der Adipogenese, mit Schwerpunkt auf der e-LOX-3, wurden die Präadipozytenlinien 3T3-L1 und Rb^{-/-} MEFs verwendet. Im Folgenden werden Versuche zur Differenzierung beider Zellsysteme vorgestellt.

5.3.1 Grundlagen der Differenzierung der 3T3-L1-Zellen

Vor der adipösen Umwandlung der 3T3-L1-Zellen ist für die Fettzellendifferenzierung ein Wachstumsstopp erforderlich. Dieser wurde durch Kultivierung der Zellen bis zur Konfluenz (d-2: zwei Tage vor Beginn der Differenzierung) erreicht. Darüber hinaus wurden die Zellen zwei Tage weiter in 10 % Rinderserum enthaltendem DMEM kultiviert. Nach dem Wachstumsstopp mußten die Präadipozyten zur Induktion der Differenzierung eine entsprechende Kombination mitogener und adipogener Signale erhalten. So wurde zum Beginn der Differenzierung (d 0), nach zweitägiger Postkonfluenz, 10 % fötales Kälberserum anstelle von Rinderserum als Mediumzusatz verwendet. Zusätzlich wurde eine die Differenzierung stimulierende Hormonmischung, bestehend aus Insulin, dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason (DEX) und dem Phosphodiesteraseinhibitor Methylisobutylxanthin (MIX) auf die Zellen appliziert.

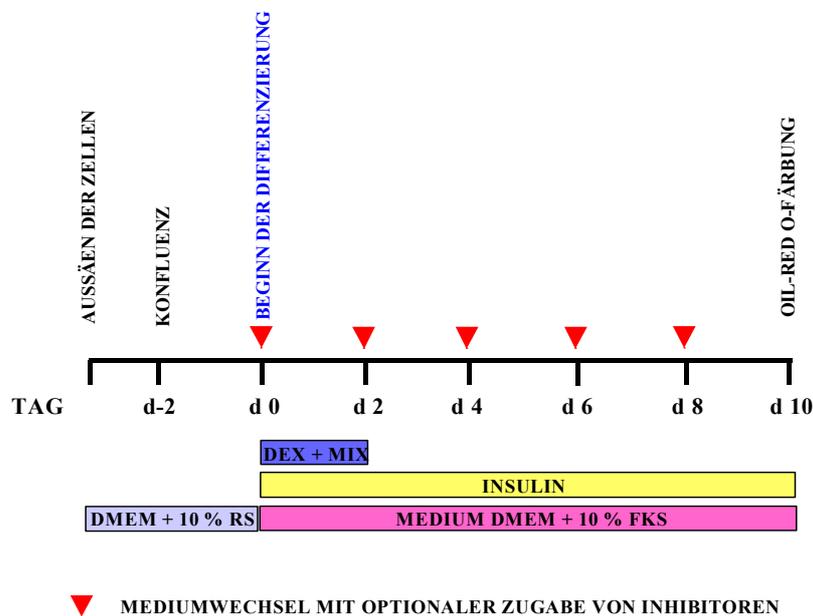


Abb. 29 Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls der 3T3-L1-Zelllinie (MDI-Protokoll).

Als Differenzierungsinduktoren wurden zum Beginn und bis zum Tag 2 (d 2) der Differenzierung Dexamethason (DEX) und Methylisobutylxanthin (MIX) zugegeben. Als weiteres Stimulanz diente Insulin, das im Gegensatz zu den beiden oben genannten Substanzen über den gesamten Zeitraum der Differenzierung verabreicht wurde.

Die Gabe des DEX und MIX erfolgte nur bis zum Tag 2 (d 2) der Differenzierung, während die Insulinbehandlung über den ganzen Zeitraum der Adipogenese (d 0 - d 10) notwendig war. Neben den Differenzierungsinduktoren konnten die Zellen optional alle zwei Tage mit möglichen Inhibitoren behandelt werden. Am Ende der Differenzierung (d 10) wurden die in reifen Adipozyten akkumulierten Lipide durch Oil-Red O angefärbt. Der Anteil der markierten Zellen stellte dabei ein Differenzierungsmaß dar.

5.3.1.1 Morphologie der 3T3-L1-Zellen während der Differenzierung

3T3-L1-Zellen besaßen zu Beginn der Differenzierung eine den Fibroblasten ähnliche Morphologie mit langen Zellausläufern. Im Verlauf der Differenzierung fand eine deutliche Änderung in eine sphärische Zellform statt. Gleichzeitig setzte die Lipidakkumulation in Form kleiner Tröpfchen ein, die von Tag 4 an nach Oil-Red O Färbung erkennbar war.

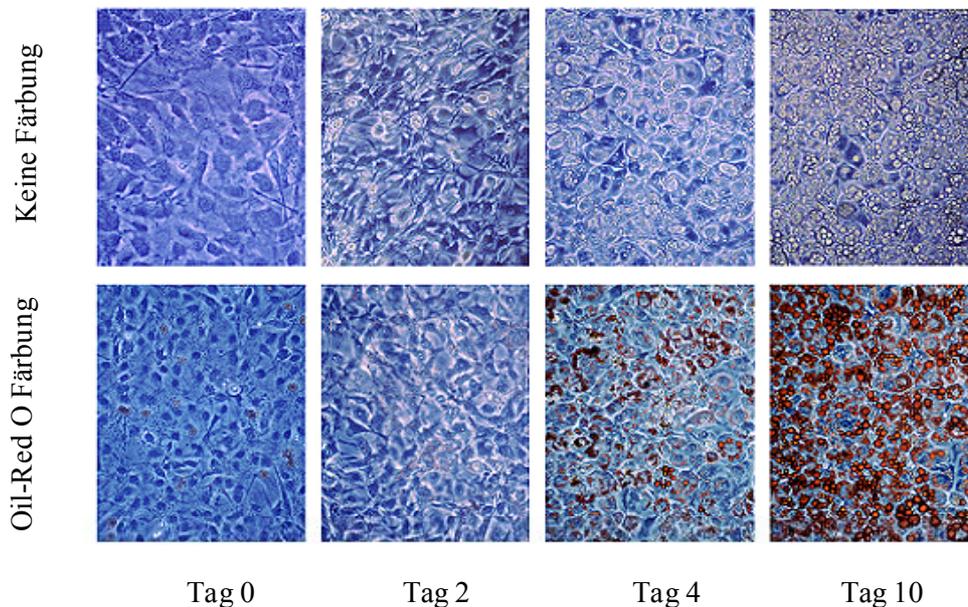


Abb. 30 Morphologie der 3T3-L1-Zellen am Tag 0, 2, 4 und 10 ihrer Differenzierung [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung].
Obere Reihe: keine Färbung; untere Reihe: Oil-Red O Färbung

Der Tag 10 der Differenzierung zeigt die endgültige Morphologie der reifen Adipozyten mit sphärischem Erscheinungsbild und ausgeprägter Lipidakkumulation als vielzählige Tröpfchen in den Zellen.

5.3.2 Grundlagen der Differenzierung der Rb^{-/-} Mausembryofibroblasten

Die Differenzierungshemmung der Rb^{-/-} MEFs kann durch Transduktion des Transkriptionsfaktors ADD-1 umgangen werden, der offensichtlich direkt die Synthese eines PPAR γ -Liganden induziert [Magana et al, 1996; Kim et al., 1996; Lopez et al., 1996].

Ein typisches Differenzierungsprotokoll für Rb^{-/-} Zellen ist in Abb. 31 gezeigt.

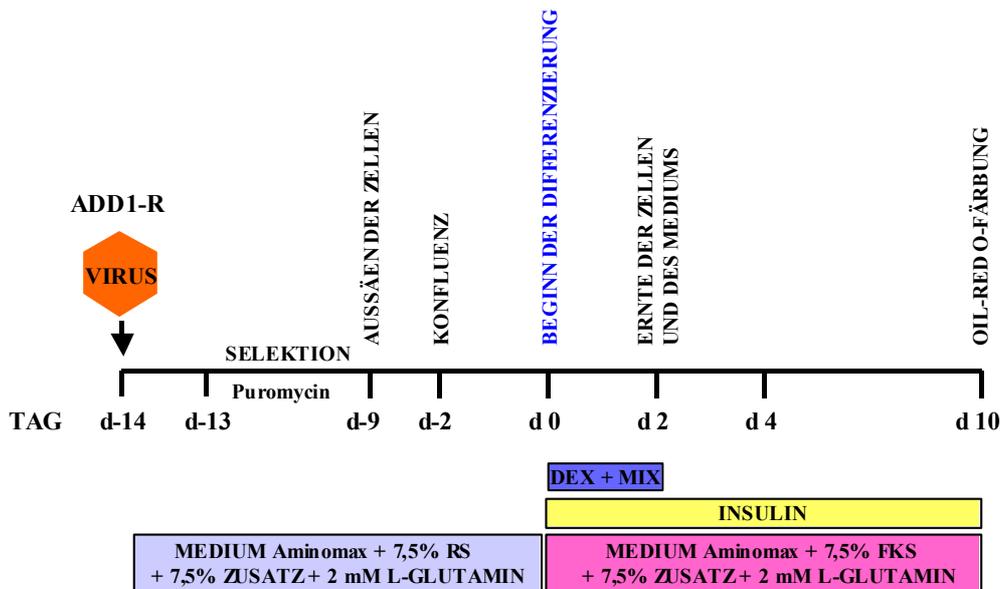


Abb. 31 Differenzierungsprotokoll der Rb^{-/-} Mausembryofibroblasten.

Die Differenzierungshemmung wurde durch Transduktion mit einem viralen ADD1-R-Plasmid aufgehoben; nach Selektion auf die über das Plasmid eingebrachte Puromycinresistenz wurde bis zur Konfluenz kultiviert (d-2) und zwei Tage nach Konfluenz (d 0) die Differenzierung analog dem MDI-Protokoll induziert (Kap. 5.3.1)

Im verwendeten Differenzierungsprotokoll erfolgte die Stimulierung der Adipogenese der Rb^{-/-} MEFs durch die Transduktion einer konstitutiv aktiven Mutante des ADD-1, ADD1-R. Die infizierten Zellen konnten aufgrund ihrer erworbenen Antibiotikaresistenz gegen Puromycin unter Selektionsdruck kultiviert werden. Nach Selektion fand die weitere Kultivierung ohne Zugabe der Antibiotikums in 7,5 % Rinderserum enthaltendem DMEM. Der für die Differenzierung notwendige Wachstumsstopp wurde durch Kontaktinhibition erreicht (d-2). Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zwei weitere Tage kultiviert. Zum Beginn der Differenzierung (d 0) der postkonfluenten Zellen wurde fötales Kälberserum anstelle des Rinderserums als Mediumzusatz verwendet. Die Induktion der Adipogenese erfolgte entsprechend des 3T3-L1-Standarddifferenzierungsprotokolls mit Insulin, Dexamethason (DEX) und Methylisobutylxanthin (MIX).

5.3.3 Lipoxygenasen und die Fettzellendifferenzierung der 3T3-L1 und der Rb^{-/-} MEFs

Der Transkriptionsfaktor PPAR γ spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Fettzellendifferenzierung. Seine Aktivierung erfolgt durch die Bindung von Liganden. Zum Auffinden dieser endogenen Aktivatoren wurden Inhibitorversuche der 3T3-L1-Zellendifferenzierung durchgeführt. Als Inhibitoren wurde Indomethacin (Indo), ein spezifischer Cyclooxygenasehemmer, 17-Ocatdecylsäure (17-ODYA) als Cytochrom P450 Inhibitor, der unspezifische Lipoxygenaseinhibitor Nordihydroguaierinsäure (NDGA) und der 12/15-LOX Inhibitor Baicalein (Baica) verwendet [Madsen et al., 2003]. Während der Cyclooxygenase- und der Cytochrom P450-Inhibitor keinen Effekt auf die Differenzierung besaßen, fand mit beiden Lipoxygenaseinhibitoren eine Hemmung der Adipogenese statt. Die Gabe von Baicalein war dabei vom ersten Tag (d 0) der Differenzierung an notwendig.

Untersuchungen des Rb^{-/-} MEF-Zellsystems bestätigten die Hemmung der Differenzierung durch Baicalein [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung].

Demnach ist der vollständige Lipoxygenaseweg für die Differenzierung der 3T3-L1-Zellen und der Rb^{-/-} MEF notwendig.

Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, welche Lipoxygenasen, die durch Baicalein gehemmt werden können, zum Beginn der Differenzierung exprimiert werden. In diesem Zusammenhang wurde die Expression verschiedener Lipoxygenasen in 3T3-L1-Zellen vor und während der Differenzierung untersucht. Ein entsprechende Analyse wurde auch in dem Rb^{-/-} MEF-Zellsystem durchgeführt.

5.3.3.1 Expression der Lipoxygenasen in 3T3-L1-Zellen

Zur Untersuchung der Lipoxygenase-Expression der auf RNA-Ebene vor und während der Differenzierung wurde die gesamte RNA der 3T3-L1-Zellen bei 50 % und 100 % Konfluenz (d-2) und am Tag 0, 1 und 2 der Adipogenese, isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde eine quantitative Echtzeit-PCR mit Primerpaaren für die 112S- und p12S-LOX und die e-LOX-3 und 12R-LOX durchgeführt. Zur Normalisierung der ermittelten Kopienzahl der verschiedenen LOX-Isoformen wurde gleichzeitig die Kopienzahl des konstitutiv exprimierten Gens TBP (TATA-Box-bindendes Protein) ermittelt.

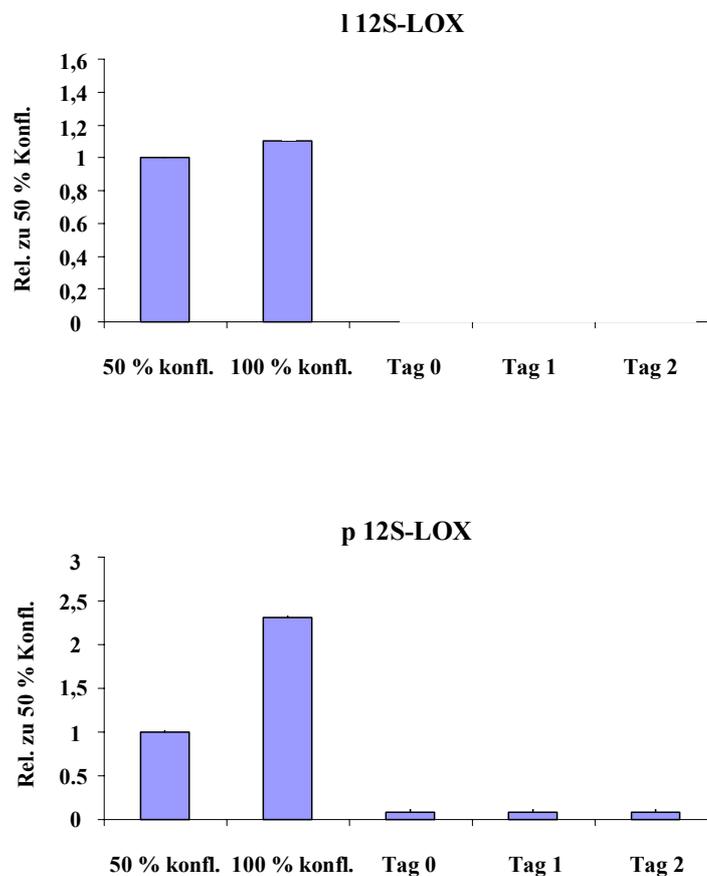


Abb. 32 mRNA-Expression der Leukozyten- und Blutblättchen-Typ 12S-Lipoxygenase in 3T3-L1-Zellen vor und während der Differenzierung. Gezeigt ist das Ergebnis der RT-PCR Analyse.

Durch quantitative Real-Time PCR wurde die mRNA Kopienzahl der 112S-LOX (oberes Bild) und der p12S-LOX (unteres Bild) ermittelt und wie im Kap. 4.1.2.2 beschrieben mit Hilfe der gleichzeitig bestimmten TBP-Kopienzahl normalisiert. Gezeigt ist die relative Änderung der normalisierten Kopienzahlen in Bezug auf den Zeitpunkt bei 50 % Konfluenz.

Abbildung 32 zeigt die relativen RNA-Spiegel der Leukozyten- und der Blutplättchen-Typ 12S-Lipoxygenase. Die Expression beider Lipoxygenasen erfolgte in 50 und 100 % konfluenten Zellen und war am Beginn der Differenzierung reduziert. Während die Expression der 112S-LOX in 50 und 100 % konfluenten Zellen konstant bleibt, war der Spiegel der p12S-LOX als einzige der untersuchten Lipoxygenasen bei 100 % im Vergleich zu 50 % Konfluenz um das 2,5-fache erhöht. Im Verlauf der Differenzierung von Tag 0 bis 2 war keine 112S-LOX und nur eine minimale Expression der p12S-LOX zu beobachten.

Die e-LOX-3 und 12R-LOX (Abb. 33) wurden beide in 50 % konfluenten Zellen exprimiert. Der Spiegel der 12R-LOX war in 100 % konfluenten Zellen deutlich reduziert und im Verlauf der Differenzierung nicht mehr zu beobachten. Die e-LOX-3 dagegen zeigte eine leichte Erhöhung der Expression bei 100 % Konfluenz und konnte als einzige der untersuchten Lipoxygenasen in differenzierenden Präadipozyten (Tag 0) nachgewiesen werden.

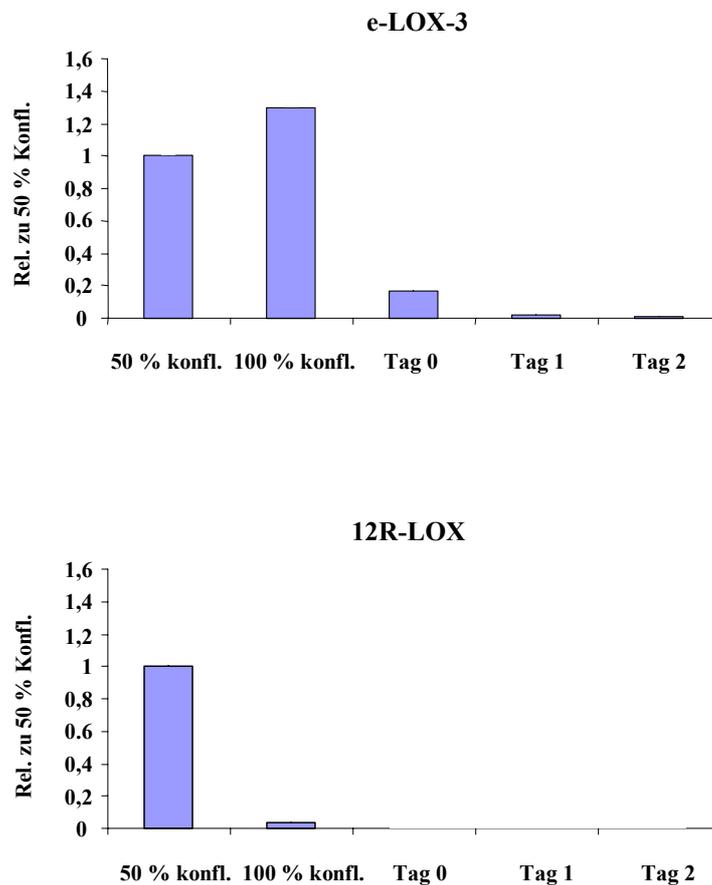


Abb. 33 mRNA-Expression der e-LOX-3 und der 12R-LOX in 3T3-L1-Zellen vor und während der Differenzierung. Gezeigt ist das Ergebnis der RT-PCR Analyse.

Durch quantitative Real-Time PCR wurde die mRNA Kopienzahl der e-LOX-3 (oberes Bild) und der 12R-LOX (unteres Bild) ermittelt und wie im Kap. 4.1.2.2 beschrieben mit Hilfe der gleichzeitig bestimmten TBP-Kopienzahl normalisiert. Gezeigt ist die relative Änderung der normalisierten Kopienzahlen in Bezug auf den Zeitpunkt bei 50 % Konfluenz.

5.3.3.2 Proteinanalyse der Lipoxygenasen in 3T3-L1-Zellen

Zur Einschätzung der Rolle der e-LOX-3 bei der Differenzierung wurde ihr Proteinspiegel vor und während der Adipogenese untersucht (Abb. 34, oben). Das e-LOX-3 Protein wurde schon vor Beginn der Differenzierung in 50 und 100 % konfluenten Präadipozyten gebildet und war vom Tag 0 bis zum Tag 4 der Differenzierung nachweisbar.

Da Blutplättchen- (p12S-LOX) und Leukozyten-Typ 12S-Lipoxygenase (l12S-LOX) Substratlieferanten für e-LOX-3 sind, wurde die Expression beider Lipoxygenasen vor der Differenzierung untersucht (Abb. 34, unten).

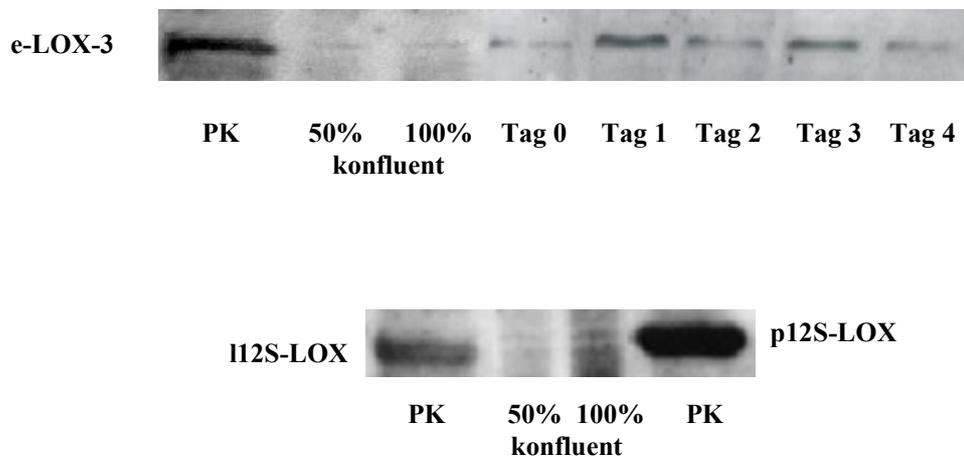


Abb. 34 Nachweis von Lipoxygenasen in 3T3-L1-Zellen vor und während der Differenzierung.

Nach Ernte und Lyse (Kap. 4.3.5) der Zellen bei 50 und 100 % Konfluenz und vom Tag 0 bis 4 der Differenzierung (Kap. 4.4.4) wurden die Lysate in einem SDS-Page Gel elektrophoretisch getrennt (Kap. 4.3.2) und dem Western- mit anschließendem Immunoblot unterzogen (Kap. 4.3.3 und 4.3.4); 1. Antikörper: Kaninchen anti-e-LOX-3 in der Verdünnung 1:5000 (oben) bzw. Kaninchen- anti-p12S-LOX in der Verdünnung 1: 6000 (unten); 2. Antikörper: Peroxidase konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG als 1:1000 Verdünnung; PK: Positivkontrolle der im HEK 293 System exprimierten, rekombinanten Protein der murinen e-LOX-3 (oben) bzw. der l12S- und p12S-LOX (unten)

In dem Immunoblot wurde neben den Proteinen aus 50 und 100 % konfluenten Präadipozyten rekombinante Leukozyten- und Blutplättchen-Typ-LOX als Positivkontrollen aufgetragen. Mit dem anti-p12S-LOX Antikörper ließ sich ein schwaches Signal der erwarteten Masse im Extrakt aus 100 % konfluenten 3T3-L1-Zellen nachweisen. Da sowohl die l12S- als auch die p12S-LOX sehr ähnliche Molekularmassen besitzen und der Antikörper unspezifisch auch die Leukozyten-Typ 12S-LOX markiert, konnte nicht zwischen den beiden Enzymen unterschieden werden. Beide Lipoxygenasen könnten demnach in diesen Zellen Substrate für e-LOX-3 bilden.

5.3.3.3 Proteinanalyse der Lipoxygenasen in Rb- defizienten Fibroblasten

Rb^{-/-} MEFs könnten durch ektopische Expression einer konstitutiv aktiven Version des Transkriptionsfaktors ADD-1, ADD-1R, zur Adipozytendifferenzierung stimuliert werden. Wie oben beschrieben, geschah dies durch Transduktion rekombinanter Retroviren, die einen effizienten Transfer des Transgens ermöglichten. Bei der ADD-1-vermittelten Differenzierung wurde offensichtlich die Synthese eines endogenen PPAR γ -Liganden induziert [Kim et al., 1998]. Versuche mit LOX-Inhibitoren ließen vermuten, daß es sich hierbei um ein Lipoxygenaseprodukt handelte. Das oben beschriebene LOX-Expressionsmuster wies die e-LOX-3 als besonders exprimierte LOX-Isoform in differenzierenden Adipozyten aus. Danach könnte der vermutete PPAR γ -Ligand ein e-LOX-3-Produkt sein. In der Tat konnte durch Transduktion von e-LOX-3-Retroviren in Rb^{-/-} MEFs die Differenzierung induziert werden [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung]. Im Folgenden wurde das Expressionsmuster der e-LOX-3 in den Rb^{-/-} MEFs am zweiten Tag der Differenzierung nach Stimulation durch ADD-1R und e-LOX-3 untersucht.

Die Untersuchung zeigte e-LOX-3 Protein in den Sedimenten der mit Vektor, ADD-1R und e-LOX-3 transduzierten Zellen, nicht jedoch in den 10.000 x g Überständen. Erwartungsgemäß war die Menge von e-LOX-3 in den mit e-LOX-3-Viren transduzierten Zellen am höchsten.

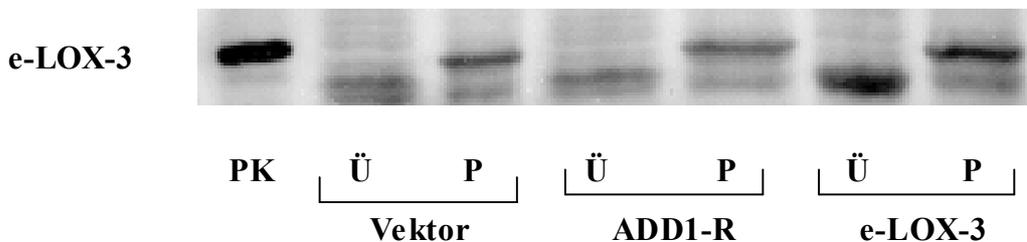


Abb. 35 Nachweis der e-LOX-3 in Vektor-, ADD-1R- oder e-LOX-3-transduzierten Rb^{-/-}MEF am zweiten Tag der Differenzierung (d 2).

Nach Ernte, Homogenisierung und Zentrifugation der Proben wurde der 10.000 x g Überstand (Ü) und das entsprechende Präzipitat (P) der jeweiligen, transduzierten Zellen im SDS-Page Gel elektrophoretisch getrennt (Kap. 4.3.2) und dem Western- mit anschließendem Immunoblot unterzogen (Kap. 4.3.3 und 4.3.4); 1. Antikörper: Kaninchen anti-e-LOX-3 in der Verdünnung 1:5000; 2. Antikörper: Peroxidase konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG als 1:1000 Verdünnung; PK: Positivkontrolle des im HEK 293 System exprimierten, rekombinaten Proteins der murinen e-LOX-3

Das mit ADD-1R zur Differenzierung stimulierte Zellsystem bat dadurch eine Basis für weitere mechanistische Untersuchungen, insbesondere der Rolle von e-LOX-3.

5.3.4 Suche nach e-LOX-3 Produkten in konditionierten Medien differenzierender Adipozyten

Differenzierende Adipozyten sekretieren einen löslichen Faktor, der die Differenzierung von Präadipozyten stimulieren kann [Kim et al., 1998]. Experimentell konnte dies dadurch belegt werden, daß, wie in Abb. 36 skizziert, Mediumüberstände aus differenzierenden MEFs auf 3T3-L1-Zellen übertragen wurden. Konditioniertes Medium von Kulturen mit ADD1-R-transduzierter Zellen zeigte hierbei eine differenzierungsstimulierende Wirkung, während das Medium der Vektor-transduzierten Zellen nur eine ganz geringe induktive Aktivität aufwies.

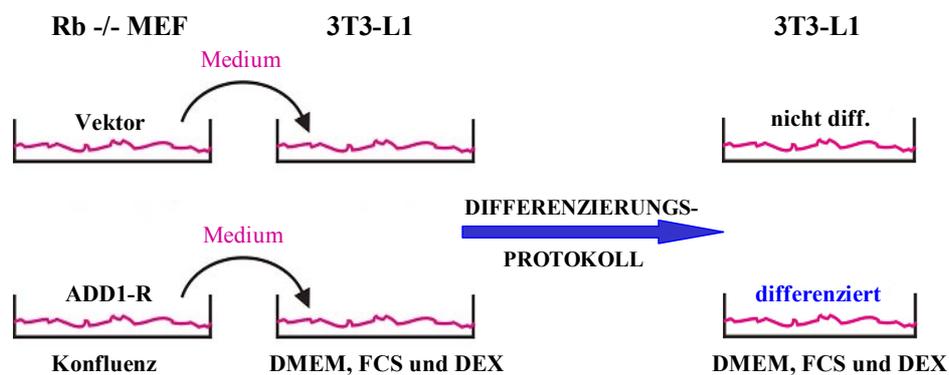


Abb. 36 Schema der Induktion der Differenzierung in 3T3-L1-Zellen durch Applikation des konditionierten Zellmediums aus konfluenten, ADD1-R transduzierten Zellen.

Im Folgenden wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich bei dem sekretierten Faktor um den durch ADD-1 induzierten PPAR γ -Liganden handelte. Wie oben ausgeführt, sprachen mehrere Indizien dafür, daß dieser Faktor ein Metabolit der e-LOX-3 darstellte.

Ziel der folgenden Untersuchung war daher, einen Lipidfaktor aus den konditionierten Mediumüberständen zu isolieren und als mögliches e-LOX-3-Produkt zu identifizieren.

Hierzu wurden Rb $^{-/-}$ MEFs mit dem Vektor als Negativkontrolle oder ADD1-R transduziert und nach verschiedenen Zeiten die Lipide aus dem Zellmedium nach einem modifizierten Verfahren von Bligh&Dyer (Kap. 4.3.11.3) extrahiert. Deutliche Unterschiede zeigten sich am Tag 2 der Differenzierung. Die Lipidextrakte aus den ADD-1R-transduzierten Mediumüberständen wurden über die RP-HPLC aufgetrennt und in drei Fraktionen gesammelt. Diese wurden für einen In-vitro-Differenzierungstest zu der Arbeitsgruppe von Prof. Kristiansen, Odense, verschickt. Eine deutliche Stimulierung der Adipozyten-differenzierung konnte mit der ersten Lipidfraktion (Retentionszeiten: 5-13 min, RP-HPLC-Laufmittelsystem: MeOH:H₂O:AcOH im Verhältnis 86:14:0,01) im Differenzierungstest erzielt werden [R. Petersen, persönliche Mitteilung].

5.3.4.1 Lipidextraktion aus Medien der Rb-/- Präadipozyten

Zur gezielten Suche nach e-LOX-3 Produkten in den konditionierten Medien wurden die Lipidextrakte aus Überständen Vektor- und ADD-1R-transduzierter Zellen einer vergleichenden RP-HPLC-Analyse unterzogen.

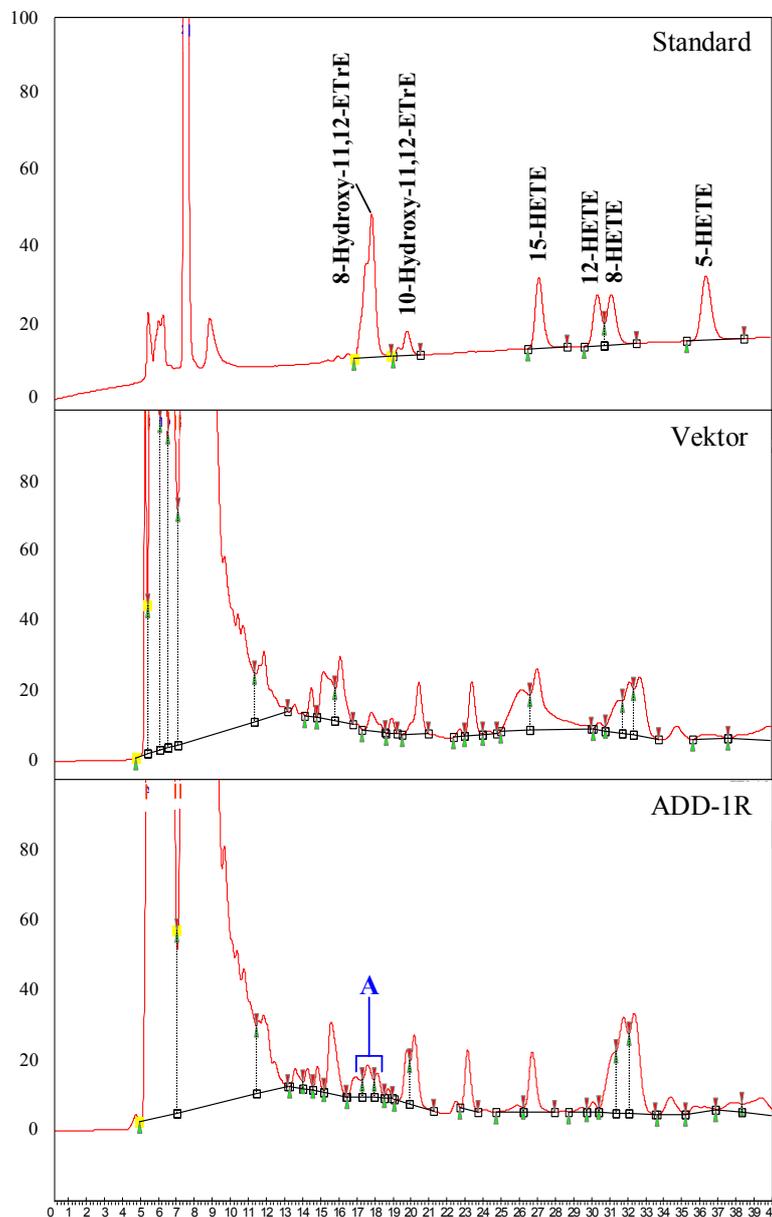


Abb. 37 RP-HPLC der Lipidextrakte aus Überständen Vektor- und ADD-1R-transduzierter Rb-/- MEFs.

Laufmittelverteilung: Methanol, Wasser, Essigsäure (82:18:0,01); x-Achse: Retentionszeit [min]; y-Achse: Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm [mAU]

Gezeigt sind der Lauf der authentischen Standards 8-Hydroxy- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäuren (Hydroxy-EtrE) und der 15-, 12-, 8- und 5-Hydroxy-eicosatetraensäuren (HETE) (oben), der Lauf des Lipidextrakts aus Vektor transduzierten Rb-/-Zellen (mittig) und der Lauf des Lipidextrakts aus ADD1-R transduzierten Rb-/- Zellen (unten)

A: isolierte, mit Hydroxy-EtrE Standards koeluiierende Fraktion A

Bei der für die Detektion von Epoxyalkoholen verwendeten Wellenlänge von 205 nm zeigten sich Unterschiede im Lipidspektrum beider Medienextrakte (Abb. 37). In Extrakten aus ADD-1R-transduzierten Zellüberständen konnten Produkte identifiziert werden (A in Abb. 37), die vergleichbare Retentionszeiten (16-18 min) wie die authentischen e-LOX-3 Produkte aufwiesen. Diese Fraktion wurde isoliert und massenspektrometrisch in Bezug auf die e-LOX-3-Produkte mit einer Molekülmasse von 336 untersucht.

Die Abbildung 39 zeigt das im Elektrospray-Massenspektrometer gemessene Spektrum der Fraktion A (ESI-MS) und das Negativionenspektrum des Fragments 335 (Tandem-MS/MS).

Zu beobachten war in diesem Spektrum die Wasserabspaltung ($M\ 335 - H_2O$) mit $m/z\ 317$ und die in Abbildung 38 aufgeführten, möglichen Fragmentationen der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure. Aufgrund der zu geringen Mengen konnte das Produkt jedoch nicht eindeutig identifiziert werden.

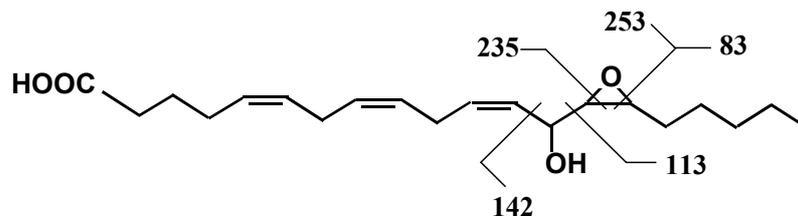


Abb. 38 Mögliche Fragmente der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure im Tandem-Massenspektrum

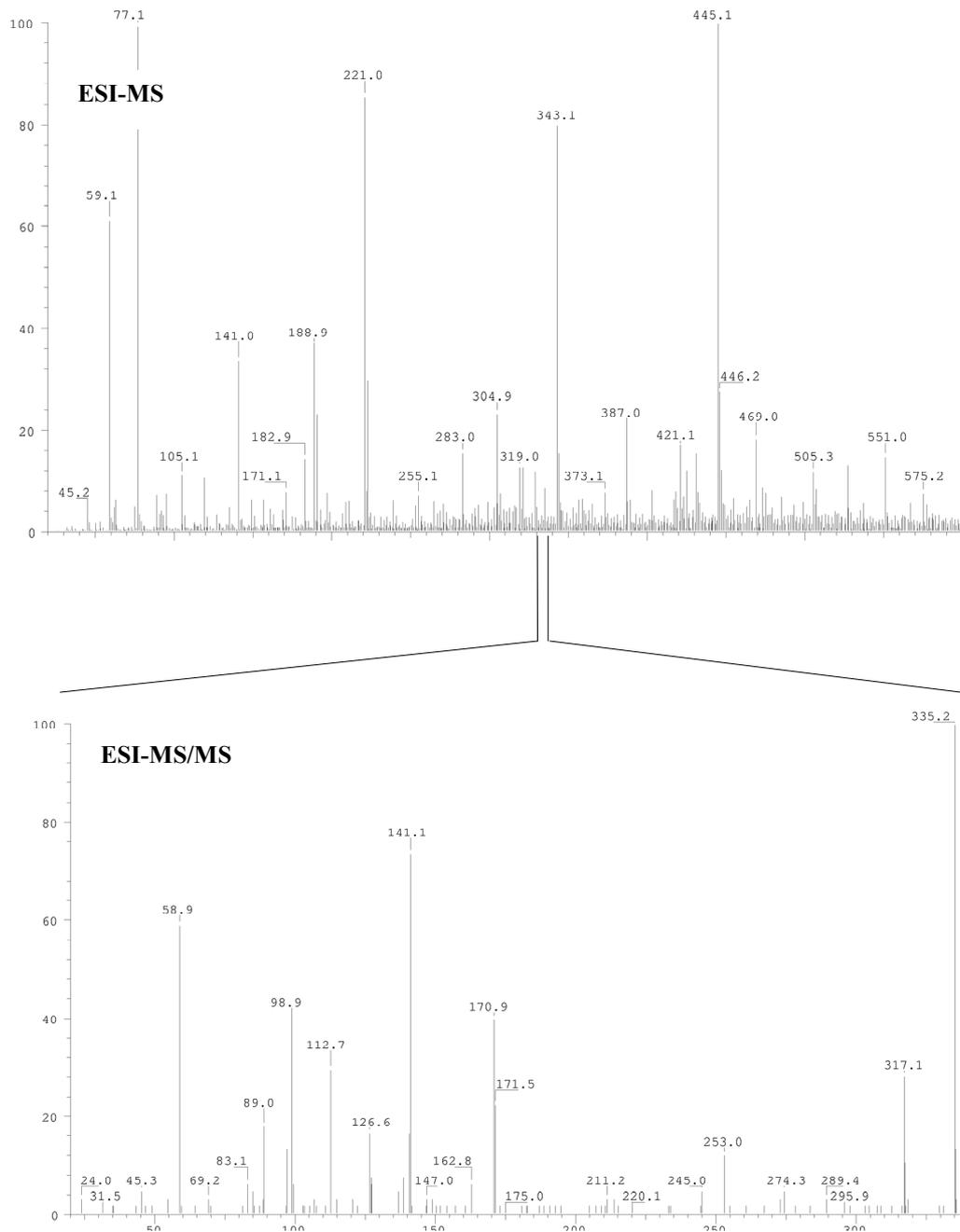


Abb. 39 ESI-Massenspektrum und Negativionen-Tandem-Massenspektrum der Molekularmasse 335 der Fraktion A. Gewonnen aus dem Lipidextrakt differenzierender Rb^{-/-} MEFs mit anschließender chromatographischer Trennung mit Hilfe der RP-HPLC (Kap. 4.3.12)

5.3.4.2 Identifizierung von Baicalein-sensitiven Lipidprodukten in Mediumübersänden von 3T3-L1-Zellen

Die Induktion der Adipozytendifferenzierung in 3T3-L1-Zellen war durch den Lipoxygenase-Inhibitor Baicalein hemmbar. Folglich zeigten die Mediumüberstände Baicalein-behandelter Zellen keine differenzierungsinduzierende Aktivität.

Zur Identifizierung von differenzierungsinduzierenden Lipoxygenaseprodukten wurden deshalb die Lipidmuster der Mediumüberstände von differenzierenden 3T3-L1- mit denen von Baicalein-behandelter 3T3-L1-Zellen verglichen.

Abb. 40 zeigt die RP-HPLC-Analyse der Zellüberstände am Tag 2 der Differenzierung.

Zwei Hauptprodukte A und B konnten in den Extrakten identifiziert werden. Das Produkt A besaß eine ähnliche Retentionszeit wie der Standard der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure (8-Hydroxy-11,12-EtrE), während das zweite Produkt eine Retentionszeit aufwies, die zwischen der von 8- und 10-Hydroxy-EtrE lag. Beide Produkte waren in der Baicalein-behandelten Probe in wesentlich geringerer Menge zu finden als in Extrakten aus unbehandelten Zellen.

Die Fraktionen mit den Produkten A und B wurden massenspektrometrisch weiter untersucht. Die Fraktion B enthielt keine bekannten e-LOX-3 Produkte (ohne Abbildung). Abb. 41 zeigt das Elektrospray- und Elektrospray-Tandem-Massenspektrum des Produktes A.

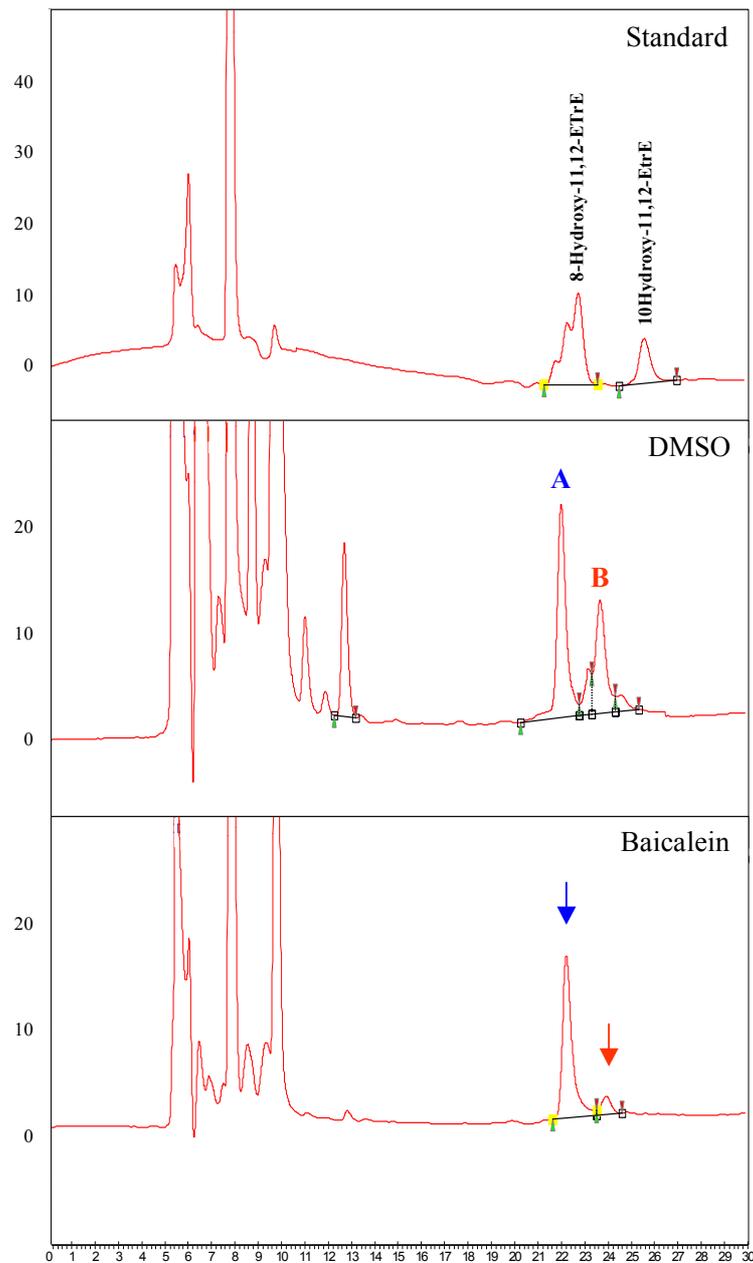


Abb. 40 Reversed-Phase HPLC von Lipidextrakten aus Überständen un behandelter und Baicalein-behandelter 3T3-L1-Zellen.

Laufmittelverteilung: Methanol, Wasser, Essigsäure (80:20:0,01); x-Achse: Retentionszeit [min]; y-Achse: Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm [mAU]

Gezeigt sind der Lauf der authentischen Standards 8-Hydroxy- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure (Hydroxy-EtrE) (oben), der Lauf des Lipidextrakts un behandelter 3T3-L1-Zellen vom zweiten Tag der Differenzierung (mittig) und der Lauf des Lipidextrakts der mit 30 µM Baicalein behandelte 3T3-L1-Zellen vom zweiten Tag der Differenzierung (unten)

A: isolierte, mit Hydroxy-EtrE Standards koeluiierende und Baicalein-sensitive Fraktion A

B: isolierte, zwischen den Hydroxy-EtrE Standards laufende und Baicalein-sensitive Fraktion B

Die Analyse des Ions mit der Masse 335 im Elektrospray-Tandem-Massenspektrometer ergab ein durch die Abspaltung von Wasser und CO₂ entstandenes Fragment mit m/z 273.

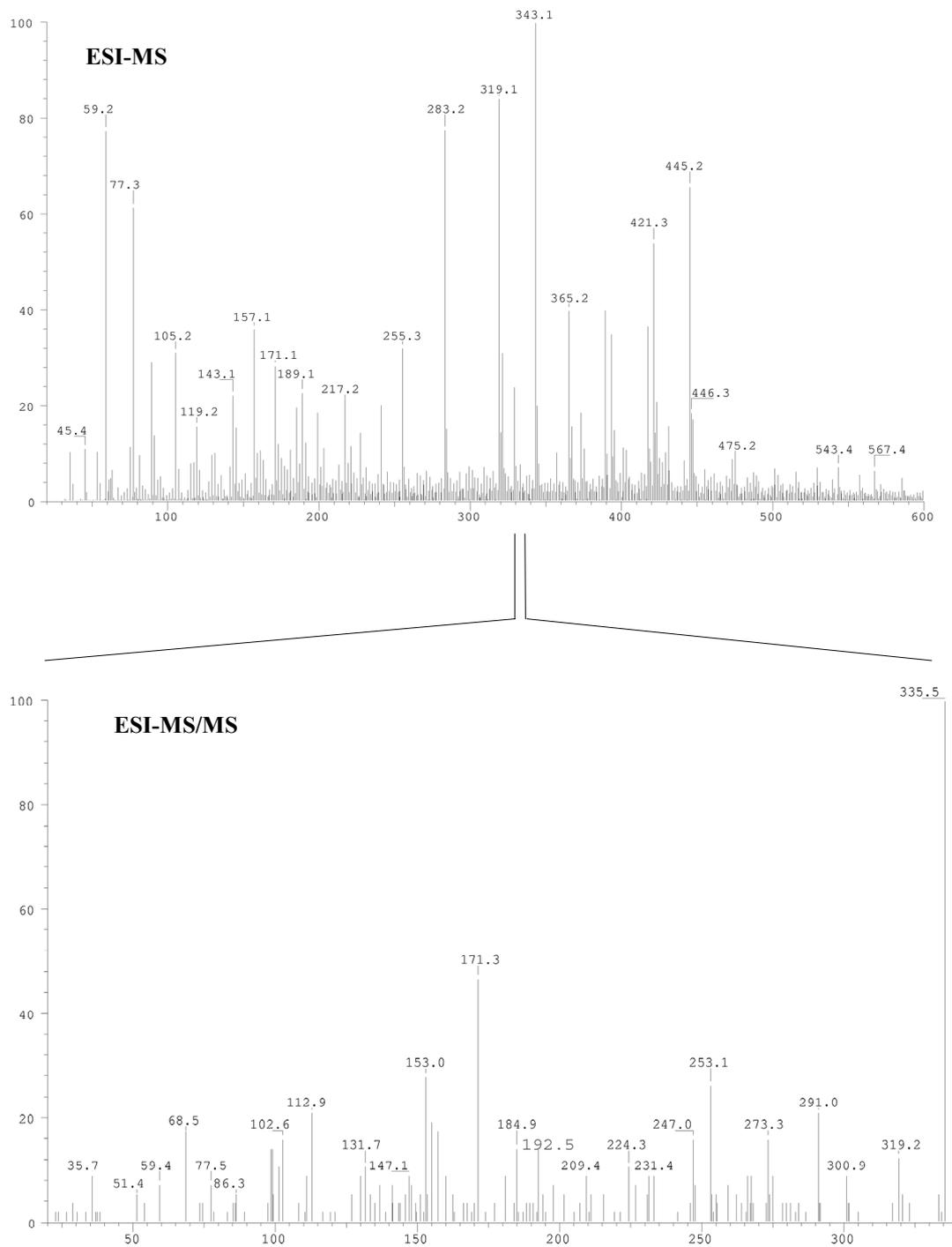


Abb. 41 ESI-Massenspektrum und Negativionen-Tandem-Massenspektrum der Molekularmasse 335 der Fraktion A. Gewonnen aus dem Lipidextrakt differenzierender 3T3-L1-Zellen mit anschließender chromatographischer Trennung mit Hilfe der RP-HPLC.

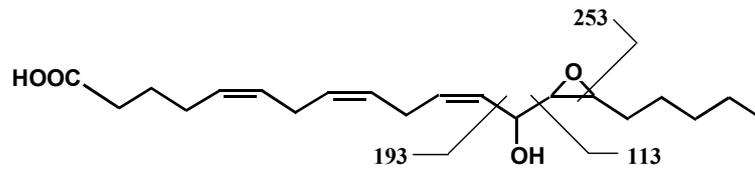


Abb. 42 Mögliche Fragmente der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure im Tandem-MS/MS Spektrum.

Weitere Fragmente mit m/z 193 und 113 könnten durch die α -Spaltung zur Hydroxylgruppe in dem möglichen Produkt der e-LOX-3, der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure gebildet worden sein (Abb.42). Das Fragmentation mit m/z 253 konnte durch den Bruch des Epoxidringes entstanden sein.

6 DISKUSSION

Umfangreiche Untersuchungen der konventionellen Lipoxygenasen zeigen die vielfältigen Funktionen dieser Enzymfamilie. Ihre Metabolite dienen als primäre oder sekundäre Mediatoren in Signalkaskaden innerhalb (endokrine Funktion) und außerhalb des Ursprunggewebes (parakrine Funktion) [Serhan, 1984]. Durch Peroxidierung von freien und veresterten Fettsäuren sind die Lipoxygenasen an zellulären Prozessen, wie z. B. der Retikulozyten- und Keratinozytenreifung, und an pathologischen Änderungen, wie arteriosklerotischen Läsionen, beteiligt [Brash, 1999].

Zur physiologischen Rolle der epidermalen Lipoxygenasen und ihrer Metabolite besteht dagegen großer Untersuchungsbedarf. Hautkrankheiten, die mit Störungen der epidermalen Differenzierung einhergehen, bringen diese Enzymfamilie in einem pathologischen Zusammenhang [Jobard et al., 2002]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß epidermale Lipoxygenasen die Krebsentstehung beeinflussen [Bürger et al., 1999; Müller et al., 2002].

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die nähere Charakterisierung der epidermalen Lipoxygenase 3 (e-LOX-3) im Vergleich zu anderen epidermalen Lipoxygenasen und Untersuchungen über ihre mögliche Rolle bei der Fettzeldifferenzierung.

6.1 Vergleich der Enzymaktivitäten epidermaler und konventioneller Lipoxygenasen

Zur Charakterisierung der epidermalen Lipoxygenasen wurde ihre enzymatischen Aktivitäten mit denen von konventionellen Enzymen verglichen. Die Aktivitätsmessungen ergaben, daß drei Vertreter der konventionellen Lipoxygenasen, die Kaninchen Retikulozyten-Typ 15S-, die Blutplättchen- und die Leukozyten-Typ 12S-LOX, zu den aktivsten Enzymen der LOX-Familie gehören. In der chromatographischen Analyse wurde erwartungsgemäß als Hauptprodukt der 15S-LOX 15-HETE und beider 12S-Lipoxygenasen 12-HETE nachgewiesen. Im Vergleich dazu war die enzymatische Aktivität der menschlichen 5S-LOX deutlich geringer.

Die orthologen Isoformen, die menschliche 15-S-LOX-2 und die murine 8S-LOX, zeigten eine mit der 5S-LOX vergleichbare Enzymaktivität.

Dagegen waren die menschliche und murine 12R- und e-LOX-3 und die murine e12S-LOX mit Arachidonsäure als Substrat sehr wenig oder gar nicht aktiv. Möglicherweise bevorzugen diese Enzyme andere, noch nicht identifizierte Substrate.

In der Tat war mit Arachidonsäuremethylester als Substrat eine erhöhte Aktivität der murinen 12R-LOX zu beobachten. Als Produkt entstand neben dem 12(R)-HETE Methylester auch die entsprechende 12(R)-HETE, die aufgrund lipolytischer Aktivitäten in den HEK 293-Zellen gebildet wurde [Krieg et al., 1999]. Möglicherweise könnten weitaus komplexere Lipide Substrate der 12R-LOX darstellen. Untersuchungen an menschlicher und muriner e-LOX-3 konnten frühere Beobachtungen bestätigen: mit keinem der bekannten LOX-Substrate, wie Arachidonsäure, Linolsäure und deren Methylestern, oder mit komplexeren Lipiden, wie Phosphatidylcholin, zeigte diese Lipoxygenase eine Enzymaktivität.

6.2 Massenspektrometrische Identifizierung epidermaler Lipoxygenasen

Während für die enzymatische Charakterisierung in HEK-Zellen exprimierte Lipoxygenasen eingesetzt wurden, erfolgte die Aufreinigung der Enzyme aus bakteriell exprimierten Proteinen. Dazu wurde mit dem pQE-Vektor ein induzierbares System gewählt, in dem N-terminal mit einem His₆-Tag versehene Fusionsproteine in hoher Ausbeute hergestellt werden konnten. Die Lipoxygenaseexpression wurde durch IPTG-Gabe induziert, die die Repression des T5-Promotors im pQE-Vektor durch das im Wirtstamm konstitutiv exprimierte lac-Repressorprotein aufhob. Nach Aufschluß der Bakterien und differenzieller Zentrifugation der Lysate wurde eine unterschiedliche Verteilung der Lipoxygenasen zwischen Überstand und Sediment beobachtet. So fand sich das m 8S-LOX Protein überwiegend in der löslichen Fraktion. Diese Beobachtung bestätigt Untersuchungen mit einem GFP-Fusionsprotein der m 8S-LOX, in denen das Protein überwiegend im Zytosol gefunden wurde [Siebert, 2002]. Dagegen waren die e12S-, 12R- und e-LOX-3 Proteine hauptsächlich im Sediment nachweisbar. Die Sedimentierung kann vermutlich auf eine Interaktion dieser Proteine mit Membranen zurückgeführt werden. Für die 5S-LOX wurde in der Tat gezeigt, daß dieses Enzym sowohl zytosolisch als auch membrangebunden vorliegen kann und die Translokation vom Zytoplasma an die Kernmembran mit einer Erhöhung des zytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels einhergeht [Rouzer et al., 1988]. Auch in Untersuchungen epidermaler Lipoxygenasen wurden Hinweise auf Wechselwirkungen mit Membranen gefunden. So wurden GFP-Fusionsproteine der 12R- und der e-LOX-3 in kernnahen Bereichen transfizierter HEK-Zellen beobachtet [Müller, 2002]. Für die weitere Reinigung der mit His₆-gekoppelten Fusionsproteine wurde die Nickel-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Die so angereicherten Proteinfractionen wurden für die massenspektrometrische Charakterisierung eingesetzt.

Die spezifische Aktivität der 8S-LOX nahm bei der Aufreinigung deutlich zu, wurde also durch die aufreinigungsbedingte, hohe Salz- und Imidazolkonzentration nicht wesentlich gestört. Die massenspektrometrische Analyse der nach Trypsinspaltung der murinen 8S-Lipoxygenase erhaltenen Proteinfragmente identifizierten das aufgereinigte Protein eindeutig als 8S-LOX.

Auch die analog aufgereinigten e12S-LOX, 12R-LOX und e-LOX-3 konnten aufgrund isoenzymspezifischer Peptidfragmentierungsmuster eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden. Damit liegen die ersten massenspektrometrischen Daten zur Identifizierung von LOX-Proteinen vor. Wie erwartet, sind die bakteriell exprimierten Proteine nicht posttranslational modifiziert. Die hochangereicherten LOX-Isoenzyme, mit Ausnahme der e-LOX-3, zeigen bei Inkubation mit Arachidonsäure, Arachidonsäure- und Linolsäuremethylester enzymatische Aktivität. Dies weist darauf hin, daß posttranslationale Modifikationen keine notwendige Bedingung für die Enzymaktivität von LOX-Enzymen darstellen.

6.3 Enzymatische Untersuchung der e-LOX-3

Für epidermale Lipoxygenase 3 waren zu Beginn der Arbeit keine Substrate. Hauptsächlich in stratifizierenden Epithelien, wie der menschlichen und murinen Haut exprimiert, zeigt dieses Enzym ein ähnliches Expressionsmuster wie die 12R-LOX [Krieg et al., 2001]. Ein Zusammenhang zwischen den enzymatischen Aktivitäten der 12R- und der e-LOX-3 wurde auch aus Untersuchungen über eine Form der autosomal rezessiven, kongenitalen Ichthyose postuliert. Basierend auf genetischen Studien, in denen inaktivierende Mutationen in einem der beiden oder in beiden LOX zu einem vergleichbaren pathologischen Phänotyp führten, wurde gefolgert, daß das Produkt der einen LOX Substrat für die andere LOX sein könnte [Jobard et al., 2002]. Kürzlich wurde das Produkt der 12R-LOX, die 12R-Hydroperoxyeicosatetraensäure (12R-HPETE), als bevorzugtes Substrat der menschlichen e-LOX-3 nachgewiesen [Yu et al., 2003]. In dieser Studie war die e-LOX-3 aus einem bakterielle Expressionssystem gewonnen worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die menschliche e-LOX-3 in einem eukaryontischen System, das posttranslationale Modifikationen erlaubt, exprimiert und in Bezug auf ihre Substratspezifität untersucht. Diese Untersuchungen bestätigten, daß bei der Umsetzung von 15(S)-HPETE neben 15-HETE ein weiteres Produkt gebildet wird, dessen analytische und massenspektrometrische Daten mit den publizierten Daten übereinstimmten [Yu et al., 2003]. Danach ist das Hauptprodukt vermutlich identisch mit 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure.

Da die Molekülmasse ($M = 336 \text{ g/mol}$) und damit die Molekülionen im Massenspektrum des Substrats 15-HPETE und des Reaktionsproduktes identisch sind, mußte das Fragmentierungsmuster der Molekülionen für die Produktidentifizierung herangezogen werden. Als typische Ionen beider Fettsäuren im Negativionenspektrum gelten z. B. die carboxyterminalen Fragmente, die durch Spaltung in α -Position zur Hydroxylfunktion entstehen, mit m/z 219 für die 15-HPETE, m/z 193 für die 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure und m/z 167 für die 11-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure.

Eine Vergleichsmessung mit dem Substrat 15(S)-HPETE zeigte ein anderes Fragmentationenspektrum als das des gebildeten Produktes. Dieses Produkt scheint durch Umlagerung von 15(S)-HPETE entstanden zu sein. Über eine Umlagerung von 15-HPETE zu Epoxyalkoholen in Gegenwart von Cytochrom P450-Monooxygenasen wurde berichtet [Chang et al., 1996]. Mögliche, durch Isomerisierung von 15-HPETE gebildeten Produkte sind in Abb. 43 gezeigt.

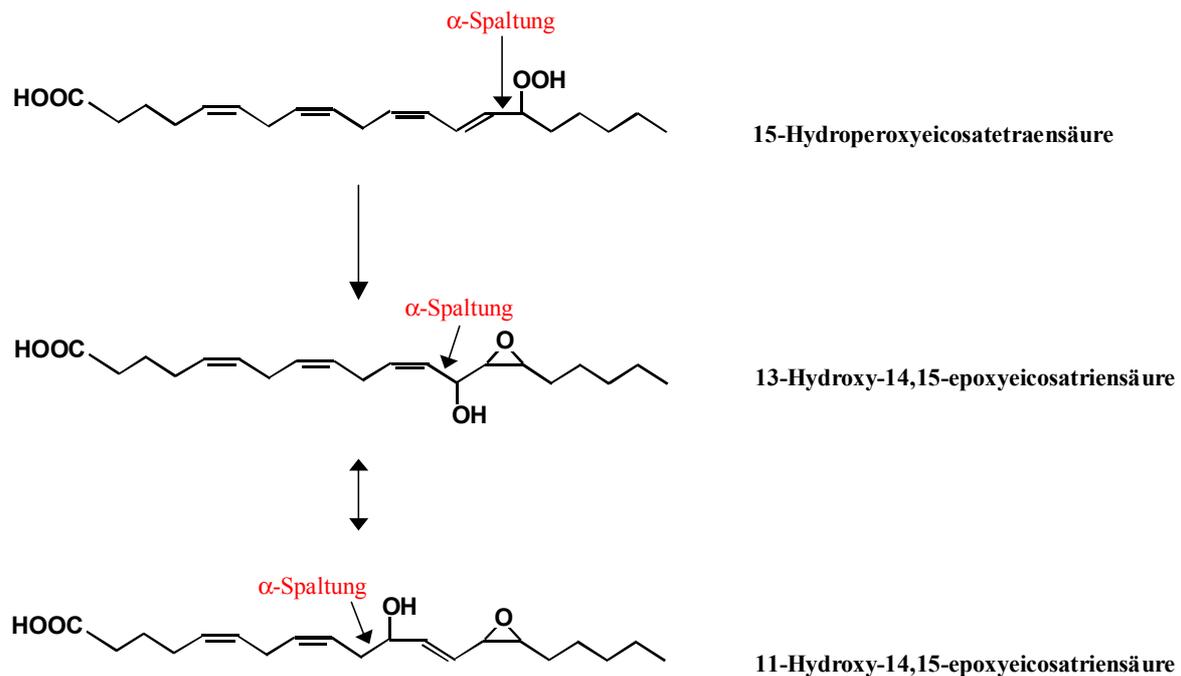


Abb. 43 Mögliche, durch enzymatische Umsetzung von 15-HPETE (oben) gebildeten Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (mittig, unten).

Mit racemischen 12(R,S)-HPETE als e-LOX-3 Substrat wurden vier Produkte erhalten, die bezüglich der analytischen und massenspektrometrischen Daten (Kap. 5.2.2) als 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure, 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure, 12-KETE und 12-HETE identifiziert wurden.

Eine Analyse der Stereokonfiguration konnte aufgrund der geringen Produktkonzentration nicht durchgeführt werden. Die Konfiguration der Produkte der e-LOX-3 Reaktion mit 12(S)- bzw. 12(R)-HPETE wurden von anderen Autoren aufgeklärt [Yu et al., 2003]. Bei der Umsetzung von 12R-HPETE mit e-LOX-3 wird 8R-Hydroxy-11R,12R-epoxyeicosatriensäure gebildet. Mit dem S-Enantiomer entstehen dagegen 8R-Hydroxy-11S,12S- und 10R-Hydroxy-11S,12S-epoxyeicosatriensäure.

Die Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der e-LOX-3, die hier mit rekombinatem Protein durchgeführt wurde, bestätigt die Befunde von Yu et al. [2003]. Die e-LOX-3 ist demnach eine Hydroperoxidisomerase.

Diese ungewöhnliche, für Lipoxygenasen untypische Aktivität der e-LOX-3 wirft die Frage nach dem Mechanismus dieser Reaktion auf. In dem gewöhnlichen Katalysezyklus von Lipoxygenasen stellt das Enzym in der Fe^{3+} -Oxidationsstufe die aktive Form dar, die ein Wasserstoffradikal von der bisallylischen Methylengruppe des Substrates abstrahiert. Nach antarafacialer Insertion von molekularem Sauerstoff wird das Hydroperoxid unter Reduktion des Fe^{3+} - zum Fe^{2+} - Ion freigesetzt (Abb. 2) [Kühn, 1999]. Die Initiation des LOX-Reaktionszyklus hängt kritisch von der Anwesenheit von Startermolekülen, in der Regel Fettsäurehydroperoxiden, ab, die die Oxidation des Fe^{2+} - zum Fe^{3+} -Ions auslösen. Antioxidantien, wie Nordihydroguarinsäure, hemmen die Initiation oder unterbrechen die LOX-Reaktion.

Im Gegensatz hierzu wird die Hydroperoxidisomerase-Aktivität der e-LOX-3 durch NDGA stimuliert [Yu et al., 2003]. Dies weist auf die Fe^{2+} -Form der e-LOX-3 als das katalytisch aktive Enzym hin. Daher schlagen Yu et al. [2003] folgendes Modell für die Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität vor (Abb. 44).

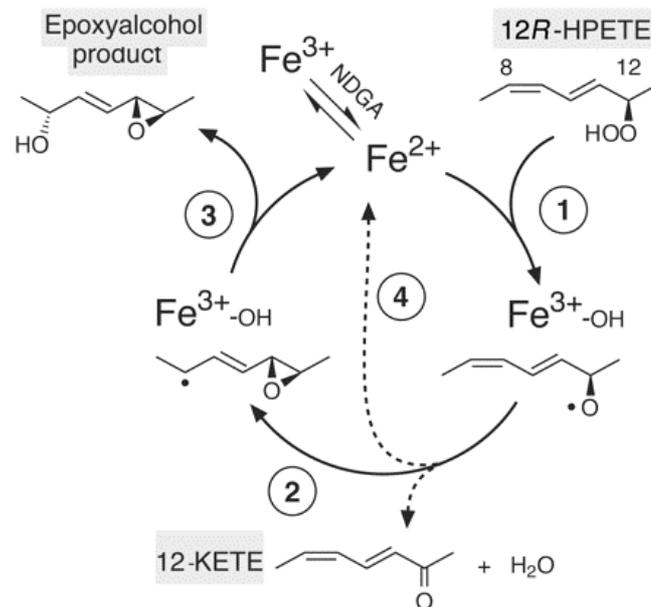


Abb. 44 Möglicher Mechanismus der e-LOX-3-Katalyse [Yu et al., 2003].

Die e-LOX-3 in der Fe^{2+} -Form spaltet die O-O-Bindung des Hydroperoxids homolytisch unter Bildung eines Alkoxyradikals (1). Dabei geht die Lipoxygenase in die Fe^{3+} -Form über, wobei der zweite Sauerstoff in einem Fe^{3+} -OH-Komplex gebunden wird. Im zweiten Schritt cyclisiert das Alkoxy- zu einem Epoxyradikal (2), auf das im dritten Schritt die Fe^{3+} -gebundene Hydroxylgruppe unter Bildung eines Epoxyalkohols übertragen wird. Dabei wird die Hydroxylgruppe entweder in α - oder γ -Position zum Epoxid eingeführt. Das Fe^{3+} -Ion wird wieder in die katalytisch aktive Fe^{2+} -Form zurückgeführt. Als Nebenprodukt entsteht durch Reduktion des Alkoxyradikals 12-KETE.

Diesem Modell folgend ist die *Reduktion* der Hydroperoxidgruppe durch Fe^{2+} das initiiierende und reaktionserhaltende Ereignis, während bei der klassischen LOX-Reaktion die *Oxidation* der ungesättigten Fettsäure den Reaktionszyklus einleitet und unterhält. Offenbar lässt der Redox-Zustand der e-LOX-3 die Bildung der Fe^{3+} -Form nicht zu und begünstigt so die Hydroperoxidisomerase-Aktivität [Yu et al., 2003].

Eine Pseudoperoxidaseaktivität wurde auch für die 5S-LOX in Gegenwart von effizienten LOX-Inhibitoren gezeigt. Die e-LOX-3-ähnliche Hydroperoxidspaltung der 13-Hydroperoxyoctadecadiensäure (13-HPODE) konnte aber nicht in Gegenwart schwächerer LOX-Inhibitoren, wie NDGA, beobachtet werden [Riendeau et al., 1991].

Über die biologische Aktivität der e-LOX-3-Produkte Reaktion ist wenig bekannt. Vermutlich handelt es sich um bioaktive Lipide, die direkt oder nach weiterer Metabolisierung biologische Effekte auslösen können.

Strukturell verwandte Hepoxiline spielen eine Rolle bei der Hautdifferenzierung durch Freisetzung von intrazellulärem Calcium [Yuspa et al., 1988] und verändern auch die vaskuläre Permeabilität in der Haut [Laneuville et al., 1991]. Sie gehören neben Stickstoffmonoxid [Furchgott et al., 1989] zu den aus dem Endothel gewonnenen Relaxationsfaktoren (EDRFs) [Pfister et al., 1998].

In jüngsten Untersuchungen wurde die e-LOX-3-Expression in 3T3-L1-Prädipozyten und im adipösen Gewebe nachgewiesen [Madsen et al., 2003]. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Rolle der e-LOX-3 und ihrer Produkte bei der Differenzierung von Prädipozyten zu Fettzellen, dem Hauptbestandteil des adipösen Gewebes. Folgendes Kapitel behandelt deshalb die molekularen Grundlagen der Adipogenese und die Rolle der e-LOX-3 bei diesem Prozeß.

6.4 Adipogenese und ihre transkriptionelle Regulation

Fehlregulationen in der Fettzellendifferenzierung (Adipogenese) können zur Fettleibigkeit und Lipotrophie führen, die mit kardiovaskulären Krankheiten und mit Diabetes in Verbindung stehen [Must et al., 1999]. Der weltweite, dramatische Anstieg der Fettleibigkeit und der Typ 2 Diabetes mellitus fordert daher ein detailliertes Verständnis der molekularen Mechanismen der Adipogenese.

Die Adipozytendifferenzierung ist ein komplexer Prozeß, der mit fein abgestimmten Veränderungen in Zellmorphologie und Genexpression einhergeht. Diese Veränderungen haben ihre Ursache in der koordinierten Aktion einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren.

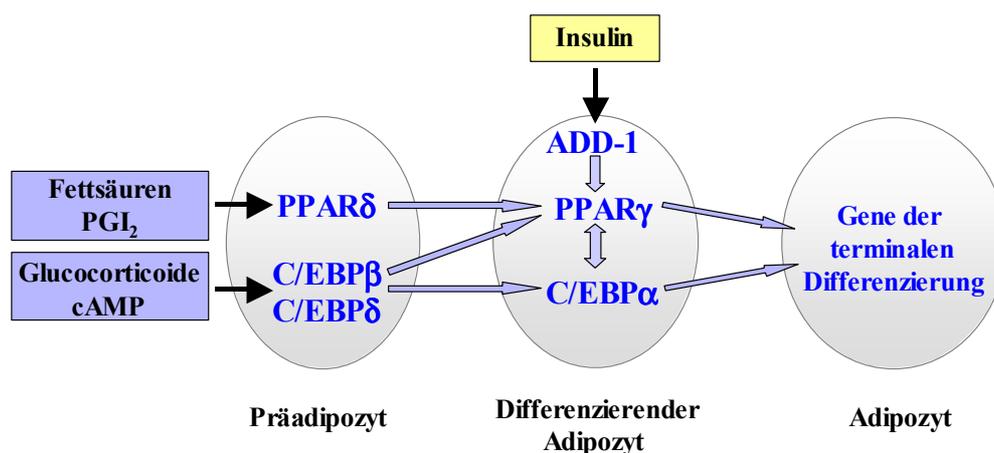


Abb. 45 Schematische Darstellung der transkriptionellen Kaskade bei der 3T3-L1-Prädipozyten-Differenzierung. Blaue Pfeile: transkriptionelle Aktivierung der Zielgene; schwarze Pfeile: externe Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren [Grimaldi, 2001]

In die Kategorien der frühen, intermediären und späten Marker der Differenzierung unterteilt, spielen die Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie zusammen mit PPAR γ und ADD-1/SREBP-1 eine Schlüsselrolle bei der Adipogenese [Rosen et al., 2000; Rangwala et al., 2000].

Als zwei zum frühen Zeitpunkt der Differenzierung exprimierte Transkriptionsfaktoren gelten C/EBP β und C/EBP δ . Beide Faktoren fördern die adipogene Umwandlung vermutlich über die Induktion von C/EBP α [Yeh et al., 1995] und PPAR γ [Wu et al., 1995 und 1996]. Der Verlust einer dieser Faktoren führt *in vivo* und *in vitro* zu Defekten in der Adipozytendifferenzierung [Yeh et al., 1995].

C/EBP α ist im adipösen Gewebe hochexprimiert [Cao et al., 1991]. Nach Stimulation der Präadipozyten mit adipogenen Hormonen erfolgt innerhalb weniger Tage die Induktion der C/EBP α -Expression. Überexpression dieses Faktors in 3T3-L1-Zellen fördert deren Differenzierung zu Fettzellen [Umek et al., 1991; Freytag et al., 1994; Lin et al., 1994], während eine Hemmung der Expression die Differenzierung vollständig unterdrückt [Samuelsson et al., 1991; Lin et al., 1992]. Zudem kann C/EBP α zahlreiche Gene der terminalen Fettzellendifferenzierung über C/EBP-Bindungsstellen aktivieren [Mac Douglad et al., 1994].

Eine Schlüsselrolle der späten Adipozytendifferenzierung nimmt der Transkriptionsfaktor PPAR γ ein. PPARs werden durch Liganden aktiviert. Sie gehören zur Familie der nuklearen Hormonrezeptoren. Als Heterodimere mit den Retinoid X Rezeptoren (RXRs) binden sie an PPAR-responsive Elemente (PPREs) in der Promotor/Enhancer Region von Genen. Der Faktor PPAR γ liegt in zwei Isoformen, PPAR γ 1 und PPAR γ 2, vor [Zhu et al., 1995]. PPAR γ 2 wird hauptsächlich in Fettzellen exprimiert und gilt als Adipozyten-spezifischer Marker. Die Aktivierung von PPAR γ ist notwendig und ausreichend, um in Zellkultur die Adipozytendifferenzierung zu stimulieren. Umgekehrt führt die Expression einer dominant negativen PPAR γ -Form zur Hemmung der Adipogenese [Kubota et al., 1999; Rosen et al., 1999]. Zusätzlich wird in solchen Zellen auch keine C/EBP α -Expression beobachtet. C/EBP α (-/-) Fibroblasten besitzen ihrerseits einen reduzierten PPAR γ -Spiegel [Wu et al., 1999], der durch Transduktion von C/EBP α wieder normalisiert werden kann.

C/EBP α und PPAR γ interagieren demnach synergistisch und halten ihre Expression aufrecht, wodurch die Zellen in das terminal-differenzierte Stadium unter Expression einer Vielzahl Adipozyten spezifischer Gene übergehen und in diesem Zustand verbleiben [Rosen et al., 2000].

Ein weiterer wichtiger Faktor der Fettzellendifferenzierung ist ADD-1/SREBP-1, ein Mitglied der Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren. ADD-1/SREBP-1 kontrolliert hauptsächlich die Expression der Gene des Cholesterinstoffwechsels über die Bindung an zwei unterschiedliche DNA-Elemente, die E-Box und die SREs (Sterol-regulierende Elemente). Dieser Faktor wird am endoplasmatischen Retikulum aus einem großen Vorläufermolekül proteolytisch abgespalten, bevor es als aktive Form in den Kern gelangt [Horton et al., 2002]. Eine forcierte ADD-1/SREBP-1-Expression außerhalb ihres normalen Expressionsgewebes ist zur Induktion einer Reihe von Genen des Fettstoffwechsels in Fibroblasten und in transgenen Tieren ausreichend. In hormonell stimulierten Zellen kann ADD-1/SREBP-1 die Adipozytendifferenzierung verstärken, indem es die Bildung eines endogenen Liganden für PPAR γ stimuliert.

Die Bedeutung dieses ADD-1/SREBP-1-Signalweges zeigt sich besonders in Retinoblastomdefizienten MEFs, bei denen die Differenzierung in der frühen Phase gehemmt ist. Dieser Defekt kann entweder durch direkte Aktivierung von PPAR γ mit einem synthetischen Liganden [Hansen et al., 1999], oder durch forcierte Expression von ADD-1/SREBP-1 aufgehoben werden [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung]. Bei dieser ADD-1/SREBP-1-induzierten Adipozytendifferenzierung wird ein endogener Faktor gebildet, der seinerseits die Differenzierung stimulieren kann [Kim et al., 1998].

Damit stellt sich die Frage nach der Natur des für die Adipozytendifferenzierung essentiellen PPAR γ -Liganden.

Als erster PPAR γ -Ligand mit hoher Affinität konnte ein Prostaglandin J₂-Derivat identifiziert werden [Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995]. In In-vitro-Versuchen wurde zudem eine Aktivierung von PPAR γ durch mikromolare Konzentrationen verschiedener Produkte des Cyclooxygenase- und Lipoxygenasestoffwechsels beschrieben. Unbekannt ist jedoch, ob einer dieser Aktivatoren auch bei der Adipozytendifferenzierung eine Rolle spielt.

Erste wichtige Hinweise auf die metabolische Herkunft des endogenen PPAR γ -Liganden kamen von Untersuchungen, die in Karsten Kristiansens Labor, Odense; in Zusammenarbeit mit unserer Gruppe durchgeführt wurden.

Diese Untersuchungen zeigten eine Hemmung der 3T3-L1-Adipozytendifferenzierung durch Inhibitoren des Lipoxygenasestoffwechsels, wie NDGA und Baicalein, aber nicht durch Inhibitoren von Cyclooxygenasen oder Cytochrom P450-Monooxygenasen. Die Hemmung konnte durch gleichzeitige Gabe synthetischer PPAR γ -Liganden, wie Rosiglitazon, wieder aufgehoben werden.

Die ersten vier Tage des Differenzierungsprozesses erwiesen sich hierbei als kritisches Zeitintervall. Während dieses Zeitraums wird, wie ein PPAR γ -Transaktivierungstest zeigt, eine allgemeine Akkumulation endogener PPAR γ -Liganden beobachtet [Madsen et al., 2003]. Auch können nur in diesem Zeitfenster exogene PPAR γ -Liganden die Differenzierungshemmung durch LOX-Inhibitoren aufheben.

Aus diesen Beobachtungen resultiert die Frage, welche Lipoxygenasen eine Rolle bei dem Differenzierungsprozeß in Adipozyten spielen.

In Adipozyten des weißen und braunen Fettgewebes konnte auf RNA-Ebene durch RT-PCR die Expression dreier Lipoxygenasen nachgewiesen werden, der p12S-LOX, der 112S-LOX und der e-LOX-3 [Madsen et al., 2003]. In differenzierenden 3T3-L1-Zellen wurden dagegen nur e-LOX-3 gefunden. Auch in der vorliegenden Arbeit war e-LOX-3 die einzige, zum Beginn der Differenzierung exprimierte Lipoxygenase. Ihr Protein wurde von Tag 0 bis 4 der Adipogenese beobachtet. Eine starke Expression der e-LOX-3 konnte auch in durch ADD-1/SREBP-1 zur Differenzierung stimulierten Rb^{-/-} MEFs dokumentiert werden. Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle der e-LOX-3 bei der Adipozytendifferenzierung.

Folgende Experimente stützen diese Vermutung [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung]. So kann durch Transduktion mit rekombinanten Viren induzierte Expression der e-LOX-3 ebenso wie eine Expression von ADD-1/SREBP-1 die Adipozytendifferenzierung von Rb^{-/-} MEFs stimulieren. Die durch e-LOX-3 induzierte Differenzierung wird durch Baicalein gehemmt und durch einen PPAR γ -Agonisten wieder hergestellt. Wird die e-LOX-3-Expression durch Transduktion viraler Antisense-Konstrukte unterdrückt, kommt es zu einer vollständigen Hemmung der Differenzierung. Zusammengenommen belegen diese Beobachtungen eine essentielle Rolle der e-LOX-3 bei der Adipozytendifferenzierung.

Wie bereits erwähnt, verwertet die e-LOX-3 die Produkte anderer Lipoxygenasen, die HPETEs. Im Zusammenhang mit der Adipozytendifferenzierung stellt sich somit die Frage nach den Substraten und Produkten der e-LOX-3 und der Lipoxygenasen, welche die Substrate für die e-LOX-3 bereitstellen.

Messungen der mRNA- und der Proteinspiegel anderer Lipoxygenasen vor Beginn der Differenzierung zeigten eine 2,5-fach erhöhte Expression der Blutplättchen-Typ 12S-LOX und eine geringe Expression der Leukozyten-Typ 12S-LOX, während andere Isoformen, wie die 12R-LOX, nicht in konfluenten Präadipozyten nachgewiesen werden konnten.

Die Westernblot-Analyse der Expression auf Proteinebene zeigte in 50 und 100 % konfluenten Zellen eine Bande mit dem Blutplättchen-Typ 12S-LOX Antikörper. Aufgrund der geringen Spezifität dieses Antikörper kann sie beiden 12S-Lipoxygenasen zugeordnet werden. Die Blutplättchen-Typ 12S-LOX kann molekularen Sauerstoff nicht nur in 12-, sondern auch in 8-Position der Arachidonsäure unter Bildung von 12(S)- und 8(R)-HPETE einbauen [Bürger et al., 2000]. Leukozyten-Typ 12S-LOX bildet aus Arachidonsäure 12(S)- und 15(S)-HPETE. Diese Produkte der beiden 12S-Lipoxygenasen kommen somit als Substrate für e-LOX-3 in Frage.

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Versuche zur Isolierung eines e-LOX-3-Produktes unternommen, der als PPAR γ -Ligand bei der Fettzellendifferenzierung eine zentrale Rolle zu spielen scheint. In früheren Untersuchungen wurde ein Faktor aus Überständen differenzierender Adipozyten isoliert, der als PPAR γ -Ligand differenzierungsinduzierend wirkte, aber nicht mehr charakterisiert wurde [Kim et al., 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, einen solchen Faktor als mögliches e-LOX-3 Produkt zu identifizieren. Aus Lipidextrakten von Zellüberständen differenzierender Rb-/- MEFs wurden Produkte erhalten, die bei der Analyse durch RP-HPLC ähnliche Charakteristika aufwiesen wie die Epoxyalkoholprodukte der e-LOX-3.

Die zwei isolierten Produkte koeluierten mit 8- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure. Die massenspektrometrische Untersuchung dieser Produkte wies im Negativionenspektrum ein Molekulation mit m/z 335 auf, das Epoxyalkoholen entsprechen könnte. Die weitere Fragmentierung dieses Ions zeigte Wasserabspaltungen, die auf eine hydroxylierte Fettsäure hinwiesen. Unterstützend wurden Lipidextrakte unbehandelter und Baicalein-behandelter 3T3-L1-Zellen chromatographisch analysiert. Die Analyse wies Baicalein-sensitive Signale mit vergleichbaren Retentionszeiten, wie die der Epoxyalkoholstandards auf. Daher kann angenommen werden, daß solche Produkte Liganden für PPAR γ darstellen.

In Transaktivierungstests konnte in der Tat gezeigt werden, daß 8- und 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure PPAR γ in mikromolaren Mengen aktivieren können [C. Jørgensen, persönliche Mitteilung].

Im Rahmen dieser Arbeit und in Kooperation mit dem Labor von Prof. Kristiansen, Odense, wurden Evidenzen zusammengetragen, daß die e-LOX-3 und ihre Produkte vom Typ der Epoxyalkohole essentielle Faktoren der Fettzellendifferenzierung darstellen können. Die endgültige Identifizierung der Lipide, die via Aktivierung von PPAR γ für die terminalen Schritte der Fettzellendifferenzierung verantwortlich sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in einer vergleichenden Charakterisierung von Epidermis-Typ Lipoxygenasen und Untersuchungen zur Rolle der epidermalen Lipoxygenase 3 (e-LOX-3) bei der Fettzellendifferenzierung.

1. Die enzymatische Aktivität der e-LOX-3 wurde mit der konventioneller und epidermaler Lipoxygenasen verglichen, die in HEK 293-Zellen exprimiert worden waren. Während für die epidermalen Enzyme im Vergleich zu konventionellen Isoenzymen geringe Enzymaktivitäten mit bekannten Lipoxygenasesubstraten nachgewiesen werden konnten, war die e-LOX-3 inaktiv. Jüngste Befunde, wonach e-LOX-3 eine Hydroperoxid-isomerase ist, wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In eukaryotischen Zellen exprimiertes e-LOX-3 Protein, das nach massenspektrometrischer Analyse nicht posttranslational modifiziert ist, metabolisierte 12(R)-HPETE und 15(S)-HPETE zu Epoxyalkoholen, die durch HPLC und Massenspektrometrie identifiziert wurden.
2. Der e-LOX-3 und ihren Produkten scheint eine kritische Rolle bei der Fettzellendifferenzierung zuzukommen. In der Studie wurden zwei Modellsysteme der Adipogenese, nämlich 3T3-L1-Zellen und die Retinoblastom-defizienten MEFs, deren Hemmung durch Transduktion des Transkriptionsfaktors ADD-1 aufgehoben werden konnte, verwendet. Dem Transkriptionsfaktor ADD-1 wird eine Rolle bei der Kontrolle der Synthese eines Liganden für PPAR γ , einem Schlüsselfaktor der späten Fettzellendifferenzierung, zugesprochen. Die Bildung dieses Faktors, der in das Medium abgegeben wird, kann durch LOX-Inhibitoren unterdrückt werden. Als einzige Lipoxygenase, die in beiden Zelllinien während der Adipogenese exprimiert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit die e-LOX-3 als Protein nachgewiesen und Produkte der e-LOX-3 mit hoher Wahrscheinlichkeit als Epoxyalkohole identifiziert werden. In der Tat wurden in Lipidextrakten aus den Medien ADD-1 induzierter Rb $^{-/-}$ MEFs Lipide isoliert, die den von e-LOX-3 gebildeten Epoxyalkoholen nach analytischen und massenspektrometrischen Befunden sehr ähnlich waren. Die entsprechenden Produkte konnten auch in 3T3-L1-Zellen nachgewiesen werden und erwiesen sich zudem als Baicalein-sensitiv. Diese Ergebnisse weisen die e-LOX-3 Produkte als mögliche, physiologische Liganden des Transkriptionsfaktors PPAR γ aus, dem eine essentielle Rolle bei der Fettzellendifferenzierung zukommt. Damit wurden erstmalig Evidenzen für eine physiologische Funktion der e-LOX-3 und ihrer Produkte erhalten.

8 AUSBLICK

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit begonnene, strukturelle Charakterisierung eines e-LOX-3-Produktes als endogener PPAR γ -Ligand sollte durch weitere Analysen vervollständig werden. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage nach der Regulation der e-LOX-3-Expression und die Rolle des Transkriptionsfaktor ADD-1. In Anbetracht der Tatsache, daß LOX-Produkte Substrate der e-LOX-3 Reaktion sind, ist es wünschenswert, die dafür verantwortlichen LOX zu identifizieren und ihre Regulation zu klären.

Die essentielle Bedeutung der e-LOX-3 und ihrer Produkte bei der Fettzellendifferenzierung stellt diese LOX als mögliches Zielenzym dar, um Fehlfunktionen der Bildung des adipösen Gewebes, wie bei Typ 2 Diabetes mellitus, besser verstehen zu können.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Baer, A. N., Castello P. B., Green F. A. [1991]

Stereospecificity of the products of fatty acid oxygenases derived from psoriatic scales
J. Lipid Res. 32: 341-347

Baer, A. N., Klaus M. V., Green F. A. [1995]

Epidermal fatty acid oxygenases are activated in non-psoriatic dermatoses
J. Invest. Dermatol. 104: 251-255

Bhatia B., Maldonado C. J., Tang S., Chandra D., Klein R. D., Chopra D., Shappell S. B., Yang P., Newman R. A., Tang D. G. [2003]

Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants
J. Biol. Chem., 278(27): 25091-25100

Birnboim H. C., Doly J. [1979]

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Research 7: 1513-1522

Bleich D., Chen S., Gu J. L., Nadler J. L. [1998]

The role of 12-lipoxygenase in pancreatic-cells
Int. J. Mol. Med. 1(1): 265-272

Boeglin W. E., Kim R., Brash A. R. [1998]

A 12(R)-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6744-6749

Brady H. R., Serhan C. N. [1996]

Lipoxins: putative breaking signals in host defense
Curr. Opin. Hyperten. Nephrol. 5: 20-27

Brash A. R. [1999]

Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate
J. Biol. Chem. 274 (34): 23679-23682

Brash A. R., Boeglin W. E., Chang M. S. [1997]

Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 6148-6152

Bürger F., Krieg P., Kinzig A., Schurich B., Marks F., Fürstenberger G. [1999]

Constitutive expression of 8-lipoxygenase in papillomas and clastogenic effects of lipoxygenase-derived arachidonic acid metabolites in keratinocytes

Mol. Carc. 24: 108-117

Bürger F., Krieg P., Marks F., Fürstenberger G. [2000]

Positional- and stereo-selectivity of fatty acid oxygenation catalysed by mouse (12S)-lipoxygenase isoenzymes

Biochem. J. 348: 329-335

Cao Z., Umek R. M., McKnight S. L. [1991]

Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells

Genes Dev. 5:1538-1552

Casimir D. A., Wilson Miller C., Ntambi J. M. [1996]

Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP² receptor in murine 3T3-L1 cells

Differentiation 60: 203-210

Catalioto R. M., Gaillard D., Maclouf J., Ailhaud G., Negrel R. [1991]

Autocrine control of adipose cell differentiation by prostacyclin and PGF_{2α}

Biochim. Biophys. Acta. 1091: 364-369

Chang M. S., Boeglin W. E., Guengerich F. P., Brash A. R. [1996]

Cytochrome P450-dependent transformations of 15R- and 15S-hydroperoxyeicosatetraenoic acids: stereoselective formation of epoxy alcohol products

Biochemistry 35(2): 464-471

Chen P. L., Riley D. J., Chen Y., Lee W. H. [1996]

Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs

Genes Dev. 10: 2794-2804

Clarkson M. R., McGinty A., Godson C., Brady H. R. [1998]

Leukotrienes and lipoxines: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis

Nephrol. Dial. Transplant 13: 3043-3051

Compton S. J., Jones C. G. [1985]

Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay

Anal. Biochem. 151: 369-374

Cornelius P., MacDougald O. A., Lane M. D. [1994]

Regulation of adipocyte development

Annu. Rev. Nutr. 14: 99-129

Denzlinger C. [1996]

Biology and pathophysiology of leukotrienes

Crit. Rev. Oncol. Hematol. 23: 167-223

Folchik V. A., Nivar Aristy R. A., Krajewski L. P., Cathcart M. K. [1995]

Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques

J. Clin. Invest. 96: 504-510

Forman B. M., Tontonoz P., Chen J., Burn R. P., Spiegelman B. M., Evans R. M. [1995]

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ

Cell 83: 803-812

Freytag S. O., Paielli D. L., Gilbert J. D. [1994]

Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein α promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells

Genes Dev. 8: 1654-1663

Funk C. D. [1993]

Molecular biology in the eicosanoid field

Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 45: 67-98

Funk C. D., Keeney D. S., Oliw E. H., Boeglin W. E., Brash A. R. [1996]

Functional expression and cellular localization of a mouse epidermal lipoxygenase

J. Biol. Chem. 271: 23338-23344

Furchgott R. F., Vanhoutte P. M. [1989]

Endothelium-derived relaxing and contracting factors

FASEB J. 3: 2007-2018

Gaillard D. R., Negrel R., Lagarde M., Ailhaud G. [1989]

Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells

Biochem. J. 15: 389-397

Gillmor S. A., Villaseñor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M. [1997]

The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity

Nature-structural biology 4(12): 1003-1009

Green H., Kehinde O. [1974]

Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid

Cell 1: 113-116

Green H., Kehinde O. [1975]

An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion

Cell 5: 19-27

Green H., Kehinde O. [1976]

Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells

Cell 7: 105-113

Green H., Kehinde O. [1979]

Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line

J Cell Physiol. 101(1):169-71

Green H., Meuth M. [1974]

An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture

Cell 3: 127-133

Gregoire F. M., Smas C. M., Sul H. S. [1998]

Understanding adipocyte differentiation

Physiol. Rev. 78: 783-809

Grimaldi P. A. [2001]

Fatty acid regulation of gene expression

Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 4(5): 433-7

Hansen J.B., Petersen R.K., Larsen B.M., Bartkova J., Alsner J., Kristiansen K. [1999]

Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma bypasses the function of the retinoblastoma protein in adipocyte differentiation

J Biol Chem. 274(4): 2386- 2393

Heidt M., Furstenberger G., Vogel S., Marks F, Krieg P. [2000]

Diversity of mouse lipoxygenases: identification of a subfamily of epidermal isozymes exhibiting a differentiation-dependent mRNA expression pattern

Lipids 35(7): 701-707

Herwig S, Strauss M. [1997]

The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis

Eur. J. Biochem. 246: 581-601

Honn K. V., Tang D. G., Grossi I., Duniec Z. M., Timar J., Renaud C., Leithauser M., Blair I., Johnson C. R., Diglio C. A. [1994]

Tumor cell-derived 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces microvascular endothelial cell retraction
Cancer Res. 54: 565-574

Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. [20029]

SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver
J. Clin. Invest. 109(9): 1125-1131

Hsi L. C., Wilson L. C., Eling T. E. [2002]

Opposing effects of 15-lipoxygenase-1 nad -2 metabolites on MAPK signaling in prostate. Alteration in peroxisome proliferator-activated receptor gamma
J. Biol. Chem. 277(43): 40549-40556

Irvine R. F. [1982]

How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?
Biochem. J. 204: 3-16

Iversen L., Kragballe K. [2000]

Arachidonic acid metabolism in skin health and disease
Prostagl. Lipid Med. 63: 25-42

Jobard F., Lefèvre, Karaduman A., Blanchet-Bardon C., Emre S., Weissenbach J., Özgüç M., Lathrop M., Prud'homme J., Fischer J. [2002]

Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1
Hum. Mol. Genetics 11(1); 107-113

Jump D.B., Thelen A., Ren B., Mater M. [1999]

Multiple mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription
Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 60(5-6): 345-349

Kim J. B., Sarraf P., Wright M., Yao K. M., Mueller E., Solanes G., Lowell B. B., Spiegelman B. M. [1998]

Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1
J. Clin. Invest. 101: 1-9

Kinter M., Sherman N. E. (Eds.) [2000]

Protein Sequencing and Identification using Tandem Mass Spectrometry
Wiley New York, 152-160

Kinzig A., Fürstenberger G., Bürger F., Vogel S., Müller-Decker K., Mincheva A., Lichter P., Marks F., Krieg P. [1997]

Murine epidermal lipoxygenase (Aloxe) encodes a 12-lipoxygenase isoform

Genomics 58: 158-164

Kinzig A., Heidt M., Fürstenberger G., Marks F., Krieg P. [1999]

cDNA Cloning, Genomic Structure, and Chromosomal Localization of a Novel Murine Epidermis-type Lipoxygenase

Genomics 58: 158-164

Kliwer S. A., Lenhard J. M., Willson T. M., Patel I., Morris D. C., Lehmann J. M. [1995]

A Prostaglandin J₂ Metabolite Binds Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Promotes Adipocyte Differentiation

Cell 83: 813-819

Krieg P., Siebert M., Kinzig A., Bettenhausen R., Marks F., Fürstenberger G. [1999]

Murine 12(R)-lipoxygenase: functional expression, genomic structure and chromosomal localization

FEBS Lett. 446: 142-148

Krieg P., Marks F., Fürstenberger G. [2001]

A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression

Genomics 73: 323-330

Kühn H. Lipoxygenases in Marks F., Fürstenberger G (Hrsg.) [1999]

Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids - From Biogenesis to Clinical application

Wiley-VCH, Weinheim: 109-141

Kühn H., Thiele B. J. [1999]

The diversity of the lipoxygenase family - Many sequence data but little information on biological significance

FEBS Lett. 449: 7-11

Kubota N., Terauci Y., Miki H., Tamemoto H. Yamauchi T. et al. [1999]

PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance

Mol. Cell. 4: 597-609

Laneuville O., Corey E. J., Couture E., Pace-Asciak C. R. [1991]

Hepoxilin A3 increases vascular permeability in the rat skin

Eicosanoids 4: 95-97

Li Y. H., Maher P., Schubert D. [1997]

A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion
Neuron 19: 453-463

Lin F. T., Lane M. D. [1992]

Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppress coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes
Genes Dev. 6: 533-544

Lin F. T., Lane M. D. [1994]

CCAAT/enhancer-binding protein α is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8757-8761

Lindl T., Bauer J. [1987]

Zell- und Gewebekultur
2. Aufl.; Gustav Fischer verlag, Stuttgart

Lopez J. M., Bennett M. K., Sanchez H. B., Rosenfeld J. M., Osborne T. E. [1996]

Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid
Proc. Natl. Acad. Sci USA 93: 1049-1053

MacDouglad O. A., Cornelius P., Lin F. T., Chen S. S., Lane M. D. [1994]

Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue
J. Biol. Chem. 269: 19041-19047

Madsen L., Petersen R.K., Sorensen M.B., Jorgensen C., Hallenborg P., Pridal L., Fleckner J., Amri E.Z., Krieg P., Furstenberger G., Berge R.K., Kristiansen K. [2003]

Adipocyte differentiation of 3T3-L1 preadipocytes is dependent on lipoxygenase activity during the initial stages of the differentiation process
Biochem J. 375(Pt 3): 539-549

Magana M. M., Osborne T. F. [1996]

Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promotor
J. Biol. Chem. 272: 28210-28217

Marks F. [1976]

Epidermal growth control mechanisms, hyperplasia, and tumor promotion in the skin
Cancer Res. 36(7 PT 2): 2636- 2643

Marks F , Fürstenberger G. [1983]

Multistage tumor promotion in skin

Princess Takamatsu Symp. 14: 273-287

Marks F., Furstenberger G , Muller-Decker K. [1999]

Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism

Recent Results Cancer Res. 151: 45-67

Marks F., Gschwend M. [1995]

Protein kinase C and skin tumor promotion

Mut. Res. 333: 161-172

Miller D. K., Gillard J. W., Vickers P. J., Sadowski S., Leveile C., Mancini J. A.,

Charleson P., Dixon R. A., Ford-Hutchinson A. W., Fortin R. [1990]

Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production

Nature 343: 278-281

Müller K. [2002]

Dissertation: Funktionsanalyse epidermaler 12-Lipoxygenasen in der Haut von Mäusen

Müller K., Siebert M., Heidt M., Marks F., Krieg P., Fürstenberger G. [2002]

Modulation of epidermal tumor development caused by targeted overexpression of epidermis-type 12S-lipoxygenase

Cancer Res. 62(16):4610-4616

Must A., Spadano J., Coakley E. H., Field A. E., Colditz G., Dietz W. H. [1999]

The disease burden associated with overweight and obesity

J. Am. Med. Assoc. 282: 1523-1529

Nair J., Fürstenberger G., Bürger F., Marks F., Bartsch H. [2000]

Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism

Chem. Res. Toxicol. 13(8): 703-709

Nakamura T., Bratton D. I., Murphy R. C. [1997]

Analysis of Epoxyeicosatrienoic and Monohydroxyeicosatetraenoic Acids Esterified to Phospholipids in Human Red Blood Cells by Electrospray Tandem Mass Spectrometry

J. Mass Spectr. 32: 888-896

Nakao A., Watanabe T., Taniguchi S., Nakamura M., Honda Z. I., Shimizu T., Kurokawa K. [1993]

Characterization of prostaglandin F_{2α} receptor of mouse 3T3 fibroblasts and its functional expression in *Xenopus laevis* oocytes

J. Cell Physiol. 155: 257-264

Negrel R., Gaillard D., Ailhaud G. [1989]

Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation

Biochem J. 257(2): 399-405

Nugent C., Prins J.B., Whitehead J.P., Savage D., Wentworth J.M., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. [2001]

Potential of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR gamma agonists is maintained in cells expressing a PPAR gamma dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR gamma activation

Mol Endocrinol. 15(10): 1729-1738

Pace-Asciak C. R., Granström E., Samuelsson B. [1983]

Arachidonic Acid Epoxides

J. Biol. Chem. 258: 6835 - 6840

Pace-Asciak C. R. [1986]

Formation of hepxilin A4, B4 and the corresponding trioxilins from 12(S)-hydroperoxy-5,8,10,14,17-icosapentaenoic acid

Prostaglandins Leukot Med. 22(1): 1-9

Park Y., Pariza M. W. [2001]

Lipoxygenase inhibitors inhibit heparin-releasable lipoprotein liase activity in 3T3-L1 adipocytes and enhance body fat reduction in mice by conjugated linoleic acid

Biochim. Biophys. Acta 1534(1): 27-33

Petersen R.K., Jorgensen C., Rustan A.C., Froyland L., Muller-Decker K., Furstenberger G., Berge R.K., Kristiansen K., Madsen L. [2003]

Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases

J Lipid Res. [Epub ahead of print]

Pfister S. L., Spitzbarth N., Nithipatikom K., Edgmond W. S., Falck J. R., Campbell W. B. [1998]

Identification of the 11,14,15- and 11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-derived Relaxing Factors of Rabbit Aorta

J. Biol. Chem. 274(47): 30879-30887

Powell W. S. [1982]

Rapid Extraction of Arachidonic Acid Metabolites from Biological Samples Using Octadecylsilyl Silica
Methods Enzymol. 86: 467-477

Prigge S. T., Boyington J. C., Gaffney B. J., Amzel L. M. [1996]

Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases
Proteins 24: 171-184

Rangwala S. M., Lazar M. A. [2000]

Transcriptional control of adipogenesis
Annu. Rev. Nutr. 20: 535-559

Rapoport S. M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W., Ludwig P., Janicke Hohne M., Tannert C., Hiebsch C., Klatt D. [1979]

The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte
Eur. J. Biochem. 96(3): 545-561

Rapoport S. M., Schewe T. [1986]

The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes
Biochim. Biophys. Acta 864, 471-495

Reginato M. J., Krakow S. L., Bailey S. T., Lazar M. A. [1998]

Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma
J Biol Chem. 273(4): 1855-1888

Riendeau D., Falguyret J. P., Guay J., Ueda N., Yamamoto S. [1991]

Pseudoperoxidase activity of 5-lipoxygenase stimulated by potent benzofuranol and N-hydroxyurea inhibitors of the lipoxygenase reaction
Biochem J. 274(1): 287-292

Rosen E. D., Sarraf P., Troy A. E., Bradwin G., Moore K., Milstone D. S., Spiegelman B. M., Mortensen R. M. [1999]

PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro
Mol Cell. 4(4): 611-617

Rosen E. D., Spiegelman B. M. [2000]

Molecular regulation of adipogenesis
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 145-171

Rouzer CA, Kargman S. [1988]

Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187
J Biol Chem. 263(22):10980-10988

Samuelsson L., Stromberg K., Vikman K., Bjursell G., Enerback S. [1991]

The CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation: evidence for direct involvement in terminal adipocyte development
EMBO J. 10(12): 3787-3793

Schewe T., Kühn H. [1991]

Do 15-lipoxygenases have a common biological role?
Trends Biochem. Sci. 16, 369-373

Schwartzman M. L., McGiff J.C. [1995]

Renal cytochrome P450
J. Lipid Med. Cell Signal. 12: 229-242

Selvarajan S., Lund L. R., Takeuchi T., Craik C. S., Werb Z. [2001]

A plasma kallikrein-dependent plasminogen cascade required for adipocyte differentiation
Nat. Cell Biol. 3: 267-275

Serhan C. N., Hamberg M., Samuelsson B. [1984]

Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5335 - 5339

Shao D., Lazar M. A. [1997]

Peroxisome proliferator activated receptor γ , CCAAT/enhancer-binding protein α , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation
J. Biol. Chem. 272: 21473-21478

Shappell S. B., Boeglin W. E., Olson S. J., Kasper S., Brash A. R. [1999]

15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma
Am. J. Pathol. 155(1): 235-245

Shillabeer G., Kumar V., Tibbo E., Lau D. C. [1998]

Arachidonic acid metabolites of the lipoxygenase as well as the cyclooxygenase pathway may be involved in regulating preadipocyte differentiation
Metabolism. 47(4): 461-466

Siebert M. [2001]

Dissertation: Funktionelle Charakterisierung epidermaler 12-Lipoxygenasen und ihrer Rolle bei der Tumorentwicklung in der Maushaut

Sohlenius A. K., Wigren J., Backstrom K., Andersson K., DePierre J. W. [1995]

Synenergistic induction of acyl-CaA oxidase activity, an indicator of peroxisome proliferation, by arachidonic acid and retinoic acid in Morris hepatoma 7800C1 cells
Biochim. Biophys. Acta 1258: 247-264

Student A. K., Hsu R. Y., Lane M. D. [1980]

Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes
J. Biol. Chem. 255(10): 4745-4750.

Sun D., Elsea S. H., Patel P. I., Funk C. D. [1998]

Cloning of a human "epidermal-type" 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13
Cytogenet Cell Genet. 81(1): 79-82

**Suzuki H., Kishimoto K., Yoshimoto T., Yamamoto S., Kanai F., Ebina Y., Miyatake A.,
Tanabe T. [1994]**

Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase
Biochim. Biophys. Acta 1210: 308-316

Umek R. M., Friedman A. D., McKnight S. L. [1991]

CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch
Science. 251(4991): 288-292

van Dijk K. W., Steketee K., Havekes L., Frants R., Hofker M. [1995]

Genomic and cDNA cloning of a novel mouse lipoxygenase gene
Biochim. Biophys. Acta 1259: 4-8

Wheelan P., Zirolli J. A., Murphy R. C. [1993]

Low-energy Fast Atom Bombardment Tandem mass Spectrometry of Monohydroxy Substituted Unsaturated Fatty Acids
Biol. Mass Spectr. 22: 465-473

Willis A. [1987]

The eicosanoids: an introduction and an overview
Willis AL (ed) Handbook of eicosanoids: Prostaglandins and related Lipids, Vol. IA. CRC Press, Boca Raton, 3-46

Woods J. W., Evans J. F., Ethier D., Scott S., Vickers P. J., Hearn L., Heibin J. A., Charleson S., Singer I. I. [1993]

5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes

J. Exp. Med. 178: 1935-1946

Wu Z., Bucher N. L., Farmer S. R. [1996]

Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids

Mol. Cell. Biol. 16(8): 4128-4136

Wu Z., Puigserver P., Spiegelman B. M. [1999]

Transcriptional activation of adipogenesis

Curr. Opin. Cell. Biol. 11(6): 689-694

Wu Z, Xie Y., Bucher N. L., Farmer S. R. [1995]

Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis

Genes Dev. 9(19): 2350-2363.

Yamamoto S. [1992]

Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions

Biochim. Biophys. Acta 1128: 117-131

Yan H., Kermouni A., Abdel-Hafez M., Lau D. C. [2003]

Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells

J. Lipid Res. 44(2): 424-429

Yeh W. C., Cao Z., Classon M., McKnight S. L. [1995]

Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins

Genes Dev. 9(2): 168-181

Yu Z., Schneider C., Boeglin W. E., Marnett L. J., Brash A. R. [2003]

The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase

Proc. Natl. Acad. Sci USA 100 (16): 9162-9167

Yu K., Bayona B., Kallen C. B., Harding H. P., Ravera C. P., McMahon G., Brown M., Lazar M. A. [1995]

Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids

J. Biol. Chem. 270: 23975-23983

Yuspa S. H., Hennings H., Tucker R. W., Jaken S., Kilkenny A. E., Roop D. R. [1988]

Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes

Ann. N. Y. Acad. Sci. 548: 191-196

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M. [1994]

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue

Nature 372: 425-432

Zhu Y., Qi C., Korenberg J. R., Chen X. N., Noya D., Rao M. S., Reddy J. K. [1995]

Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms

Proc Natl Acad Sci U S A. 92(17): 7921-7925

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1 Arachidonsäurestoffwechsel in Säugern.</i>	3
<i>Abb. 2 Der Katalysezyklus der Lipoxygenasereaktion.</i>	4
<i>Abb. 3 Phylogenetischer Stammbaum der Säuger-Lipoxygenasen.</i>	6
<i>Abb. 4 Experimentelle Vorgehensweise zur funktionellen Charakterisierung der e-LOX-3</i>	15
<i>Abb. 5 Amplifikation von DNA mit der PCR-Technik.</i>	29
<i>Abb. 6 Schematische Zeichnung eines Western-Blot-Aufbaus</i>	42
<i>Abb. 7 Schematische Darstellung der verstärkten Chemilumineszenzreaktion</i>	44
<i>Abb. 8 Schematischer Ablauf der Extraktion freier Fettsäuren nach Powell</i>	53
<i>Abb. 9 Schematische Darstellung der Proteinexpression und –reinigung von epidermalen Lipoxygenasen aus Bakterien.</i>	66
<i>Abb. 10 Aufreinigung rekombinanter m 8S-Lipoxygenase.</i>	67
<i>Abb. 11 Gemessene, spezifische Aktivität der unten aufgeführten Fraktionen der m 8S-LOX Proteinexpression und –aufreinigung.</i>	68
<i>Abb. 12 Aufreinigung rekombinanter m e12S-Lipoxygenase.</i>	69
<i>Abb. 13 Gemessene, spezifische Aktivität der unten aufgeführten Fraktionen der m e12S-LOX Proteinexpression und –aufreinigung.</i>	70
<i>Abb. 14 Aufreinigung rekombinanter m 12R-Lipoxygenase.</i>	71
<i>Abb. 15 Aufreinigung rekombinanter m e-LOX-3.</i>	72

<i>Abb. 16 MALDI-TOF-Massenspektrum der m 8S-LOX.</i>	73
<i>Abb. 17 MALDI-TOF-Massenspektrum der m e12S-LOX.</i>	74
<i>Abb. 18 MALDI-TOF-Massenspektrum der m 12R-LOX.</i>	75
<i>Abb. 19 MALDI-TOF-Massenspektrum der m e-LOX-3.</i>	76
<i>Abb. 20 Produkte der h e-LOX-3 nach Inkubation mit 15(S)-HPETE.</i>	78
<i>Abb. 21 Produkt A der e-LOX-3 nach Inkubation mit 15(S)-HPETE.</i>	80
<i>Abb. 22 Produkte der h e-LOX-3 nach Inkubation mit 12(R,S)-HPETE.</i>	81
<i>Abb. 23 Darstellung der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.</i>	83
<i>Abb. 24 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 13-Hydroxy-14,15-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 15(S)-HPETE durch die menschliche e-LOX-3.</i>	84
<i>Abb. 25 Darstellung der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.</i>	86
<i>Abb. 26 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 8-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 12(R,S)-HPETE durch die menschliche e-LOX-3.</i>	86
<i>Abb. 27 Darstellung der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure und ihrer im ESI-MS/MS gefundenen Fragmentionen.</i>	87
<i>Abb. 28 ESI-Massen- und ESI-Tandem-Massenspektrum der 10-Hydroxy-11,12-epoxyeicosatriensäure als Produkt der Umsetzung von 12(R,S)-HPETE durch die menschliche e-LOX-3.</i>	87

<i>Abb. 29 Schematische Darstellung des Differenzierungsprotokolls der 3T3-L1 Zelllinie.</i>	88
<i>Abb. 30 Morphologie der 3T3-L1 Zellen am Tag 0, 2, 4 und 10 ihrer Differenzierung.</i>	89
<i>Abb. 31 Differenzierungsprotokoll der Rb-/- Mausembryofibroblasten.</i>	90
<i>Abb. 32 Untersuchung der mRNA-Expression der Leukozyten- und Blutblättchen-Typ 12S-Lipoxygenase durch RT-PCR Analyse der 3T3-L1 Zellen vor und während der Differenzierung.</i>	92
<i>Abb. 33 Untersuchung der mRNA-Expression der e-LOX-3 und der 12R-LOX durch RT-PCR Analyse der 3T3-L1 Zellen vor und während der Differenzierung.</i>	93
<i>Abb. 34 Nachweis von Lipoxygenasen in 3T3-L1 Zellen vor und während der Differenzierung.</i>	94
<i>Abb. 35 Nachweis der e-LOX-3 in Vektor-, ADD-1R- oder e-LOX-3-transduzierten Rb-/-MEFs am zweiten Tag der Differenzierung.</i>	95
<i>Abb. 36 Schema der Induktion der Differenzierung in 3T3-L1 Zellen durch Applikation des konditionierten Zellmediums aus konfluenten, ADD1-R transduzierten Zellen.</i>	96
<i>Abb. 37 Lipidextrakte aus Überständen Vektor- und ADD-1R-transduzierter Rb-/- MEFs.</i>	97
<i>Abb. 38 ESI-Massenspektrum und Negativionen-Tandem-Massenspektrum der Molekularmasse 335 der Fraktion A.</i>	98
<i>Abb. 39 Mögliche Fragmente der 13-Hydroxy-14,15-epoxy-eicosatriensäure im Tandem-Massenspektrum</i>	99
<i>Abb. 40 Lipidextrakte aus Überständen unbehandelter und Baicalein-behandelter 3T3-L1 Zellen.</i>	101

<i>Abb. 41 ESI-Massnespektrum und Negativionen-Tandem-Massenspektrum der Molekularmasse 335 der Fraktion A.</i>	102
<i>Abb. 42 Mögliche Fragmente der 13-Hydroxy-14,15-epoxy-eicosatriensäure im Tandem-MS/MS Spektrum.</i>	103
<i>Abb. 43 Mögliche, durch enzymatische Umsetzung von 15-HPETE gebildeten Hydroxyepoxyeicosatriensäuren</i>	107
<i>Abb. 44 Möglicher Mechanismus der e-LOX-3 Katalyse.</i>	109
<i>Abb. 45 Schematische Darstellung der transkriptionelle Kaskade der 3T3-L1 Präadipozyten-Differenzierung.</i>	110

11 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tab. 1</i>	<i>Verwendete PCR-Programme</i>	30
<i>Tab. 2</i>	<i>Temperaturprogramme der Sequenzierungsreaktion</i>	34
<i>Tab. 3</i>	<i>Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	38
<i>Tab. 4</i>	<i>Verdünnungen des ersten und zweiten Antikörpers</i>	43
<i>Tab. 5</i>	<i>Kreuzreaktionen der verwendeten ersten Antikörper</i>	44
.		
<i>Tab. 6</i>	<i>HPLC-Trennsysteme: RP-, SP- und CP-HPLC und ihre Laufbedingungen</i>	54
<i>Tab. 7</i>	<i>Retentionszeiten der LOX-Standards in den einzelnen HPLC-Trennsystemen</i>	55
<i>Tab. 8</i>	<i>Aktivität ausgewählter konventioneller und epidermaler Lipoxygenasen.</i>	65

12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aa	Arachidonsäure
AaOMe	Arachidonsäuremethylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase
DiHETE	α,β -Dihydroxyeicosatriensäuren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EET	Epoxyeicosatetraensäure
EI-MS	Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie
ESI-MS/MS	Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie
FKS	Fötale Kälber-Serum
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HETrE	Hydroxyeicosatriensäure
HODE	Hydroxyoctadecyldiensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
RP-HPLC	Reversed Phase HPLC
SP-HPLC	Straight Phase HPLC
HPODE	Hydroperoxyoctadecyldiensäure
KDa	kilo-Dalton
La	Linolsäure
LaOMe	Linolsäuremethylester
LOX	Lipoxygenase
8S-LOX	8S-Lipoxygenase
12R-LOX	12R-Lipoxygenase
e12S-LOX	murine, epidermale 12S-Lipoxygenase
e-LOX-3	epidermale Lipoxygenase 3
h5S-LOX	menschliche 5S-Lipoxygenase
l12S-LOX	Leukozyten-Typ 12-Lipoxygenase
p12S-LOX	Blutplättchen-Typ 12-Lipoxygenase
rb15-LOX	Kaninchen 15S-Lipoxygenase

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PG-	Prostaglandin-
PPAR	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
PVDF	Polyvinylendiendifluorid
PUFA	mehrfach ungesättigete Fettsäuren
RNA	Ribonukleinsäure
MRNA	Boten-RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat

13 DANK

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an alle Personen richten, die auf ihre besondere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Friedrich Marks möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Anregungen und freundliche Unterstützung während der Doktorarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Jürgen Wolfrum für die Annahme und Vertretung dieser Arbeit in der Chemischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg.

Dr. Gerd Fürstenberger, Dr. Peter Krieg und PD Dr. Karin Müller-Decker gilt mein Dank für ihre fachkundige wissenschaftliche und praktische Unterstützung meiner Arbeit.

Bei meinen Laborkollegen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre: Corinna Bähr, Sandra Blöthner, Luis Jave Suarez, Ina Kutschera, Thorsten Lau, Gwendolin Manegold, Karsten Müller, Gitta Neufang, Melanie Neumann, Sandra Pfrang, Andrea Pohl-Arnold, Gabrielle Rinke, Dorothea Schweiger, Malte Siebert und Brigitte Steinbauer.

Mein tiefer Dank gilt Prof. Dr. Karsten Kristiansen und seinen Mitarbeiter der Fakultät für Biochemie und Molekularbiologie, Odense (DK), insbesondere Claus Jørgensen, Philip Hallenborg, Rasmus Petersen und Ariane Minet, für ihre freundliche und überaus konstruktive Zusammenarbeit, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Wolf-Dieter Lehmann und Gerhard Erben in der Zentralen Spektroskopie und Dr. Martina Schnölzer in der Zentralen Proteinanalytik für die Analyse meiner Substanzen.

Zuletzt, aber dafür aus ganzem Herzen danke ich meiner Familie. Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und Ermutigung während meiner Ausbildung. Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Mann Sven für sein Verständnis, Ermutigung und unschätzbare Hilfe nicht nur bei der Korrektur dieser Arbeit aussprechen.

Sven, diese Arbeit ist dir gewidmet.

Alle, die ich vergessen habe oder denen eigentlich mehr Platz hätte eingeräumt werden müssen, bitte ich um Nachsicht.