

**Untersuchungen zur Evolution der 15-Lipoxygenase (ALOX15)
bei Säugetieren und funktionelle Charakterisierung von
Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität der
15-Lipoxygenase-2 (Alox15b)**

Marjänn Helena Schäfer

Univ.-Diss.

zur Erlangung des akademischen Grades

"Doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie“

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Institut für Biochemie und Biologie

der Universität Potsdam

Datum der Disputation: 13.12.2023

Die Publikation ist durch das Urheberrecht und/oder verwandte Schutzrechte geschützt. Nutzende sind berechtigt, die Publikation in jeder Form zu nutzen, die das Urheberrechtsgesetz (UrhG) und/oder einschlägige verwandte Schutzrechte gestatten. Für weitere Nutzungsarten ist die Zustimmung der Rechteinhaber*innen einzuholen.
<https://rightsstatements.org/page/InC/1.0/>

Diese Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Charité–Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn (AG-Lipoxygenaseforschung) angefertigt.

Hauptbetreuer: Prof. Gerhard P. Püschel
Betreuer: Prof. Dr. Hartmut Kühn
Prof. Dr. Gerhard P. Püschel

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard P. Püschel, Universität Potsdam
Prof. Dr. Hartmut Kühn, Charité–Universitätsmedizin Berlin
Prof. Dr. Andreas Koeberle, Universität Innsbruck

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-62034>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-620340>

Gewidmet den Tieren, die für diese Arbeit ihr Leben gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	XI
II.	Abbildungsverzeichnis	XVI
III.	Tabellenverzeichnis.....	XX
	Abstract (Deutsch).....	XXIV
	Abstract (Englisch).....	XXVI
1	Einleitung	1
1.1	Lipoxygenasen	1
1.1.1	Vorkommen und Evolution.....	1
1.1.2	Reaktionsmechanismus	3
1.1.3	Klassifizierung	5
1.1.4	Humane und murine ALOX-Gene	8
1.1.5	Lipoxygenaseprodukte	10
1.1.6	Biologische Rolle	13
1.2	Veränderungen der Reaktionsspezifität von ALOX15 und ALOX15B ...	17
1.2.1	Triadenkonzept.....	17
1.2.2	Sequenzdeterminanten der ALOX15B	18
1.2.3	Evolutionskonzept.....	20
1.2.4	Das Spitzhörnchen <i>Tupaia belangeri</i> als alternatives Modell für höhere Säugetiere	21
1.2.4.1	<i>Evolutionäre Stellung von Spitzhörnchen</i>	23
1.2.4.2	<i>Tupaia belangeri als ein Vertreter der Spitzhörnchen (Scandentia)</i>	24
1.3	Entzündungsreaktionen und die Bedeutung von Zytokinen	25
1.3.1	Einfluss von ALOX15 bei Entzündungsreaktionen	26
1.4	Ziele der Arbeit	27
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Chemikalien	30
2.1.2	Puffer und Lösungen	32

2.1.3	Enzyme und Kits	33
2.1.4	Klonierungs- und Expressionsvektoren	34
2.1.5	<i>E.-coli</i> -Stämme.....	34
2.1.6	Primer für Evolutionsanalyse	34
	2.1.6.1 <i>Primer der Sloane-Mutanten</i>	35
	2.1.6.2 <i>Primer der Borngräber-1-Mutanten</i>	39
2.1.7	Geräte	42
2.1.8	Software	43
2.2	Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1	Klonierung der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies ..	44
	2.2.1.1 <i>Datenbankrecherchen und Sequenzalignments für ALOX15-</i> <i>Lipoxygenase</i>	44
	2.2.1.2 <i>Transformation für Plasmid-DNA-Präparation</i>	44
	2.2.1.3 <i>Präparative Plasmidspaltung und Ligation</i>	45
	2.2.1.4 <i>Klonierung der Lipoxygenase-cDNA in verschiedenen</i> <i>Expressionsvektoren</i>	47
	2.2.1.5 <i>Proteinexpression der rekombinanten Lipoxygenasen in pro- und</i> <i>eukaryontischen Expressionssystemen</i>	48
2.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese der Sloane- und Borngräber- Determinanten	50
2.2.3	PUFA-Oxygenierungsassays von ALOX15-Orthologen	52
2.2.4	Nachweis des ALOX15-Proteins und Proteinquantifizierung	54
2.2.5	Analyse der Enzymaktivität mittels RP-/NP-/CP-HPLC	55
2.2.6	Charakterisierung der rekombinanten ALOX15-Orthologen vom <i>T. belangeri</i>	56
	2.2.6.1 <i>Lysat-Volumen-Abhängigkeit</i>	56
	2.2.6.2 <i>Zeitabhängigkeit</i>	57
	2.2.6.3 <i>Temperatur- und pH-Abhängigkeit</i>	57
	2.2.6.4 <i>Charakterisierung der Substratspezifität</i>	58
	2.2.6.5 <i>Sauerstoffabhängigkeit</i>	58
2.2.7	Membranoxygenierung	59
2.3	Charakterisierung der Alox15b-Knock-in-Mäuse mit humanisierter Reaktionsspezifität	60
2.3.1	Genotypisierung der Alox15b-Knock-in-Mäuse.....	62

2.3.2	Alterungsversuch.....	63
2.3.2.1	<i>Blutanalyse und Organgewichte</i>	63
2.3.3	Analyse der Oxygenierungsmetabolite im Blutplasma von Alox15b-KI-Mäusen	65
2.3.4	Nachweis der genetischen Manipulation	66
2.3.4.1	<i>Aufarbeitung von Gewebeproben für die qRT-PCR</i>	67
2.3.4.2	<i>Aufarbeitung für den Ex-vivo-Arachidonsäure-Aktivitätsassay der PMA behandelten Maushaut</i>	71
2.4	DSS-Kolitismodell	73
2.4.1	Beschreibung des Modellversuchs	73
2.4.2	Akutphase im Hauptversuch	76
2.4.3	Heilungsphase im Hauptversuch.....	76
2.4.4	Histologische Aufarbeitung	76
2.4.5	Analyse der Oxygenierungsmetabolite im DSS-Kolitis-Versuch.....	76
2.5	CFA-induziertes Pfotenödemmodell.....	78
2.5.1	Durchführung des Pfotenödemmodells.....	78
2.5.2	Bestimmung des Pfotenvolumens	80
2.5.3	Von-Frey-Tests	80
2.5.4	Hargreaves-Tests.....	81
2.6	Statistische Auswertung.....	82
3	Ergebnisse	84
3.1	Der ALOX15-Weg von <i>T. belangeri</i>	84
3.1.1	Rekombinante Expression von tupALOX15a und tupALOX15c.....	85
3.1.2	Identifizierung der chemischen Struktur der gebildeten ALOX15 Produkte	87
3.1.3	Reaktionskinetische Parameter für die rekombinanten tupALOX15- Isoformen	89
3.1.4	Substrat- und Produktspezifitäten der rekombinanten tupALOX15- Isoformen	94
3.1.5	Mutagenese der Triadendeterminanten	100
3.1.6	Membranoxygenasaktivität der beiden tupALOX15-Isoformen	101
3.2	Evolutionäre Aspekte von Säugetier-ALOX15- und ALOX15B- Orthologen.....	105

3.2.1	Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes auf ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere	105
3.2.1.1	<i>Experimentelle Strategie</i>	106
3.2.1.2	<i>Reaktionsspezifitäten gezielt ausgewählter Säugetier-ALOX15- Orthologe</i>	107
3.2.1.3	<i>Ortsgerichtete Mutagenese der Triadendeterminanten</i>	110
3.2.2	Die Evolutionshypothese der ALOX15-Reaktionsspezifität	113
3.2.2.1	<i>Neu charakterisierte ALOX15-Orthologe folgen der Evolutionshypothese</i>	114
3.2.3	Reaktionsspezifität der Säugetier ALOX15B-Orthologen.....	115
3.3	Katalytische Eigenschaften der Maus-Alox15b und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Mutante	118
3.3.1	Reaktionsspezifität der beiden Enzymvarianten mit Arachidonsäure ..	119
3.3.2	Produktspezifität der beiden Enzymvarianten mit anderen Polyenfettsäuren	120
3.4	Charakterisierung von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität	123
3.4.1	Herstellung der Alox15b-Knock-in-Mäuse und ausgekreuzter Wildtyp-Kontrollen	124
3.4.2	Expression der verschiedenen ALOX-Isoformen in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	126
3.4.3	<i>Ex-vivo</i> -Aktivitätsassays der Alox-Isoformen mit PMA behandelter Maushaut	128
3.4.4	Fellstruktur und Mobilität	130
3.4.5	Vergleich der Gewichte ausgewählter Organe von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	131
3.4.6	Einzelfallbeschreibung von Tumoren während der Alterung der Alox15b-KI-Mäuse	134
3.4.7	Charakterisierung der Körpergewichtsentwicklung.....	136
3.4.8	Beeinträchtigte Erythropoese der männlichen Alox15b-KI-Mäuse im fortgeschrittenen Alter	138
3.4.9	Erhöhte osmotische Erythrozytenresistenz bei alten männlichen Alox15b-KI-Mäuse	139
3.4.10	Untersuchungen zum Blutplasmaoxylipidom von Alox15b-KI-Mäusen	142
3.5	Testung der Alox15b-KI-Mäuse in <i>In-vivo</i> -Entzündungsmodellen	145

3.5.1	Modell der DSS-Kolitis.....	145
3.5.1.1	<i>Klinische Readout-Parameter der experimentell induzierten DSS-Kolitis.....</i>	<i>147</i>
3.5.1.1.1	<i>Vergleich der Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....</i>	<i>147</i>
3.5.1.1.2	<i>Vergleich der Kolonlängen von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....</i>	<i>149</i>
3.5.1.1.3	<i>Morphologischer Vergleich und histologische Entzündungsmerkmale der beiden Genotypen.....</i>	<i>150</i>
3.5.1.2	<i>Oxylinprofile im entzündlich veränderten Darmgewebe</i>	<i>152</i>
3.5.1.2.1	<i>Summe aller quantifizierten Oxyline.....</i>	<i>153</i>
3.5.1.2.2	<i>Oxygenierte Arachidonsäure-Metabolite.....</i>	<i>154</i>
3.5.1.2.3	<i>Oxygenierte Eicosapentaensäure-Metabolite</i>	<i>156</i>
3.5.1.2.4	<i>Oxygenierte Docosahexaensäure-Metabolite</i>	<i>158</i>
3.5.1.2.5	<i>Oxygenierungsmetabolite anderer Polyenfettsäuren.....</i>	<i>160</i>
3.5.1.2.6	<i>Komplexe Oxygenierungsmetabolite unterschiedlicher Polyenfettsäuren</i>	<i>162</i>
3.5.2	Induktion des CFA-induzierten Pfotenödems.....	163
3.5.2.1	<i>Das Pfotenvolumen als Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung.....</i>	<i>164</i>
3.5.2.2	<i>Die Schmerzreaktion als Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung.....</i>	<i>165</i>
4	Diskussion	168
4.1	Funktionelle Gene der ALOX15-Isoformen in <i>T. belangeri</i>	168
4.2	Bestätigung des Triadenkonzepts in verschiedenen Säugetierklassen....	170
4.3	Bestätigung der Evolutionshypothese in verschiedenen Säugetierklassen	172
4.3.1	Bestätigung der Evolutionshypothese durch alle in dieser Arbeit funktionell charakterisierten ALOX15-Orthologen.....	172
4.3.2	Evolutionsgrad unabhängige Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15B-Orthologen	175
4.4	Funktionelle Unterschiede zwischen humaner und muriner ALOX15B	176
4.4.1	Erfolgreiche <i>In-vivo</i> -Humanisierung der Reaktionsspezifität bei Alox15b-KI-Mäusen	177

4.4.2	Geschlechtsspezifische Veränderungen im Alterungsprozess	178
4.4.2.1	Veränderung des Körpergewichts durch Genetik und/ oder Alter.....	178
4.4.2.2	Veränderungen des Blutbildes durch Genetik und/ oder Alter	180
4.4.2.3	Nicht beurteilbarer Effekt des Alox15b-Knock-ins auf die Tumorentstehung.....	182
4.5	Beeinflussung von Entzündungsreaktionen durch die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b	184
4.5.1	Verstärkung der Entzündungssymptome der Alox15b-KI-Mäuse im DSS-Kolitismodell.....	184
4.5.2	Divergente Entzündungsauswirkung im CFA-Pfotenödemmodell der murinen Alox15b-KI-Mäuse.....	187
4.5.3	Zusammenfassende Diskussion zur Rolle der Humanisierung der Alox15b-Spezifität bei der Entzündungsreaktion	187
4.6	Limitationen	188
4.7	Ausblick	191
5	Zusammenfassung.....	195
6	Literaturverzeichnis.....	198
7	Anhang	234
7.1	Statistikgutachten	234
7.2	Herstellerangaben zur Alox15b-KI-Maus zu Abschnitt 2.3	235
7.3	Ergänzungen zur LC-MS-/MS-Analyse durch die Lipidomix GmbH....	239
7.4	Rekombinante Reaktionsspezifität des ALOX15b-KI-Enzyms	243
7.5	Morphologische Auffälligkeiten des Blutes von Alox15b-KI-Mäusen	244
7.6	Box-Plot-Darstellung und statistische Auswertung aller Blutparameter von Alox15b-KI-Mäusen	245
7.7	Histologischer Schnitt von der Haut einer Alox15b-KI-Maus	254
7.8	Ergänzende Daten zur osmolaren Stabilität der Erythrozyten	254
7.9	Alleinfuttermittelzusammensetzung der humanisierten Alox15b-KI-Mäuse	255

7.10	Ergänzende Daten zu den Vorversuchen des DSS-Kolitismodells	255
7.11	Ergänzende Auswertung des DSS-Kolitismodells	258
7.11.1	Körpergewichtskinetiken getrennt in 7-Tage- und 15-Tage- Gruppen.....	258
7.11.2	Daten zu Kolonlänge und Kolongewicht	261
7.11.3	Auswertung der Oxylinprofile im DSS-Kolitismodell	264
7.11.4	Auswertung komplexerer Oxyline im DSS-Kolitismodell	270
7.12	Ergänzende Auswertung zum Pfotenödemmodell.....	275
7.12.1	Phänotypisches Pfotenödem der Alox15b-KI-Maus.....	275
7.12.2	Statistische Auswertung zum Pfotenvolumen.....	275
7.12.3	Statistische Auswertung des Von-Frey-Tests	277
7.12.4	Statistische Auswertung des Hargreaves-Test	277
8	Danksagung.....	279
9	Eidesstattliche Erklärung	280

I. Abkürzungsverzeichnis

5-H(p)EPE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure
5-H(p)ETE	5-Hydro(pero)xy-6E,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraensäure
7S,14S-diHPDHA	7,14-Dihydroxydocosahexaensäure
8-H(p)ETE	8-Hydro(pero)xy-5Z,9E,11Z,14Z-Eicosatetraensäure
8,9-EET-d11	8(9)-epoxy-5Z,8Z,14Z-Eicosatrien-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,- 20-d11-säure
9-H(p)ODE	9-Hydro(pero)xy-10E,12Z-Octadecadiensäure
9,10-DiHOME	9,10-Dihydroxyoctadec-12-ensäure
10-HGLA	10-Hydro(pero)xy-6Z,8E,12Z-Octadecatriensäure
11-H(p)ETE	11-hydro(pero)xy-5Z,8Z,12E,14Z-Eicosatetraensäure
12-H(p)EPE	12-Hydro(pero)xy-5Z,7E,11Z,14Z,17Z-Eicosapentaensäure
12-H(p)ETE	12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure
12,13-EpOME-d4	12,13-EODE-d4; 12(13) epoxy-9Z-Octadecen-9,10,12,13-d4-säure
13-HALA	13-Hydroxy-9Z,11E,13R,15Z-Octadecatriensäure
13-HGLA	13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure
13-H(p)ODE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-Octadecadiensäure
13-H(p)OTrE	13-Hydro(pero)xy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure
14-H(p)DHA	14-Hydro(pero)xy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-Docosahexaensäure
14,15-DHET-d11	14,15-DiHETrE-d11; 14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-Eicosatrien- 16,16,17,17,18,18,19,19,20,20-d11-säure
15-H(p)EPE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-Eicosapentaensäure
15-H(p)ETE	15-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure
17-H(p)DHA	17-Hydro(pero)xy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-Docosahexaensäure
18-H(p)EPE	18-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-Eicosapentaensäure
20-HETE-d6	20-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z-Eicosatetraen-16,16,17,17,18,18-d6- säure
20-HDHA	20-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,18E-Docosahexaensäure
AA	Arachidonsäure, 5,8,11,14-Eicosatetraensäure
ALA	Alpha-Linolensäure, 9,12,15-Octadecatriensäure
Ala	Alanin
ALOX5	Arachidonsäure 5-Lipoxygenase
ALOX 12	Arachidonsäure 12-Lipoxygenase
ALOX 12B	Arachidonsäure 12B-Lipoxygenase
ALOX15	Arachidonsäure 15-Lipoxygenase
ALOX15B	Arachidonsäure 15-Lipoxygenase-2
ALOXE3	Arachidonsäure Lipoxygenase 3
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asp602Tyr	Austausch von Asparaginsäure an Aminosäureposition 602 gegen Tyrosin
bp	Basenpaare

BG1-	Borngräber-1-(Determinante)
BG2-	Borngräber-2-(Determinante)
BL	Basis-Linie (Baseline)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CA	Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CFA	Freund'sches Adjuvans (Freund's complete Adjuvant = FCA)
CLP	coactosin-ähnlichen Protein (Coactosin-Like Protein)
COX	Cyclooxygenase
CP-HPLC	Chiralphasen-HPLC
CRISPR	gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CYP	Cytochrom-P450
Cys	Cystein
d4-13-HODE	(deuterierte) d4-13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-Octadecadiensäure
d4-PGB2	(deuterierte) 9-oxo-15S-Hydroxy-prosta-5Z,8(12),13E-trien-1-oic-3,3,4,4-d4-säure
d4-PGE2-13,14-dihydro-15-keto	(deuterierte) 13,14-dh-15-keto PGE2-d4, 9,15-dioxo-11alpha-hydroxy-prost-5Z-en-1-oic-3,3,4,4-d4-säure
d4-PGF2a	(deuteriertes) Prostaglandin F2a-d4
Da	Dalton
DAI	Krankheitsaktivität-Index (Disease Activity Index)
DAMP	Schaden-assoziiertes molekulares Muster (Damage-associated molecular pattern)
DHA	Docosahexaensäure, 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige (Double Stranded)-DNA
DSS	Dextransulfat-Natriumsalz (Dextran Sulfate Sodium Salt)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Epoxyeicosatriensäuren
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure; 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fe	Eisen
fl	Femtoliter
FLAP	5-Lipoxygenasen-Aktivierungsprotein (5-Lipoxygenase Activating Protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatografie mit gekoppelter Massenspektrometrie

GLA	Gamma-Linolensäure, 6,9,12-Octadecatriensäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
gRNA	Guide-RNA
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	menschliche embryonale Niere (Human Embryonic Kidney)
His	Histidin
His604Val	Austausch von Histidin an Aminosäureposition 604 gegen Valin
H ₂ O	Wasser
HO	Homozygot
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie, (High Performance Liquid Chromatography)
humALOX15	15-Lipoxygenase des Menschen
humALOX12	12-Lipoxygenase des Menschen
humALOX12B	12B-Lipoxygenase des Menschen
humALOX15B	15-Lipoxygenase-2 des Menschen
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
Ile418/ Met 419	Isoleucin an Aminosäureposition 418 und Methionin an Aminosäureposition 419
Ile 593	Isoleucin an Aminosäureposition 593
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KI	Knock-in
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KO	Knock-out
KOH	Kaliumhydroxid
LA	Linolsäure, 9,12-Octadecadiensäure
LB-Medium	Luria Bertani (Nährmedium)
LC/MS	Flüssigkeitschromatografie (Liquid Chromatography)/ Massenspektrometrie (Mass Spectrometry)
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (Low Density Lipoprotein)
Leu	Leucin (L)
LOX	Lipoxygenase
15-LOX-2	15-Lipoxygenase-2 = Synonym für ALOX15B
LT	Leukotrien
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTB ₄ -D ₄	Leukotrien B ₄ -d ₄ (deutertiert)
LÜ	Lysatüberstand
LX	Lipoxin
LXB ₄	Lipoxin B ₄
M	Molar
MaR	Maresin
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
MCH	mittleres korpuskuläre Hämoglobin (Mean Corpuscular Haemoglobin)

MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration)
MCV	mittleres korpuskuläre Volumen (Mean Corpuscular Volume)
Mdn	Median
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minuten
mouALOX15	15-Lipoxygenase der Maus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger Ribonucleic Acid)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	Nationales Zentrum für Informationen zur Biotechnologie (National Center for Biotechnology Information)
NF- κ B	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter κ -Ketten (Kappa-Kette) von B-Lymphozyten bindet (nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells)
nm	Nanometer
μ m	Mikrometer
NP_031466.2	Proteincodex der NCBI-Referenz-Sequenz
NPD-1	Neuroprotectin D1
NP-HPLC	Normalphasen- HPLC
OD	optische Dichte
OH	Hydroxidgruppe
OH-PUFA	Oxylipine
Oligo(dT)18	Oligo-Desoxythymidine
opt	Optimum (Indexschreibweise)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (Pathogen Associated Molecular Pattern)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat buffered Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)
PD1	Protectin-1
PDX	Protectin DX, 10,17-Dihydroxydocosa-4,7,11,13,15,19-Hexaensäure
PG	Prostaglandin
PGE2-D4	Prostaglandin-E2-d4
PGI ₂	Prostazyklin
Phe	Phenylalanin
Phe353Leu	Austausch von Phenylalanin an Aminosäureposition 353 gegen Leucin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors)

PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids)
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
ratALOX15	15-Lipoxygenase der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (Reversed Phase HPLC)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per Minute)
RT	Echtzeit (Real Time)
Rv	Resolvin
(S/R)	<i>S</i> (lat. <i>sinister</i> = links)/ <i>R</i> (von lat. <i>rectus</i> = rechts)-Chiralität
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
Ser	Serin
Ser558Ala	Austausch von Serin an Aminosäureposition 558 gegen Alanin
Ser558Asn	Austausch von Serin an Aminosäureposition 558 gegen Asparagin
Ser558His	Austausch von Serin an Aminosäureposition 558 gegen Histidin
siRNA	kleine eingreifende RNS (Small Interfering RNA)
Sf9	Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SLO	Sloane-(Determinante)
SMP	submitochondriale Partikeln
SOC	Nährmedium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression)
ssDNA	einzelsträngige (Single Stranded)-DNA
SP-HPLC	Normalphasen-HPLC (Straight Phase HPLC)
TAE	Tris/Acetat/Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th-1-Zellen	Typ1-Thymus-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
Tnfr	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)Propan-1,3-diol
tupALOX15	15-Lipoxygenase des <i>Tupaia belangeri</i>
Tyr	Tyrosin
Tyr603Asp	Austausch von Tyrosin an Aminosäureposition 603 gegen Asparaginsäure
TxA ₂	Thromboxan A ₂
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenfraktion (Volume per Volume)
Val	Valin
Val603His	Austausch von Valin an Aminosäureposition 603 gegen Histidin
v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	Massekonzentration (Weight per Volume)
WT	Wildtyp

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsweg der Lipxygenasen.....	4
Abbildung 2: Humanes und murines ALOX-Gencluster	9
Abbildung 3: Übersicht zu von derzeit bekannten Oxylipinen, die aus verschiedenen Polyenfettsäuren gebildet werden können.	11
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Oxygenierungsprodukte von Arachidonsäure, die über drei metabolische Wege synthetisiert werden	12
Abbildung 5: Innere Systematik von Supraprimaten (Euarchontoglires)	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie der Alox15b-KI-Maus.....	61
Abbildung 7: Plethysmometer zur Bestimmung des Pfortenvolumens	80
Abbildung 8: Von-Frey-Testaufbau	81
Abbildung 9: Hargreaves-Testaufbau.....	82
Abbildung 10: Expression der ausgewählten ALOX15-Isoformen von <i>T. belangeri</i> (tupALOX15a, tupALOX15c) in <i>E. coli</i>	85
Abbildung 11: Identifizierung der chemischen Struktur der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte, die durch tupALOX15a (A) und tupALOX15c (B) gebildet wurden	88
Abbildung 12: Bestimmung der Substrataffinitäten der ausgewählten tupALOX15- Isoformen	90
Abbildung 13: Bestimmung der Sauerstoffaffinitäten der tupALOX15-Isoformen	91
Abbildung 14: Bestimmung der pH-Profile von tupALOX15a und tupALOX15c	92
Abbildung 15: Bestimmung der Temperaturprofile von tupALOX15a und tupALOX15c.....	93
Abbildung 16: Substratspezifität von tupALOX15a und tupALOX15c für freie Polyenfettsäuren.....	95
Abbildung 17: Produktspezifität für tupALOX15a bei der Oxygenierung verschiedener Polyenfettsäuren	98
Abbildung 18: Membranoxygenaseaktivität von tupALOX15a	103
Abbildung 19: Vereinfachte Klassifizierung der Säugetiere.....	108

Abbildung 20: RP-HPLC-Analyse der dominanten AA-Oxygenierungsprodukte die durch die ALOX15-Orthologe des Menschen und der Maus gebildet werden	109
Abbildung 21: RP-HPLC-Chromatogramme der AA-Oxygenierungsprodukte der Wildtyp-ALOX15 des Dreizehnstreifenhörnchens und seiner Sloane-Mutanten	112
Abbildung 22: RP-HPLC-Chromatogramme der AA-Oxygenierungsprodukte der V418I+V419M-Doppelmutante der ALOX15 vom Dreizehnstreifenhörnchen und deren F353L- bzw. F353A-Dreifachmutanten.....	113
Abbildung 23: Reaktionsspezifität der rekombinanten Maus-Alox15b und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante mit Arachidonsäure als Substrat	119
Abbildung 24: Muster der Oxygenierungsprodukte, die aus verschiedenen PUFAs durch die Maus-Alox15b und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante gebildet werden	123
Abbildung 25: Crispr/Cas9-Strategie zur Herstellung von Alox15b-Knock-in-Mäusen.....	125
Abbildung 26: Expression der Alox-Isoformen in verschiedenen Mausgeweben	127
Abbildung 27: Ex-vivo-Alox15b-Aktivitätsassays mit Homogenatsüberständen von PMA-behandelter Schwanzepidermis.....	129
Abbildung 28: Fellstruktur von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	130
Abbildung 29: Samenstrangtumor einer männlichen Alox15b-KI-Maus	134
Abbildung 30: Weibliche Alox15b-KI-Maus mit einem nicht näher definierten Bauchraumtumor.....	135
Abbildung 31: Weibliche Alox15b-KI-Maus mit einem nicht näher definierten Lipom im Mesenterium.....	135
Abbildung 32: Absolute Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	137
Abbildung 33: Basale hämatologische Parameter von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen in verschiedenen Alterskategorien	139
Abbildung 34: Osmotische Resistenz von murinen Alox15b-KI-Erythrozyten und entsprechenden Zellen von ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen verschiedener Alterskategorien.....	140
Abbildung 35: Plasmakonzentrationen ausgewählter Eikosanoide bei Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen	143

Abbildung 36: Relative Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen unter DSS-Behandlung.....	148
Abbildung 37: Quantifizierung der Kolonlängen.....	149
Abbildung 38: Kolonlängen von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen unter DSS-Behandlung.....	150
Abbildung 39: Eröffneter Bauchsitus einer Alox15b-KI- und ausgekreuzten Wildtyp-Maus nach DSS-Behandlung.....	151
Abbildung 40: HE-Färbungen von Kolonschnitten verschiedener Versuchstiere.....	151
Abbildung 41: Oxylipinkinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	154
Abbildung 42: HETE-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	156
Abbildung 43: HEPE-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	158
Abbildung 44: HDHA-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	159
Abbildung 45: PUFA-Kinetiken anderer Oxylipine während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	161
Abbildung 46: Kinetiken komplexer Oxylipide während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	162
Abbildung 47: Quantifizierung des inflammatorischen Pfotenödems bei Alox15b- KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.....	164
Abbildung 48: Quantifizierung der Schmerzempfindung beim CFA- Entzündungsmodell.....	166
Abbildung 49: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	246
Abbildung 50: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	247
Abbildung 51: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	248
Abbildung 52: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den aufgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	249
Abbildung 53: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	251

Abbildung 54: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	252
Abbildung 55: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren in jungem, mittlerem und hohem Alter	253
Abbildung 56: Histologischer Schnitt mit HE-Färbung von der Rückenhaut einer Alox15b-KI-Maus.....	254
Abbildung 57: Absolute Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen im Vorversuch unter 2 % DSS-Behandlung	257
Abbildung 58: Absolute Körpergewichtskinetiken der ausgekreuzten Alox15b-KI-Wildtyp-Mäuse im Vorversuch unter 2 % DSS-Behandlung.....	257
Abbildung 59: Vergleich Körpergewichtsveränderung von ausgekreuzten Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 15 Tagen.....	259
Abbildung 60: Vergleich Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 15 Tagen	259
Abbildung 61: Vergleich Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 7 Tagen.....	260
Abbildung 62: Vergleich der Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 7 Tagen.....	260
Abbildung 63: Pfotenödem 2 Tage nach der CFA-Behandlung bei einer ausgekreuzten Wildtyp-Maus und bei einer homozygoten Alox15b-KI-Maus.....	275

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Aminosäuresequenz der ALOX-Gene von Mensch und Maus	8
Tabelle 2: Lipoxygenase-Gene des Menschen	10
Tabelle 3: Aminosäure-Identität der ALOX15-Isoformen des Baumspitzhörnchens (tupAlox15) im Vergleich zur Maus-Alox15 (mouAlox15).....	22
Tabelle 4: Exon-Intron Organisation der vier verschiedenen ALOX15-Orthologen von <i>T. belangeri</i>	23
Tabelle 5: Chemikalien.....	30
Tabelle 6: Puffer und Lösungen	32
Tabelle 7: Enzyme und Kits	33
Tabelle 8: Klonierungs- und Expressionsvektoren für die Zellkultur	34
Tabelle 9: <i>E.-coli</i> -Stämme für die rekombinante Proteinexpression.....	34
Tabelle 10: Geräte	42
Tabelle 11: Zusammensetzung des Spaltansatzes	45
Tabelle 12: Zusammensetzung des Ligationsansatzes	46
Tabelle 13: PCR-Ansatz für ortsgerichtete Mutagenese von Sloane- und Borngräber- Mutanten	51
Tabelle 14: PCR-Programm für ortsgerichtete Mutagenese von Sloane- und Borngräber-Mutanten.....	51
Tabelle 15: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	54
Tabelle 16: Zusammensetzung des Primer-Stocks für die Genotypisierung der Alox15b-KI-Mäuse	62
Tabelle 17: PCR-Programm für die Genotypisierung der ALOX15b-KI-Mäuse	62
Tabelle 18: Primer für die Genotypisierung der Alox15b-KI-Maus	62
Tabelle 19: RNA-Messwerte der Alox15b-KI-Maus-Haut für die cDNA- Transkription.....	67
Tabelle 20: Gesamtansatz für die cDNA-Synthese zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI-Mutation <i>ex vivo</i>	68

Tabelle 21: Primer für qRT-PCR zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI-Mutation <i>ex vivo</i>	68
Tabelle 22: Master-Mix für qRT-PCR zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI Mutation <i>ex vivo</i>	68
Tabelle 23: Verdünnungsreihen am Beispiel des GAPDH-Gens ohne cDNA als Grundlage für eine Kalibriergerade für die qRT-PCR.....	69
Tabelle 24: Zusammensetzung für den Primer-Linearisierungsansatz.....	71
Tabelle 25: Proteinkonzentrationen der Schwanzhaut-Homogenatüberstände der Alox15b-KI-Maus.....	72
Tabelle 26: Auflistung der mit LC-MS/MS analysierten Oxylinmetaboliten während der DSS-Kolitis	77
Tabelle 27: Auszug aus der Berechnung für die biometrische Fallzahlplanung des Pfotenödemversuchs an Alox15b-KI-Mäusen mithilfe der G.Power-Software	79
Tabelle 28: Experimenteller Zeitverlauf des Pfotenödemmodells mit männlichen Alox15b-KI-Mäusen	79
Tabelle 29: Quantifizierung der dominanten Oxygenierungsprodukte verschiedener Polyenfettsäuren durch tupALOX15a und tupALOX15c.....	99
Tabelle 30: Produktspezifität von Triadendeterminanten der beiden tupALOX15-Isoformen	101
Tabelle 31: Reaktionsspezifitäten der ausgewählten Säugetier-ALOX15 Orthologen.....	110
Tabelle 32: Reaktionsspezifitäten der Triadenmutanten ausgewählter Säugetier-ALOX15-Orthologen.....	111
Tabelle 33: Jisaka-Determinanten der ALOX15B-Orthologen verschiedener Säugetiere.....	116
Tabelle 34: Mögliche Off-target-Mutationen bei der Herstellung der Alox15b-KI-Mäuse	126
Tabelle 35: Absolute und relative Organgewichte von weiblichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen	132
Tabelle 36: Absolute und relative Organgewichte von männlichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen	133
Tabelle 37: Semiquantitative Auswertung der histologischen Entzündungsparameter	152
Tabelle 38: Gradient der mobilen Phase, der für die LC-Trennung der Plasma-Oxyline verwendet wird.....	239

Tabelle 39: Ionisierungsbedingungen der LC-MS-basierten Analyse der Blutplasma-Lipidome	239
Tabelle 40: Charakteristische Massenübergänge, Stoßenergien und Retentionszeiten der verschiedenen Oxylipine.....	239
Tabelle 41: Auflistung der Detektionslimits zu den Metaboliten der Blutplasma-Lipidom-Analyse	242
Tabelle 42: Ergebnisse der Reaktionsspezifität der rekombinanten Alox15b-Maus und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante mit verschiedenen PUFAs als Substrat	243
Tabelle 43: Auffälligkeiten der Blutzusammensetzung und Morphologie der Blutzellen von Alox15b-KI-Männchen im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren verschiedener Alterskategorien.....	244
Tabelle 44: Auffälligkeiten der Blutzusammensetzung und Morphologie der Blutzellen von Alox15b-KI Weibchen im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren verschiedener Alterskategorien.....	244
Tabelle 45: Anzahl der einbezogenen Tiere in die Berechnung zur osmotischen Resistenz von Alox15b-KI-Erythrozyten und der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen verschiedener Alterskategorien.....	254
Tabelle 46: Futtermittelzusammensetzung der verwendeten Alleinfuttermittel für die humanisierten Alox15b-KI-Mäuse.....	255
Tabelle 47: Datentabelle vom 1,5 % DSS-Vorversuch der Alox15b-KI-Mäuse	256
Tabelle 48: Datentabelle vom 2 % DSS-Vorversuch der Alox15b-KI-Mäusen	256
Tabelle 49: Gegenüberstellung von Kolonlänge und Kolongewicht in den verschiedenen Versuchsgruppen von homozygoten Alox15b-KI-Mäusen und dem ausgekreuzten Wildtyp im DSS-Kolitismodell.....	261
Tabelle 50: Statistische Auswertung von Kolonlänge und Kolongewicht in den verschiedenen Versuchsgruppen von homozygoten Alox15b-KI-Mäusen und dem ausgekreuzten Wildtyp im DSS-Kolitismodell.....	262
Tabelle 51: Analyse der Oxylinmetabolite während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Kontroll-Mäusen.....	264
Tabelle 52: Analyse der Oxylinmetabolite während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Kontroll-Mäusen	265
Tabelle 53: Analyse der Oxylinmetabolite während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen	266
Tabelle 54: Analyse der Oxylinmetabolite während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen	267

Tabelle 55: Analyse der Oxylinmetabolite während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen	268
Tabelle 56: Analyse der Oxylinmetabolite während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen	269
Tabelle 57: Analyse der komplexeren Oxylipide während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Kontroll-Mäusen.....	270
Tabelle 58: Analyse der komplexeren Oxylipide während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Kontroll-Mäusen	271
Tabelle 59: Analyse der komplexeren Oxylipide während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen	272
Tabelle 60: Analyse der komplexeren Oxylipide während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen	273
Tabelle 61: Analyse der komplexeren Oxylipide während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen	274
Tabelle 62: Analyse der komplexeren Oxylipide während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen.....	274
Tabelle 63: Statistischer Vergleich des Pfortenvolumens zwischen den Genotypen	276
Tabelle 64: Statistischer Vergleich zum Von-Frey-Test zwischen den Behandlungen der Genotypen.....	277

Abstract (Deutsch)

Arachidonsäurelipoxygenasen (ALOX-Isoformen) sind Lipid-peroxidierenden Enzyme, die bei der Zelldifferenzierung und bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen bedeutsam sind. Im menschlichen Genom gibt es sechs funktionelle *ALOX*-Gene, die als Einzelkopiegene vorliegen. Für jedes humane *ALOX*-Gen gibt es ein orthologes Mausgen. Obwohl sich die sechs humanen *ALOX*-Isoformen strukturell sehr ähnlich sind, unterscheiden sich ihre funktionellen Eigenschaften deutlich voneinander. In der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche Fragestellungen zum Vorkommen, zur biologischen Rolle und zur Evolutionsabhängigkeit der enzymatischen Eigenschaften von Säugetier-*ALOX*-Isoformen untersucht:

1) Spitzhörnchen (*Tupaiaidae*) sind evolutionär näher mit dem Menschen verwandt als Nagetiere und wurden deshalb als Alternativmodelle für die Untersuchung menschlicher Erkrankungen vorgeschlagen. In dieser Arbeit wurde erstmals der Arachidonsäurestoffwechsel von Spitzhörnchen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass im Genom von *Tupaia belangeri* vier unterschiedliche *ALOX15*-Gene vorkommen und die Enzyme sich hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften ähneln. Diese genomische Vielfalt, die weder beim Menschen noch bei Mäusen vorhanden ist, erschwert die funktionellen Untersuchungen zur biologischen Rolle des *ALOX15*-Weges. Damit scheint *Tupaia belangeri* kein geeigneteres Tiermodell für die Untersuchung des *ALOX15*-Weges des Menschen zu sein.

2) Entsprechend der Evolutionshypothese können Säugetier-*ALOX15*-Orthologe in Arachidonsäure-12-lipoxygenierende- und Arachidonsäure-15-lipoxygenierende Enzyme eingeteilt werden. Dabei exprimieren Säugetierspezies, die einen höheren Evolutionsgrad als Gibbons aufweisen, Arachidonsäure-15-lipoxygenierende *ALOX15*-Orthologe, während evolutionär weniger weit entwickelte Säugetiere Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Enzyme besitzen. In dieser Arbeit wurden elf neue *ALOX15*-Orthologe als rekombinante Proteine exprimiert und funktionell charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse fügen sich widerspruchsfrei in die Evolutionshypothese ein und verbreitern deren experimentelle Basis. Die experimentellen Daten bestätigen auch das Triadenkonzept.

3) Da humane und murine *ALOX15B*-Orthologe unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen, können Ergebnisse aus murinen Krankheitsmodellen zur biologischen Rolle der *ALOX15B* nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Um die *ALOX15B*-Orthologen von Maus und Mensch funktionell einander anzugleichen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Knock-in-Mäuse durch die *In-vivo*-Mutagenese

mittels CRISPR/Cas9-Technik hergestellt. Diese exprimieren eine humanisierte Mutante (Doppelmutation von Tyrosin603Asparaginsäure+Histidin604Valin) der murinen Alox15b. Diese Mäuse waren lebens- und fortpflanzungsfähig, zeigten aber geschlechtsspezifische Unterschiede zu ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltieren im Rahmen ihre Individualentwicklung.

4) In vorhergehenden Untersuchungen zur Rolle der ALOX15B in Rahmen der Entzündungsreaktion wurde eine antiinflammatorische Wirkung des Enzyms postuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Humanisierung der murinen Alox15b die Entzündungsreaktion in zwei verschiedenen murinen Entzündungsmodellen beeinflusst. Eine Humanisierung der murinen Alox15b führte zu einer verstärkten Ausbildung von Entzündungssymptomen im induzierten Dextran-Natrium-Sulfat-Kolitismodell. Im Gegensatz dazu bewirkte die Humanisierung der Alox15b eine Abschwächung der Entzündungssymptome im Freund'schen Adjuvans Pfotenödemmodell. Diese Daten deuten darauf hin, dass sich die Rolle der ALOX15B in verschiedenen Entzündungsmodellen unterscheidet.

Abstract (Englisch)

Arachidonic acid lipoxygenases (ALOX-isoforms) are lipid peroxidizing enzymes that have been implicated in cell differentiation and in the pathogenesis of different diseases. In the human genome six different *ALOX* genes have been identified and all of them occur as single copy genes. For each human *ALOX* gene an ortholog exists in the mouse genome. Although human and mouse *ALOX* orthologs share a high degree of structural similarity *ALOX15* and *ALOX15B* orthologs exhibit distinct functional characteristics. In the present study addressed four different questions on the occurrence, the biological role and enzyme evolution of mammalian *ALOX15* and *ALOX15B* orthologs.

1) *Tupaiaidae* are more closely related to humans than rodents and therefore these mammals have frequently been suggested as better animal models than mice for investigations into patho-physiological basis of human diseases. This work explored for the first time the arachidonic acid metabolism of a *Tupaiaidae* representative (*Tupaia belangeri*) and found that this mammal carries four distinct *ALOX15* genes in its genome. The enzymes encoded by these four genes share a high degree of functional similarity but the observed genomic multiplicity, which is neither present in mice nor in humans, makes studies into the biological role of *ALOX15* orthologs more complex. Thus, *Tupaia belangeri* is not more suitable than mice for investigations into the biological role of mammalian *ALOX15* orthologs since loss-of-function studies on one *ALOX15* ortholog may easily be compensated by upregulation of an orthologous gene.

2) According to the Evolutionary Hypothesis mammalian *ALOX15* orthologs can be subdivided into arachidonic acid 12-lipoxygenating and arachidonic acid 15-lipoxygenating enzymes. Mammalian species, which are ranked above gibbons express arachidonic acid 15-lipoxygenating *ALOX15* orthologs. In contrast mammals ranked below gibbons express arachidonic acid 12-lipoxygenating enzymes. In this study the *ALOX15* orthologs of eleven different mammals expressed as recombinant proteins and characterized their functional properties. The results of these experiments were consistent with the Evolutionary Hypothesis and put this theory on a broader experimental basis. Moreover, the obtained in vitro mutagenesis data indicate that the novel enzymes follow Triad Concept.

3) Since human and mouse *ALOX15B* orthologs exhibit different functional properties, conclusion drawn in mouse models of human diseases may be misleading. To make human and mouse *ALOX15B* orthologs more like each other were generated *Alox15b* knock-in mice, which express the humanized Tyr603Asp+His604Val double mutant of mouse *Alox15b* instead of the endogenous wildtype enzyme employing the CRISPR/Cas9

in vivo mutagenesis strategy. These Alox15b-KI mice are viable, reproduce normally but exhibit gender-specific differences to outbred wildtype control animals when the bodyweight kinetics during adolescence and early adulthood were followed.

4) In previous studies an anti-inflammatory role of ALOX15B in the pathogenesis of inflammation has been suggested. Here we explored whether functional humanization of mouse Alox15b impacts the severity of inflammatory symptoms in two mouse inflammation models. In the dextran-sodium sulfate colitis model humanization of mouse Alox15b induced more severe inflammatory symptoms. In contrast, humanization of this enzyme protected mice in the Freund's complete adjuvants induced paw edema model. Taken together, these data suggest that the patho-physiological roles of Alox15b may vary depending on the type of the animal inflammation model used.

1 Einleitung

1.1 Lipoxygenasen

1.1.1 Vorkommen und Evolution

Alle auf der Erde vorkommenden Lebensformen können entsprechend des Drei-Domänen-Modells des irdischen Lebens (Woese and Fox 1977; Woese et al. 1990) in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt werden. Obwohl alternative Klassifizierungsmodelle vorgeschlagen wurden, hat sich das Drei-Domänen-Model durchgesetzt (Ho et al. 2013). Nach diesem Klassifizierungsschema können alle irdischen Lebensformen einem der folgenden Königreiche zugeordnet werden:

1. Archaeen
2. Bakterien
3. Eukaryonten

Wesentliches Einteilungskriterium für dieses Modell ist die Struktur der ribosomalen Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid, RNA), die sich grundlegend zwischen den Vertretern der drei Domänen unterscheidet. Lipoxygenasen sind Fettsäuredioxygenasen, die in zwei der drei Domänen (Bakterien, Eukaryonten) vertreten sind (Oliw 2002; Andreou et al. 2008; Vance et al. 2004; Ivanov et al. 2010; Vogel et al. 2010). Weit verbreitet sind sie in Pflanzenzellen und in Säugetierzellen (Rosahl 1996; Brash 1999). Das Vorkommen von Lipoxygenasen ist auch in niedrig entwickelten Organismen und Einzellern bewiesen (Vance et al. 2004; Hörnsten et al. 2002; Horn et al. 2015). Horn et al. haben in Viren einige Sequenzen identifiziert, die den Lipoxygenasen ähneln (Horn et al. 2015), jedoch wurden bisher keine funktionellen Lipoxygenasen in Viren nachgewiesen (Gehring et al. 2018). Die identifizierten Sequenzen sind entweder stark verkürzt oder es fehlen Aminosäurereste, die für die katalytische Aktivität von funktionellen Enzymen wesentlich sind. Eine komplette Lipoxygenase-ähnliche Sequenz wurde im Mimivirus *Acanthamoeba polyphaga* identifiziert, jedoch konnten Untersuchungen mit dem rekombinant exprimierten Protein keine Lipoxygenase-Aktivität nachweisen (Horn et al. 2015; Gehring et al. 2018; Gehring 2019). Ebenso wurden Lipoxygenase-ähnliche Sequenzen in Archaeen gefunden (*Halorubrum kocurii* und *Methanococcus voltae*), dabei gibt es bisher keine Hinweise auf das Vorkommen eines funktionell aktiven Enzyms (Horn et al. 2015). Lipoxygenasen benötigen für die durch sie vermittelten Reaktionen atmosphärischen Sauerstoff, welcher für verschiedene Archaeen toxisch ist, sodass unklar bleibt, wie in diesen Spezies eine

Lipoxygenierung stattfinden sollte. Nur weniger als 0,5 % der Bakteriengenome enthalten Lipoxygenase-Gene (Horn et al. 2015). Die Bakterienarten mit identifizierten funktionellen Lipoxygenase-Genen umfassen Proteobakterien, Firmicutes, Cyanobakterien, Actinobakterien und einige Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroide (Hansen et al. 2013; Horn et al. 2015; Chrisnasari et al. 2022). Es ist bisher nicht bekannt, ob während der Evolution des irdischen Lebens eine zeitweilige Urform der Lipoxygenasen als Ursprung vorkam, aus der sich alle derzeit existierenden Lipoxygenasen entwickelt haben, oder ob sich Lipoxygenasen durch horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies ausbreiteten (Ivanov et al. 2010). Die Tatsache, dass diese Enzyme in Cyanobakterien vorkommen (Lang and Feussner 2007; Lang et al. 2008; Hansen et al. 2013; Newie et al. 2016), die bereits zu Urzeiten existierten, könnte auf eine systematische Evolution aller Lipoxygenasen aus den Cyanobakterien-Lipoxygenasen hindeuten. Sequenzuntersuchungen haben gezeigt, dass die heute noch existierenden Lipoxygenase-Isoformen der Cyanobakterien hohe Sequenzähnlichkeiten mit den Chloroplasten-Lipoxygenasen der Pflanzen aufweisen. Unklar ist derzeit, warum Bakterien Lipoxygenasen exprimieren, obwohl mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die normalerweise als Lipoxygenase-Substrate umgesetzt werden, in Bakterien nicht weit verbreitet vorkommen. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch könnte sein, dass bakterielle ALOX-Isoformen Polyenfettsäuren ihrer Wirtsorganismen als Substrate verwenden, wenn sie diese infizieren.

Im Tierreich kommen Lipoxygenasen von niedrig bis höher entwickelten Organismen vor, von Einzellern bis zum Menschen. Da die meisten tierischen Lipoxygenasen im Gegensatz zu vielen pflanzlichen Enzymen Arachidonsäure als Substrat verwenden, werden diese Enzyme als Arachidonsäure-Lipoxygenasen (ALOX-Isoformen) bezeichnet. Die meisten ALOX-Isoformen enthalten als katalytisch aktives Übergangsmetall ein Eisenion. Bei manchen Enzymen der Gattung der Pilze enthalten die ALOX-Isoformen jedoch ein Manganion anstatt eines Eisenions als katalytisch wirksames Metall (Hamberg et al. 1998; Su and Oliw 1998; Hörnsten et al. 2002; Wennman et al. 2016). Einzeller enthalten meist nur ein oder zwei Lipoxygenase-Gene in ihren Genomen, während die Genome höhere Säugetiere sechs oder sieben funktionelle Lipoxygenase-Gene enthalten (Waterston et al. 2002; Hansen et al. 2013; Horn et al. 2015). So enthält z. B. das humane Genom (siehe Abschnitt 1.1.4) sechs funktionelle ALOX-Gene, die für unterschiedliche ALOX-Isoformen kodieren (Funk et al. 2002; Hajeyah et al. 2020). Bei der Auswertung der Aminosäuresequenzen von mehr als 100 Säuger-ALOX15-Orthologen wurde die Hypothese aufgestellt (siehe Abschnitt 1.2.3), dass Säugetiere, die in der Evolution unterhalb der

Gibbons eingruppiert sind, Arachidonsäure-12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe exprimieren (Adel et al. 2016; Kuhn et al. 2018). Im Gegensatz dazu exprimieren höhere Primaten wie ausgestorbene und existierende Menschen, Schimpansen, Orang-Utans und Gorillas 15-lipoxygenierende Enzyme (Adel et al. 2016). Zwei Gene oder Proteine sind in verschiedenen Arten zueinander ortholog, wenn ein gemeinsamer Vorfahre ein Artenbildungsereignis durchlaufen hat. Die in der Forschung häufig verwendeten Tiermodelle (Maus und Ratte) besitzen sieben funktionelle Lipoxygenase-Gene und jeweils ein Arachidonsäure-12-lipoxygenierendes ALOX15-Ortholog (siehe Abschnitt 1.1.4). Da hochgezüchtete Kulturpflanzen (z. B. Reis, Weizen, Sojabohnen) häufig einen polyploiden Chromosomensatz enthalten, finden sich bei pflanzlichen Organismen manchmal mehr als zehn verschiedene Lipoxygenase-Gene (Umate 2011; Yang et al. 2012; Chen et al. 2015). Aus diesen Zahlen wird deutlich, dass die Anzahl der Lipoxygenase-Gene in einem Organismus nicht als Maßstab für eine höhere Entwicklungsstufe der verschiedenen Spezies angesehen werden kann.

1.1.2 Reaktionsmechanismus

Tierische ALOX-Isoformen besitzen eine Polypeptidkette mit einer Molekularmasse von 75–80 kDa, während die pflanzlichen Enzyme häufig größer sind (94–104 kDa) (Brash 1999). Diese Enzyme katalysieren in vier Schritten die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die eine 1Z,4Z-Pentadiengruppe enthalten, zu den jeweiligen Hydroperoxyderivaten (Kuhn and Thiele 1999; Hajeyah et al. 2020). In Abbildung 1 ist der prinzipielle Reaktionsmechanismus der Lipoxygenasen schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wird eine mehrfach ungesättigte Fettsäure am aktiven Zentrum des Proteins in der Nähe des enzym-gebundenen Nicht-Häm-Eisens gebunden. Aufgrund der räumlichen Nähe des Nicht-Häm-Eisens (Oxidationsstufe +3, $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) und einer der doppelallylständigen Methylengruppen der Substratfettsäure wird ein Wasserstoffatom stereospezifisch von dieser Gruppe abstrahiert. Parallel dazu erfolgt ein protonengekoppelter Elektronentransfer, wobei ein Elektron von der bisallylischen Methylengruppe direkt auf das enzym-gebundene Nicht-Häm-Eisen übertragen wird (Knapp et al. 2002; Lehnert and Solomon 2003; Hatcher et al. 2004). Das bei der Wasserstoffabstraktion entstehende Proton wird vom Hydroxidliganden aufgenommen, und es entstehen ein Lipidalkylradikal und Nicht-Häm-Eisen in der Oxidationsstufe +2 ($\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$). Im zweiten Schritt der ALOX-Reaktion wird dieses Lipidradikal in die stabilere konjugierte Dien-Form umgelagert. Ein Fettsäureperoxyl-Radikal entsteht im dritten Schritt durch antarafaciale Insertion

molekularen Sauerstoffs, auf der dem abstrahierten Wasserstoffatom gegenüberliegenden Seite des Doppelbindungssystems. Während des vierten Reaktionsschritts, der Radikalreduktion, wird ein Elektron vom zweiwertigen ($\text{Fe}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$) Nicht-Häm-Eisen auf das Hydroperoxyfettsäure-Radikal übertragen, wodurch das Hydroperoxyfettsäure-Anion und dreiwertiges Nicht-Häm-Eisen ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) entsteht. Die in diesen Reaktionen entstehenden einfachen oxygenierten Lipide können in zellulären Systemen durch Bindung an Rezeptorproteine intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Sie können aber auch zu komplexeren Lipidmediatoren (z. B. Eoxine, Leukotriene, Lipoxine, Resolvine) verstoffwechselt werden (Serhan et al. 2006; Feltenmark et al. 2008; Christie and Harwood 2020), die ebenfalls an spezifischen Oberflächenrezeptoren binden und damit alternative Signalkaskaden induzieren können.

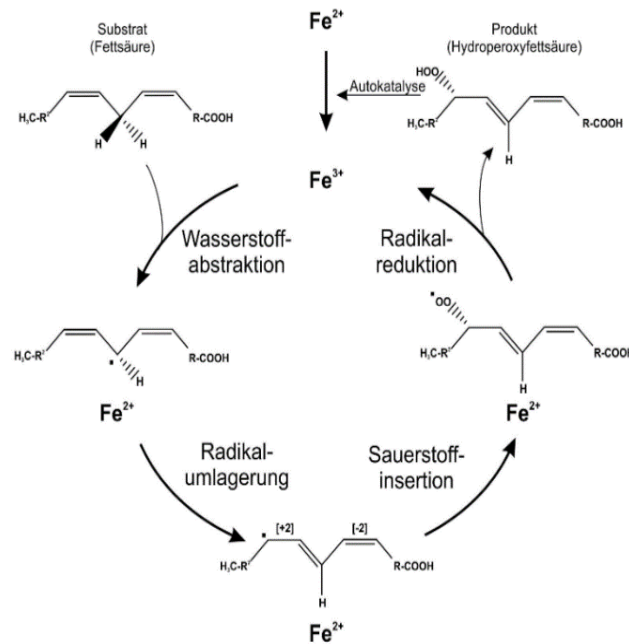


Abbildung 1: Reaktionsweg der Lipoxygenasen (modifiziert nach Hofheinz 2014; Ivanov et al. 2010). Erläuterungen siehe Text.

Die meisten der bislang bekannten Kristallstrukturen von Lipoxygenasen zeigen eine N-terminale Domäne und eine C-terminale Domäne als strukturelle Komponenten (Boyington et al. 1993; Gillmor et al. 1997; Choi et al. 2008; Gilbert et al. 2011; Kobe et al. 2014). Letztere enthält das für die Oxygenierungsreaktion erforderliche Nicht-Häm-Eisen. Die N-terminale Domäne von ALOX15 wird zwar nicht direkt für die katalytische Aktivität von Lipoxygenasen benötigt, könnte aber über eine Interaktionsstelle zwischen N-terminalen und katalytischen Domänen eine Rolle für die strukturelle Integrität der

katalytischen Domänen spielen (Ivanov et al. 2011; Walther et al. 2011; Eek et al. 2012; Xu et al. 2012; Droege et al. 2017). Darüber hinaus sorgt sie für die Bindung des Enzyms an Zellmembranen und bei der ALOX5 für die Translokation des Enzyms aus dem Zytosol an die Kernmembran (Chen and Funk 2001; Hanaka et al. 2002; Walther et al. 2002; Walther et al. 2011). Die Regulation von der bisher am meisten untersuchten ALOX5 kann durch mehrfache Phosphorylierung des Enzyms an verschiedenen Aminosäuren erfolgen. Die Phosphorylierung von Ser-271, Ser-663 erhöht und von Ser-523 erniedrigt die ALOX5-Aktivität (Werz et al. 2000; Werz et al. 2002; Luo et al. 2004; Flamand et al. 2009; Ye et al. 2008; Sun et al. 2019). Die humane ALOX5 interagiert zudem mit dem coactosin-ähnlichen Protein (Coactosin-like Protein, CLP) und dem 5-Lipoxygenasen-Aktivierungsprotein (5-Lipoxygenase-activating Protein, FLAP) (Basavarajappa et al. 2014; Häfner et al. 2015). Für die Bindung vom Lipoxygenasen an Biomembranen (Zellmembranen, Zellorganellmembranen) wird Calcium benötigt und einige ALOX-Isoformen besitzen dafür spezielle Ca-Bindungsmotive in der N-terminalen β -barrel-Domäne (Wong et al. 1988; Hagmann et al. 1993; Watson and Doherty 1994; Brinckmann et al. 1998; Eek et al. 2012; Droege et al. 2017). Diese Domäne ist eine kompakte, sich selbstständig strukturierende Einheit, bestehend aus mehreren β -Faltblättern, die zu einer Fassform verdrillt sind (β -barrel).

1.1.3 Klassifizierung

Die Einteilung von Lipoxygenasen hat im letzten Jahrhundert mehrere Phasen durchlaufen und verschiedene Enzymeigenschaften (z.B. Reaktionsspezifität je nach Substratumsetzung) wurden dabei als Klassifizierungsmerkmale und Namensgeber herangezogen. So fungierten ab den 70-er Jahren die Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung, die Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid, DNA)-Sequenzähnlichkeit oder das zelluläre Vorkommen (Chloroplasten, Thrombozyten-Zellmembran) der Enzyme als Klassifizierungskriterien. Als erste Lipoxygenase wurde 1928 ein Isoenzym aus Sojabohnen identifiziert, das in der Lage war, Carotin zu oxidieren (Sumner and Dounce, 1939 zitiert nach Sumner and Sumner 1940; Wolf 1975; Ikediobi and Snyder 1976; Grosch et al. 1977). Dieses Enzym wurde daraufhin als Carotinoxidase und später als Lipoxygenase bezeichnet (Sumner and Sumner 1940; Shibata et al. 1987). Im Rahmen der weiteren Entwicklung wurde dieses Enzym und andere Lipoxygenase-Isoformen der Sojabohne umfassend charakterisiert (Funk et al. 1981; Slappendel et al. 1981; van Os et al. 1981; Chedea and Jisaka 2011; Mandal et al. 2014). Derzeitig werden pflanzliche Lipoxygenasen unabhängig

von ihrer Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure hinsichtlich ihres Vorkommens in zytosolische (Fischer et al. 1999; Porta and Rocha-Sosa 2002) und chloroplastische Isoformen eingeteilt (Douillard and Bergeron 1981; Hatanaka et al. 1987; Bell et al. 1995; Feussner and Wasternack 2002). Der Hauptgrund dafür ist, dass eine große Anzahl von pflanzlichen Lipoxygenasen die Arachidonsäure nicht als Substrat nutzen kann. Deshalb kann das Arachidonsäure-basierte Klassifizierungssystem auf viele pflanzliche ALOX-Isoformen nicht oder nur begrenzt angewendet werden. Die Arachidonsäure-basierte Klassifizierung beruht darauf, dass die Enzyme hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure als Substrat eingeteilt werden. Aus dieser Polyenfettsäure können prinzipiell sechs unterschiedliche Oxygenierungsprodukte (Hydroxyperoxyarachidonsäure, HpETE) gebildet werden, die cis-trans konjugierte Doppelbindungssysteme tragen (5-HpETE, 8-HpETE, 9-HpETE, 11-HpETE, 12-HpETE, 15-HpETE) (Borgeat et al. 1976; Brash 1999; Funk et al. 2002; Schneider and Brash 2002). Die primären ALOX-Produkte, besitzen ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und können somit jeweils als R- oder S-Isomere vorliegen (Brash 1999; Schneider and Brash 2002). Im Rahmen der ALOX-Reaktion wird von den meisten Enzymen nur eines der beiden Enantiomere gebildet, so dass keine racemische Produktmischung entsteht. Für die Bildung von 5-HpETE (Borgeat et al. 1976; Aharony et al. 1987), 8-HpETE (Bundy et al. 1986), 11-HpETE (Reddy et al. 1992), 12-HpETE (Siegel et al. 1979; Yoshimoto and Takahashi 2002) und 15-HpETE (Lundberg et al. 1981; Narumiya and Salmon 1982) konnten bereits verschiedene ALOX-Isoformen (LOX5, LOX11, LOX12, LOX15) identifiziert werden. Lediglich für die Bildung von 9-HpETE konnte bisher noch keine ALOX-Isoform beschrieben werden. Das Arachidonsäure-basierte Klassifizierungssystem ist zwar leicht verständlich, führt aber zu einer Reihe von Problemen, die dessen Anwendbarkeit einschränken.

Die Positionsspezifität einer Lipoxygenase beschreibt die Nummer des Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure, das im Rahmen der katalysierten Reaktion oxidiert wird. So vermittelt die 5-Lipoxygenase (ALOX5) die Oxygenierung der Arachidonsäure am Kohlenstoffatom 5, während die 15-Lipoxygenase die Oxygenierung des Kohlenstoffatoms 15 katalysiert (ALOX15). Werden jedoch Linolsäure (9 cis, 12 cis-Octadecadiensäure) oder (4 cis, 7cis, 10 cis, 13 cis, 16 cis, 19 cis)-Docosahexaensäure als Substrate verwendet, verändert sich die Reaktionsspezifität der Enzyme und diese Veränderungen führen zu Missverständnissen in der Enzymbezeichnung, da z. B. 13-HODE (13-Hydroxy-9 cis, 11 trans-Octadecadiensäure) das Hauptprodukt der Oxygenierung von Linolsäure durch ALOX15-Orthologe ist. Alternativ zur Klassifizierung der Enzyme entsprechend ihrer

Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure (Kuhn and Thiele 1999) wurde von Ivanov et al., 2010 eine sequenzbasierte Klassifizierung der Lipoxygenasen vorgeschlagen, die auf dem Homologiegrad der Nukleotidsequenzen ihrer Gene und damit auf der Aminosäuresequenz der Enzyme beruht (Ivanov et al. 2010; Sarde et al. 2018). Homologe Gene haben einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren und lassen sich in zwei Gruppen einteilen: a) orthologe Gene, b) paraloge Gene. Bei orthologen Genen existierte der Vorfahre vor der Aufspaltung der Arten. Deshalb kommen sie in unterschiedlichen Organismen vor und üben meist ähnliche biologische Funktionen aus. Paraloge Gene entstehen durch Genduplikationen innerhalb des Genoms einer Art (Gabaldón and Koonin 2013). Evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen ALOX-Isoformen lassen sich vom Arachidonsäure-basierten Klassifizierungssystem nicht adäquat ableiten. So unterscheiden sich unter anderem die ALOX15-Orthologen des Menschen und der Maus funktionell unter anderem dadurch, dass sie trotz hoch konservierter Aminosäuresequenzen Arachidonsäure zu unterschiedlichen Oxygenierungsprodukten umwandeln. Dabei ist 15-HpETE das Hauptprodukt des humanen Enzyms (Sigal et al. 1988; Sigal et al. 1990) und 12-HpETE das Hauptprodukt des murinen Enzyms (Sun and Funk 1996). Entsprechend des Arachidonsäure-basierten Klassifizierungssystems würden diese beiden ALOX-Isoformen in verschiedene Enzymklassen eingegliedert werden, obwohl es orthologe Enzyme mit einem hohen Verwandtschaftsgrad sind, was anhand der Aminosäure-Sequenzähnlichkeit (Kuhn et al. 2018) erkennbar ist. Entsprechend des Arachidonsäure-basierten Klassifizierungssystems würden andererseits die humane ALOX12 und die murine Alox15 in eine Enzymklasse eingruppiert werden, weil beide Enzyme Arachidonsäure dominant zu 12-HpETE umwandeln (Freire-Moar et al. 1995; Sun and Funk 1996; Kuhn et al. 2018). Jedoch weisen diese Enzyme nur einen geringen Verwandtschaftsgrad auf, was aus dem geringen Grad der Aminosäurekonservierung (Identität (*Identity*) ca. 60 %; [NCBI-Datenbank-Referenzsequenz von Maus: NP_031466.2; Human: NP_000688.2]) abgeleitet werden kann. Der Identitätsprozentsatz bestimmt die Anzahl identischer Reste über eine definierte Länge in einem gegebenen Alignment. In dieser Arbeit werden die Maus-ALOX-Gene/ Orthologe klein geschrieben, damit eine bessere Übersichtlichkeit erlangt wird.

Mit der Untersuchung der Reaktionsmechanismen haben verschiedene Studien postuliert, dass sich Substratfettsäuren in unterschiedlichen Orientierungen in einer Substratbindungstasche binden können. Je nach Art und Weise der Substratorientierung kann sich die Produktspezifität des Enzyms ändern. Ob Fettsäuresubstrate mit ihrem Methylende voran in die Substratbindungstasche hineingleiten (Tail-first-Orientierung) oder

ob Fettsäuren mit ihrer Carboxylgruppe zuerst eindringen (Head-first-Orientierung) hängt vom Enzym und von der Substratstruktur ab (Schwarz et al. 1998; Walther et al. 2001).

1.1.4 Humane und murine ALOX-Gene

Heute sind sechs funktionelle Lipoxygenase-Gene im menschlichen Genom identifiziert: *ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15*, *ALOX15B* und *ALOXE3* (Funk et al. 2002; Hajeyah et al. 2020). Sie zeigen eine gewebespezifische und zellspezifische Expression und unterschiedliche Substratpräferenzen (Tabelle 2). Lipoxygenase-Gene werden in dieser Arbeit zur besseren Unterscheidung kursiv geschrieben. Mit Ausnahme von *ALOX5* sind alle *ALOX*-Gene sowie die Pseudogene *ALOX-12P1* und *ALOX-12P-2* in einem gemeinsamen Gencluster auf Chromosom 17 lokalisiert (Abbildung 2). Das *ALOX5*-Gen ist auf Chromosom 10 lokalisiert (Funk et al. 1992). Auch das Maus-Gen der *Alox5* ist auf einem anderen Chromosom (Chromosom 6) als die übrigen sechs Maus-*ALOX*-Gene (Chromosom 11) lokalisiert (Funk et al. 2002). In Abbildung 2 sind die Gencluster auf den Chromosomen 17 (human) und 11 (murin) dargestellt. Erkennbar ist die entgegengesetzte Anordnung der Gene auf dem Chromosom. Die *ALOX12P*-Gene sind beim Menschen funktionslose Pseudogene. Sie existieren bei der Maus nicht. Das Ortholog vom *ALOX12P2* ist bei der Maus das funktionelle *Alox12e*-Gen. Die Aminosäuresequenzen der Maus-*Alox12*-, *Alox12b*-, *Aloxe3*- und *Alox5*-Isoformen stimmen hochgradig (> 90 %) mit ihren menschlichen Orthologen überein und zeigen ähnliche enzymatische Eigenschaften. Die Sequenzen von Maus-*Alox15* und -*Alox15b* ähneln den menschlichen Isoformen mit über 85 % (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Aminosäuresequenz der ALOX-Gene von Mensch und Maus. Die Aminosäuresequenzen der Enzyme wurden mittels paarweisem Sequenz-Alignment durch das Online-Tool „EMBL-EBI-Service_EMBOSS-Needle“, (Stand: 09.2019) miteinander verglichen.

ALOX-Gen	Identität der Aminosäuren [%]	Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen [%]
<i>ALOXE3</i>	88,5	94,7
<i>ALOX5</i>	93,5	97,2
<i>ALOX12</i>	85,5	91,3
<i>ALOX12B</i>	86,0	94,0
<i>ALOX15</i>	73,6	85,7
<i>ALOX15B</i>	78,0	88,2

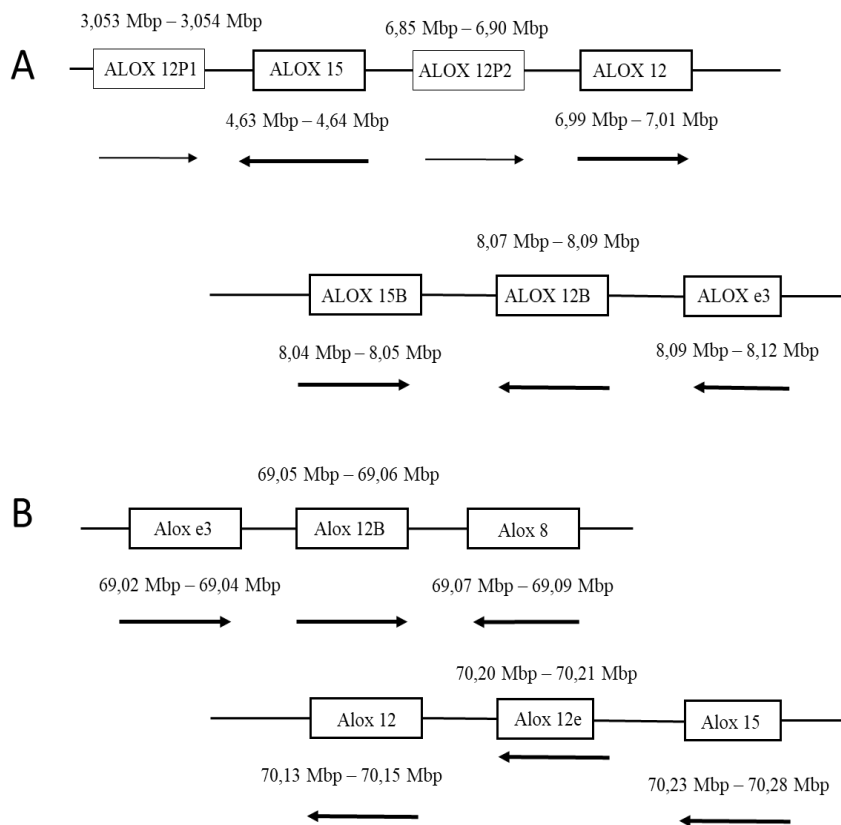


Abbildung 2: A) Humanes ALOX-Gencluster auf Chromosom 17, B) Murines Alox-Gencluster auf Chromosom 11 (Quelle: eigene Darstellung). Die Gengröße ist in Megabasenpaaren (Mbp) angegeben und die Richtung des Leseraster wird durch die Pfeile symbolisiert. Pseudogene sind schwächer umrandet. Weitere Erläuterung im Text.

In Tabelle 2 sind die Lipoxygenase-Gene des Menschen und ihr Expressionsort mit entsprechenden Quellen aufgelistet. Alle bekannten Lipoxygenasen sind Monomere, können jedoch auch als Homodimere (z. B. ALOX5 und ALOX15) oder als eine Mischung von Monomeren und Dimeren (z. B. ALOX5) vorliegen, was einen möglichen Regulationsmechanismus darstellt (Choi et al. 2008; Häfner et al. 2011; Ivanov et al. 2012; Ivanov et al. 2021). Bei der Bildung von kovalenten Dimeren der humanen ALOX5 werden die beiden Monomeren über Disulfidbrücken miteinander vernetzt. Die Dimerisierung des Enzyms wird blockiert durch die Mutation verschiedener Cysteine (Cys159, Cys300, Cys416, Cys418), die in der Dimerisierungsgrenzfläche lokalisiert sind, die sich wiederum am Eingang der Substratbindungstasche befindet. Die Inkubation von ALOX5-Monomeren mit Diamid, einem redoxaktiven Harnstoffderivat, das den zellulären Redoxstatus verändert und somit funktionelle Veränderungen induziert, führt zu einer Dimer- bzw. Oligomerbildung. Dadurch wird die katalytische Aktivität der ALOX5 deutlich reduziert (Häfner et al. 2011). Die Kaninchen-ALOX15 zeigt eine reversible Dimerisierung, bei der

nichtkovalent verknüpfte Enzymdimere gebildet werden. Dabei erfolgt die Dimerisierung in wässriger Lösung und die Enzym-Dimere sind in Gegenwart ihrer Substrate stabil (Ivanov et al. 2012). Der Grad der ALOX15-Dimerisierung ist stark variabel und hängt von den experimentellen Bedingungen (Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) und von der An- bzw. Abwesenheit von Liganden ab, die am aktiven Zentrum des Enzyms binden (Gillmor et al. 1997; Shang et al. 2011; Ivanov et al. 2012). Dadurch können bestimmte ALOX15-Hemmstoffe als allosterische Enzymregulatoren fungieren (Golovanov et al. 2022).

Tabelle 2: Lipoxygenase-Gene des Menschen (modifiziert und ergänzt nach Singh and Rao 2019)

Lipoxygenase	Gen	Expressionsort	Quellen
5-LOX	<i>ALOX5</i>	Lunge, Plazenta, Mastzellen, dendritische Zellen, Leukozyten	Rouzer and Samuelsson 1985; Matsumoto et al. 1988; Colamorea et al. 1999; Spanbroek et al. 2000; Spanbroek et al. 2001
12S-LOX	<i>ALOX12</i>	Epidermis, glatte Muskelzellen, Nabelschnurendothel, Thrombozyten, B-Lymphozyten	Funk et al. 1992; Chen and Funk 1993; Weisinger et al. 2007; Weisinger et al. 2013; Kutzner et al. 2017; Simard-Bisson et al. 2018
12R-LOX	<i>ALOX12B</i>	Haarwurzeln, Keratinozyten, Lungenepithel, Tonsillen	Boeglin et al. 1998; Krieg et al. 2001; Schneider et al. 2001; Garcia-Verdugo et al. 2012
15-LOX-1	<i>ALOX15</i>	Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, Retikulozyten, Bronchialepithel	Kroschwald et al. 1989; Nadel et al. 1991; Spanbroek et al. 2001; Wuest et al. 2012
15-LOX-2	<i>ALOX15B</i>	Makrophagen, Haarwurzeln, Haut, Hornhaut, Lunge, Prostata	Brash et al. 1997; Shappell et al. 1999; Spanbroek et al. 2001; Chang et al. 2005; Wuest et al. 2012
eLOX3	<i>ALOXE3</i>	Epidermis, Testis, Plazenta	Krieg et al. 2001; Zheng et al. 2011; Krieg and Fürstenberger 2014

1.1.5 Lipoxygenaseprodukte

Verschiedene Studien in den 2000er-Jahren haben gezeigt, dass oxygenierte Derivate von Omega-3-Fettsäuren und Omega-6-Fettsäuren entzündungsfördernde oder entzündungshemmende Wirkungen haben (Serhan et al. 2000; Simopoulos 2002; Bagga et al. 2003; Song et al. 2003; Serhan et al. 2008; Serhan and Chiang 2008). Arachidonsäure (AA), Docosahexaensäure (DHA), Eicosapentaensäure (EPA),

Linolsäure (LA), Alpha-Linolensäure (ALA) und Gamma-Linolensäure (GLA) sind wichtige Substrate von Lipoxygenasen. In Abbildung 3 und 4 sind vereinfachte biosynthetische Reaktionswege nach (Smith and Murphy 2016; English et al. 2017) für die entzündungsfördernden Prostaglandine und Leukotriene sowie für die proresolutorischen Lipoxine, Resolvine, Protectine und Maresine dargestellt. Abbildung 4 zeigt einen Überblick von Oxidationsprodukten, die aus Omega-3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure entstehen. Diese Produkte zeigen überwiegend entzündungshemmende und entzündungsauflösende (heilende) Wirkungen. Aus Linolsäure kann Arachidonsäure hergestellt werden, während Alpha-Linolensäure das Ausgangssubstrat für die Bildung von Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure ist. In vereinfachten Reaktionswegen können verschiedene ALOX-Enzyme aus den Substraten Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure die entzündungsauflösenden Resolvine und Maresine bilden. Resolvine hemmen beim Menschen die Migration von neutrophilen Granulozyten durch Blutgefäßwände (Campbell et al. 2007).

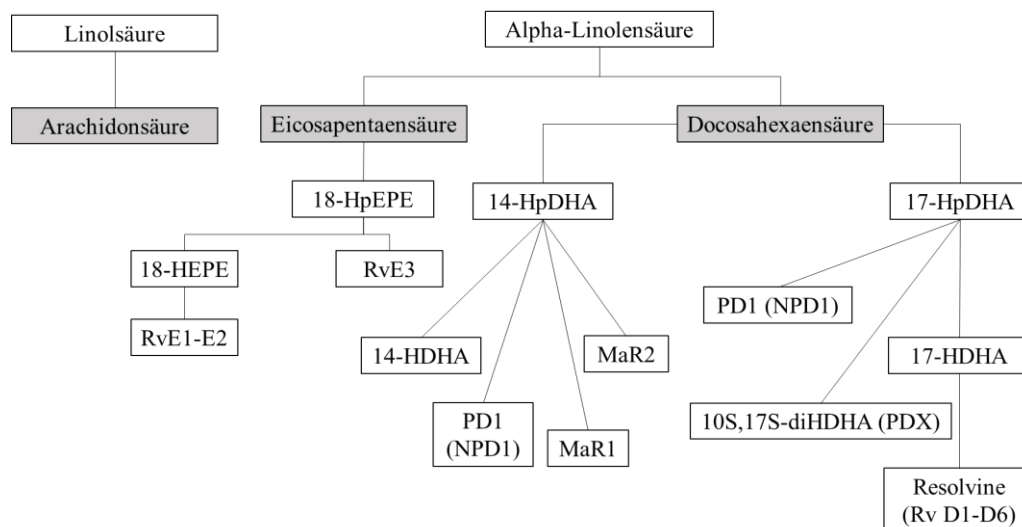


Abbildung 3: Übersicht zu derzeit bekannten Oxylipinen, die aus verschiedenen Polyenfettsäuren gebildet werden können (modifiziert nach English et al. 2017). Die Oxylipine, die aus Arachidonsäure synthetisiert werden, sind in Abbildung 4 zusammengefasst und werden hier nicht gezeigt. Nähere Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen für Substrate und Produkte: 14-HpDHA, 14-Hydroperoxydocosa-4,7,10,12,16,19-Hexaensäure; 14-HDHA, 14-Hydroxydocosa-4,7,10,12,16,19-Hexaensäure; 17-HpDHA, 17-Hydroperoxydocosa 4,7,10,13,15,19-Hexaensäure; 17-HDHA, 17-Hydroxydocosa-4,7,10,13,15,19-Hexaensäure; 10(S),17(S)-diHDHA PDX, Protectin DX, 10,17-Dihydroxydocosa-4,7,11,13,15,19-Hexaensäure; 18-HpEPE, 18-Hydroperoxy-5,8,11,14,16-Eicosapentaensäure; 18-HEPE, 18-Hydroxy-5,8,11,14,16-Eicosapentaensäure; RvE1, Resolvin E1; RvE2, Resolvin E2; RvE3, Resolvin E3; PD1/NPD1, Protectin-1/Neuroprotectin-1; MaR1, Maresin-1; MaR2, Maresin-2; RvD1-D6, Resolvin D1 bis Resolvin D6.

Resolvine E1 und E2 werden von diesen Zellen über den ALOX5-Weg synthetisiert (Arita et al. 2005; Tjonahen et al. 2006). Isobe et al. zeigte 2012, dass eosinophile Granulozyten von Mensch und Maus den antiinflammatorisch wirkenden Lipidmediator Resolvin E3 aus 18-HEPE über den ALOX15-Weg erzeugten (Isobe et al. 2012; Isobe et al. 2013). Maresine sind von Makrophagen produzierte Oxylipine, die zur Wundheilung beitragen und die Empfindlichkeit von Nerven gegenüber Schmerzreizen verringern (Serhan et al. 2009; Hwang et al. 2019). Protectine hemmen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Serhan et al. 2006; Schwab et al. 2007). Protectin DX ist ein Isomer von Protectin D1. Das Neuroprotectin hemmt die durch oxidativen Stress induzierte Expression proinflammatorischer Genen (Bazan 2006). Es fördert das Überleben von Gehirnzellen über die Induktion von antiapoptotischen und neuroprotektiven Genexpressionsprogrammen (Lukiw et al. 2005; Bazan 2006, 2009b). Dadurch sichert Neuroprotectin D1 (NPD1) die homöostatische Regulierung der Integrität von neuronalen Schaltkreisen (Bazan et al. 2013).

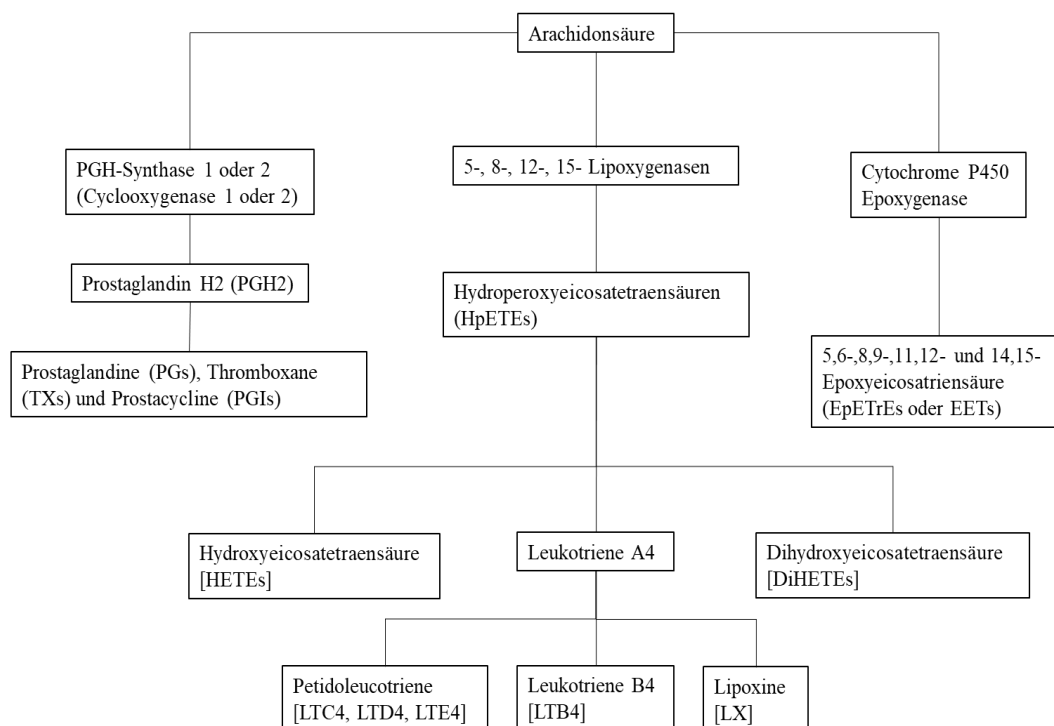


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Oxygenierungsprodukte von Arachidonsäure, die über drei metabolische Wege synthetisiert werden (Zyklooxygenase-Weg, Lipoxygenase-Weg, Cytochrom-P450-Weg) (modifiziert nach Smith and Murphy 2016). Abkürzungen für Produkte: LTA4, Leukotrien A4; 5S,6S-Epoxy-7E,9E,11Z,14Z-Eicosatetraensäure; LTB4, Leukotrien B4; 5S,12R-Dihydroxy-6Z,8E,10E,14Z-Eicosatetraensäure; LTC4, Leukotrien C4; 5S-Hydroxy-6R-(S-glutathionyl)-7E,9E,11Z,14Z-Eicosatetraensäure; LTD4, Leukotrien D4; 5S-Hydroxy-6R-(S-cysteinylglycinyll)-7E,9E,11E,14Z-Eicosatetraensäure; LTE4, Leukotrien E4, 5S-Hydroxy-6R-(S-Cysteinyl)-7E,9E,11Z,14Z-Eicosatetraensäure; Lipoxine (LX): LXA4, Lipoxin A4, 5S,6R,15S-Trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-Eicosatetraensäure Säure; LXB4, Lipoxin B4, 5S,14R,15S-Trihydroxy-6E,8Z,10E,12E-Eicosatetraensäure.

In Abbildung 4 sind die Oxylipine dargestellt, die aus Arachidonsäure synthetisiert werden können. Mit wenigen Ausnahmen entfalten fast alle Oxylipine ihre biologischen Aktivitäten über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren. Dadurch induzieren sie intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die zu Veränderungen des zellulären Phänotyps führen. So gehören auch die Prostaglandinrezeptoren zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren. Sie werden durch ein Präfix (PG) bezeichnet, um ihre Präferenz für bestimmte Prostaglandine (z. B. Prostaglandin D₂, Prostaglandin E₂, Prostaglandin F₂, Prostaglandin I₂) zu kennzeichnen. Thromboxan A₂ fördert die Blutgerinnung. Im Gegensatz dazu wirkt Prostazyklin (Prostaglandin I₂) gerinnungshemmend. Außerdem fungiert Prostaglandin I₂ als potenter Vasodilatator und hemmt die Blutplättchenaggregation (Kelton and Blajchman 1980). Prostaglandin E₂ oder Prostaglandin D₂ können als Endprodukt durch Umwandlung von Prostaglandin H₂ entstehen (Ricciotti and FitzGerald 2011). Prostaglandin D₂ moduliert die Thrombozytenaggregation und Bronchokonstriktion (Hardy et al. 1984; Bushfield et al. 1985). Prostaglandin E₂ und Prostaglandin F₂ sind Hormone, die verschiedene Funktionen erfüllen und auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzen (Kobza Black et al. 1982; Nagata et al. 1987). Leukotriene sind entzündungsfördernde Botenstoffe. Die Substanzgruppe unterteilt sich in die Peptido-(Cysteinyl-)Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ und das Cysteinyl-freie LTB₄ (Werz and Steinhilber 2006). Die antiinflammatorischen Epoxyeicosatriensäuren (EETs) werden durch die Aktivität von Cytochrom-P450-abhängigen (CYP-abhängigen) Monooxygenasen aus Arachidonsäure erzeugt. EETs regulieren den Gefäßtonus, die Zellproliferation, die Neoangiogenese sowie die Migration glatter Muskelzellen (Thomson et al. 2012).

1.1.6 Biologische Rolle

Für alle humanen ALOX-Isoformen wurden bereits isoformspezifische biologische Funktionen beschrieben. So konnte aus Untersuchungen von genetisch veränderten Mäusen, bei denen die Expression verschiedener ALOX-Gene selektiv inaktiviert wurde (Alox5 bei Chen et al. 1994b und Goulet et al. 1994, Alox15 bei Sun and Funk 1996, Alox12 bei Johnson et al. 1999, Alox12b bei Epp et al. 2007, Alox3 bei Krieg et al. 2013 und Alox15b bei Alfardan et al. 2019), abgeleitet werden, dass die verschiedenen ALOX-Isoformen der Maus unterschiedliche biologische Funktionen besitzen. Offenbar gibt es keine funktionelle Redundanz der verschiedenen murinen Alox-Isoformen. Der Knock-out eines *Alox*-Gens kann nach den bisher vorliegenden Funktionsdaten nicht durch die verstärkte Expression eines anderen *Alox*-Gens kompensiert werden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass jedem

humanen paralogem ALOX-Gen isoformspezifische biologische Funktionen zukommen, die nicht von anderen ALOX-Isoformen übernommen werden können. Ein kurzer Einblick in die spezifische Funktionalität der einzelnen ALOX-Isoformen kann folgendermaßen gegeben werden:

Die ALOX5 ist das Schlüsselenzym bei der Biosynthese der Leukotriene, die klassisch als proinflammatorische Mediatoren wirken. Das Enzym katalysiert die Oxygenierung von Arachidonsäure zu 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5-HpETE) und die anschließende Dehydratisierung von 5-HpETE zu 5,6-Epoxyeicosatetraensäure (Carolis et al. 1996; Petrich et al. 1996; Gilbert et al. 2011; Smyrniotis et al. 2014). Kürzlich wurde eine Rolle des Enzyms in der Glukose-Homöostase durch Bildung des Leukotriens B4 und dessen Einfluss auf die Insulinsensitivität demonstriert (Hosooka et al. 2020). Ein Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von ALOX5 und der Expression inflammatorischer Marker konnte in Tiermodellen der Adipositas hergestellt werden (Chakrabarti et al. 2011). ALOX5 kann neben Arachidonsäure auch Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure, 15(S)-HETE und 18(S/R)-HEPE oxygenieren und sollte damit durch die Bildung von Resolvinen auch antiinflammatorisch wirken (Tjonahen et al. 2006; Oh et al. 2011; Ivanov et al. 2019). Weiterhin hemmt die ALOX5 durch Oxidation von Docosahexaensäure die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese (Sapieha et al. 2011). Außerdem ist das Enzym an der Regulation der Monozytenadhäsion und der Wundheilung beteiligt (Lee et al. 2013; Brogliato et al. 2014). Durch die Beteiligung der ALOX5 an der Biosynthese von antiinflammatorisch und/oder entzündungsauflösend wirkenden Botenstoffen kann dieses Enzym nicht mehr einseitig als proinflammatorisch angesehen werden. Eine umfassendere Zusammenfassung der biologischen Bedeutung der ALOX5 wird in entsprechenden Übersichtsartikeln gegeben (Haeggström and Funk 2011; Horn et al. 2013; Sun et al. 2019; Halade et al. 2022).

Verschiedene biologische Prozesse werden auch durch ALOX12 reguliert, die Arachidonsäure in das bioaktive Lipid 12(S)-HpETE umwandelt. Da dieses Enzym in Blutplättchen auf hohem Niveau exprimiert wird, scheint es bei der Thrombozytenaktivierung und bei der Blutplättchenaggregation bedeutsam zu sein (Chen and Funk 1993). Das Enzym kann 14(S)-Hydroperoxy-Docosahexaensäure in Epoxy-Docosahexaensäure umwandeln, die in Makrophagen als Intermediat der Maresinsynthese fungiert (Dalli et al. 2013). Die dabei entstehenden Maresine regulieren die Makrophagendifferenzierung und unterstützen die Differenzierung von naiven Makrophagen zu antiinflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen. Der abgestimmte

Wechsel von entzündungsfördernden M1-Makrophagen zu immunregulierenden M2-Makrophagen ist von zentraler Bedeutung für die Heilung von Entzündungen (Radmark 2022). ALOX12 kann außerdem durch die sequenzielle Oxidation von Docosahexaensäure spezialisierte Immunmodulatoren (z. B. Resolvin D5) herstellen, wodurch die Immunantwort herunterreguliert und die Thrombozytenaggregation verhindert wird (Freedman et al. 2020; Perry et al. 2020 b). Das Leukotrien A4 (LTA4) kann durch ALOX12 in bio- und vasoaktive Lipoxine umgewandelt werden, welche die Aktivität von neutrophilen Granulozyten regulieren (Romano et al. 1993). ALOX12 ist zudem an der Migration, der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt, in dem es die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) reguliert und Apoptose verhindert (Nie et al. 1998; Nie et al. 2006; Klampfl et al. 2012). Durch Regulation der Apoptosereaktion ist die ALOX12 auch am Überleben von vaskulären glatten Muskelzellen beteiligt (Weisinger et al. 2013). In der Übersichtsarbeit von Zeng et al. werden weitere biologische Funktionen von ALOX12 bei verschiedenen Krankheiten diskutiert (Zheng et al. 2020).

ALOX12B und ALOXE3 bilden eine funktionelle Einheit, die für eine normale Hautentwicklung nötig ist. Beide Enzyme katalysieren unterschiedliche Reaktionen im Rahmen der epidermalen Differenzierung. Existierende Knock-outs der Gene in Mäusen unterbrechen die gleiche Reaktionskette, was zu ähnlichen Phänotypen der Knock-out-Mäuse führt. In der normalen epidermalen Differenzierung erfolgt zuerst die durch ALOX12B vermittelte enzymatische Oxygenierung von bestimmten Ceramiden, wodurch Hydroperoxyceramide entstehen, die anschließend durch die Hydroperoxidisomeraseaktivität der ALOXE3 in Sekundärprodukte umgewandelt werden können. Die Oxygenierung der Hautceramide ist eine notwendige Voraussetzung für die Konjugation dieser Lipide mit Proteinen der extrazellulären Matrix des *Stratum corneum* der Epidermis (Zheng et al. 2011). Hierdurch sind sowohl die ALOX12B als auch die ALOXE3 an der Bildung der Hautbarriere gegen Wasserverlust beteiligt (Zheng et al. 2011). Im Gegensatz zu allen anderen humanen ALOX-Isoformen weist die ALOXE3 unter normoxischen Bedingungen eine stark reduzierte Fettsäureoxygenaseaktivität auf (Yu et al. 2003; Yu et al. 2006; Zheng and Brash 2010 a, 2010 b). Unter diesen Bedingungen katalysiert das Enzym die Isomerisierung von Hydroperoxylipiden zu chemisch reaktiven Epoxyalkoholen und Ketonen (Yu et al. 2003; Zheng and Brash 2010 a). Ähnliche Hydroperoxidisomeraseaktivitäten wurde auch für andere ALOX-Isoformen beschrieben, sind aber meist nur unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar (Horn et al. 2015;

Mashima and Okuyama 2015). Hepoxiline stellen eine weitere Gruppe von biologisch aktiven Eicosanoiden dar, die über die Hydroperoxidisomeraseaktivität von ALOX-Isoformen gebildet werden können. Aufgrund der Produktion von Hepoxilinen durch die ALOXE3 ist das Enzym auch an der Adipozytendifferenzierung beteiligt (Brash et al. 2007; Hallenborg et al. 2010). Weitere biologische Funktionen der ALOX12B und der ALOXE3 werden in der Übersichtsarbeit von Mashima et al. erörtert (Mashima and Okuyama 2015).

Die ALOX15 katalysiert die stereospezifische Peroxidation von freien und veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren und produziert dadurch verschiedene bioaktive Lipidmediatoren (Kühn et al. 1993; Funk et al. 2002; Snodgrass and Brüne 2019). Durch Modifikation von 12-HpETE entstehen durch ALOX15-vermittelte Reaktionen Hepoxiline mit potenziell proinflammatorischen Eigenschaften. Durch sequenzielle Oxidationen von Docosahexaensäure entstehen proresolutorische Oxylipine wie Resolvin-D5 und 7S,14S-Dihydroxydocosahexaensäure (7S,14S-diHPDHA), die die Thrombozytenaggregation hemmen und antiinflammatorisch wirken (Perry et al. 2020 b; Marques et al. 2021).

ALOX15 spielt durch Peroxidation von membrangebundenem Phosphatidylethanolamin eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz, da hierdurch apoptotische Zellen während einer Entzündung beseitigt und eine Autoimmunreaktion verhindert werden kann (Maskrey et al. 2007; Snodgrass and Brüne 2019). Das Enzym reguliert ebenfalls die Aktinpolymerisation, was seine Rolle bei der lokalen Kontrolle der Aktinpolymerisation in Makrophagen als Reaktion auf die Interaktion mit apoptotischen Reizen erklärt (Miller et al. 2001). ALOX15 generiert endogene Liganden für den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPAR- γ) und moduliert so die Funktion von Makrophagen (Huang et al. 1999). Im Jahr 2015 zeigte sich bei Gronert et al. im Mausmodell, dass die Alox15 durch die Produktion von Lipoxinen und Neuroprotectinen an der epithelialen Wundheilung der Hornhaut beteiligt ist (Gronert et al. 2005; Biteman et al. 2007). Eine Beteiligung des Enzyms an endoplasmatischem Retikulum-Stress (Cole et al. 2012a) und daraus resultierenden Entzündungsreaktionen wurde in verschiedenen Studien in Adipozyten (Chakrabarti et al. 2009; Cole et al. 2012b), Leberzellen (Martínez-Clemente et al. 2010; Zhang et al. 2017) und den Inselzellen des Pankreas (Cole et al. 2012b; Dobrian et al. 2018) demonstriert. Martínez-Clemente et al. zeigte 2010 mit zu Hyperlipidämie neigenden Apolipoprotein E-defizienten-Mäusen, dass sie ein Mangel an Alox15 vor Leberverfettung, Insulinresistenz und entzündlichen Verletzungen schützt (Martínez-Clemente et al. 2010). Bei Cole et al. wird beschrieben, dass der endoplasmatische Retikulum-Stress die Alox15

aktiviert und dass das dabei gebildete 12(S)-HETE endoplasmatische Retikulum-Stress über Interleukin-12-abhängige Mechanismen induziert (Cole et al. 2012a).

Die ALOX15B reguliert den Zellzyklus und das humane Enzym aktiviert über die Bildung von 15-HETE ebenfalls PPAR- γ -vermittelte Signalwege (Subbarayan et al. 2006). Eine Rolle von ALOX15B in der Tumorprogression und Metastasierung wurde durch die Regulation der Zellproliferation und Migration von Adenokarzinomzellen (A549) demonstriert (Yang et al. 2018). Das Enzym ist demnach an der Biosynthese von Lipoxinen und Resolvinen beteiligt und fungiert somit auch als Immunmodulator (Perry et al. 2020; Perry et al. 2020 b). An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich die Erkenntnisse zur biologischen Rolle der humanen ALOX15B nicht 1:1 auf das murine Enzym übertragen lassen. Diese Einschränkung ergibt sich aus der Tatsache, dass die humane ALOX15B die Arachidonsäure fast ausschließlich in 15-HETE umwandelt, während das murine Ortholog dominant 8-HETE bildet.

1.2 Veränderungen der Reaktionsspezifität von ALOX15 und ALOX15B

1.2.1 Triadenkonzept

Erste Untersuchungen zur Reaktionsspezifität der Lipoxygenase in Retikulozyten von Kaninchen zeigten in den 1980er Jahren, dass Arachidonsäure von diesem Enzym zu zwei verschiedenen Isomeren von Hydroperoxyeicosatetraensäure umgesetzt wurde: 15S-HpETE und 12S-HpETE (Bryant et al. 1982). Das Verhältnis von 15S-HpETE und 12S-HpETE lag bei ca. 10:1. Da diese Beobachtung gegen das damals übliche Paradigma verstieß, dass Lipoxygenasen eine definierte Polyenfettsäure nur selektiv zu einem Oxidationsprodukt umwandeln können, wurde die 12-HpETE-Bildung durch die Verunreinigung des Enzympräparates mit der ALOX12 aus Thrombozyten erklärt. Da anschließend jedoch gezeigt werden konnte, dass sich das Verhältnis der beiden Oxygenierungsprodukte (15-HpETE vs. 12-HpETE) im Laufe der Enzymreinigung nicht veränderte und dass sich die duale Reaktionsspezifität des Enzyms auch beim elektrophoretisch reinen Enzympräparat nachweisen ließ (Kühn et al. 1990), musste geschlossen werden, dass ALOX15-Orthologe und möglicherweise auch andere ALOX-Isoformen prinzipiell duale Reaktionsspezifitäten aufweisen können. Nach der Beschreibung der dualen Reaktionsspezifität der ALOX15 des Kaninchens wurde in Schweineleukozyten ein Enzym beschrieben, welches ebenfalls eine duale Reaktionsspezifität aufwies. Für dieses Enzym wurde allerdings ein umgekehrtes Produktmuster (simultane Bildung von 12- and 15-HpETE im Verhältnis von 10:1) beschrieben (Yokoyama et al. 1986). In nachfolgenden

Untersuchungen wurde festgestellt, dass die orthologen Enzyme der Maus (AA-12-lipoxygenierend wie bei Bürger et al. 2000; McDonnell et al. 2001), des Menschen (AA-15-lipoxygenierend wie bei Kühn et al. 1993) und der Ratte (AA-12-lipoxygenierend wie bei Watanabe et al. 1993; Pekárová et al. 2015) ebenfalls duale Reaktionsspezifitäten aufwiesen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere unterschiedliche Reaktionsspezifitäten besitzen. Zur Erklärung dieser Ergebnisse wurde das sogenannte Triadenkonzept eingeführt, welches die molekularen Ursachen für die duale Reaktionsspezifität verschiedener Säugetier-ALOX15-Isoformen beschreibt (Borngräber et al. 1999). Es besagt, dass drei Aminosäuren am aktiven Zentrum der ALOX15-Orthologen die Substratbindung an diesem und dadurch die Reaktionsspezifität der Enzyme beeinflussen (Borngräber et al. 1999). Nach dem Triadenkonzept bestimmen die Aminosäuren Phenylalanin 353 (Phe), Isoleucin 418 (Ile) sowie Methionin 419 (Met) und Isoleucin 593 der ALOX15 des Kaninchens das Volumen der Substratbindungstasche. Die Einführung von weniger raumfüllenden Aminosäureresten an einer dieser Positionen begünstigt die Oxygenierung des zwölften Kohlenstoffatoms der Arachidonsäure. Befinden sich an diesen Stellen Aminosäuren mit raumfüllenden Seitenketten, wird das Kohlenstoffatom 15 der Arachidonsäure oxygeniert (Borngräber et al. 1996; Gillmor et al. 1997; Borngräber et al. 1999). Ein Modell von Gillmor et al. konnte 1997 zur Enzym-Substrat-Interaktion der Kaninchen-ALOX15 zeigen, dass Ile593 ebenfalls wichtig für die Positionsspezifität dieses Enzyms sein könnte (Gillmor et al. 1997). Bei Borngräber et al. wurde im Jahr 1999 durch ortsgerichtete Mutagenese von Ile593 zu Alanin (Ala) das Volumen der Substratbindungstasche erhöht. Die Hauptreaktionsprodukte (15S-HpETE und 12S-HpETE) der 15-lipoxygenierenden Kaninchen-ALOX15 wurden durch die Ile593-Ala-Mutante von ca. 10:1 in ein Verhältnis von 1:1 verschoben (Borngräber et al. 1999). Das Triadenkonzept erklärt die Reaktionsspezifität aller bisher getesteten Säugetier-ALOX15-Orthologen und ist auch teilweise auf ALOX12- und ALOX5-Orthologe anwendbar (Vogel et al. 2010). Bisher untersuchte ALOX15B-Orthologe folgen diesem Konzept jedoch nicht.

1.2.2 Sequenzdeterminanten der ALOX15B

Jisaka et al. fanden heraus, dass die Positionsspezifität der Maus-Alox15b (auch Alox8 genannt) durch die Sequenzdeterminanten Tyrosin 603 (Tyr) und Histidin 604 (His) bestimmt wird. Durch ortsgerichtete Mutation der beiden Aminosäuren zu den entsprechenden Aminosäuren (Asparaginsäure, Asp und Valin, Val) der humanen ALOX15B (Tyr603Asp und His604Val) lässt sich die Positionsspezifität von

AA-8-Lipoxygenierung zu dominanter (90 %) AA-15-Lipoxygenierung verändern (Jisaka et al. 2000). Werden die entsprechenden Jisaka-Determinanten in der humanen ALOX15B invers mutiert, verändert sich die Positionsspezifität in umgekehrter Richtung. In diesen Experimenten wurde beschrieben, dass die einfache Asp602Tyr-Mutation die Positionsspezifität der humanen ALOX15B kaum verändert. Die Val603His-Einfachmutante produzierte fast gleiche Mengen von 15- und 8-HpETE, während die Doppelmutante (Asp602Tyr+Val603His) 70 % 8-HETE und nur noch 30 % 15-HETE bildete. Ein Jahr später publizierte Jisaka et al. eine weiterentwickelte molekulare Struktur der beiden ALOX15B-Orthologen (humane 15-LOX-2 und murine Alox8) (Jisaka et al. 2001). Im Vergleich zu anderen tierischen Lipoxygenasestrukturen wird bemerkenswerterweise bei beiden Enzymorthologen das Nicht-Häm-Eisen in der katalytischen Domäne anders ligandiert. Bei den meisten ALOX-Isoformen ist das Nicht-Häm-Eisen über zwei hoch konservierte Ligandencluster-Strukturen mit dem Enzym über die Aminosäuren Histidin oder Asparagin (Asn) verbunden (Cluster 1: His-X₁-X₂-X₃-X₄-His, Cluster 2: His-Z₁-Z₂-Z₃-His (Asn)). Dabei stellen X₁₋₄ und Z₁₋₃ beliebige Aminosäuren dar. Bei den beiden ALOX15B-Orthologen von Mensch und Maus zeigt der zweite Eisencluster einen Serin-Rest (Ser) statt Histidin in seiner Sequenz (His-Z₁-Z₂-Z₃-Ser). In der Studie von Jisaka et al. führten 2001 multiple ortsgerichtete Mutationen dieses Serinrestes (Ser558Asn, Ser558His, Ser558Ala) zu Alox8-Mutanten, die hohe katalytische Aktivitäten aufwiesen. Für die Ser558Asn und Ser558His war bereits bekannt, dass His und Asn auch als Eisenliganden fungieren können. Neu war das Ergebnis der Ser558Ala-Mutante, da Ala aufgrund seiner chemischen Struktur nicht als Eisenligand fungieren kann, aber trotzdem eine katalytische Aktivität auswies. Da alle Mutanten des Ser558 eine signifikante Aktivität aufwiesen, deuten diese Daten von Jisaka et al. darauf hin, dass Ser558 funktionell kein wichtiger Eisenligand sein sollte. Bei den Ser558Asn- und Ser558His-Mutanten konnte in derselben Studie interessanterweise 15(S)-HETE als Nebenprodukt identifiziert werden (Jisaka et al. 2001). Diese Daten legen nahe, dass diese Mutationen eine subtile Verschiebung der Positionsspezifität der Enzyme induziert haben. Aus der Kenntnis der Stereochemie kann abgeleitet werden, dass eine geringe Veränderung in der Proteinstruktur dem Fettsäuremolekül ermöglicht, in entgegengesetzter Kopf-Schwanz-Konformation in die Reaktionstasche zu gleiten und somit die teilweise 15-Lipoxygenase-Aktivität zu erzeugen. Zusammengefasst kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass Ser558 weder für die Reaktionsspezifität des Enzyms von

großer Bedeutung ist, noch dass diese Aminosäure als funktioneller Eisenligand fungiert (Jisaka et al. 2001).

1.2.3 Evolutionskonzept

Adel et al. klonierten und charakterisierten im Jahr 2016 ALOX15-Orthologe ausgewählter Spezies, die verschiedene Stadien der späten Primatenevolution repräsentieren (Adel et al. 2016). Sie stellten fest, dass höhere Primaten wie der Mensch und Schimpansen AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe besitzen, während niedrigere Primaten wie Paviane und Rhesusaffen AA-12-lipoxygenierende Enzyme exprimieren. Zudem wurde beobachtet, dass Gibbons, die evolutionär zwischen Rhesusaffen und Orang-Utans einzuordnen sind, ein ALOX15-Ortholog mit ausgeprägter dualer Reaktionsspezifität exprimieren. Die rekombinante Gibbon-ALOX15 (*Nomascus leucogenys*) wandelt Arachidonsäure *in vitro* zu fast gleichen Anteilen von 12- und 15-HpETE um. Die ALOX15-Orthologe von Nagetieren (Maus und Ratte) wiesen eine 12-Lipoxygenierungsaktivität auf. Das Kaninchen, das zur Ordnung der *Lagomorpha* zählt, stellt eine Ausnahme dar. Im Kaninchengenom befindet sich ein einzelnes *ALOX15*-Gen (National Center for Biotechnology Information-Gene ID: 100009114; Nucleotide-Location: NC_013687.1, Stand: 2016), das entsprechend der Triadenhypothese für ein AA-15-lipoxygenierendes Enzym kodiert (Adel et al. 2016). In der Arbeit von Berger et al. (1998) zeigte sich jedoch, dass dieses Gen auch für ein AA-12-lipoxygenierendes Enzym kodiert, bei dem auf Messenger-Ribonukleinsäure-Ebene (messenger ribonucleic acid, mRNA) eine der Triadendeterminanten mutiert vorliegt. Die Aminosäure Phenylalanin an Position 353 wird durch Leucin (Leu) ersetzt. Diese Daten deuten darauf hin, dass aus diesem einzelnen *ALOX15*-Gen zwei unterschiedliche mRNAs gebildet werden, wobei eine dieser mRNAs für eine 15-lipoxygenierende ALOX15, die andere für eine 12-lipoxygenierende ALOX15 kodiert (Berger et al. 1998). Obwohl der Mechanismus dieser mRNA-Rekodierung bislang nicht näher untersucht wurde, muss derzeit davon ausgegangen werden, dass im Kaninchen gewebespezifisch sowohl eine AA-12-lipoxygenierende ALOX15 (periphere Monozyten) als auch ein AA-15-lipoxygenierendes Enzym (erythroide Zellen) exprimiert werden. Aus diesen Beobachtungen und weiteren Daten zur Lipoxygenasefunktionalität wurde die Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von ALOX15 bei Säugetieren entwickelt, die besagt, dass ALOX15-Orthologe von Primaten, die in der Evolution einen höheren Rang als Gibbons einnehmen, 15-lipoxygenierende Enzyme sind (Adel et al. 2016; Kuhn et al. 2018). Im Gegensatz dazu exprimieren Säugetiere, die eine niedrigere Evolutionsstufe als Gibbons

aufweisen, überwiegend 12-lipoxygenisierende ALOX15-Orthologe. Die Gibbon-ALOX15 stellt ein Übergangsenzym mit ausgeprägter dualer Reaktionsspezifität dar. Dieser Theorie folgen rund 95 % der derzeit sequenzierten ALOX15-Enzyme von Säugetieren, einschließlich der Enzyme von lebenden und ausgestorbenen Hominiden (Chaitidis et al. 2013; Adel et al. 2015; Adel et al. 2016; Kozlov et al. 2019). Es existieren aber auch Säugetierspezies (ca. 5 % der bisher untersuchten ALOX15-Orthologen), die gegen dieses Konzept verstoßen (z. B. das Kaninchen, die Ord-Kängururatte, die graue Bambusratte, der südliche Tamandua) (Adel et al. 2016; Kozlov et al. 2019; Heydeck et al. 2022). Deswegen bestand ein Schwerpunkt dieser Arbeit darin, zusätzliche experimentelle Daten zur Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen zu sammeln, um diese in das Evolutionskonzept einzuordnen (vgl. Abschnitt 1.4).

1.2.4 Das Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* als alternatives Modell für höhere Säugetiere

Spitzhörnchen im Allgemeinen und *Tupaia belangeri* (*T. belangeri*) im Speziellen wurden aufgrund ihrer evolutionären Stellung als geeigneteres Tiermodell für höher entwickelte Säugetiere vorgeschlagen als Mäuse und Ratten (Cao et al. 2003). Da zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit noch keine Daten zum Arachidonsäurestoffwechsel von Spitzhörnchen verfügbar waren, konnte damals noch nicht entschieden werden, ob dieser Stoffwechselweg bei Spitzhörnchen überhaupt existiert. Dadurch ließ sich auch nicht abschätzen, welche Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede es zwischen Spitzhörnchen und höheren Säugetieren in dieser Hinsicht gibt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Sequenz des *T. belangeri*-Genoms auf das Vorkommen von Arachidonsäuremetabolisierenden-Enzymen untersucht. Dabei wurde der Fokus zunächst auf die ALOX15 gelegt. Fan et al. hat bereits 2014 die genomischen Sequenzen für *T. belangeri* veröffentlicht (Fan et al. 2014), jedoch wurde erst 2019 die vollständige Sequenz des *Tupaia*-Genomes auf der Internetplattform „TreeshrewDB“ in ihrer derzeitigen Form publiziert (www.treeshrewdb.org, Stand: 2019). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Forschungsgruppe um Fan et al. darum gebeten, nach ALOX15-Sequenzen zu suchen. Im Genom des Baumspitzhörnchens (*T. belangeri*) konnten vier strukturell unterschiedliche ALOX15-Gene identifiziert werden (tupALOX15a-d). Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da die ALOX15-Gene im humanen- und im Mausgenom als Einzelkopie-Gene (Single-copy-Genes) vorliegen. Für die vier *T. belangeri* ALOX15-Gene wurden von Fan et al. zunächst die Exon-Intron-Strukturen ermittelt (Tabelle 3). Dabei wurde eine hohe

Ähnlichkeit der Exon-Intron-Organisation für alle vier *ALOX15*-Gene nachgewiesen. Die Exon-Sequenzen waren hoch konserviert, während der Konservierungsgrad der Introns naturgemäß etwas geringer war. Beim Vergleich der extrahierten *ALOX15*-Proteinsequenzen zeigte sich eine Aminosäureidentität von 95–98 % zwischen den vier Tupaia-*ALOX15*-Isoformen. Vergleichsweise niedrig war dagegen die Aminosäureidentität ($\approx 67\%$) mit der Maus-*ALOX15* (Tabelle 4). In allen Tupaia-*ALOX15*-Proteinen waren die funktionell wichtigen Eisenliganden streng konserviert, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei allen vier *ALOX15*-Paralogen um funktionsfähige Proteine handeln sollte. Die sehr hohen Aminosäurekonservierungsgrade deuteten darauf hin, dass die vier *ALOX15*-Gene durch konsekutive Genduplikationen entstanden sein könnten. Da sich in den komplementäre DNS (complementary DNA, cDNA)-Sequenzen von Fan et al. 2014 keine gravierenden Mutationen nachweisen ließen und keine vorzeitigen Stopcodons nachweisbar waren, konnte davon ausgegangen werden, dass entweder die Genduplikationen erst kürzlich stattgefunden hat, oder dass auf allen Sequenzen ein ähnlicher Selektionsdruck lastete, der spontane Mutationen verhinderte. Die Frage, wie dieser Selektionsdruck genau aussieht, kann aufgrund fehlender Informationen zur biologischen Rolle der *T. belangeri*-*ALOX15*-Orthologen zurzeit nicht beantwortet werden. Auf der Basis der Aminosäureähnlichkeit lassen sich die vier Tupaia-*ALOX15*-Isoformen in zwei Familien unterteilen: die *tupALOX15a* und *tupALOX15b* bilden zusammen eine Familie, während *tupALOX15c* und *tupALOX15d* die zweite Unterfamilie darstellen könnten.

Tabelle 3: Aminosäure-Identität der *ALOX15*-Isoformen des Baumspitzhörnchens (*tupALOX15*) im Vergleich zur Maus-*Alox15* (*mouALOX15*) (Schäfer et al. 2020). Die Proteinsequenzen von *mou-ALOX15* stammen aus der NCBI-Proteindatenbank und die Sequenzen der *tupALOX15*-Isoformen aus der aktualisierten Version des Baumspitzmaus-Genoms (www.treeshrewdb.org, Stand: 2018). Die Grade der Aminosäureidentität wurden mit einem Online-Tool berechnet (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ (Stand: 01.2019)).

	Anteil der Aminosäure Identität (%)				
	<i>mouALOX15</i>	<i>tupALOX15a</i>	<i>tupALOX15b</i>	<i>tupALOX15c</i>	<i>tupALOX15d</i>
<i>mouALOX15</i>	100	67,1	66,6	66,8	67,1
<i>tupALOX15a</i>	67,1	100	97,6	98,0	96,5
<i>tupALOX15b</i>	66,6	97,6	100	95,6	94,7
<i>tupALOX15c</i>	66,8	98,0	95,6	100	97,0
<i>tupALOX15d</i>	67,1	96,5	94,7	97,0	100

Tabelle 4: Exon-Intron-Organisation der vier verschiedenen ALOX15-Orthologen von *T. belangeri* (Schäfer et al. 2020). Die Daten wurden von chinesischen Co-Autoren zur Verfügung gestellt.

	Anzahl an Basenpaaren			
	ALOX15a	ALOX15b	ALOX15c	ALOX15d
Exon 1	135	138	135	135
Intron1	458	464	459	332
Exon 2	205	198	205	205
Intron 2	278	278	300	300
Exon 3	82	80	82	82
Intron 3	81	82	81	81
Exon 4	123	125	123	123
Intron 4	161	161	161	161
Exon 5	104	104	104	104
Intron 5	194	194	194	194
Exon 6	161	161	161	161
Intron 6	653	654	697	697
Exon 7	144	140	144	144
Intron 7	1.416	1.421	1.659	1.643
Exon 8	210	213	210	210
Intron 8	1.303	1.304	1.880	1.899
Exon 9	87	87	87	87
Intron 9	93	93	93	93
Exon 10	170	171	170	170
Intron 10	155	152	155	155
Exon 11	122	124	122	122
Intron 11	555	856	553	555
Exon 12	101	101	101	101
Intron 12	110	111	110	110
Exon13	168	169	168	168
Intron 13	103	104	103	103
Exon 14	180	181	180	180
Intron 14	996	997	997	997
Summe der Exons	1.992	1.992	1.992	1.992

1.2.4.1 Evolutionäre Stellung von Spitzhörnchen

Wie bereits unter 1.2.4 erwähnt, sind Spitzhörnchen im Allgemeinen und *T. belangeri* im Speziellen als Vertreter der Superprimaten enger mit dem Menschen verwandt als die in der Forschung häufig verwendeten Nagetiere (Maus, Ratte) (Fan et al. 2013; Doronina et al. 2022). Obwohl auch Maus und Ratte zu den Superprimaten gerechnet werden, geht diese engere Verwandtschaftsbeziehung aus der inneren Systematik der Supraprimaten klar hervor (Abbildung 5). Die Überordnung der Supraprimaten wird in fünf Ordnungen unterteilt: *Rodentia*, *Lagomorpha*, *Scandentia*, *Primates*, *Dermoptera*. Die Ordnung der *Scandentia* wird in die Familien *Ptilocercidae* und *Tupaiaidae* untergliedert (in Abbildung 5 nicht dargestellt). Aus dieser Darstellung geht hervor, dass chinesische Baumspitzhörnchen

(*Tupaia belangeri chinensis*) evolutionär den Primaten näherstehen als Mäusen und Ratten. Deshalb wurde das Baumspitzhörnchen als besser geeignetes Tiermodell für menschliche Erkrankungen vorgeschlagen (Wang et al. 2013; Xiao et al. 2017; Yao 2017). Ob das auch für Erkrankungen zutrifft, die mit Veränderungen im Arachidonsäurestoffwechsel einhergehen, konnte aufgrund fehlender funktioneller Daten bisher nicht hinreichend sicher geschlussfolgert werden.

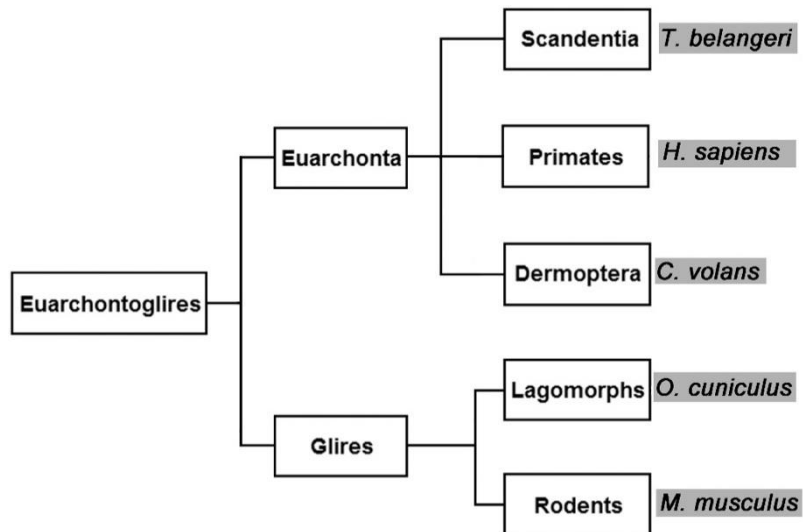


Abbildung 5: Innere Systematik von Supraprimaten (Euarchontoglires) (Schäfer et al. 2020). Die evolutionäre Verwandtschaft von Primaten (*H. sapiens*) und Scandentia (*T. belangeri*) ist dargestellt.

1.2.4.2 *Tupaia belangeri* als ein Vertreter der Spitzhörnchen (Scandentia)

Das *T. belangeri* erreicht eine Körperlänge von ca. 20 cm sowie eine Schwanzlänge von ca. 16 cm, bei rund 120–150 g Körpergewicht. Mit den scharfen Krallen an allen Zehen sind sie gute Kletterer. Das graubraune, dichte Fell ist kurz und glatt. Die Ohren sind klein und liegen am Kopf an. Es liegen offensichtliche phänotypische Ähnlichkeiten zwischen Tupaias und Ratten vor. Beispielsweise liegen die Augen seitlich am Kopf, der Schwanz ist behaart und die durchschnittlichen Körperlängen unterscheiden sich kaum. Tupaias haben im Vergleich zu Mäusen und Ratten keine langen Tasthaare an der Schnauze und sind nur halb so schwer wie Ratten. Ihre Reproduktionszeit ist fast doppelt so lang wie die von Ratten und die Reproduktionsrate ist mit durchschnittlich zwei bis sechs Jungtieren ähnlich wie bei den gängigen Versuchstieren (Martin 1968; Wang et al. 2013; Xiao et al. 2017). Dennoch gibt es viele Studien mit Baumspitzhörnchen (*T. belangeri*), die versuchen, grundlegende biologische Mechanismen und Therapien für Krankheiten aufzuklären. Die vollständige

Genomsequenz des chinesischen Baumspitzhörnchens (www.treeshrewdb.org, Stand: 2019, (Fan et al. 2014)) bietet die strukturelle Basis für gezielte genetische Manipulationen. Trotzdem muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt zugegeben werden, dass das Wissen zur Genetik und zu den gezielten Veränderungen des Erbmaterials von Mäusen deutlich größer ist und dass auch die Kenntnisse zum Eikosanoidstoffwechsel von Mäusen und Ratten deutlich über denen von Spitzhörnchen liegen.

1.3 Entzündungsreaktionen und die Bedeutung von Zytokinen

Die erste Verteidigung des Immunsystems gegen körpereigene Signale oder externe Gefahren, wie beispielsweise pathogene Keime, ist bei den meisten Wirbeltieren ähnlich (Medzhitov et al. 1997; Medzhitov and Janeway 1997b; Buchmann 2014). Das menschliche Immunsystem ist untergliedert in zwei miteinander verbundene Subsysteme: A) nichtadaptives (angeborenes) Immunsystem, bei dem neutrophile Granulozyten die wichtigsten zellulären Elemente darstellen; B) adaptives (erworbenes) Immunsystem, das vor allem auf der Funktion der Lymphozyten beruht (Marshall et al. 2018). Als professionell antigenpräsentierende Zellen verbinden Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen die beiden Subsysteme miteinander. Mithilfe pathogenerkennender Rezeptoren des nichtadaptiven Immunsystems (Pattern Recognition Receptors, PRRs) erkennen diese Zellen Pathogene, sind aber gleichzeitig dazu in der Lage, die zellulären Elemente des adaptiven Immunsystems (Lymphozyten) zu aktivieren (Medzhitov and Janeway 1997a). Neutrophile Granulozyten erkennen pathogenassoziierte molekulare Muster (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) und gefahrenassoziierte molekulare Muster (Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs) mithilfe verschiedener Klassen von Mustererkennungsrezeptoren (Tang et al. 2012). Zu diesen Zelloberflächenrezeptoren gehören beispielsweise die Toll-like-Rezeptoren. Nach Bindung von PAMPs/DAMPs an diese Rezeptoren werden Signale ins Innere der Immunzellen weitergeleitet, was unter anderem zur Aktivierung der Transkription verschiedener Gene führt (Tang et al. 2012). Hierzu gehören vor allem solche Gene, die an der Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, wie den Zytokinen, Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α), die Interleukine 1, 6 und 10 sowie Interferon- γ , beteiligt sind (Kawai and Akira 2006; Geginat et al. 2016; Kany et al. 2019). Bei diesen Botenstoffen handelt es sich überwiegend um sezernierte Proteine, deren Freisetzung die Aktivierung von Immunzellen und die Sekretion weiterer Zytokine zur Folge hat. Dabei können funktionell entzündungsfördernde und entzündungshemmende Zytokine klassifiziert werden, wobei

sich das Mengenverhältnis fördernder bzw. hemmender Botenstoffe in entzündlich veränderten Geweben in Abhängigkeit von der Entzündungsphase verändert. So ist z. B. die akute Entzündungsphase durch ein Überwiegen der proinflammatorischen Botenstoffe charakterisiert. Im Gegensatz dazu überwiegen die antiinflammatorischen Mediatoren in der Phase der Entzündungsheilung. Arachidonsäure-Metaboliten, die über verschiedene ALOX-Wege gebildet werden, fungieren einerseits als Induktoren proinflammatorischer Zytokine (Chen et al. 2005; Feltenmark et al. 2008), die naive T-Zellen zur Differenzierung in Richtung der T-Zellen Typ 1 stimulieren. Diese sind für die zellvermittelte Immunantwort wichtig und dadurch wird die proinflammatorische Immunantwort verstärkt (Lindley et al. 2010; Perez-Hernandez et al. 2021). Andererseits können komplexere ALOX-Produkte (Resolvine, Maresine, Protectine) gebildet werden (Adel et al. 2016; Duvall and Levy 2016), die überwiegend antiinflammatorisch wirken und/oder weitere entzündungsheilende Mechanismen auslösen.

1.3.1 Einfluss von ALOX15 bei Entzündungsreaktionen

Eicosanoide bilden eine Klasse von entzündungsmodulierenden Lipidmediatoren, die aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren über den Cyclooxygenase-Weg (COX), Lipoxygenase-Weg (ALOX), den Cytochrom-P450-Weg oder durch nicht-enzymatische Lipidperoxidation gebildet werden (Massey and Nicolaou 2013; Vigor et al. 2014). In Abbildung 3 und 4 sind die wichtigsten Vertreter der Lipoxygenaseprodukte und deren metabolische Bildungswege im Überblick dargestellt. Untersuchungen zur Bioaktivität verschiedener ALOX-Produkte deuten darauf hin, dass diese sowohl entzündungsfördernd (proinflammatorisch), entzündungshemmend (antiinflammatorisch) als auch entzündungsheilend (resolutorisch) wirken können. So wurden für 12-HETE, das sowohl von ALOX15- als auch von ALOX12-Orthologen gebildet werden kann, entzündungsfördernde und entzündungshemmende Aktivitäten in verschiedenen Entzündungsmodellen beschrieben (Conrad 1999; Kühn and O'Donnell 2006; Kim et al. 2018). Die Überexpression der menschlichen ALOX15 im Kaninchen und in der Ratte führte zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion in bestimmten Entzündungsmodellen (Shen et al. 1995; Munger et al. 1999; Serhan et al. 2003). Ob das bei anderen Entzündungsmodellen auch der Fall ist und damit ein generelles Prinzip darstellt, wurde bislang nicht überprüft. Außerdem weisen die verwendeten genmanipulierten Tiere in Shen et al. im Jahr 1995 und Munger et al. im Jahr 1999 einige Besonderheiten auf, die für die Interpretation der experimentellen Daten bedeutsam sein könnten. So wurde z. B. bei der Herstellung der transgenen ALOX15-

überexprimierenden Kaninchen (Shen et al. 1995) nicht darauf geachtet, an welcher Stelle des Kaninchengenoms das Transgen der menschlichen ALOX15 integriert wurde und ob bei der Herstellung der Tiere eine einfache oder eine multiple Integration des Transgens ins Wirtsgenom abgelaufen ist. Diese unkontrollierte Integration des Transgens könnte dazu geführt haben, dass zusätzlich zum gewünschten Effekt (Überexpression der humanen ALOX15) unerwünschte genetische Modifizierungen (Off-target Alterations) abliefen, die zur Ausprägung der beobachteten phänotypischen Veränderungen (antiinflammatorischer Effekt der ALOX15-Expression) beigetragen haben könnten. Bei der Interpretation der Studie von Munger et al. 1999 blieb unberücksichtigt, dass die ALOX15 der Ratte im Unterschied zur menschlichen ALOX15 ein 12-lipoxygenierendes Enzym ist. Damit wurde durch die Expression des menschlichen Transgens ein Enzym eingeführt, das sich funktionell deutlich vom endogenen Rattenenzym unterscheidet. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit wäre es besser gewesen, das *Alox15*-Gen der Maus als Transgen zu verwenden. Funktionell sind sich die beiden murinen *Alox15*-Orthologen deutlich ähnlicher. Beim Menschen konnten ebenfalls entzündungsfördernde und entzündungshemmende Aktivitäten der ALOX15 nachgewiesen werden (Ringholz et al. 2014; Kuhn et al. 2015; Singh and Rao 2019). Die Studie von Adel et al. zeigte 2016, dass 15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe eine höhere Lipoxinsynthaseaktivität aufweisen als 12-lipoxygenierende Enzyme, wenn die Enzyme *in vitro* mit 5-HETE als Substrat inkubiert wurden (Adel et al. 2016). Bei einer Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen *Alox15* und *Alox15b* könnte es *in vitro* dann zu einer signifikanten Steigerung der Lipoxinsynthaseaktivität der Enzyme kommen.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Lipoxygenierung von Polyenfettsäuren ist ein wichtiger Schritt in der Synthese verschiedener Lipidmediatoren (z. B. Leukotriene, Lipoxine, Resolvine und andere Hydroxyfettsäuren), die eine Immunreaktion auslösen bzw. kontrollieren können. Diese Mediatoren werden unter anderem über den Lipoxygenaseweg gebildet und mehrere ALOX-Isoformen (ALOX5, ALOX12, ALOX15, ALOX15B) spielen dabei eine Rolle. Obwohl die ALOX-Gene bei allen Säugetieren einen hohen Grad an struktureller Ähnlichkeit aufweisen, unterscheiden sich die von ihnen kodierten Enzyme hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften und ihrer biologischen Funktionen. Obwohl die humane ALOX15 und die humane ALOX15B ähnliche Reaktionsspezifitäten und ähnliche dreidimensionale Strukturen zeigen, unterscheiden sich beide Enzyme hinsichtlich anderer proteinchemischer

und katalytischer Eigenschaften voneinander. Die ALOX15-Orthologen von Säugetieren können Arachidonsäure zu 15-HETE oder 12-HETE umwandeln und entsprechend dem Evolutionskonzept der Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen exprimieren höhere Primaten (Mensch, Schimpanse, Gorilla) überwiegend AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Niedere Primaten (z. B. Pavian, Makake) und andere Säugetiere (z. B. Maus, Ratte, Schwein) exprimieren überwiegend 12-lipoxygenierende Enzyme. Für Spitzhörnchen (z. B. *T. belangeri*), die aufgrund ihrer evolutionären Stellung als alternative Modellorganismen zu Mäusen und Ratten vorgeschlagen wurden, gab es zu Beginn dieser Doktorarbeit noch keine Informationen zu Enzymen des oxidativen Arachidonsäurestoffwechsels. Beim Vergleich der Reaktionsspezifitäten der ALOX15B-Orthologen von Mensch und Maus, ist erkennbar, dass das humane Enzym ausschließlich 15-HETE bildet, während die murine *Alox15b* als 8-Lipoxygenase fungiert. Obwohl die strukturelle Basis für die unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten von muriner und humaner ALOX15 und ALOX15B durch Mutageneseuntersuchungen an den rekombinanten Enzymen intensiv untersucht wurden, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unklar, ob die beobachteten Unterschiede auch *in vivo* nachweisbar sind. Des Weiteren war unklar, ob eine ähnliche Mutagenesestrategie der endogenen *Alox15*- bzw. *Alox15b*-Gene der Maus auch *in vivo* zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität der beiden Enzyme führt und sich aus dieser Humanisierung phänotypische Veränderungen der Tiere ergeben.

In Auseinandersetzung mit den oben aufgeführten Wissenslücken sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Forschungsfragen untersucht und beantwortet werden:

- (1) Enthält das Genom von *T. belangeri* funktionelle Gene, die für ALOX15-Orthologe kodieren? Können diese Enzyme als rekombinante Proteine exprimiert werden und welche katalytischen Eigenschaften weisen sie auf?
- (2) Kann das Triadenkonzept der Reaktionsspezifität, das bislang nur für eine begrenzte Anzahl von Säugetier-ALOX15-Orthologen bestätigt wurde, auf die Enzyme anderer Prototheria, Metatheria und Eutheria (einschließlich *T. belangeri*) übertragen werden?
- (3) Folgt die Mehrheit der Säugetier-ALOX15-Orthologen der Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität und auf welche Säugetierspezies ist dieses Konzept nicht anwendbar? Kann die Evolutionshypothese auf ALOX15B-Orthologe übertragen werden?

(4) Beeinflusst die Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b (*In-vivo*-Mutagenese) andere katalytische Eigenschaften des Enzyms und verändern sich dadurch die biologischen Funktionen der Alox15b im Rahmen der Entzündungsreaktion?

Grundlage für die unter (4) spezifizierten Fragestellungen sind Ergebnisse aus vorherigen Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass die humane ALOX15B bei entzündlichen Darmerkrankungen möglicherweise eine antiinflammatorische Rolle spielen könnte (Pochard et al. 2016). Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass die humanisierte murine Alox15b *in vitro* eine signifikant höhere Lipoxinsyntheseaktivität aufweist, als das 8-lipoxygenierende Wildtypenzym (Adel et al. 2016). Könnte man diese *In-vitro*-Experimente auf die *In-vivo*-Situation übertragen, sollte die *In-vivo*-Humanisierung der murinen Alox15b die Suszeptibilität von Mäusen für entzündliche Darmerkrankungen herabsetzen. In diesem Fall sollten Knock-in-Mäuse, die eine Alox15b mit humanisierter Reaktionsspezifität exprimieren, in einem Modell für entzündliche Darmerkrankungen (Dextransulfat-Natriumsalz (DSS)-Kolitis) und möglicherweise auch in anderen murinen Entzündungsmodellen (z. B. Adjuvans-induziertes Pfotenödem) geschützt sein. Zur Auseinandersetzung mit dieser Fragestellung wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche *In-vivo*-Entzündungsmodelle (Adjuvans-induziertes Pfotenödem und DSS-Kolitis) angewandt.

2 Material und Methoden

Um die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologe und den Einfluss der humanisierten Alox15b-Maus auf Entzündungsreaktionen zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit im Labor zahlreiche biochemische Methoden verwendet, die im Folgenden aufgelistet und beschrieben werden. Die Auswertung erfolgte mittels statistischer Tests, was ebenfalls erläutert wird.

2.1 Material

Das verwendete Material für diese Arbeit ist in den folgenden Unterpunkten separat von den Versuchsdurchführungen aufgelistet. Der Bezug zu den einzelnen Materialien findet sich ab dem Unterpunkt 2.2.

2.1.1 Chemikalien

Die meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Merck, Roth, SERVA und Sigma. Tabelle 5 gibt einen detaillierten Überblick.

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Firma, Firmensitz
Acrylamid Bis (30 %)	BioRad, Feldkirchen, Deutschland
Agarose Tabletten 0,5g	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Antibiotika: Ampicillin-Natrium, Kanamycinsulfat; Antibiotikum: Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland; Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Antifoam 204	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti-His-G-HRP-Antikörper	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Bakterium: <i>M. butyricum</i> Desiccated X600	Fisher Scientific, Thermo Fisher, Scientific, Schwerte, Deutschland
Bradford Solutions	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Balanced Salt Solution)	PAN Biotech, Aisendorf, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dextransulfat-Natriumsalz, Dextran Sulfate Sodium Salt, Colitis Grade (DSS)	(CAT No. 160110), MP Biomedicals, Irvine, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland; PanReac AppliChem, Chicago, USA
Essigsäure 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Firma, Firmensitz
Freund Adjuvans, X60n, inkomplett (FCA bzw. CFA)	Fisher Scientific, Thermo Fisher, Scientific, Schwerte, Deutschland
Glutamin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Helium	Linde, Berlin, Deutschland
HPLC-Standards: (z. B. 5S-, 12S-, 15R/S-HETE; 13R/S-HODE)	Cayman Chemicals, distributed by Biomol, Hamburg, Deutschland
HPLC-Lösungsmittel: Acetonitril, n-Hexane, Methanol, Isopropanol, Wasser	Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Fettsäuren: AA [(5Z,8Z,11Z,14Z)-Eicosa-5,8,11,14-Tetraensäure], LA [(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-Diensäure], ALA [(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-Triensäure], EPA [(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eicosa-5,8,11,14,17-Pentaensäure], DHA [(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-Hexaensäure]	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isofluran (Forene 100 %, 250 ml)	AbbVie, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe, Deutschland; PanReac AppliChem, Chicago, USA
Max Efficiency DH10Bac Competent Cells	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
<i>Myxococcus fulvus</i> -Protein	Herstellung durch AG-Kühn, Charité-Berlin
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Oligo dT18	BioTez, Roche, Schweiz
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
95 %-Paraformaldehyd	Sigma, St.Louis, USA
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Marker Western Blot Precision Plus Protein Dual Color Standard	BioRad, Feldkirchen, Deutschland
RNA later	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RNA Gel Loading Dye (2x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Sauerstoff (Gas)	Linde, Berlin, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)-Lösung, 1M, pH = 8,0	Merck, Darmstadt, Deutschland; PanReac AppliChem, Chicago, USA
Trypan Blue Solution	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween®20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weitere Materialien:	
Blotting Papier MN218B	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Lysis Matrix D Tubes	MP Biomedicals, Irvine, USA
Bakterienkultivierungskolben für die Proteinexpression (Ultra Yield Culture Flasks)	Thomson Instrument Company, Oceanside, USA
96-Well-Platten für die osmolare Stabilitätsanalyse	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen je zugehöriger Methode, die zur rekombinanten Zellexpression, dem Nachweis der Enzymaktivität und der Genotypisierung der Versuchstiere verwendet wurden.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Methoden	Puffer	Zusammensetzung
Aktivitätsassay	PBS	13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,15 mM KH ₂ PO ₄ , 0,6 mM Na ₂ HPO ₄ in 1 l H ₂ O, pH = 7,4
	Tris/Borat-Puffer	50 mM Tris/HCl, 50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ im pH-Bereich von 6–10 (0,4-er Schritte) mit 1 N HCl bzw. 1 N NaOH eingestellt
Agarosegelelektrophorese	TAE-Puffer	40 mM Tris, 2 mM EDTA-Na-Salz, 29,6 mM Essigsäure, pH = 8,5
	Gel-Red Nucleo Acid Stain	Biotium, San Francisco Bay Area, USA
Marker	Hyper Ladder™ 100 bp	Bioline GmbH, Luckenwalde Deutschland
Marker	Hyper Ladder™ 1 kb	Bioline GmbH, Luckenwalde Deutschland
LB-Agar	LB-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEK- Zellkultur	DMEM, low glucose, pyruvate Medium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
	DMEM-Lösung	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
	Trypsin-EDTA (0,05 %), phenol red	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
	Fötale Kälber Serum (FKS)	Gibco, invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
	Opti-MEM®Reduced-Serum Medium	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
	TransIT®-LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison, USA
Sf9-Insektenzellkultur	Insect XPRESS Medium	LONZA Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Genotypisierung des Tiermodells	Base Puffer (50 x Stock)	1,25 M NaOH, 10 mM EDTA, pH = 12
	Neutralisationspuffer (50 x Stock)	2 M Tris/HCl, pH = 5
Proteinexpression 1 (ALOX15-Orthologe)	Spurenelemente	50 mg CaCl ₂ x2H ₂ O, 9,55 mg ZnCl ₂ , 11,65 mg MnCl ₂ x4H ₂ O, 1,65 g FeCl ₃ x6H ₂ O, 10 mg CuSO ₄ , 10 mg CoCl ₂ , 10,75 ml Na ₂ -EDTA-Lösung (= 2 g)
	Nährmedium	pro 1 l: 2,00 g Na ₂ SO ₄ , 6,12 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,50 g NH ₄ Cl, 14,60 g K ₂ HPO ₄ , 3,60 g NaH ₂ PO ₄ , 1,00 g tri-Ammoniumcitrat, 0,24 g

Method	Puffer	Zusammensetzung
		Trypton/Pepton, 0,48 g Hefeextrakt, 40 mg Dextrin, 1 µl Spurenelemente, 5 mg Thiamin-HCl, 36,95 mg MgSO ₄
Proteinexpression 2 (ALOX15-Mutanten und Alox15b-KI-Maus)	Enpresso B-Kit	Enpresso GmbH, Berlin, Deutschland
SDS-PAGE	Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (v/v) SDS, pH = 6,75
	Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, 0,6 % (v/v) SDS, pH = 8,8
	Elektrophoresepuffer - Stock (5 x)	75,5 g Tris, 360 g Glycin, 25 g SDS auf 5 l mit Wasser (MilliQ) auffüllen, pH = 8,3
	Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycine, 0,1 % (v/v) SDS, pH = 8,3
	Pro Sieve Ex Running-Puffer	Biozyme LONZA, Visp, Schweiz
	Resolving-Gel-Puffer	Biozyme LONZA, Visp, Schweiz
	Stacking-Gel-Puffer	BioRad, Hercules, USA
Transformation	SOC-Medium (Super Optimal Broth)	10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt
Agarose-Gelelektrophorese	TAE-Puffer (50 x)	TAE-Puffer verdünnt auf 1 x; PanReac AppliChem, Chicago, USA
Western-Blot	Transferpuffer	1 x Rapid Transferpuffer; VWR Life Science, AMRESCO, Darmstadt, Deutschland
	Waschpuffer	PBS mit 0,05 % Tween [®] 20
	Probenpuffer	ProSIEVE Pro Trac Dual Color Protein Loading Buffer; Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, Deutschland

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Kits, die zur Aufarbeitung der verschiedenen Zellkulturen und Gewebeprobe verwendet wurden.

Tabelle 7: Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Firma, Firmensitz
Bac-to-Bac [®] Baculovirus Expression Systems	Invitrogen Life Technologies, Karlsbad, USA/ Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
NucleoBond [®] Xtra MIDI Plus	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	
NucleoSpin [®] Plasmid EasyPure	
NucleoSpin [®] RNA-Plus	
Proteinkinase K	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNA easy Mini KIT 250	
Rapid DNA Ligation-Kit	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Enzyme und Kits	Firma, Firmensitz
PfuUltra II HotStart PCR Master-Mix	Agilent Technology, Waldbronn, Deutschland
Ribo Safe RNase-Inhibitor	Meridian Bioscience, bioline, Memphis, USA; QIAGEN, Hilden, Deutschland
SensiFast SYBR-No-ROX-Kit	
Tetro-Reverse-Transkriptase	
MyTaq™ Red Mix	
Fast Digest DpnI	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Restriktionsenzyme: BamHI, HindIII, Sall, XbaI	Thermo Scientific, molecular biology, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.1.4 Klonierungs- und Expressionsvektoren

Tabelle 8 gibt die Klonierungs- und Expressionsvektoren an, die für die rekombinante Proteinexpression in verschiedenen Zellkultursystemen verwendet wurden.

Tabelle 8: Klonierungs- und Expressionsvektoren für die Zellkultur

Vektoren	Firma, Sitz, Land
pcDNA3.1(-)/His/LacZ	Invitrogen, Karlsbad, USA
pCR2.1-TOPO®	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
pET 28b	Merck, Darmstadt, Deutschland
pFastBac HTB	Invitrogen, Karlsbad, USA

2.1.5 *E.-coli*-Stämme

Für die rekombinante Proteinexpression wurden verschiedene kompetente *E.-coli*-Stämme verwendet, da sie eine hohe Ausbeute an Enzymen erzeugten (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: *E.-coli*-Stämme für die rekombinante Proteinexpression

Zellstamm	Firma, Sitz, Land
BL21 (DE3)pLysS	Invitrogen, Karlsbad, USA
Rosetta (DE3)pLysS	Novagen, Darmstadt, Deutschland
XL1 Blue	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.6 Primer für Evolutionsanalyse

Für die ortsgerichtete Mutation der ALOX15-Orthologe wurden verschiedene Primer-Sequenzen ausgewählt und modifiziert. Dies ist der Aminosäurecode für die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten: Alanin (Ala /A), Isoleucin (Ile /I), Leucin (Leu/ L), Methionin (Met /M), Phenylalanin (Phe /F), Valin (Val /V). Je drei Nukleotide bilden eine Informationseinheit (Basentriplett) für eine Aminosäure. Im Folgenden sind die relevanten, mutierten Aminosäure-Basentriplets farblich markierten.

2.1.6.1 Primer der Sloane-Mutanten

Von der Position Val418 + Val419 (VV) aus wurden die Primer für die Mutanten Val418Ile + Val419Val (IV); Val418Val + Val419Met (VM); Val418Ile + Val419Met (IM) hergestellt.

Afrikanische Elefant *Loxodonta africana*:

Von VV in IV:

1. Forward: ATT TTT GAT CAG **ATT GTG** AGT ACC GGT
2. Reverse: ACC GGT ACT CAC AAT CTG ATC AAA AAT

Von VV in VM:

3. Forward: ATT TTT GAT CAG **GTT ATG** AGT ACC GGT
4. Reverse: ACC GGT ACT CAT AAC CTG ATC AAA AAT

Von VV in IM:

5. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **ATT ATG** AGT ACC GGT GGT
6. Reverse: ACC ACC GGT ACT CAT AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Bolivianisches Totenkopffäffchen *Saimiri boliviensis*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **ATT GTT** AGC ACC GGT GGC GGC
2. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT AAC AAT CTG ATC AAA CAC ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **GTT ATG** AGC ACC GGT GGC GGC
4. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT CAT AAC CTG ATC AAA CAC ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **ATT ATG** AGC ACC GGT GGC GGC
6. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT CAT AAT CTG ATC AAA CAC ACC

Chinesisches Spitzhörnchen *Tupaia chinensis ALOX15a*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT GTT TTT GAT CAG **ATT GTT** AGT ACC GGC GGC GGT
2. Reverse: ACC GCC GCC GGT ACT AAC AAT CTG ATC AAA AAC ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT GTT TTT GAT CAG **GTG ATG** AGT ACC GGC GGC GGT
4. Reverse: ACC GCC GCC GGT ACT CAT CAC CTG ATC AAA AAC ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT GTT TTT GAT CAG **ATT ATG** AGT ACC GGC GGC GGT
6. Reverse: ACC GCC GCC GGT ACT CAT AAT CTG ATC AAA AAC ACC

Chinesisches Spitzhörnchen *Tupaia chinensis ALOX15c*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **ATT GTG** AGC ACC GGC GGC GGC
2. Reverse: GCC GCC GCC GGT GCT CAC AAT CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in VM:

3. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **GTG ATG** AGC ACC GGC GGC GGC
4. Reverse: GCC GCC GCC GGT GCT CAT CAC CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in IM:

5. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **ATT ATG** AGC ACC GGC GGC GGC
6. Reverse: GCC GCC GCC GGT GCT CAT AAT CTG ATC AAA CAC GCC

Dreizehn-Streifenhörnchen *Ictidomys tridecemlineatus*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **ATT GTT** AGC ATT GGT GGT GGC
2. Reverse: GCC ACC ACC AAT GCT AAC AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **GTG ATG** AGC ATT GGT GGT GGC
4. Reverse: GCC ACC ACC AAT GCT CAT CAC CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **ATT ATG** AGC ATT GGT GGT GGC
6. Reverse: GCC ACC ACC AAT GCT CAT AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Elefantenspitzmaus *Elephantulus edwardii*:

Von VV in IM:

1. Forward: GTG TTC GAT CAG ATT ATG AGT ACC GGC GGC
2. Reverse: GCC GCC GGT ACT CAT AAT CTG ATC GAA CAC

Großer Panda *Ailuropoda melanoleuca*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG ATT GTG AGT ACC GGC GGT GGC
2. Reverse: GCC ACC GCC GGT ACT CAC AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG GTT ATG AGT ACC GGC GGT GGC
4. Reverse: GCC ACC GCC GGT ACT CAT AAC CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG ATT ATG AGT ACC GGC GGT GGC
6. Reverse: GCC ACC GCC GGT ACT CAT AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Kap-Goldmull *Chrysochloris asiatica*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG ATT GTG AGT ACC GGT GGT GGT
2. Reverse: ACC ACC ACC GGT ACT CAC AAT CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in VM:

3. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG GTG ATG AGT ACC GGT GGT GGT
4. Reverse: ACC ACC ACC GGT ACT CAT CAC CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in IM:

5. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG ATT ATG AGT ACC GGT GGT GGT
6. Reverse: ACC ACC ACC GGT ACT CAT AAT CTG ATC AAA CAC GCC

Nancy-Ma-Nachtaffe *Aotus nancymae*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG ATT GTT AGC ACC GGC GGT GGT
2. Reverse: ACC ACC GCC GGT GCT AAC AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **GTT ATG** AGC ACC GGC GGT GGT
4. Reverse: ACC ACC GCC GGT GCT CAT AAC CTG ATC AAA AAT ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT ATT TTT GAT CAG **ATT ATG** AGC ACC GGC GGT GGT
6. Reverse: ACC ACC GCC GGT GCT CAT AAT CTG ATC AAA AAT ACC

Philippinen-Koboldmaki *Carlito syrichta*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **ATA GTT** AGC ACC GGT GGC GGT
2. Reverse: ACC GCC ACC GGT GCT AAC TAT CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in VM:

3. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **GTG ATG** AGC ACC GGT GGC GGT
4. Reverse: ACC GCC ACC GGT GCT CAT CAC CTG ATC AAA CAC GCC

Von VV in IM:

5. Forward: GGC GTG TTT GAT CAG **ATA ATG** AGC ACC GGT GGC GGT
6. Reverse: ACC GCC ACC GGT GCT CAT TAT CTG ATC AAA CAC GCC

Sternmull *Condylura cristata*:

Von VV in IM:

1. Forward: GTG TTC GAT CAG **ATT ATG** AGC ACC GGT GGC GGT
2. Reverse: ACC GCC ACC GGT GCT CAT AAT CTG ATC GAA CAC

Tansania-Stummelaffe *Colobus angolensis palliatus*:

Von VV in IM:

1. Forward: GTG TTC GAT CAG **ATT ATG** AGT ACC GGT GGT GGT
2. Reverse: ACC ACC ACC GGT ACT CAT AAT CTG ATC GAA CAC

Weißbüschelaffe *Callithrix jacchus*:

Von VV in IV:

1. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **ATT GTT** AGC ACC GGT GGC GGC
2. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT AAC AAT CTG ATC AAA CAC ACC

Von VV in VM:

3. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **GTT ATG** AGC ACC GGT GGC GGC
4. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT CAT AAC CTG ATC AAA CAC ACC

Von VV in IM:

5. Forward: GGT GTG TTT GAT CAG **ATT ATG** AGC ACC GGT GGC GGC
6. Reverse: GCC GCC ACC GGT GCT CAT AAT CTG ATC AAA CAC ACC

2.1.6.2 Primer der Borngräber-1-Mutanten

Nach der rekombinanten Expression der Sloane-Mutanten mit einer Einfach- oder Doppelmutation an Position 418 und 419, wurden für die Untersuchung der Borngräber-1-Mutanten ebenfalls Primer entworfen. Von der Mutante Val418Ile + Val419Met + Phe353 wurden die Primer für die Dreifachmutanten Val418Ile + Val419Met + Phe353Ala (von F in A) und Val418Ile + Val419Met + Phe353Leu (von F in L) hergestellt.

Afrikanische Elefant *Loxodonta africana*:

Von F in A:

1. Forward: GTG CGC AGT AGT GAT **GCT** CAG CTG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AGC ATC ACT ACT GCG CAC

Von F in L:

3. Forward: CGC AGT AGT GAT **TTA** CAG CTG CAT GAA
4. Reverse: TTC ATG CAG CTG TAA ATC ACT ACT GCG

Bolivianisches Totenkopffäffchen *Saimiri boliviensis boliviensis*:

Von F in A:

1. Forward: GTG CGC AGC AGC GAT **GCT** CAG CTG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AGC ATC GCT GCT GCG CAC

Von F in L:

3. Forward: GTG CGC AGC AGC GAT **CTT** CAG CTG CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AAG ATC GCT GCT GCG CAC

Chinesisches Spitzhörnchen *Tupaia chinensis ALOX15a*:

Von F in A:

1. Forward: GTT CGT AGT AGT GAA **GCT** CAG ATT CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG AAT CTG AGC TTC ACT ACT ACG AAC

Von F in L:

3. Forward: GTT CGT AGT AGT GAA **CTT** CAG ATT CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG AAT CTG AAG TTC ACT ACT ACG AAC

Chinesisches Spitzhörnchen *Tupaia chinensis ALOX15c*:

Von F in A:

1. Forward: GTG CGT AGC GCC GAA **GCT** CAG GTT CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG AAC CTG AGC TTC GGC GCT ACG CAC

Von F in L:

3. Forward: GTG CGT AGC GCC GAA **CTT** CAG GTT CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG AAC CTG AAG TTC GGC GCT ACG CAC

Dreizehn-Streifenhörnchen *Ictidomys tridecemlineatus*:

Von F in A:

1. Forward: GAT AGC CAG GGT CTG **GCT** AAA AAA CAT CGT GAA
2. Reverse: TTC ACG ATG TTT TTT AGC CAG ACC CTG GCT ATC

Von F in L:

3. Forward: GAT AGC CAG GGT CTG **CTT** AAA AAA CAT CGT GAA
4. Reverse: TTC ACG ATG TTT TTT AAG CAG ACC CTG GCT ATC

Elefantenspitzmaus *Elephantulus edwardii*:

Von F in L:

1. Forward: CGT AGT AGC GAC **CTG** CAG CTG CAT GAA
2. Reverse: TTC ATG CAG CTG CAG GTC GCT ACT ACG

Großer Panda *Ailuropoda melanoleuca*:

Von F in A:

1. Forward: GTT CGC AGC GCA GAT **GCT** CAG ATG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAT CTG AGC ATC TGC GCT GCG AAC

Von F in L:

3. Forward: GTT CGC AGC GCA GAT **CTT** CAG ATG CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG CAT CTG AAG ATC TGC GCT GCG AAC

Kap-Goldmull *Chrysochloris asiatica*:

Von F in A:

1. Forward: GTG CGC AGT GCC GAT **GCT** CAG CTG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AGC ATC GGC ACT GCG CAC

Von F in L:

3. Forward: GTG CGC AGT GCC GAT **CTT** CAG CTG CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AAG ATC GGC ACT GCG CAC

Nancy-Ma-Nachtaffe *Aotus nancymae*:

Von F in A:

1. Forward: GTT CGT AGC AGC GAT **GCT** CAG CTG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AGC ATC GCT GCT ACG AAC

Von F in L:

3. Forward: GTT CGT AGC AGC GAT **CTT** CAG CTG CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AAG ATC GCT GCT ACG AAC

Philippinen-Koboldmaki *Carlito syrichta*:

Von F in A:

1. Forward: CTG ATG GCC GAA GTG **GCT** GCA GTG GCA ACC ATG
2. Reverse: CAT GGT TGC CAC TGC AGC CAC TTC GGC CAT CAG

Von F in L:

3. Forward: CTG ATG GCC GAA GTG **CTT** GCA GTG GCA ACC ATG
4. Reverse: CAT GGT TGC CAC TGC AAG CAC TTC GGC CAT CAG

Sternmull *Condylura cristata*:

Von F in L:

1. Forward: CGC AGT AGT GAC **CTG** CAG CTG CAT GAA
2. Reverse: TTC ATG CAG CTG CAG GTC ACT ACT GCG

Tansania-Stummelaffe *Colobus angolensis palliatus*:

Von F in L:

1. Forward: CGC AGC AGC GAC **CTG** CAG CTG CAT GAA
2. Reverse: TTC ATG CAG CTG CAG GTC GCT GCT GCG

Weißbüschelaffe *Callithrix jacchus*:

Von F in L:

1. Forward: GTG CGT AGC AGT GAT **CTT** CAG CTG CAT GAA CTG
2. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AAG ATC ACT GCT ACG CAC

Von F in A:

3. Forward: GTG CGT AGC AGT GAT **GCT** CAG CTG CAT GAA CTG
4. Reverse: CAG TTC ATG CAG CTG AGC ATC ACT GCT ACG CAC

2.1.7 Geräte

Tabelle 10 gibt einen detaillierten Überblick zu den verwendeten Geräten in dieser Arbeit.

Tabelle 10: Geräte

Gerätename/-zweck	Hersteller	Fabrikat/Modell
Chemilumineszenzkammer	FUJIFILM	FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Elektrophoresekammer mit Stromversorgung für Agarosegele	Biometra	Biometra Elektrophoresekammer und Power Patch 25
Geldokumentation UV-Transilluminator mit Dunkelhaube und Drucker	Biometra	BioDoc Analyze GelDoc; Biometra Digital Graphic Printer UP-D890 (SONY)
Gelelektrophoresekammer für Western Blot	BioRad	BioRad Mini Protein Tetra System
Gewebe-Homogenisator	MPbio	FAST Prep 24
Reversephase-HPLC	Agilent	Agilent 1100 Series mit SHIMADZU LC-9A Liquid-Chromatograph
Reversephase-HPLC	SHIMADZU	SPD-M20A (Diode Array Detector), CTO-20AC-2 x LC-20AD (pumps), CBM-20A (Communication Bus Modul), SIL-20AC (Autoinjector) mit Nucleodur C18 Gravity-Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gekoppelt mit einer Vorsäule (8 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße)
Normalphase-/Chiralphase-HPLC	SHIMADZU	SPD-M10AVP (Diode Array Detector), CBM-10A (Communication Bus Modul), LC-10AT (pump),

Gerätename/-zweck	Hersteller	Fabrikat/Modell
		SIL-10AXL (Autoinjector) mit Chiralpak AD-H-Säule (4,6 x 250 mm, 5 µm Partikelgröße, Daicel, Osaka, Japan) wurde mit einer Nucleosil-Vorsäule (4,6 x 30 mm, 5 µm Partikel) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verbunden
Heizblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
pH-Elektrode	Phoenix Instrument	EC-30 pH
Photometer für Erythrozytenstabilitätsmessung	TECAN	Sunrise
Photometer zur Konzentrationsmessung (Protein/DNA/RNA)	Eppendorf	Bio PhotometerPlus mit Termal Printer DPU-414
qRT-PCR	Corbett Research	Rotor Gene RG-3000, Machine Serial No: 020301, Model: 5-Plex HRM
Rotationsverdampfer	Heidolph	Heidolph VV2000
Thermocycler	Biometra	Biometra T3, Serial No.: 1308324
Ultraschallgerät für <i>E. coli</i> -Zellen	SONIFIER, Brandon Ultraschall	Digital Sonifier, W-250 D Microtip Model 0102C (CE)
Ultraschallgerät für HEK-/Sf9-Zellen	Hielscher ultrasound technology	Ultraschallprozessor UP50H tip
Waagen	Satorius	BP210D und PP110

2.1.8 Software

Im Folgenden wird ein Überblick über der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Software gegeben, die für die Auswertung und Berechnung der Enzymaktivitätsmesswerte und während der Tierversuche von Bedeutung waren.

- Microsoft Excel (2016) wurde für die Berechnung der deskriptiven Statistik und zur Erstellung von Diagrammen/ Abbildungen (siehe Anhang) verwendet.
- Mittels IBM SPSS Statistics 26 wurden Signifikanztests durchgeführt (siehe Anhang).
- MathLab und GraphPad Prism wurde für die statistische Berechnung von Dr. D. Heydeck verwendet.
- G.Power 3.1 wurde für die Berechnung der Gruppengröße und Power in den Entzündungsmodellen verwendet.

- Mit dem Online-Tool „Psychometrica“ wurden Effektstärken der Entzündungsmodelle nachberechnet (vgl. Wolfgang Lenhard and Alexandra Lenhard 2017, siehe Anhang).
- Mit der PyRAT-Software (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden, Deutschland, interne Charité-Version) wurde für das Tiermanagement der Alox15b-KI-Tiere genutzt.
- Die Western-Blot-Banden wurden mit ImageJ quantifiziert.
- Mit SigmaPlot (Systat Software Inc., Chicago, USA) wurden V_{\max} - und K_m -Werte berechnet.
- LabSolutions LCsolution Version 1.25 (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japan) oder HP ChemStation for LC, Rev. A.0603 [509] wurde für die Auswertung der Enzymaktivitäts-Chromatogramme verwendet.
- Die Rotor-Gene Q-Pure detection, Version 2.3.1 (Build 49) wurde für die qRT-PCR-Analyse verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung der ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies

2.2.1.1 Datenbankrecherchen und Sequenzalignments für ALOX15-Lipoxygenase

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die NCBI-Proteindatenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>; Stand: 2019) nach ALOX15-Lipoxygenase-sequenzen verschiedener Säugetierspezies durchsucht. Die positiven Suchergebnisse wurden anschließend nach dem Molekulargewicht sortiert, wobei alle Proteine mit einem Molekulargewicht < 60 kDa und > 100 kDa eliminiert wurden. Mit folgenden Online-Tools wurden Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzalignments und Primer ermittelt:

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/> (Stand: 2019),

<https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html> (Stand: 2019),

https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (Stand: 2019).

2.2.1.2 Transformation für Plasmid-DNA-Präparation

Für die Herstellung der rekombinanten Expressionsplasmide wurden die kodierenden Sequenzen der ALOX-cDNAs chemisch von der Firma General Biosystems synthetisiert und in den PUC-57-Vektor hineinkloniert. Die lyophilisierten Plasmide (5 μ g) wurden jeweils in 50 μ l sterilem Wasser gelöst. Von dieser Lösung der rekombinanten

Klonierungsvektoren wurde 1 µl in 100 µl kompetene *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen transformiert. Die Probe wurde dazu 30 min auf Eis gestellt und dann erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und die Zugabe von 200 µl SOC-Medium. Die Lösung wurde eine Stunde bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot dieser Suspension auf einer Ampicillin-Luria-Bertani (LB)-Agarplatte (Stockkonzentration 100 mg/ml; Verdünnung 1:1000) ausplattiert und bei 37 °C für ca. 24 h inkubiert. Mehrere isoliert gewachsene Bakterienklone wurden danach selektiert und in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) bei 37 °C für 24 h kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure-Kit aus der Bakterienkultur isoliert. Plasmid-DNA-Klone, welche die Inserts von ALOX-Orthologen enthielten, wurden mittels einer Probespaltung mit den Restriktionsenzymen HindIII und SalI identifiziert.

2.2.1.3 Präparative Plasmidspaltung und Ligation

Zur Überführung der ALOX-Inserts aus den Klonierungsvektoren in Expressionsvektoren wurde zunächst die Spaltung der Klonierungsplasmide durchgeführt. Die Zusammensetzung der Spaltungsansätze (Tabelle 11) musste dazu zuerst wie folgt berechnet werden. Die Mengenangaben x und y sind dabei variable Mengen, je nach untersuchtem Säugetier-ALOX15-Ortholog (c) und Ansatz:

Berechnung Spaltansatz: (je 16 µl Ansatz)

Plasmid mit Insert: 2,5 µg/c Plasmid DNA = x µl
 + y µl Wasser
 Vektor peT28b: 5 µg/c Vektor DNA

Tabelle 11: Zusammensetzung des Spaltansatzes (20 µl Gesamtvolumen)

Spaltansatz	
Volumen	Reagenz
2 µl	Fast Digest Puffer (mit grünem Farbstoff)
1 µl	Restriktionsenzym SalI
1 µl	Restriktionsenzym HindIII
x µl	DNA-Insert oder -Vektor
y µl	Wasser (steril)

Die Spaltung erfolgte für 40 min bei 37 °C auf einem Thermomixer. Die Spaltprodukte wurden mithilfe der Agarosegelelektrophorese (1%iges Agarosegel) aufgetrennt. Die Banden mit dem Insert und dem linearisierten Klonierungsvektor konnten dann aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die DNA und der

Klonierungsvektor mit dem NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up-Kit (Tabelle 7) aus dem Gel isoliert. Zum Schluss wurde das ALOX-Insert in den linearisierten Expressionsvektor hineinligiert. Die Berechnung der Zusammensetzung des Ligationansatzes erfolgte mithilfe folgender Formel:

$$\frac{([ng] \text{ Vektor} \times [kb] \text{ Insert nach Spaltung})}{[kb] \text{ Zielvektor}} \times 3 \quad (1)$$

$$= x [ng] \text{ Insert zur Ligation}$$

Insert: ca. 2004 kb
 Vektor: 5269 kb

Tabelle 12: Zusammensetzung des Ligationsansatzes (20 µl Gesamtvolumen)

Ligationsansatz	
<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
4 µl	5 x Rapid Puffer
1 µl	T4-Ligase
x µl	Vektor (möglichst 90 ng)
y µl	Insert (siehe Berechnung)
z µl	steriles Wasser (aus dem Ligationskit)

Der Ligationsansatz (Tabelle 12) wurde für 30–45 min bei 22 °C inkubiert. Das gesamte Ansatzvolumen wurde danach in 100 µl kompetenter *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen transformiert. Die Probe wurde dazu 30 min auf Eis gestellt. Dann erfolgt der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und die Zugabe von 200 µl SOC-Medium. Die Lösung wurde anschließend 1 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt und danach auf einer Kanamycin-LB-Agarplatte (Verdünnung 1:1000, Stockkonzentration 50 µg/ml) ausplattiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C für ca. 24 h. Danach wurden einzeln gewachsene Bakterienklone selektiert und in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin (Verdünnung 1:1000, Endkonzentration 50 ng/ml) bei 37 °C für 24 h kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure-Kit aus der Bakterienkultur isoliert.

Nach einer Probespaltung (siehe S. 45) wurden die ALOX-positiven Klone durch Sequenzierung geprüft. Die erfolgreiche Einführung des ALOX-Inserts sowie der korrekte Leserahmen wurden mittels Nukleotidsequenzierung (Eurofins Genomics, Berlin, Deutschland) bestätigt. Die Expressionsplasmide für die bakterielle Expression (pET-28b [+]) enthielten ALOX-kodierenden Sequenzen und zusätzlich eine Nukleotidsequenz, die für ein N-terminales His6-Tagpeptid kodierten.

Die isolierte cDNA der ALOX15B des Menschen wurde von Dr. W. Boeglin (Vanderbilt University, Nashville, USA) zur Verfügung gestellt und von Frau Dr. D. Heydeck (AG H. Kühn, Institut für Biochemie der Charité, Deutschland) aus dem pQE-9-Expressionsvektor mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII in den pET28b-Expressionsvektor umkloniert. Das Maus-Ortholog im pQE-9-Expressionsvektor stammt von Herrn Dr. M. Walther (AG H. Kühn, Institut für Biochemie der Charité, Deutschland) und wurde von Frau Dr. D. Heydeck in den pET28b-Vektor umkloniert. Die sequenzierten rekombinanten Expressionsplasmide wurden hier der Autorin für die Expression der rekombinanten Proteine zur Verfügung gestellt.

2.2.1.4 Klonierung der Lipoxygenase-cDNA in verschiedenen Expressionsvektoren

Wenn eine Expression in *E. coli*-Zellen keine katalytische Enzymaktivität der ALOX15 gezeigt hatte, wurde die Proteinexpression in Insekten- bzw. in Human-Embryonic-Kidney-Zellen (HEK293) durchgeführt. Dies erforderte eine weitere Umklonierung der ALOX-Inserts in die eukaryontischen Expressionsvektoren pFastBac HTB (Sf9-Insektenzellexpression) und pcDNA3.1(-) (Expression in HEK293-Zellen). Zu diesem Zweck wurden das jeweilige Leerplasmid und das ALOX15-enthaltende rekombinante Klonierungsplasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI gespalten. Die Spaltprodukte wurden mithilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschten Banden des ALOX-Inserts und des linearisierten Expressionsvektors wurden aus dem Gel unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA und der Klonierungsvektor mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit aus dem Gel isoliert und mit dem Rapid-DNA-Ligation-Kit (Tabelle 7) zusammenligiert. Anschließend wurde das rekombinante Plasmid in *E. coli*-XL-1-Blue-Zellen transformiert und die Zellen wurden auf einer Kanamycin-LB-Platte (Verdünnung 1:1000, Endkonzentration 50 ng/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für ca. 24 h. Danach wurden einzeln gewachsene Bakterienklone selektiert und in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin (Verdünnung 1:1000, Endkonzentration 50 ng/ml) bei 37 °C für 24 h kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure-Kit aus der Bakterienkultur isoliert. Nach einer Probespaltung wurden die ALOX15-positiven Klone durch Sequenzierung geprüft (Eurofins Genomics, Berlin, Deutschland). Alle drei oben beschriebenen rekombinanten Expressionsvektoren (pET-28 [+], pFastBac HTB und pcDNA3.1(-)) wurden auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Nur bei der Umklonierung des ALOX15-Inserts vom pET-28b-Vektor in den eukaryontischen Expressionsvektor

pcDNA3.1(-) wurden die Restriktionsenzyme XbaI und HindIII verwendet. Die Expressionsplasmide für die bakterielle Expression (pET-28b [+]) und für die Expression der rekombinanten ALOX15 in Sf9-Zellen (pFastBac HTB) enthielten zusätzlich zur kodierenden Sequenz der ALOX-cDNAs eine Nukleotidsequenz, die für ein N-terminales His₆-Tagpeptid kodierte.

2.2.1.5 Proteinexpression der rekombinanten Lipoxygenasen in pro- und eukaryontischen Expressionssystemen

Für die pro-karyotische Proteinexpression der ALOX-Orthologe wurde der *E. coli*-Rosetta-2-(DE3)-pLysS-Stamm verwendet. Die kompetenten Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden (pET-28b [+]) transformiert. Die Transformation der Bakterienzellen mit dem leeren Expressionsplasmid diente bei der Expression in *E. coli* als Negativkontrolle. Vom rekombinanten Expressionsplasmid wurden 100 ng in 100 µl *E. coli*-Zellen transformiert. Die Probe wurde dazu 30 min auf Eis gestellt. Dann erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und die Zugabe von 300 µl SOC-Medium. Die Bakterien wurden nach einer Stunde bei 37 °C und 180 rpm auf einer Kanamycin/Chloramphenicol-LB-Agarplatte (Verdünnung 1:1000, Stockkonzentrationen 50 µg/ml Kanamycin, 35 µg/ml Chloramphenicol) ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach ca. 24 h wurden einzeln gewachsene Zellklone präpariert und in 1 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Verdünnung 1:1000, Stockkonzentrationen 50 µg/ml Kanamycin, 35 µg/ml Chloramphenicol) überführt. Zur Kontrolle des Bakterienzellwachstums wurde die optische Dichte der Flüssigkultur bei 600 nm (OD₆₀₀) photometrisch (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verfolgt. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,1–0,15 in einer 1:50 Verdünnung der Flüssigkultur wurden 1–2 ml Flüssigkultur in 50 ml-Medium-Kulturen (mit EnPresso-Kit) angesetzt und bei 30 °C im Schüttler (250 rpm) für ca. 24 h inkubiert. Zum bakteriellen Nährmedium (EnPresso-System) wurden je 50 µl Kanamycin, Chloramphenicol (Verdünnung 1:1000, Stockkonzentrationen 50 µg/ml Kanamycin, 35 µg/ml Chloramphenicol), 100 µl Antifoam 204-Reagenz, 50 µl EnZ I (Reagenz A, EnPresso) zugegeben. Nach der Inkubationszeit erfolgte die photometrische Überprüfung des Kulturwachstums. Die OD₆₀₀ sollte über dem Wert 5 im Originalansatz liegen. Die Proteinexpression wurde durch die Aktivierung des lac-Operons mit 50 µl 1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Zusätzlich wurden noch 250 µl EnZ I (Reagenz A EnPresso) und die Booster-Mischung aus dem EnPresso-Kit zugegeben.

Die Zentrifugation der Zellen (4000 g, 10 min, 4 °C) erfolgte nach weiteren 24 h bei 23 °C/ 230–250 rpm. Das Zellpellet wurde in 3–5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (1 x PBS) mit 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) aufgenommen und mittels Ultraschall 2 x 30 s lysiert (Digital Sonifier, W-250 D Microtip, Max. 30 % Amplitude, Model 0102C (CE), Brandon Ultraschall, Fürth, Deutschland). Der Lysatüberstand wurde nach der Zentrifugation (15000 g, 15 min, 8 °C) abgetrennt und konnte als Enzymquelle für weitere Experimente verwendet werden.

Im Laufe der gesamten Arbeit wurden zwei Kultivierungsmethoden zur Proteinexpression der ALOX15-Orthologen verwendet. Initial wurde das System der Firma BioSilta (BioSilta Oy, Oulu, Finnland) verwendet. Bei diesem System wurde das Kulturmedium nach einer optimierten Rezeptur selbst hergestellt, wobei alle Zutaten einzeln abgewogen werden mussten. Beim EnPresso-System (Enpresso GmbH, Berlin, Deutschland) lagen alle Komponenten in Form von vorgefertigten Tabletten vor, die bei Bedarf einfach in Wasser aufgelöst wurden. Die genaue stoffliche Zusammensetzung der einzelnen Tabletten wurde als Firmengeheimnis deklariert und selbst auf Nachfrage nicht veröffentlicht.

Für die ALOX-Isoformen, die in den verwendeten bakteriellen Expressionssystemen nicht exprimiert werden konnten, wurde versucht, die aktiven Proteine in HEK- oder in Sf9-Insekten-Zellen zu exprimieren (eukaryontische Expression).

Die HEK293-Zellen (LGC-Standards, Wesel, Deutschland) wurden sowohl für die eukaryontische Proteinexpression einzelner ALOX15-Orthologe als auch für zugehörigen Sloane-/Borngräber-Mutanten verwendet. Für die Expression wurden HEK293-Zellen in 6-Well-Platten mit 4×10^5 Zellen/Well in 2 ml 10%iger FKS-DMEM-Lösung (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Transfektion wurden 194 µl Opti-MEM® I Reduced-Serum-Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) mit 2 µg Plasmid-DNA (im pcDNA3.1[-] Vektor) vermischt und es wurden 6 µl von TransIT® -LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, USA) zugegeben. Als negative bzw. positive Kontrollen dienten die Transfektion der HEK293-Zellen mit dem leerem Expressionsplasmid pcDNA3.1(-) und der humALOX15. Nach einer Inkubation von 25 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen unter ständigem Schwenken der Platte tropfenweise transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C, indem sie zuerst mit 1 x PBS gewaschen und danach durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren aus den einzelnen Wells abgelöst wurden. Die Zellen aus je zwei Wells wurden in 2-ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 4000 rpm für 5 min

abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 0,5 ml PBS-Arachidonsäure-Lösung (100–160 μM) resuspendiert und mit Ultraschall (UP50H tip, Hielscher Ultrasound Technology, Deutschland) lysiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumborhydrid (NaBH_4) gestoppt und anschließend weiter für die Aktivitätsprüfung aufgearbeitet. Für die ALOX-Aktivitätsmessungen wurde Arachidonsäure (AA) als Substratfettsäure verwendet. Da diese Fettsäure oxidationsempfindlich ist, wurde sie als methanolische Stammlösung (100 μl , 100 mM) unter Argon bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Im Laufe der Arbeit wurden mehrere Stammlösungen aus unterschiedlichen AA-Präparationen hergestellt. Als Endkonzentration der AA im Aktivitätsansatz wurde routinemäßig 100 μM verwendet.

Für die Expression der ALOX-Isoformen in Sf9-Zellen wurde zunächst die kodierende Region aus dem rekombinanten bakteriellen Expressionsplasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII herausgeschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese isoliert. Diese wurde anschließend in das linearisierte pFastBac-HTB-Expressionsplasmid hineinlegiert. Nach der Amplifikation des rekombinanten Expressionsplasmids wurden das rekombinante Bacmid und das rekombinante Baculovirus gemäß den Anweisungen des Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionsystems (Invitrogen Life Technologies, Thermo Fisher) hergestellt. Nachdem das rekombinante Baculovirus mehrfach amplifiziert wurde, konnten 50 ml Sf9-Zellkultur (ATCC[®] CRL-1711) (2×10^6 Zellen/ml) mit 7 ml rekombinantem Baculovirus vermischt werden. Dafür wurden die nichtinfizierten Zellen im Insect Xpress Medium (LONZA Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, supplementiert mit 4 mM Glutamin und 0,5 % FKS) resuspendiert. Dann erfolgte die Inkubation bei $27\text{ }^\circ\text{C}$ und 120 rpm für mehrere Tage. Als 70–80 % der Zellen abgestorben waren, wurde der Ansatz 10 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 1500 xg zentrifugiert. Alle Pellets des Ansatzes wurden in insgesamt 5 ml PBS mit 2 mM EDTA gelöst, mit Ultraschall lysiert und das Lysat bei 10000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der daraus entstandene Zelllysatüberstand wurde für die Aktivitätsassays verwendet (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese der Sloane- und Borngräber-Determinanten

Der Einfluss der Mutagenese der Triadendeterminanten führte in vorherigen Studien zu vorhersagbaren Veränderungen der Produktspezifität der Enzyme (Borngräber et al. 1999; Vogel et al. 2010; Adel et al. 2016; Kozlov et al. 2019). Um diesen Einfluss auf eine breitere experimentelle Basis zu stellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit von ausgewählten tierischen ALOX15-Orthologen Mutageneseuntersuchungen der Borngräber-I (BGI)- und

der Sloane (SL)-Determinanten durchgeführt. Bei vielen AA-12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen sind die Positionen 418 und 419 (SL) durch kleine Valin (Val)-Reste besetzt, während ein großer Phenylalanin (Phe)-Rest an Position 353 (BG-1) vorzufinden ist. Um die Reaktionsspezifität der Enzyme zu verändern, wurden zunächst folgende Sloane-Mutanten hergestellt: Val419Met, Val418Ile, Val418Ile+Val419Met. Anschließend wurde versucht, die dabei erzielten Veränderungen in der Reaktionsspezifität der Enzyme durch Mutationen der Borngräber-Position durch Einfügen kleiner Aminosäuren bei Phe353 rückgängig zu machen. Dazu wurden die beiden folgende Mutanten hergestellt: Val418Ile+Val419Met+Phe353Leu; V418Ile+Val419Met+Phe353Ala. Für jede dieser Mutationen und für jedes ALOX15-Ortholog wurden spezifische Mutageneseprimer hergestellt (BioTeZ Berlin-Buch GmbH), welche die gewünschten Nukleotidaustausche enthielten (siehe 2.1.6). Das jeweilige ALOX-Ortholog, das als Insert im pET-28b(+)-Plasmid vorlag, wurde mithilfe der Mutageneseprimer, dem Pfu Ultra II HotStart 2 x PCR Master-Mix (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) und der hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* amplifiziert. Der PCR-Ansatz (25 µl Gesamtvolumen) ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: PCR-Ansatz für die ortsgerichtete Mutagenese von Sloane- und Borngräber-Mutanten (25 µl Gesamtvolumen)

PCR-Ansatz	
<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
12,5 µl	2 x PFU-Mastermix
1 µl	Primer upstream (5 µM)
1 µl	Primer downstream (5 µM)
x µl	DNA (100 ng)
y µl	Wasser (steril)

Der Ansatz wurde darauf im Thermocycler (T3 Biometra; Serial No.: 1308324) mit folgendem PCR-Programm (Tabelle 14) inkubiert:

Tabelle 14: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese von Sloane- und Borngräber-Mutanten

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	95	1	
2	95	0,5	17 Zyklen
3	55	1	
4	68	10 (1 min/kb)	
5	10	20	

Nach der PCR erfolgte der Verdau des Plasmids für 30 min bei 37 °C mit je 1 µl DpnI-Restriktionsendonuklease (Fast Digest Fermentas). Dabei wurde das als Matrize bei der PCR eingesetzte Wildtyp-Plasmid, das einen hohen Methylierungsgrad aufweist, abgebaut, sodass nur noch doppelsträngige, mutierte Plasmide übrigblieben. Das mutierte rekombinante Plasmid wurde anschließend in *E. coli*-XL-Blue-Zellen transformiert und auf einer Kanamycin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Amplifizierung des mutierten Plasmids erfolgte wie im Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Nach Anzucht der isoliert gewachsenen Bakterienklone in 1 ml Flüssigkultur wurden die mutierten Plasmide mit dem NucleoSpin® Plasmid EasyPure-Kit präpariert. Die erfolgreiche Mutagenese in der Plasmid-DNA wurde durch eine Nukleotidsequenzierung mit Eurofins Genomics (Berlin, Deutschland) bestätigt. Da die Enzymvarianten unterschiedlich gut exprimiert wurden, musste das optimale Volumen des einzusetzenden Lysatüberstands in einem Vorversuch zunächst ausgetestet werden. Für die Aktivitätsmessungen wurde ein Aliquot des Lysatüberstandes (5–50 µl) zu 0,5 ml PBS zugegeben, in dem sich 100 µM mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) befand. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 20 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 1 mg NaBH₄ gestoppt und der Ansatz wurde für 10 min auf Eis gelagert. In dieser Zeit wurden die bei der ALOX-Reaktion entstandenen Hydroperoxy-PUFAs, die chemisch instabil sind, zu den stabilen Hydroxyverbindungen reduziert. Danach erfolgte die Zugabe von 45 µl Essigsäure (99 %) und 455 µl Acetonitril (99 %). Die Lösung wurde gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 8 °C/ 15000 rpm für 15 min, um die denaturierten Proteine auszufällen. Der Überstand wurde in Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Vials (High-performance-liquid-chromatography-, HPLC-Vials) über-führt und mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (Reversed-phase high-performance-liquid-chromatography, RP-HPLC) analysiert.

2.2.3 PUFA-Oxygenierungsassays von ALOX15-Orthologen

Um herauszufinden, ob eine katalytische Aktivität verschiedener Säugetier-ALOX15-Orthologen mit verschiedenen PUFAs erzeugt werden kann und welche Reaktionsprodukte gebildet werden, wurden bei *In-vitro*-Aktivitätsassays verschiedene Oxygenierungssubstrate verwendet und quantifiziert. Abhängig vom Substratansatz wurden die Omega-3-PUFAs (Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexaensäure (DHA) und Alpha-Linolensäure (ALA))

oder Omega-6-PUFAs (Arachidonsäure (AA) und Linolsäure (LA)) als Substrat eingesetzt. Die finale Substratkonzentration im Messansatz betrug jeweils 100 µM.

In einem Vorversuch wurde die optimale Menge an Lysatüberstand für eine aussagekräftige Enzymaktivität ermittelt. Die Reaktion wurde mit der Zugabe der optimalen Menge der Enzympräparation aus dem Lysatüberstand zu einer in 1 x PBS gelösten PUFA (Ansatzvolumen 500 µl) gestartet und nach 10 min bei 20 °C auf dem Schüttler mit NaBH₄ gestoppt und auf Eis gestellt. Nach dem Abschluss der Gasbildung erfolgte die Zugabe von 45 µl Essigsäure (99 %) und 455 µl Acetonitril (99 %). Die Lösung wurde gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 8 °C/15000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und analysiert.

Die Hauptreaktionsprodukte, die die dominanten Reaktionsprodukte enthielten, wurden aufgefangen und das Lösungsmittel nach Zugabe von 1 ml Isopropanol im Vakuum-Rotationsverdampfer verdampft. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol aufgenommen, gemischt und unter Ultraschallbehandlung (Ultraschallbad) gelöst. Die Firma Lipidomix GmbH (Berlin-Buch, Deutschland) führte die Analyse der chemischen Identität der Reaktionsprodukte durch. Die eingeschickten Proben wurden 1:10 mit einer Methanol-Wasser-Mischung (1:1 Vol) verdünnt und weiter mittels LC-MS-/MS-Methode analysiert. Die Firma Lipidomix GmbH beschrieb ihre Probenvorbereitung und Analyse von PUFA-abgeleiteten Lipidmediatoren wie folgt: „500 µl Plasma, oder ca. 10–30 mg Gewebe oder vorpräparierte PUFA-Oxygenierungsprodukte wurden mit einer Mischung aus Antioxidantien und einem internen Standard versetzt, bestehend aus je 1 ng (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA)“:

14,15-DHET-D11	d4-13-HODE
15-HETE-d8	d4-PGB2
20-HETE-d6	d4-PGE2-13,14-dihydro-15-keto
8,9-EET-d11	d4-PGF2a
9,10-DiHOME-d4	LTB4-D4
d4-12(13)-EpoME	PGE2-D4

Dann wurden Methanol und Natriumhydroxid zur Proteinfällung und alkalischen Hydrolyse bei 60 °C für 30 min zugegeben. Nach Zentrifugation und pH-Einstellung wurde der erhaltene Überstand zur Festphasenextraktion auf Bond-Elute-Certify-II-Säulen (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gegeben. Das Eluat wurde auf einem Thermomixer bei 40 °C unter einem Stickstoffstrom eingedampft, um einen festen Rückstand zu erhalten, der

in 100 µl Methanol/Wasser gelöst wurde. Die Lagerung des Lysatüberstands, die nicht sofort für die weitere Analyse verwendet wurde, erfolgte bei -80 °C.

2.2.4 Nachweis des ALOX15-Proteins und Proteinquantifizierung

Zum Nachweis der rekombinant exprimierten ALOX15-Proteine und zur Abschätzung der Expressionshöhen der verschiedenen ALOX-Isoformen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zuerst wurde für die Proteinmengenbestimmung der Lysatüberstände ein Bradford-Assay mit 2 µl Lysatüberstand, 800 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz angesetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann photometrisch bei 595 nm gemessen. Für die Gelelektrophorese wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel (Tabelle 15) genutzt und für 30–40 min eine elektrische Spannung von 200 V angelegt. Die Auftragung der Proben auf das Gel erfolgte zusammen mit einem Marker (5 µl Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad, Feldkirchen, Deutschland). Für die Quantifizierung erfolgte zuerst die Auftragung von 500 ng, 250 ng und 125 ng gereinigtem *Myxococcus-fulvus*-ALOX-Protein in 15 µl Probenvolumen. Danach wurden die zu untersuchenden ALOX15-Proben aufgetragen, wobei immer die gleiche Menge an Gesamtprotein enthalten war (80 µg bis 1 mg). Zur einfacheren Auftragung und Visualisierung der Proteinbanden wurden ca. 10 µl Probe mit 5 µl ProSIEVE Pro Track Dual Color Protein Loading Puffer + DTT (Reduktionsreagenz) angefärbt und für 3 min bei 95 °C aufgeköcht.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (10%ig)		Sammelgel (4%ig)	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
Acrylamid	3,3 ml	Acrylamid	1,4 ml
Trenngelpuffer 4 x (1,5 M TRIS, pH 8,8; 0,6 % SDS)	2,5 ml	Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS, pH 6,75; 0,4 % SDS)	2,5 ml
TEMED	20 µl	TEMED	20 µl
10 % Ammoniumpersulfatlösung	100 µl	10 % Ammoniumpersulfatlösung	100 µl
Wasser (MilliQ)	4,1 ml	Wasser (MilliQ)	6 ml

Danach wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel durch ein Nassblotverfahren (ProSieve Ex Western Blot Buffer 10 x, Pro Sieve Ex Running-Buffer, Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, Deutschland) bei 400 mA für 23 min auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran (Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) übertragen. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit einer Ponceau-Rot-Färbung angefärbt, um

sicherzustellen, dass der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran funktioniert hat. Anschließend wurde die Membran für 30 min mit Blockierungslösung (10 x BlueBlock PF for Blotting, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit einem Anti-His-HRP-Antikörper (1:5000-Verdünnung, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) für 1–2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren 5-minütigen Waschschritten mit 1 x PBS + 0,05 % Tween wurde die Membran mit dem SERVALight Polaris CL HRP WB Substrate-Kit (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) 5 min lang bei Raumtemperatur gefärbt. Die Chemilumineszenz der immunoreaktiven Proteinbanden wurde mit dem FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-1000plus (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und Image J-Software quantifiziert (siehe Abbildung 10).

2.2.5 Analyse der Enzymaktivität mittels RP-/NP-/CP-HPLC

Um die Produktmuster der verschiedenen ALOX15-Orthologen zu analysieren, wurden die ALOX-Aktivitätsassays mit RP-HPLC an einer Nucleosil-C-18-Säule analysiert (Macherey & Nagel, Nucleodur 100-5, 250 mm × 4 mm, 5 µm Partikelgröße). Die mobile Phase des RP-HPLC-Systems bestand aus einer Lösungsmittelmischung im Verhältnis von 70 % Acetonitril, 30 % Wasser und 0,1 % Essigsäure (isokratische Eluation). Die Dauer eines chromatografischen Analysedurchlaufs betrug 15 min, mit einer eingestellten Flussrate von 1 ml/min bei 25 °C. Die Quantifizierung der Lichtabsorption bei 235 nm erfolgte mit einem Hewlett-Packard-Diode-Array-Durchflussdetektor. Die verschiedenen Hydroxyfettsäuren, die aus den angebotenen PUFAs hergestellt wurden, eluierten unter diesen chromatografischen Bedingungen im Retentionszeitintervall von 5–12 min.

Nicht alle Hydroxyfettsäure-Produkte ließen sich unter diesen chromatografischen Bedingungen durch die RP-HPLC auftrennen. Deshalb wurden weitergehende Analysen der Reaktionsprodukte mittels kombinierter Normalphasen-/Chiralphasen-HPLC (NP-/CP-HPLC) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine CHIRAL-PAK-AD-H-Säule (250 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Daicel, Osaka, Japan) hinter eine Normalphasen-Säule (Nucleodur, 30 mm x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) geschaltet. Die mittels RP-HPLC gereinigten Hydroxyfettsäuren wurden in 0,2 ml Laufmittel der NP-/CP-HPLC gelöst. Die Hydroxyfettsäuren wurden isokratisch eluiert, wobei das Laufmittel aus einer Mischung n-Hexan (96 %), Methanol (3 %), Ethanol (1 %) und Essigsäure (0,1 %) bestand. Zur Entgasung wurde das Lösungsmittelgemisch

kontinuierlich mit Helium durchströmt. Das chromatografische System wurde durch die Injektion authentischer Standards (\pm 8-HETE, \pm 12-HETE, \pm 15-HETE, \pm 13-HODE) doppelt kalibriert. Dabei wurden zuerst die Retentionszeiten der authentischen Standards ermittelt, sodass diese mit den Retentionszeiten der Reaktionsprodukte verglichen werden konnten. Bei Übereinstimmung der Retentionszeiten eines Reaktionsproduktes mit der Retentionszeit eines bestimmten authentischen Standards konnte auf die Identität der chemischen Struktur des Reaktionsproduktes geschlossen werden. Zweitens wurden die Peakflächen der Standards als Maß für die eingespritzte Substanzmenge ermittelt. Dafür wurden verschiedenen Mengen an 15-HETE analysiert und aus den erhaltenen Peakflächen wurde eine Eichgerade konstruiert. Aus dieser Eichgeraden konnten dann die Flächeneinheiten der Analyten (Hydroxyfettsäuren) in Produktmenge ([nmol] konjugierte Diene) berechnet werden. Da alle konjugierten Diene den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten ($20000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) haben, konnte die 15-HETE-Eichung 1:1 auf andere konjugierte Diene wie 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 13-HODE, 15-HEPE, 17-HDHA, usw. übertragen werden (siehe Abbildung 11).

2.2.6 Charakterisierung der rekombinanten ALOX15-Orthologen vom *T. belangeri*

Für die Analyse der ALOX15-Isoformen des *T. belangeri* wurden verschiedene Enzymaktivitätsassays durchgeführt, um herauszufinden welche Bedingungen (Volumen, Zeit, Temperatur, pH-Wert, Substrataffinität) für eine optimale Enzymaktivität notwendig sind. Zu jeder Probe der folgenden Charakterisierungsschritte wurde ein doppelter Ansatz hergestellt, der mittels RP-HPLC doppelt gemessen wurde. Am Ende konnten so vier Messwerte je getestetem Parameter erhalten werden. In Abschnitt 2.2.6.1 bis 2.2.6.5 wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen immer Negativ-Kontrollen ohne Zugabe von Lysatüberstand mitgeführt. Die Reihenfolge der nachstehenden Versuche geben nacheinander immer die optimalen Bedingungen für den folgenden Versuch an. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12–16 gezeigt.

2.2.6.1 Lysat-Volumen-Abhängigkeit

Nachdem die ALOX15-Orthologe rekombinant exprimiert und eine Enzymaktivität nachgewiesen wurde, sollte mit einer weiteren Versuchsanordnung die Abhängigkeit der Arachidonsäureoxygenierung vom Lysatüberstandsvolumen untersucht werden. Dazu wurde das Volumen des Lysatüberstands von 5–50 μl in 5 μl -Abständen ausgewählt. Zu x μl der 100 μM Arachidonsäure-Lösung (in 1 x PBS) wurde die entsprechende Menge an y μl

Lysatüberstand zugegeben, sodass das Volumen des Gesamtansatzes 500 µl betrug. Die Ansätze wurden bei 20 °C für 10 min auf dem Thermomixer schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 1–3 mg festem NaBH₄ gestoppt und der Ansatz wird kurz vermischt. Die Proben standen auf Eis, wurden mit 45 µl Essigsäure (99 %) angesäuert und mit 455 µl Acetonitril (99 %) aufgefüllt. Die Lösung wurde gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 8 °C/15000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC analysiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Zeitabhängigkeit

In dieser Versuchsanordnung wurde die Arachidonsäureoxygenierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Dazu wurden die Inkubationszeiten zwischen 2–30 min ausgewählt. Zu x µl der 100 µM AA-Lösung (in 1 x PBS) wurde die optimale Menge Lysatüberstand (y µl) zugegeben, sodass das Volumen des Gesamtansatzes 500 µl betrug. Das optimale Lysatüberstandsvolumen wurde mit dem Versuch „Lysatvolumenabhängigkeit“ (siehe Abschnitt 2.2.6.1) ermittelt. Die Ansätze wurden bei 20 °C schüttelnd auf dem Thermomixer inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 1–3 mg festem NaBH₄ gestoppt. Die Proben standen dann auf Eis, es wurde mit 45 µl Essigsäure (99 %) angesäuert und mit 455 µl Acetonitril (99 %) ausgefällt. Anschließend wurde wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben vorgegangen.

2.2.6.3 Temperatur- und pH-Abhängigkeit

Um den Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung zu untersuchen, wurde die Reaktion des ALOX15-Enzyms bei verschiedenen Reaktionstemperaturen zwischen 5–50 °C in einem 5 °C-Abstand durchgeführt (Abbildung 15). Die Ansätze wurden kurz gemischt und bei der optimalen Zeit (siehe Abschnitt 2.2.6.2) inkubiert. Weiterhin wurde der Einfluss des pH-Wertes untersucht (Abbildung 14). Der Reaktionsansatz (500 µl) bestand aus Tris/Borat-Puffer mit der verdünnten Arachidonsäure (100 µM) und dem jeweiligen pH-Wert (pH 6–10 in 0,4-er-Schritten) sowie der optimalen Menge an Lysatüberstand (siehe Abschnitt 2.2.6.1). Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 20 °C auf dem Thermomixer wurde die Reaktion durch Zugabe von festem NaBH₄ gestoppt und der Ansatz kurz gemischt. Die Proben standen dann auf Eis, wurden mit 45 µl Essigsäure (99 %) angesäuert und mit 455 µl Acetonitril (99 %) ausgefällt. Die Lösung wurde gemischt und 10 min auf Eis gestellt.

Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 8 °C/15000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC analysiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.4 Charakterisierung der Substratspezifität

Wie sich die Empfindlichkeit der Enzymaktivität auf verschiedene Substratkonzentrationen und PUFA-Substrate auswirkt, wurde ermittelt. Zuerst wurde die Affinität der ALOX-Orthologe zur Arachidonsäure untersucht, indem die Probeansätze mit verschiedenen Fettsäurekonzentrationen (5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM, 120 µM, 200 µM) und die jeweilige optimale Menge an Lysatüberstand (siehe Kapitel 2.2.6.1) inkubiert. Das Gesamtansatzvolumen auf Basis von 1x PBS betrug 500 µl und wurde für 10 min bei 20 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben. Mithilfe der gewonnenen Daten aus Abschnitt 2.2.6.4 und dem Programm SigmaPlot 2000 (Enzym Kinetic Modul 1.0, Systat Software Inc., Chicago, USA) konnte die Bestimmung der Enzymkinetik (K_m -Wertes, v_{max}) und die Anfertigung der Michaelis-Menten-Kurven für den Enzym-charakterisierenden Sättigungsverlauf erfolgen (Abbildung 12).

Um die Affinität der ALOX-Orthologe zu fünf Substratfettsäuren zu bestimmen, wurde dazu erneut wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben vorgegangen. Um die Substratspezifität der ALOX-Orthologe zu charakterisieren, wurden einzeln die am häufigsten biologisch vorhandenen Polyenfettsäuren als potenzielle Substrate verwendet (je 80 µM, AA, DHA, EPA, ALA, GLA, LA) und die Mengen der Oxygenierungsprodukte durch RP-HPLC quantifiziert. Für jedes Enzym wurde die Menge der Oxygenierungsprodukte, die aus der am besten metabolisierten Fettsäure gebildet wurden, 100 % gesetzt und die relativen Oxygenaseaktivitäten für die anderen Fettsäuren berechnet (Abbildung 16 und Abbildung 17).

2.2.6.5 Sauerstoffabhängigkeit

Zur Abschätzung der Sauerstoffaffinität der rekombinanten ALOX15-Orthologen (Abbildung 13) wurden vergleichende Aktivitätsassays bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. In der Studie von Schäfer et al. 2020 wurde dazu „anaerobe“ Arachidonsäure-Lösung (80 µM in 1 x PBS, 15 min mit Argon gespült) mit hyperoxischer PBS-Lösung (80 µM Arachidonsäure, 15 min mit Sauerstoffgas gespült) in einer gasdichten Reaktionskammer (Kammervolumen 1,1 ml, zuvor mit Argon gefüllt)

untersucht. Dabei wurde in der Studie die „anaerobe“ Reaktionslösung über eine Kapillareinlassöffnung in die vorher mit Argon gespülte Reaktionskammer gegeben. Anschließend wurde ein definiertes Volumen der hyperoxischen Lösung zugegeben, sodass der gesamte Reaktionsraum mit Flüssigkeit gefüllt war. Aus dem Volumenverhältnis von „anaerober“ und hyperoxischer Lösung errechnet sich dann die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsvolumen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5–25 µl einer teilweise anaeroben Enzympräparation gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei 20 °C wurden die Ansätze wie im Versuch 2.2.6.1 beschrieben aufgearbeitet.

2.2.7 Membranoxygenierung

Die Fähigkeit der ALOX15-Orthologe, biologische Membranen zu oxygenieren, wurde durch Inkubationen des Enzyms (Lysatüberstand) mit submitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherzen untersucht. Diese Modellmembranen repräsentieren Inside-out-Vesikel der inneren Mitochondrienmembranen von Rinderherzzellen und stellen ein geeignetes Modells substrat für die Membranoxygenaseaktivität von ALOX15-Orthologen dar. Dazu wurde in 15-ml-Röhrchen (Blue caps) 450 µl bzw. 350 µl 1 x PBS pipettiert und 50 µl (tupALOX15a) oder 150 µl (tupALOX15c) Lysatüberstand zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 500 µl erreicht wurde. In diese Lösung wurden 10 µl der Membranpräparation SMP zugegeben und die Lösung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandenen Hydroperoxyfettsäuren wurden mit NaBH₄ reduziert und der Reaktionsansatz mit 35 µl Essigsäure (99 %) angesäuert. Anschließend wurden das 2,5-fache des Ansatzvolumens an Methanol (1,25 ml) und das 1,25-fache des Ansatzvolumens an Chloroform (625 µl) zugegeben. Die Ansätze wurden 1 min lang vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden weitere 625 µl Chloroform und 625 µl 1 x PBS zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde dann erneut 1 min gemischt. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm bei 4 °C bildeten sich zwei Phasen. Die untere Phase, welche die gesamten Lipide der Mitochondrienmembranen enthielt, wurde in ein Glas-Schliff Röhrchen überführt. Das Lösungsmittel wurde mit einem Rotationsverdampfer (Heidolph VV2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland) verdampft und die zurückgebliebenen Lipide in 500 µl anaerobem MeOH (Argon begast) gelöst. Dieser Lösung wurden 75 µl 40%iger anaerober KOH-Lösung zugesetzt. Zur Hydrolyse der Esterlipide wurden die Proben bei 60 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe abgekühlt und angesäuert (Zugabe von 45–75 µl 99%iger Essigsäure). Die Lösung wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (15000 rpm bei 7 °C für 10 min).

Anschließend wurden die Hydrolysate mittels RP-HPLC (Flussrate von 1 ml/min; Laufmittel: 70 % Acetonitril; 30 % Wasser; 0,1 % Essigsäure) analysiert. Die PUFA-Oxidationsprodukte (konjugierte Diene) wurden bei 235 nm, die nicht-oxygenierten PUFAs bei 210 nm detektiert. Die oxygenierten PUFAs wurden aufgefangen (Retentionszeitintervall von 7–12 min) und das Laufmittel mit dem Rotationsverdampfer verdampft. Die Lipide wurden in 300 µl Laufmittel für die NP-HPLC gelöst. Das Laufmittel der Normalphase bestand aus 98 % Hexan, 2 % Isopropanol und 0,1 % Essigsäure. Die Laufzeit betrug 20 min. Zur Quantifizierung der Membranoxygenaseaktivität wurden die Mengen an konjugierten Dienen (Summe von HETE- und HODE-Isomeren) sowie die Menge nichtoxygenierter Linolsäure und Arachidonsäure im Hydrolysat ermittelt. Das Verhältnis von konjugierten Dienen zu nichtoxygenierten Fettsäuren, welches den Oxygenierungsgrad der Membranlipide widerspiegelt, wurde als Maß für die ALOX15-Membranoxygenaseaktivität bestimmt (vgl. Kuhn et al. 1990). Für die weitere Analyse der Hauptreaktionsprodukte wurde die CP-HPLC, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, angewandt. Die Daten sind vom *Tupaia belangeri* beispielhaft in Abbildung 18 dargestellt.

2.3 Charakterisierung der Alox15b-Knock-in-Mäuse mit humanisierter Reaktionsspezifität

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell (Alox15b-Knock-in-Mäuse, Alox15b-KI) handelt es sich um eine C57BL/6-Mauslinie mit zwei konsekutiven Punktmutationen im Exon 13 des *Alox15b*-Genlocus. Durch diese geringgradige genetische Manipulation, die mithilfe der CRISPR/Cas9-Strategie ins Genom von embryonalen Stammzellen eingeführt wurde, sollten die Mäuse anstatt der AA-8-lipoxygenierenden Wildtyp-Alox15b die AA-15-lipoxygenierende Tyr603Asn+His604Val-Doppelmutante exprimieren. Aus der Verpaarung von heterozygoten Alox15b-KI-Founder-Mäusen wurden Kolonien von homozygoten Wildtyp-Mäusen oder homozygoten Alox15b-KI Mäusen gezüchtet, die für vergleichende Untersuchungen genutzt wurden. Die genetisch veränderte Maus (Alox15b-KI) wurde subjektiv hinsichtlich morphologischer Besonderheiten und hinsichtlich ihres Verhaltens bewertet. Auch wurden Blutproben entnommen, um unter anderem die Erythrozytenstabilität zu beurteilen. Zudem wurden der Alterungsprozess in Abhängigkeit von Geschlecht und Genotyps beurteilt sowie das Auftreten von Alterstumoren vermerkt. Ferner wurden ausgewählte Organgewichte der Genotypen verglichen. Die Gewebe wurden teilweise histologisch untersucht. Außerdem wurden die

beiden Mauslinien in zwei unabhängigen murinen Entzündungsmodellen (Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS)-Kolitismodell, komplette Freund-Adjuvans (CFA)-Pfortenödemmodell) getestet.

Das Mausmodell wurde von der Firma Cyagen Bioscience Inc. in Santa Clara (USA) im Auftrag der AG-Kühn-Lipoxygenaseforschung des Instituts für Biochemie der Charité in Berlin erzeugt. Folgende Beschreibung des Herstellungsprozesses stammt vom Hersteller und wurde hier ins Deutsche übersetzt:

„Das *Alox8-* (*Alox15b-*) Gen der Maus (GenBANK Zugangsnummer: NM_009661.4; Ensembl: ENSMUSG00000020891) befindet sich auf dem Chromosom 11. Es besteht aus 14 Exons, wobei das ATG-Startcodon im Exon 1 und das TAA-Stopcodon in Exon 14 lokalisiert sind. Tyr603 und His604 befinden sich im Exon 13. Da diese beiden Aminosäuren modifiziert werden sollten, wurde das Exon 13 als Zielort ausgewählt. Ein gRNA-Targeting-Vektor und ein Donor-Oligonukleotid, welches die Zielsequenz für die einzuführenden Mutationen enthielt, wurden konstruiert. Die Mutationsstellen für Tyr603Asn+His604Val (TATCAC zu **GACGTC**) im Donor-Oligonukleotid wurden durch Homologie gesteuerte Reparatur ins Exon 13 eingeführt. Eine stumme Mutation (CTC zu **CTG**) wurde zusätzlich eingefügt, um die Bindung und das erneute Schneiden der Sequenz durch die gRNA nach Homologie-gerichteter Reparatur zu verhindern. Die Cas9-mRNA, die durch *In-vitro*-Transkription erzeugte gRNA und das Donor-Oligonukleotid wurden für die Produktion von ALOX15B-KI-Mäusen in befruchtete Eizellen injiziert. Die Jungtiere wurden durch PCR genotypisiert, gefolgt von einer Sequenzanalyse und Aat II-Restriktionsanalyse.“ (Quelle: Cyagen Bioscience Inc., Santa Clara, USA)

Die englische Beschreibung des Herstellers befindet sich im Anhang in Abschnitt 7.2.

Der Hersteller gibt weiterhin die farblich markierten Allelsequenzen an:

„Das *Alox15b* Wildtyp-Allel von der genetischen Manipulation hatte folgende Sequenz:
 ACC TAC TTC CAA AGG CCA GGC CCG GCC TGA GAG TTT CAT AGC CAC G(**CTC**)
CCA GCA GTT AAT TCG TCA AGT (TAT CAC) ATC ATT GCT CTC TGG CTG CTA
 AGC GCA GAA CCT GGG GAC CAA GTA AGT AAG GAG CTG GGA.
 Das mutierte *Alox15b* Allel nach der genetischen Manipulation sollte entsprechend der gewählten Mutationsstrategie folgende Sequenz aufweisen:
 ACC TAC TTC CAA AGG CCA GGC CCG GCC TGA GAG TTT CAT AGC CAC G(**CTG**)
CCA GCA GTT AAT TCG TCA AGT (GAC GTC) ATC ATT GCT CTC TGG CTG CTA
 AGC GCA GAA CCT GGG GAC CAA GTA AGT AAG GAG CTG GGA
 Die Sequenzen in Klammern im Wildtyp-Allel sollten nach der erfolgreichen Modifizierung durch die Sequenz in Klammern im Mutations-Allel ersetzt sein. Die Farbcodierung soll als Hilfestellung für die Wiederfindung dienen.“ (Quelle: Cyagen Bioscience Inc., Santa Clara, USA)

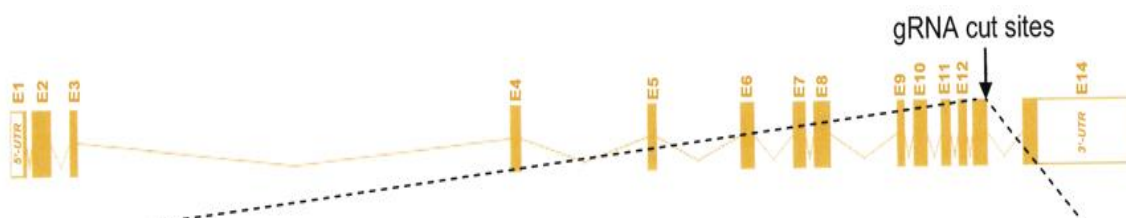


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie der Alox15b-KI-Maus (Quelle: Cyagen, Santa Clara, USA, siehe auch Anhang, Abschnitt 7.2; beschriftet nach Schäfer et al. 2022). Die genomische Region des Maus-Alox8-Locus (13,91 kb) ist dargestellt. Durchgehende Balken = open reading frames, offene Balken = untranslated regions, gRNA = guide ribonucleic acid.

2.3.1 Genotypisierung der Alox15b-Knock-in-Mäuse

Für die Tierversuche war es notwendig, die heterozygoten Alox15b-(Y603D+H604V)-Knock-in-Mäuse reinerbig zu züchten. Zum Tiermanagement wurde die PyRAT-Software (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden, Deutschland) genutzt. Um die Tiere zu genotypisieren, wurden Ohrbiopsien verwendet. Für die DNA-Extraktion wurden die Ohrbiopsien mit 40 µl 1 x Base Puffer (Tabelle 6) versetzt und 60 min bei 95 °C auf dem Thermoschüttler geschüttelt. Darauf erfolgte eine kurze Abzentrifugation (10000 rpm) sowie die Zugabe von 40 µl 1 x Neutralisationspuffer und kurzes Vermengen. Die tierischen Proben wurden bei -20 °C gelagert. Für die PCR-Analyse wurden 2 µl der DNA-Lösung zu 23 µl der Primer-Stock (Tabelle 16) gegeben und mit einem erprobten PCR-Programm (Tabelle 17) im Thermocycler (T3 Biometra; Serial No.: 1308324) inkubiert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Primer-Stocks für die Genotypisierung der Alox15b-KI-Mäuse

Primer Stock	
Volumen	Reagenz
6,5 µl	steriles Wasser
2 µl	Primer upstream (5 µM) (Tabelle 18)
2 µl	Primer downstream (5 µM) (Tabelle 18)
12,5 µl	MyTAq Red Mix (Bioline)

Tabelle 17: PCR-Programm für die Genotypisierung der Alox15b-KI-Mäuse

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	94	5	
2	94	0,5	2 x 34 Zyklen
3	60	0,5	
4	72	0,67	
5	72	10	
6	10	20	

Nach Durchlauf des PCR-Programms wurde die Lösung kurz abzentrifugiert und mit dem PCR-Clean-up-Kit (Macherey & Nagel GmbH Co KG, Düren, Deutschland) aufgearbeitet. Die Sequenzanalyse führte die Firma Eurofins (Berlin, Deutschland) mit dem entsprechenden Sequenzierprimer (Tabelle 18) durch.

Tabelle 18: Primer für die Genotypisierung der Alox15b-KI-Maus

Alox8ki_633up Sequenzierprimer	ATA TTC ACC TGC TCA GCC AAG CAT G
Primer upstream	CGG GAA GCC CTG GTC CAG TAT ATC
Primer downstream	AGC CTG ACC CTG CCT CTA CTC TAA GT

2.3.2 Alterungsversuch

Wie sich die genetische *Alox15b*-Manipulation auf den lebenden Organismus auswirkt, ist bisher unbekannt. Manche natürlicherweise vorkommenden und/oder artifiziell eingeführten Mutationen können mit zunehmendem Alter der tierischen Individuen eine negative Auswirkung zeigen (Crowley and Curtis 1963; Moorad and Promislow 2008; Mao et al. 2012; Kashiwagi et al. 2017). Um Hinweise für einen solchen Zusammenhang zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Alterungsprozess der genetisch veränderten Tiere vergleichend zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren beobachtet. Aufgrund interner Erfahrungswerte wurde die Gruppengröße zu dieser Longitudinalstudie wie folgt festgelegt: Jeweils 10 männliche und weibliche Mäuse des Wildtyps und der homozygoten *Alox15b*-KI-Tiere (insgesamt 40 Tiere) wurden zufällig aus der gezüchteten Population ausgewählt und einmal wöchentlich gewogen. Die Tiere wurden nach Standardbedingungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité- Universitätsmedizin Berlin gehalten (Gruppenhaltung von max. 5 Tieren je Käfig, Futter (siehe Abschnitt 7.9, Tabelle 46) und Wasser *ad libitum* sowie klimatisierte Käfige mit einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus). Aufgrund der Tatsache, dass die Expression der *ALOX15B* in der menschlichen Haut nachgewiesen werden konnte (Brash et al. 1997), war davon auszugehen, dass das Enzym auch eine Rolle in der Haut spielt. Wäre das der Fall, könnte die Manipulation des murinen *Alox15b*-Gens Veränderungen in der Haut bzw. im Fell hervorrufen. Deshalb wurden in dieser Arbeit regelmäßig einzelne Tiere der jeweiligen Genotypen fotografiert, um die Fellstruktur zu beobachten.

2.3.2.1 Blutanalyse und Organgewichte

Im Rahmen des Alterungsverlaufs wurden jeweils aus den gezüchteten Mauslinien Tiere beider Geschlechter und unterschiedlichen Alters zufällig ausgewählt und deren Blut bzw. deren Organe analysiert. Es handelte sich hierbei um einen explorativen Versuch, der durch keine spezifische Arbeitshypothese untermauert war. Bei einer unterschiedlichen Anzahl an Tieren beider Geschlechter wurde das Körpergewicht als auch das Gewicht der Nieren, der Milz, des Gehirns und beider Hoden gemessen und zwischen ausgekreuzten Wildtyp-Mäusen und homozygoten *Alox15b*-KI-Tieren verglichen. Von mindestens fünf Tieren je Genotyp und Geschlecht wurde Blut aus dem Herzen oder der Hohlvenen (*Vena cava*) in drei verschiedenen Altersgruppen entnommen. Die Altersgruppen wurden eingeteilt in jung (10–20 Wochen), mittel (30–40 Wochen) und alt (ab ca. 70 bis ca. 80 Wochen). Die pro Tier

entnommenen 0,5 ml EDTA-Blut wurden für das hämatologische Labor (IMD, Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam, GbR) und die osmolare Erythrozyten-Stabilitätsanalyse aufgeteilt.

Osmolare Erythrozyten-Stabilitätsanalyse:

Für die Stabilitätsanalyse wurden 250 µl Blut mit 250 µl PBS vermischt. Auf einer 96-Well-Platte wurden für jede Tierblutprobe je 2–3 Wells mit jeweils 200 µl einer NaCl-Lösung unterschiedlicher Konzentration (0,85 %; 0,5 %; 0,475 %; 0,45 %; 0,425 %; 0,40 %; 0,35 %; 0 %) befüllt, worauf 5 µl des Blut-PBS-Gemisches auf die Wells mit 0 % bis 0,5 % NaCl-Lösung gegeben und vermischt wurden. Dann erfolgte eine 30-minütige Inkubation, bei 20 °C in Dunkelheit. Fünf Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde weiteres Blut frisch mit 1 x PBS vermischt und in die Wells mit 0,85 % NaCl überführt und vermischt. Bei 0,85%iger NaCl-Lösung liegt eine fast physiologische Konzentration vor und diente somit als Referenzwert. Dieses Vorgehen wurde aus älteren Studien abgewandelt (Parpart et al. 1947; Dewey et al. 1982; Rademacher et al. 2020) und von früheren Experimenten der Lipoxygenaseforschung übernommen (Rademacher et al. 2020). Danach wurde die Well-Platte für 5 min bei 1500 rpm und bei Raumtemperatur zentrifugiert. In eine neue 96-Well-Platte wurden 100 µl des Überstands überführt und die Lichtabsorption bei 540 nm photometrisch (Sunrise, TECAN, Deutschland) gemessen. Die osmolare Stabilität der Erythrozyten wurde als prozentuale Lyse der Erythrozyten in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration und dem Alter der Tiere berechnet (siehe Abschnitt 2.6).

Laboranalyse der hämatologischen Parameter:

Die Blutanalyse im hämatologischen Labor beinhaltete die Zählung der Leukozyten [Gpt/l], Erythrozyten [Tpt/l], Thrombozyten [Anzahl/µl], den Hämoglobinwert [mmol/l], den Hämatokritwert, das mittlere korpuskuläre Volumen (mean corpuscular volume, MCV [fl]), das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (mean corpuscular haemoglobin, MCH [fmol]) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (mean corpuscular haemoglobin concentration, MCHC [g/dl]). Die Leukozyten wurden zudem differenziert nach stabkernigen neutrophilen Granulozyten, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen bzw. basophilen Granulozyten. Weiterhin wurde der Anteil an Retikulozyten im Blut bestimmt (jeweils als [Anzahl/µl]).

Hämatologische Auffälligkeiten wie Anisozytose, Poikilozytose, Polychromasie, Plättchenaggregation, Howell-Jolly-Körperchen, lymphozytäre Reizformen, atypische

Lymphozyten, Plasmazellen, Thrombozytenaggregate und Mikrozytose wurden ebenfalls bewertet (siehe Anhang, Abschnitt 7.5).

2.3.3 Analyse der Oxygenierungsmetabolite im Blutplasma von Alox15b-KI-Mäusen

Um den Einfluss der Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b auf das Muster von freien Plasma-Oxylipinen zu untersuchen, wurden die Mengen an freien oxygenierten PUFAs im Blutplasma der Versuchstiere quantifiziert. Für diese Analysen wurden 5 männliche und 5 weibliche Alox15b-KI-Mäuse sowie der ausgekreuzte Wildtyp beider Geschlechter durch eine Überdosis Isofluran und Genickbruch getötet. Sofort danach wurde EDTA-Blut entnommen und zentrifugiert, um das Blutplasma zu gewinnen. Dieses wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und an die Firma Lipodomix GmbH in Berlin-Buch geschickt. Dort wurden die Plasmaproben wie folgt aufgearbeitet und analysiert: Dem Blutplasma (10 µl) wurden 450 µl Wasser, 10 µl einer Mischung interner Standards (LTB4-d4, 20-HETE-d6, 15-HETE-d8, 13-HODE-d4, 14,15-DHET- d11, 9,10-DiHOME-d4, 12,13-EpOME-d4, 8,9-EET-d11, PGE2-d4; jeweils 10 ng/ml) und 5 µl Butylhydroxytoluol (BHT) zugegeben. Plasmaproteine wurden durch die Zugabe von 100 µl einer 1:4-Mischung (bezogen auf das Volumen) von Glycerin:Wasser und 500 µl Acetonitril ausgefällt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 2 ml Phosphatpuffer (0,15 M) auf pH 6,0 eingestellt, die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt und der klare Überstand wurde für die Festphasen-Lipidextraktion auf einer 200 mg-Agilent-Bond-Elute-Certify-II-Kartusche verwendet (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Vor dem Auftragen der Probe wurde die Kartusche mit 3 ml Methanol und 3 ml Phosphatpuffer (0,15 M, pH 6,0) konditioniert. Nach der Probenauftragung wurde die Säule mit 3 ml Methanol:Wasser (1:1, bezogen auf das Volumen) gewaschen und die oxygenierten Fettsäuren mit einer 74:25:1-Mischung (bezogen auf das Volumen) von Ethylacetat:n-Hexan:Essigsäure eluiert. Die Lösungsmittel wurden im Stickstoffstrom verdampft, die verbleibenden Lipide in 100 µl einer 6:4-Mischung (bezogen auf das Volumen) von Methanol:Wasser rekonstituiert und für die LC-MS-/MS-Analyse verwendet. Die LC-MS-/MS-Analyse wurde mit einem Agilent 1290/II-LC-MS-System bestehend aus einer binären Pumpe, einem Autosampler und einem Säulenofen (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die stationäre Phase war eine Agilent-Zorbax-Eclipse-C18-UPLC-Säule (150 x 2,1 mm, 1,8 µm Partikelgröße). Die Temperatur wurde auf 30 °C eingestellt. Als mobile Phase wurde ein Lösungsmittelgradient verwendet, der aus zwei Stammlösungen gemischt wurde: Stammlösung A: Wasser mit 0,05 % Essigsäure;

Stammlösung B: Methanol:Acetonitril (1:1 % Vol.). Der Zeitverlauf des für die Analysen verwendeten Lösungsmittelgradient ist im Anhang, Abschnitt 7.3, dargestellt. Um chromatografische Artefakte zu vermeiden, wurde das Injektionssystem nach jeder Injektion mit einer Mischung im Verhältnis Methanol:Wasser:Isopropanol (5:4:1 % Vol.) gespült. Das HPLC-System war mit einem Triple-Quadrupol-MS-System (Agilent 6495 System, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verbunden. Es wurde eine negative Elektrospray-Ionisation durchgeführt (Ionisationsparameter siehe Anhang, Abschnitt 7.3). Das Massenspektrometer wurde im dynamischen Multiple-Reaction-Monitoring-Modus betrieben und jeder Metabolit wurde simultan durch zwei unabhängige Massenübergänge nachgewiesen. Experimentelle Rohdaten wurden extern mit dem Softwarepaket Agilent Mass-Hunter, Version B10.0 ausgewertet. Für alle analysierten Metaboliten wurden individuelle Kalibrierungskurven erstellt und die unteren Nachweisgrenzen bestimmt (vgl. Schäfer et al. 2022, siehe Anhang, Abschnitt 7.3). Diese Daten beinhalten nur die im Blutplasma vorkommenden freien Hydroxyfettsäuren, nicht jedoch deren veresterte Derivate (Abbildung 35).

2.3.4 Nachweis der genetischen Manipulation

Zum Nachweis der durch die genetische Manipulation induzierten Veränderung der Alox15b-Funktion (AA-15-Lipoxygenierung durch die mutierte Alox15b anstatt der AA-8-Lipoxygenierung) des Wildtyp-Enzyms wurde zunächst versucht, Aktivitätsassays unter Verwendung verschiedener Gewebe *ex vivo* durchzuführen (Abbildung 26). Da die Alox15b der Maus in ihrer Expression durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) stimuliert wird (Jisaka et al. 1997; Krieg et al. 1998), wurden zunächst verschiedene Zellen und Gewebe (Peritonealmakrophagen, Knochenmark, Lunge, Prostata, Rückenhaut) präpariert und für 2 h in 1 x PBS mit 5 μ M PMA inkubiert. Anschließend wurden aus diesen Geweben Homogenate hergestellt und Aliquots der Homogenatsüberstände als Enzymquelle für *Ex-vivo*-Aktivitätsassays verwendet. Leider konnten dabei mit der RP-HPLC keine signifikanten Mengen an Hydroxyfettsäuren gefunden werden. Um dennoch Informationen zur Funktionalität der Alox15b zu erhalten, wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. Für diese Versuche wurden 4 Alox15b-KI-Mäuse und 4 ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollmäuse in Narkose getötet und die Schwänze präpariert. Diese wurden anschließend für 2 h in PBS mit 5 μ M PMA inkubiert und danach die Epidermis präpariert. Aus dem proximalen Anteil der Epidermis (3 cm vom Schwanzansatz) wurde ein Gewebehomogenat hergestellt, das anschließend als Enzymquelle für *Ex-vivo*-Aktivitätsassays verwendet

wurde. Die gewebespezifische Expression der Alox15b wurde in verschiedenen Mausgeweben untersucht (Abbildung 26 A). Aus ausgewähltem Gewebe (Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Muskelgewebe, Magen, Herz, Milz, Kolon, Hoden, Knochenmark und Haut) einer männlichen C57BL/6-Maus wurde die Gesamt-RNA, wie beispielhaft an der Haut im Abschnitt 2.3.4.1 beschrieben, extrahiert und die Expression der Alox15b mittels Quantitativer-Real-Time-PCR quantifiziert.

2.3.4.1 Aufarbeitung von Gewebeproben für die qRT-PCR

Um aus ausgewählten Gewebestücken (Haut, Organe) der Mäuse auf die Expression verschiedener Gene zu schließen, wurde die Methode der Quantitativen-Real-Time-PCR (qRT-PCR) angewandt. Für die dazu notwendige RNA-Aufarbeitung wurden zuerst 3 cm Haut oder andere ausgewählte Gewebeproben (Organe) mit einer Schere zerkleinert und in 750 µl Lysepuffer aus dem Macherey-Nagel-RNA-Plus-Kit vermengt. Die Probenansätze wurden dann mit einem Fast-Prep-Homogenisator (60 m/s) homogenisiert (3 x 40 s mit je 1 min Pause auf Eis) und 15 min bei 4 °C und 14000 rpm abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 500 µl über eine Shredder-Säule der Firma QIAGEN zentrifugiert und dann nach Anleitung des Macherey-Nagel-RNA-Plus-Kits weiter aufgearbeitet. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und der Durchfluss ein zweites Mal über die Säule gegeben. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -80 °C gelagert. Die Umschreibung der RNA in cDNA und die qRT-PCR wurde von Frau Dr. D. Heydeck durchgeführt. Die Messwerte für die Umschreibung der RNA in c-DNA sind in Tabelle 19 aufgeführt. Tabelle 21 zeigt die Primer für die qRT-PCR. Für die cDNA-Synthese wurden 0,5–1 µg RNA in maximal 12–24 µl Gesamtansatz umgeschrieben. Hierfür wurde die RNA mit Wasser gemischt, zu dem Gesamtansatz (Tabelle 20) pipettiert und dann zusätzlich 7 µl des Primer-Mixes und 1–2 µl Tetro-Reverse-Transkriptase hinzugegeben. Die Mischung wurde für 30–60 min bei 45 °C inkubiert und die Reaktion anschließend 5 min bei 85 °C inaktiviert. Die Reaktion wurde auf 10 °C abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 19: RNA-Messwerte der Alox15b-KI-Maus-Haut für die cDNA-Transkription

Probe	RNA [ng/µl]	0,5 µg/ x µl (≤ 10 µl)	RNA [µg]	add H₂O [µl]
Alox15b-KI-Wildtyp	106	4,72	0,5	7,28
Alox15b-KI-Mutante	132	3,79	0,5	8,21

Tabelle 20: Gesamtansatz für die cDNA-Synthese zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI-Mutation *ex vivo*

Gesamtansatz für die cDNA-Synthese	
Volumen	Reagenz
8 µl	5 x Reaction Buffer
2 µl	dNTPs (je 10 mM)
2 µl	Oligo dT18 (10 µM)
2 µl	RNase-Inhibitor (optional) oder steriles Wasser

Tabelle 21: Primer für qRT-PCR zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI-Mutation *ex vivo*
(up = upstream, do = downstream, m = Maus, m+h = Maus+Human)

Primer	Name/Position	PCR-Stück-Länge	Primer Sequenz
m+hGAPDH	Pavlos-Mix 590 up	447 bp	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA
	977 do		GGATGACCTTGCCACAGCCTTG
mAlox15	mALOX15_42 up	222 bp	GTACGCGGGCTCCAACAACGA
	mALOX15_263 do		TCTCCGGGGCCCTTCACAGAA
mAlox15b	244 up	371 bp	CCTCCCGCTTATGTCTTTCCGT
	592 do		GCCCTTTGACTTTCAGCTCCGTA
mAlox12	1349 up	434 bp	GCGGCCATGTTTCAGTTGCTTAC
	1782 do		CATCGTCACGTCGTCCTTGCTG
mAlox12b	12R-LOX 1570 up	509 bp	GGTGATGGTTCGGGGTCTGTCT
	12R-LOX 2056 do		GAGTCCAGAGCACCAAGAGCACA
mAloxe12	1014 up	269 bp	CTCCAGCCACCACGACACGG
	1282 do		GCAACGAGTCCACAATGTCCCT
mAloxE3	1573 up	399 bp	GGCGGCTATTGAGAGGTTTGT
	1962 do		TCTGGTCCTTTGGCTCTTGGCT
mAlox5	Pavlos 287 up	495 bp	TCGAGTCCCATGTTACCGCT
	761 do		CTGTGGTCACTGGGAGCTTCG

Die benötigten genspezifischen Primer wurden mittels Datenbanksequenzen konstruiert und durch die Firma BioTez (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Zwei Primer wurden von Herrn Pavlos Chaitidis designt und hergestellt. Unter Verwendung dieser Primer konnte die cDNA in einer PCR vermehrt werden. Dazu wurden 1 µl der c-DNA aus den Schwanzhauthomogenaten mit 9 µl Master-Mix (Tabelle 22) in Amplifikationsröhrchen vermischt.

Tabelle 22: Master-Mix für qRT-PCR zum Nachweis der genetischen Alox15b-KI Mutation *ex vivo*

Master Mix für qRT-PCR	
Volumen	Reagenz
2,4 µl	Wasser
1,6 µl	Primer-Mix (je 0,8 µl/5 µM)
5 µl	2 x SensiFast SYBR No-ROX Mix

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

- Denaturierung für 10 min bei 95 °C.
- Zykluszeiten: Der Zyklus wurde 40-mal wiederholt.
 - Denaturierungsphase für 15 s bei 95 °C,
 - Annealingphase für 30 s bei 65 °C,
 - Hybridisierungsphase für 20 s bei 72 °C.
- Schmelzkurve: in 1 °C-Abständen von 60 °C–99 °C
- Endphase: 1 min bei 60 °C, dann für je 5 s im Bereich 61 °C–99 °C

Tabelle 23: Verdünnungsreihen am Beispiel des GAPDH-Gens ohne cDNA als Grundlage für eine Kalibriergerade für die qRT-PCR

GAPDH				Kopien/µl	
		Standardlösung 2 (SL2)		100 000 000	
		Standardlösung 3 (SL3) 50 µl SL2 + 950 µl RT-Puffer		5 000 000	
Arbeitslösung	Verwendete Lösung	Verdünnungsreihe	1 x RT-Puffer	GAPDH [Kopien/µl]	
AL1	SL3	50 µl	50 µl	5 000 000	
AL2	AL 1	50 µl	50 µl	2 500 000	
AL3	AL 2	50 µl	50 µl	1 250 000	
AL4	AL 3	50 µl	50 µl	625 000	
AL5	AL 4	50 µl	50 µl	312 500	
AL6	AL 5	50 µl	50 µl	156 250	
AL7	AL 6	50 µl	50 µl	78 125	
AL8	AL 7	50 µl	50 µl	39 063	
AL9	AL 8	50 µl	50 µl	19 531	
AL10	AL 9	50 µl	50 µl	9 766	
		jeweils 20 x mit Pipette mischen			

Der Fortschritt der Amplifikationsreaktion wurde durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Für jedes untersuchte Gen wurde die Kalibriergerade erstellt (Tabelle 23) und Leerwerte, ohne cDNA, als Kontrollgrößen gemessen. Für die Untersuchung wurde das qRT-PCR-Messgerät Rotor-Gene RG 3000 verwendet. Am Ende wurde die spezifische Schmelzkurve des Amplifikationsproduktes analysiert, die eine Aussage hinsichtlich der Homogenität der Amplifikationsprodukte erlaubt. Das verwendete endogene Referenzgen war Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), weshalb die Expression der Zielgene auf je 1 Mio. GAPDH-Kopien bezogen wurde.

Herstellung von Standardlösungen

Für die Herstellung der Standardlösungen (SL1–3), die notwendig für die Herstellung der Amplifikationsverdünnungen sind, musste zunächst ermittelt werden, wie viele einzelsträngige (Single Stranded, ss) DNA-Moleküle in den Ur Lösungen (UL) vorhanden sind. In diese Berechnung gehen die DNA-Konzentration der UL ([ng/μl], spektrophotometrische Bestimmung) und die Fragmentgröße des PCR-Produktes in Basenpaaren (bp) ein. Mithilfe der unten genannten Formel kann aus diesen beiden Werten die Zahl der doppelsträngigen (Double Stranded, ds) DNA-Moleküle/μl in der UL berechnet werden:

$$\left(\frac{\text{Konz. UL}/10^9}{\text{Fragmentgröße (Vektor + Insert)} \times 660} \right) \times 6,022 \times 10^{23} \quad (2)$$

Die SL1 wurde aus der UL durch Verdünnung so hergestellt, dass 10^{10} ss-DNA-Moleküle/μl enthalten waren. Zur Berechnung diente folgende Gleichung, die das UL-Volumen für 100 μl SL1 angibt:

$$\left(\frac{\text{Einzelstrang-DNA-Moleküle} \left[\frac{\text{Mol}}{\mu\text{l}} \right] \times 100 \mu\text{l}}{\text{Doppelstrang-DNA-Moleküle} \left[\frac{\text{Mol}}{\mu\text{l}} \right]} \right) / 2 \quad (3)$$

Die weitere Verdünnung für die Herstellung der SL2 erfolgte mit Real-Time-Puffer (RT). Der 1 ml einer SL2, die 100 Mio. ss-DNA-Moleküle/μl enthielt, wurde aus 10 μl SL1, 1 μl Plasmid (pGL3 Control 4,8 μg/μl als DNA-Tracer) und 989 μl 1 x RT-Puffer hergestellt. Zuletzt wurden mehrere SL2 von verschiedenen Genen zu einer SL3 gemischt, indem beispielsweise jeweils 30 μl von drei SL2 mit insgesamt 910 μl RT-Puffer verdünnt wurden. Somit entstand eine SL3 für zwei bis drei verschiedene Gene mit jeweils 1 Mio. oder 3 Mio. Kopien. Je nach Kopien-Bedarf wurde die Standardlösung 3 (SL3) hergestellt, sodass die Eichkurve in einem Bereich ist, indem die Probenwerte eingeschlossen werden.

Herstellung der externer Amplifikationsstandards

Als Standard diente ein PCR-Produkt, das spezifisch für das jeweilige Gen war. Folgende weitere Kriterien sollten darüber hinaus erfüllt sein: die Annealingtemperatur der Primer sollte etwa zwischen 68–72 °C liegen, die Primer sollten etwa 100–300 bp lang sein, mindestens die DNA oder wenigstens ein PCR-Stück sollte sich über zwei Exons legen lassen und möglichst keine HindIII-Spaltstelle besitzen. Nach diesem PCR-Produkt wurde

dann in den entsprechenden biologischen Proben gesucht. Das PCR-Produkt wurde in den Topoisomerase-basierenden (TOPO)-Vektor kloniert, sequenziert, linearisiert und es wurde die Konzentration bestimmt. Im folgenden Ansatz wurden die Primer mit dem Enzym HindIII linearisiert:

Tabelle 24: Zusammensetzung für den Primer-Linearisierungsansatz

Primer-Linearisierungs-Reaktionsansatz	
<i>Volumen</i>	<i>Reagenz</i>
x µl	DNA (5 µg)
5 µl	Fast Digest-Puffer ohne Farbstoff
5 µl	HindIII

Der Reaktionsansatz (Tabelle 24) wurde dann auf 50 µl Gesamtvolumen mit sterilem Wasser aufgefüllt und vermischt. Die Spaltung erfolgte im Thermocycler für 1 h bei 37 °C, anschließend 10 min bei 80 °C und wurde dann auf 10 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte eine Kontrollspaltung mit einem 1%igen Agarosegel, angefärbt mit Gel-Red-Farbstoff, bei einer Laufzeit von mind. 30–60 min bei einer Spannung von 85–100 V. Zuerst wurden 10 µl Maker (1 kbp) und dann je Primer 5 µl des Spaltansatzes aufgetragen. Der restliche Ansatz (45 µl) wurde mit dem PCR-Purification-Kit von Macherey & Nagel aufbereitet. Die Eluation erfolgte zweimal mit 20–30 µl Wasser und anschließender photometrischer Konzentrationsbestimmung.

2.3.4.2 Aufarbeitung für den Ex-vivo-Arachidonsäure-Aktivitätsassay der PMA behandelten Maushaut

Um die humanisierte Reaktionsspezifität der mutierten Alox15b nachzuweisen, wurden von den Alox15b-KI-Tieren und von ausgekreuzten Wildtyp-Mäusen Hautproben *ex vivo* mit PMA stimuliert und dann für einen Arachidonsäure-Aktivitätsassay aufgearbeitet. Mit einer Schere wurde je Genotyp die PMA-behandelte Epidermis kleingeschnitten, in 1 ml 1 x PBS mit 1 mM EDTA aufgenommen und unter Verwendung eines Fast-Prep-Homogenisators (MP Biomedicals, Irvine, USA) homogenisiert (bei 60 m/s, 3 x 40 s mit je 1 min Pause auf Eis). Zelltrümmer und Bindegewebsfragmente wurden abzentrifugiert (10 min, 12000 xg, 4 °C) und 650 µl Lysatüberstand gewonnen. Für die Proteinbestimmung wurde ein Bradford-Assay angesetzt, bei dem 2 µl Homogenatüberstand, 800 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt wurden. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde

die Lichtabsorption bei 595 nm photometrisch gemessen. Die gemessenen Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Proteinkonzentrationen der Schwanzhaut-Homogenatüberstände der Alox15b-KI-Maus
Ermittelt mit Braford-Assay (H.Kühn/ M.Schäfer).

Alox15b-KI-Wildtyp [mg/ml]	Alox15b-KI-Mutante [mg/ml]
4,9	5,5
5,9	5,5
6,1	4,2

Anschließend wurden 600 µl des Lysatüberstands mit 400 µl 1 x PBS samt 100 µM AA vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die während der Inkubation entstandenen oxygenierten Arachidonsäure-Derivate wurden mit 1–3 mg NaBH₄ reduziert. Nach Zugabe von 35 µl Essigsäure (99 %) und 1 ml Ethylacetat (99 %) wurde die Lösung 1 min gemischt und 5 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde abgenommen, in ein Schliffglas überführt und die Unterphase mit 1 ml Ethylacetat reextrahiert. Die beiden Extrakte wurden vereinigt und 2 ml Isopropanol zugesetzt. Anschließend wurden die Lösungsmittel mit einem Vakuumrotationsverdampfer bei 40 °C abgedampft. Nach dem Verdampfen wurden 250 µl Acetonitril zum Lösen der zurückgebliebenen Lipide zugegeben, die Lösung in den Röhrchen für 2 min gemischt und anschließend ins Ultraschallbad (25 °C) gestellt. Dann wurden 250 µl Wasser und 5 µl Essigsäure hinzu pipettiert und unlösliches Material durch Zentrifugation (15 min, 15000 xg, 4 °C) entfernt. Aliquots der Probenüberstände (je 300 µl) wurden mittels RP-HPLC analysiert. Dafür wurde eine Flussrate von 1 ml/min und ein isokratisches Lösungsmittelsystem bestehend aus 70 % Acetonitril, 30 % Wasser und 0,1 % Essigsäure verwendet. Da in der RP-HPLC unter den gegebenen analytischen Bedingungen 12-HETE und 8-HETE nicht sicher voneinander getrennt werden konnten, wurden die HPLC-Fractionen, welche die konjugierten Diene enthielten, präpariert und mittels kombinierter NP-/CP-HPLC weiter analysiert. Dazu wurde eine Chiralpak-AD-H-Säule (4,6 x 250 mm, 5 µm Partikelgröße, Daicel, Osaka, Japan) mit einer Nucleosil-Vorsäule verbunden (4,6 x 30 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Die oxygenierten Arachidonsäure-Derivate wurden durch isokratische Elution mit einem Gemisch von 96 % Hexan, 3 % Methanol, 1 % Ethanol und 0,1 % Essigsäure eluiert. Als authentische Standards wurde eine 1:1-Mischung von 12(R/S)-HETE und 8(R/S)-HETE verwendet (Abbildung 27).

2.4 DSS-Kolitismodell

2.4.1 Beschreibung des Modellversuchs

Beim Kolitismodell handelt es sich um einen genehmigten Tierversuch mittleren Schweregrads mit dem Aktenzeichen G0272/19. Dabei wurde in den Mäusen durch die Gabe von 2%igem Dextran-Sulfate-Natrium (DSS) im Trinkwasser eine experimentelle Kolitis induziert. Dadurch konnte auch schon in anderen Studien gezielt eine entzündliche Schädigung des Darmepithels erzeugt werden (Okayasu et al. 1990; Perše and Cerar 2012; Eichele and Kharbanda 2017). Der Schweregrad der Erkrankung konnte anhand verschiedener Readout-Parameter (Körpergewichtsreduktion, Stuhlbeschaffenheit, enterale Blutungen, Kolongewicht, Kolonlänge) quantifiziert werden. Aufgrund der Erfahrungen, die die AG-Kühn-Lipoxygenaseforschung (Charité, Berlin) mit Wildtyp-Mäusen bisher sammeln konnte, entwickelten die Tiere in Abhängigkeit von der DSS-Konzentration im Trinkwasser, von der DSS-Charge und vom Mäusestamm eine Darmentzündung. Ziel des hier beschriebenen Versuchs war es zu untersuchen, ob eine Humanisierung der Reaktionsspezifitäten der murinen *Alox15b* *in vivo* zu Veränderungen im Schweregrad der Entzündungsreaktion im DSS-Kolitismodell führt. Andere Studien konnten zeigen, dass die systemische Inaktivierung des *Alox15*-Gens bei der Maus zu einer signifikanten Abschwächung der Entzündungssymptome im Modell der DSS-induzierten Kolitis führt (Kroschwald et al. 2018). Bei dieser Vergleichsstudie beruhte die Anzahl der Tiere je Gruppe auf Erfahrungen aus einem vorherigen Kooperationsprojekt (Aktenzeichen: G0201/10, FEM 990). Es waren dazu 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt erforderlich, um statistisch gesicherte Aussagen zu erhalten. Die vorgesehene Tieranzahl und Gruppengröße waren in dieser Studie zur statistischen Absicherung mit einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler erster Art von 0,05 und einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler zweiter Art von 0,2 berechnet worden. Die Power von 0,95 wurde mit G.Power berechnet, wobei 2,5 als „Effect size“ angenommen wurde (berechnet von Frau Dr. D. Heydeck). Abhängig von der Art des Vergleichs (zwei oder mehrere Gruppen, abhängige oder unabhängige Gruppen) und der Datenverteilung (parametrische oder nichtparametrische Daten), sollten die folgenden statistischen Tests verwendet werden: Students t-Test, Mann-Whitney-U-Test. Die Hauptzielgrößen im hier durchgeführten Versuch waren die tägliche Körpergewichtsmessung und der sogenannte Disease Activity Index (DAI) sowie die Kolonlängen und das Kolongewicht nach der Tötung der Tiere. Es wurde auch eine histologische Beurteilung des Kolongewebes im Hinblick auf eine Ödembildung und auf die Infiltration von Entzündungszellen durch die Firma iPATH Berlin durchgeführt. Die zu untersuchende Nebenzielgröße war die Lipid-

analytik zur Quantifizierung und Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Eikosanoiden aus den Kolongeweben, welche durch die Firma Lipidomix GmbH (Berlin-Buch) analysiert wurde.

Zur Bestimmung der geeigneten DSS-Konzentration wurden unter Berücksichtigung der Tierschutzrichtlinien zwei Vorversuche mit jeweils 3 Tieren je Genotyp durchgeführt. Dafür wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 12–15 Wochen verwendet. Männliche Mäuse wurden aufgrund starken Revierverhaltens bei Gruppentierhaltung weder für die Vorversuche noch für den Hauptversuch verwendet. Zudem haben im Hinblick auf den Menschen Frauen im mittleren Alter häufiger entzündliche Darmerkrankungen (Rubin et al. 2000; Zelinkova et al. 2012; Shah et al. 2018; Freeman et al. 2021).

Die Tiere wurden immer getrennt nach Genotypen geliefert und zu dritt in separaten Käfigen gehalten. Während des gesamten Haltungs- und Versuchszeitraums wurden die Tiere unter Standardhaltungsbedingungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin gehalten. Futter (Tabelle 46) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer Gewöhnungsphase von 10 Tagen begann der Vorversuch. Dazu wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 6 Tagen mit DSS im Trinkwasser (1,5 %) und zwei weitere Tage mit normalem Wasser versorgt. Die Trinkmenge von normalem Wasser und von DSS-haltigem Wasser zeigte nach vorherigen Versuchen von Frau Dr. D. Heydeck mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen keinen signifikanten Unterschied (t-Test: p-Wert = 0,080). Dabei lag die Trinkmenge pro Stunde und pro g Körpergewicht von C57BL/6 WT-Mäusen bei $0,0429 \pm 0,0026$ g und bei Lipoxygenase-Knock-out (LOX-KO)-Mäusen bei $0,0396 \pm 0,0055$ g.

Die Tiere wurden täglich gewogen und der Schweregrad der Kolitis durch die bereits genannten Readout-Parameter quantifiziert. Alle Tiere wurden nach acht Tagen mit einer Überdosis Isofluran und zervikaler Dislokation getötet und wie folgend beschrieben ausgewertet. Der Versuch musste aufgrund zu geringer Entzündungssymptome mit 2 % DSS wiederholt werden. Dabei lag eine Gewichtsabnahme von 10–14 % vor, die Darmlängen verkürzten sich um 10–14 mm. Diese Konzentration war für die Durchführung des Hauptversuchs ausreichend (siehe Anhang, Abschnitt 7.10).

Für den Hauptversuch waren 30 Weibchen je Genotyp ebenfalls im Alter von 12–15 Wochen notwendig, die zu sechst in den Käfigen gehalten wurden. Dabei repräsentierte jeder Käfig eine experimentelle Gruppe. Die Gruppeneinteilung des DSS-Kolitis Hauptversuchs mit Alox15b-KI-Mäusen und aufgekreuzten Wildtyp-Kontrollmäusen war wie folgt:

Tötung am 0. Tag (vor erster DSS-Gabe):

Gruppe 0-C: Wildtyp-Kontrolltiere (aus Alox15b-KI)

Gruppe 0-D: Alox15b-KI-Tiere

Kontrolltiere (kein DSS), Tötung nach 7 Tagen:

Gruppe K-8C: Wildtyp-Kontrolltiere (aus Alox15b-KI)

Gruppe K-8D: Alox15b-KI -Tiere

DSS-Tiere, Tötung nach 7 Tagen:

Gruppe D-8C: Wildtyp-Kontrolltiere (aus Alox15b-KI)

Gruppe D-8D: Alox15b-KI -Tiere

Kontrolltiere (kein DSS), Tötung nach 15 Tagen:

Gruppe K-16C: Wildtyp Kontrolltiere (aus Alox15b-KI)

Gruppe K-16D: Alox15b-KI -Tiere

DSS-Tiere, Tötung nach 15 Tagen:

Gruppe D16-8C: Wildtyp-Kontrolltiere (aus Alox15b-KI)

Gruppe D16-8D: Alox15b-KI -Tiere

Nach einer Gewöhnungsphase von zehn Tagen wurde der eigentliche Hauptversuch begonnen. Je Genotyp gab es dreimal 6 Tiere, die als Ausgangskontrollen (z. B. Gruppe 0-C, Gruppe K-8C, Gruppe K-16C) dienten. Bei der „Gruppe 0“ wurde am 0. Tag der Versuchsdurchführung zunächst von jedem Tier das Körpergewicht bestimmt und danach wurden diese Tiere getötet. Das Kolon aller Gruppen und Individuen wurde präpariert, vermessen, gewogen und anschließend in vier gleich große Segmente unterteilt, die ebenfalls gewogen wurden, nachdem der Darminhalt mit PBS ausgewaschen worden war. Das proximale Viertel wurde in 4 % Paraformaldehyd fixiert und für histologische Untersuchungen aufgearbeitet. Das proximal-mediale Viertel wurde als Reserve für mögliche Immunoblotexperimente bzw. Enzyme-linked-immunosorbent-assay-Analysen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das medial-distale Viertel wurde in RNAlater-Lösung für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren, um später Gesamt-RNA für die Durchführung von qRT-PCR-Studien durchführen zu können. Aus der RNA-Präparation konnte nur von wenigen Proben qualitativ hochwertige RNA erhalten werden, sodass routinemäßige qRT-PCR-Analysen nur begrenzt möglich waren. Eine Quantifizierung der individuellen DAIs war aufgrund der Gruppenhaltung nicht möglich. Dies hätte eine Einzelhaltung der Tiere vorausgesetzt, was aus Tierschutzgründen behördlich nicht genehmigt worden war. Aus dem distalen Viertel des Kolons wurden nach der Lagerung in flüssigem Stickstoff pro- und antiinflammatorische Oxylipine mittels LC-MS/MS (Firma: Lipidomix GmbH, Berlin-Buch) quantifiziert (Abschnitt 2.4.6).

2.4.2 Akutphase im Hauptversuch

Für die Erzeugung einer akuten Entzündungsreaktion wurden gleichzeitig zweimal 6 Weibchen je Genotyp mit 2 % DSS im Trinkwasser *ad libitum* getränkt (Gruppen D-8C, D-8D und Gruppen D-16C, D-16D), wobei zweimal 6 Kontrolltiere je Genotyp bei normaler Trinkwassergabe mitversorgt wurden (Gruppen K-8C, K-8D und Gruppen K-16C, K-16D). Den Tieren sollte über 6 Tage (144 h) 2 % DSS verabreicht werden. Da es aber zu einigen schweren Verläufen kam, musste nach 5,3 Tagen das DSS abgesetzt und 7 Tiere getötet werden (n = 2 der Gruppe D-8D, n = 3 der Gruppe D16-8D, n = 2 der Gruppe D-8C). Die Tötung war aufgrund der vorher festgelegten Abbruchkriterien, wie zum Beispiel rund 20 % Körpergewichtsverlust, Apathie, blutiger Kot und Blut an Körperöffnungen, notwendig gewesen. Nach 2 weiteren Tagen (+ 48 h) wurden die übrigen zweimal 6 Tiere je Genotyp mit und ohne DSS-Behandlung (Gruppen K-8C, K-8D, D-8C, D-8D) getötet und, wie im vorherigen Absatz 2.4.1 beschrieben, präpariert.

2.4.3 Heilungsphase im Hauptversuch

Nach dem Absetzen des DSS vergingen 10 Tage bevor die verbliebenen Tiere in den Käfigen (K-16C, K-16D, D-16C, D-16D) getötet wurden und das Kolon identisch, wie in Absatz 2.4.1 beschrieben, aufgearbeitet werden konnte. In diesem Zeitraum erhielten die behandelten Tiere die Möglichkeit, sich wieder zu erholen, sodass der Heilungsprozess eintreten konnte.

2.4.4 Histologische Aufarbeitung

Die Aufarbeitung und histologische Bewertung ausgewählter Gewebeproben aus dem DSS-Kolitis-Versuch und auffällige Gewebestrukturen, die im Rahmen des Alterungsversuchs auffielen, wurden extern durch die Firma iPATH Berlin-Core Unit Immunpathologie für Experimentelle Modelle übernommen. Bei den Proben aus dem DSS-Kolitis-Versuch handelte es sich um Tiere, die starke Entzündungsanzeichen aufwiesen oder aus dem Versuch genommen werden mussten, sowie um Kontrollproben (Abbildung 40). Die Bewertung der Entzündung im Kolitismodell richtete sich nach Erben et al. (Erben et al. 2014).

2.4.5 Analyse der Oxygenierungsmetabolite im DSS-Kolitis-Versuch

Ob die *In-vivo*-Mutation des *Alox15b*-Gens das Muster des Plasmaoxylipidoms im Rahmen des Zeitverlaufs einer DSS-Kolitis beeinflusst, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht werden.

Tabelle 26: Auflistung der mit LC-MS/MS analysierten Oxylinmetaboliten während der DSS-Kolitis

Fettsäure	Docosahexaen-säure	Eicosapentaen-säure	Arachidon-säure	Linolsäure	Linolen-säure
<i>Metabolit</i>	4-HDHA	5-HEPE	5-HETE	9-HODE	9-HOTrE
	7-HDHA	8-HEPE	8-HETE	13-HODE	13-Gamma-HOTrE
	8-HDHA	9-HEPE	9-HETE		
	8-HDHA (109)	11-HEPE	11-HETE	8-HETrE	
	10-HDHA	12-HEPE	12-HETE	12-HETrE	
	11-HDHA	15-HEPE	15-HETE	15-HETrE	
	13-HDHA	18-HEPE			
	14-HDHA		PGB2		
	16-HDHA	PGB3	LTB4 12-oxo		
	17-HDHA	LTB5	LTB4		
	20-HDHA	LxA5	LTB4 18-COOH-dinor		
			LTB3		
	Maresin 1		LXA4 15(R)epi		
	NPD-1		LXA4 6(S)		
	Maresin 2		LXA4		
	RvD1		LXB4		
			PGJ2 15-deoxy-delta 12,14		
	RvD1 17(R)		PGJ2		
	RvD2		PGJ2 delta12		
	RvD3				
	RvD4 17(R,S)				
	RvD5				

Deswegen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs den Tieren direkt nach der Tötung das Kolon entnommen und distale Viertel des Kolons zur Oxylinomanalyse verwendet. Dazu wurden die Gewebeprouben, wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, aufgearbeitet, eine Proteinbestimmung (Lowry-Methode) durchgeführt und die Gesamtlipide extrahiert. Nach alkalischer Hydrolyse der Esterlipide wurden ausgewählte Oxyline mittels LC-MS/MS analysiert. Die LC-MS-/MS-Analyse erfolgte extern durch die Lipidomix GmbH (Berlin-Buch). Die Durchführung war vergleichbar mit der beschriebenen Durchführung in Abschnitt 2.3.3, wobei folgende Oxyline analysiert wurden (Tabelle 26).

2.5 CFA-induziertes Pfotenödemmodell

2.5.1 Durchführung des Pfotenödemmodells

Bei dem Pfotenödemmodell handelt es sich um einen genehmigten Tierversuch mittleren Schweregrads mit dem Aktenzeichen G0268/18. Es wurden je 10 männliche Tiere im Alter zwischen 12–15 Wochen des Genotyps *Alox15b*-KI-Homozygot und ausgekreuztem Wildtyp verwendet. Damit sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der genetischen Manipulation des murinen *Alox15b*-Gens auf den Zeitverlauf der akuten Entzündung untersucht werden (Abschnitt 3.5.2). Da Literaturdaten (Gaveriaux-Ruff et al. 2011) und vorherige Experimente (Cayla et al. 2012; Fehrenbacher et al. 2012) den Hinweis gaben, dass Mäuse nach 2 Tagen intraplantarer Injektion von komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) eine Entzündungsreaktion entwickeln, die nach besagten 2 Tagen ihr Maximum erreicht, wurden 2 Tage nach intraplantarer CFA-Injektion die Zunahme des Pfotenvolumens und das Schmerzempfinden (Von-Frey-Test und Hargreaves-Test) als klinische Readout-Parameter quantifiziert. Die injizierten 20 µl CFA-Injektion bestanden aus 50 µg abgetöteten *Mycobacterium butyricum* gelöst in Freund'schem Adjuvans. Als Kontrolle wurde in die kontralaterale Hinterpfote derselben Maus das gleiche Volumen 0,9%iger NaCl-Lösung gespritzt. Ein Beispiel zur phänotypischen Volumenänderung ist in Abbildung 63 (Abschnitt 7.12.1) dargestellt. Nach 2 Tagen wurden die Tiere anschließend für die Gewebeentnahme mit einer Überdosis Isofluran getötet und Pfotenstanzen entnommen. Diese Gewebeproben waren ursprünglich dafür vorgesehen, Gesamt-RNA zu präparieren und Expressionsprofile entzündungsrelevanter Genprodukte zu erstellen. Die durchgeführte RNA-Präparation führte jedoch nicht durchgängig zur Gewinnung hoch qualitativer RNA, sodass keine verlässlichen Expressionsprofile erstellt werden konnten. Die zu bestimmenden Hauptzielgrößen waren das Pfotenvolumen und die Reduktion der Schmerzschwellen mittels Von-Frey-Test und Hargreaves-Test. Das Pfotenödemmodell wurde bis auf die Probenentnahme und Aufarbeitung von Frau Dr. Labuz (Charité, Berlin) durchgeführt. Die biometrische Planung im Rahmen dieser Arbeit beruht auf Literaturdaten (Xu et al. 2010; Park et al. 2011; Oehler et al. 2017) und Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Labuz (Charité, Berlin). Die endogene Konzentration von Resolvinen im Gewebe ist erfahrungsgemäß sehr gering. Bei einer Anwendung von niedrigeren Resolvin-Dosen (3–10 ng) in Tumornekrosefaktor-Rezeptor-defizienten (*Tnfr*^{-/-})-Mäusen, im CFA-induzierten Pfotenödemmodell und einem Beobachtungszeitraum von einigen Stunden betragen die maximalen analgetischen Effekte ca. 10–30 % (Xu et al. 2010). Deswegen wurde für das hier beschriebene Pfotenödemmodell eine 30%ige Reduktion der

Schmerzwahrnehmung mit 20%iger biologischer Varianz angenommen. Dies ergibt eine Effektgröße von 1,5. Um diesen Effekt mit einer Power von 90 % auf einem 5 %-Signifikanzniveau nachweisen zu können (Mann-Whitney-Test), war eine Gruppengröße von jeweils 13 Tieren erforderlich (Tabelle 27). Die Tieranzahl wurde für den Versuch auf Anraten von Frau Dr. D. Labuz aufgrund von Kapazitätsengpässen auf je 10 Tiere pro Gruppe reduziert.

Tabelle 27: Auszug aus der Berechnung für die biometrische Fallzahlplanung des Pfotenödemversuchs an Alox15b-KI-Mäusen mithilfe der G.Power-Software (Englisch) (Quelle: Dr. D. Heydeck).

t tests - Means: Wilcoxon-Mann-Whitney test (two groups)	
Options: A.R.E. method	
Analysis: A priori: Compute required sample size	
Input: Tail(s) = Two	
Parent distribution = min ARE	
Effect size d = 1.5000000	Sample size group 1 = 13
α err prob = 0.05	Sample size group 2 = 13
Power (1- β err prob) = 0.90	Total sample size = 26
Allocation ratio N2/N1 = 1	Actual power = 0.9227130
Output: Noncentrality parameter δ = 3.5547152	
Critical t = 2.0829355	
Df = 20.4640000	

Tabelle 28: Experimenteller Zeitverlauf des Pfotenödemmodells mit männlichen Alox15b-KI-Mäusen

Tag 1–6	Handling und Eingewöhnung für die Experimente, ein- bis zweimal täglich
Tag 7	a) basale Schwellen vor CFA-Injektion (Von-Frey- und Hargreaves-Test) b) basale Volumina der Hinterpfoten (Plethysmometer) c) intraplanare CFA-Injektion, 20 μ l (50 μ g abgetötete Mykobakterien in CFA) in rechte Hinterpfote d) intraplanare NaCl-Injektion, 20 μ l (0,9 %) in linke Hinterpfote
Tag 8	Haltung/Beobachtung
Tag 9 (d. h. Tag 2 nach CFA- /NaCl-Injektion)	e) Messung mit Von-Frey- und Hargreaves-Test f) Messung der Pfotenvolumina (Plethysmometer) g) Anschließend Tötung der Tiere und Gewebepreparation

2.5.2 Bestimmung des Pfootenvolumens

Das Pfootenvolumen wurde mithilfe eines Plethysmometers bestimmt (Abbildung 7). Dazu wird die Mäusepfote in ein definiertes Volumen von Wasser eingeführt. Nach dem Archimedischen Prinzip wird dadurch ein entsprechendes Wasservolumen verdrängt, was sich im abgeschlossenen System in der Erhöhung des Wasserdruckes bemerkbar macht. Diese Druckerhöhung wird gemessen und automatisch in verdrängtes Wasservolumen umgerechnet.



Abbildung 7: Plethysmometer zur Bestimmung des Pfootenvolumens (Foto von Dr. D. Labuz, beschriftet von M. Schäfer).

2.5.3 Von-Frey-Tests

Im Von-Frey-Test wird die mechanische Sensitivität der Pfootenunterseite unter Verwendung sogenannter kalibrierter Von-Frey-Fäden unterschiedlicher Stärke getestet. Die Maus wird hierfür in der Beobachtungskammer auf einem Drahtgitter platziert (Abbildung 8). Nach einer Eingewöhnungszeit werden die Stimulusfäden an der Pfootenunterseite präsentiert. Die Versuche beginnen immer mit der linken Hinterpfote, unmittelbar danach wird die rechte Hinterpfote getestet. Das Filament wird mit zunehmendem Druck auf die mittlere Plantarfläche des Fußes gelegt, bis dieser sich biegt. In einer Aufzeichnungsschablone werden eine Nichtreaktion oder eine Rückzugsreaktion notiert. Reagiert die Maus nicht (keine Rückzugsreaktion der Pfoote), wird zum nächsthöheren Filament übergegangen und die Stimulation fortgesetzt, bis eine Rückzugsreaktion der Pfoote stattfindet. Sobald eine

Rückzugsreaktion beobachtet wird, sollte die Stimulation mit demselben und anschließend mit dem nächstniedrigeren Filament fortgesetzt werden, bis mindestens drei aufeinanderfolgende Darbietungen von Filamenten in der Serienstärke ohne Reaktionen beobachtet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuch 2 Tage nach der CFA-/NaCl-Injektion bei den männlichen Alox15b-KI-Tieren beider Genotypen (n = 10) durchgeführt.

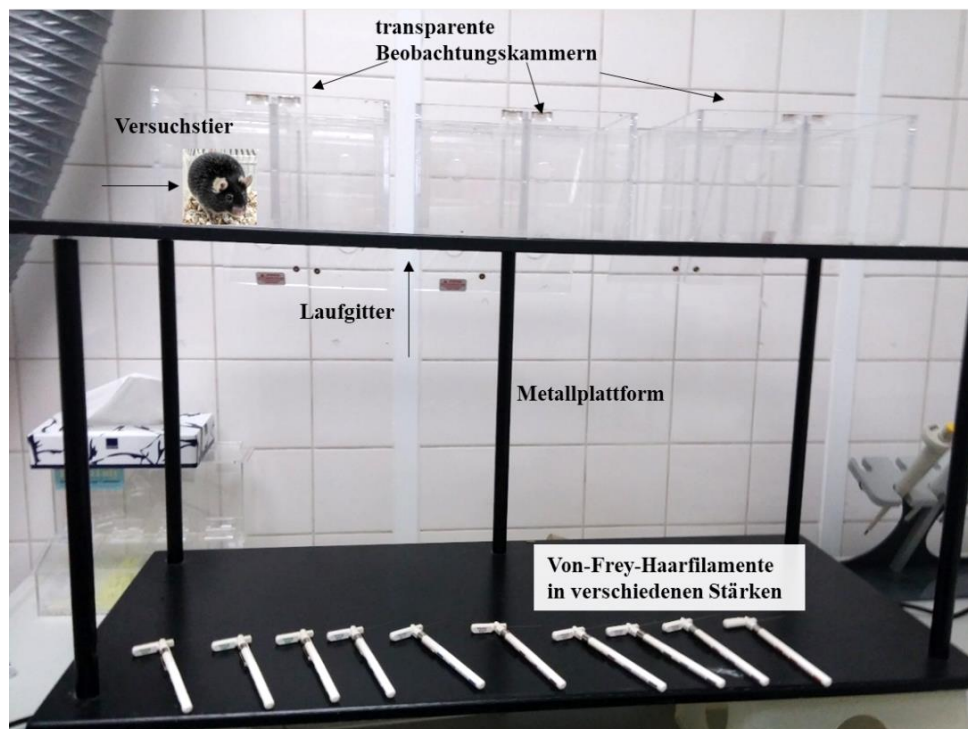


Abbildung 8: Von-Frey-Testaufbau (Foto von Dr. D. Labuz, beschriftet von M.Schäfer).

2.5.4 Hargreaves-Tests

Der Hargreaves-Test untersucht das Schmerzverhalten von Versuchstieren mit einer Messung der Latenzzeit für das Zurückziehen der Pfoten bei thermischer Stimulation durch eine transparente Glasscheibe (Abbildung 9). Die Menge und Dauer der Wärmeenergie wird dabei auf das gewünschte Niveau eingestellt, der Wärmestrahler auf die sich frei bewegende Maus gerichtet und die Zeit, die bis zum Zurückziehen der Pfote vergeht, wird automatisch aufgezeichnet. Die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Pfote bei einer bestimmten Energiezufuhr ist der Endpunkt des Tests. In der vorliegenden Arbeit wurde der Hargreaves-Test 2 Tage nach der CFA-/NaCl-Injektion bei den männlichen ALOX15b-KI-Tieren beider Genotypen (n = 10) durchgeführt.

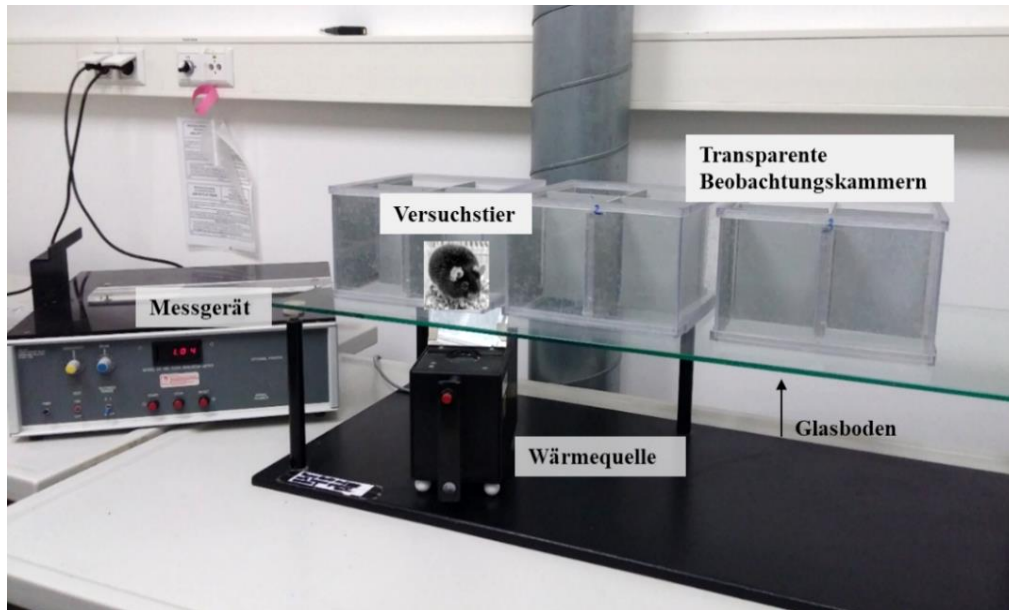


Abbildung 9: Hargreaves-Testaufbau (Foto von Dr. D. Labuz, beschriftet von M.Schäfer).

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung war für die einzelnen Versuche unterschiedlich. Von besonderem Interesse war, ob es signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen der neuen, gentechnisch veränderten Alox15b-KI-Maus gab. Bei allen statistischen Tests wurden numerische p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Im Folgenden werden die wesentlichsten Methoden der Auswertung aufgezählt:

- Die statistische Auswertung der Enzymaktivitätsdaten und die Quantifizierung der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte wurde mit dem zweiseitigen Student-t-Test unter Verwendung des Microsoft-Excel-Softwarepakets (Excel 2016) oder dem ungepaarten t-Test unter Verwendung des GraphPad-Prism-Programms durchgeführt und dargestellt.
- Die Blutparameter (Abbildung 33 und 34) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und Körpergewichtskinetiken (Abbildung 32 und 36) mit dem Wilcoxon-Test des Softwarepaketes GraphPad Prism, Version 8.2.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) analysiert und dargestellt (Berechnung und Darstellung von Dr. D. Heydeck).
- Bei der Auswertung der osmolaren Stabilität der Erythrozyten (Abschnitt 2.3.2.1) wurde zuerst aus 2–3 photometrischen Messwerten jeder Maus der Mittelwert zu jeder

NaCl-Konzentration mittels Microsoft-Excel (Excel 2016) berechnet. Danach wurde die Differenz aus den ermittelten Werten und dem Mittelwert der 0,85%igen NaCl-Lösung-Messungen ermittelt. Der Hämolysewert bei der 0,85%igen NaCl-Lösung diente als Kontrollwert, weil diese Salzkonzentration einer isotonen Lösung entspricht, bei der so gut wie keine osmotische Hydrolyse der roten Blutzellen stattfindet. Negative Messwerte unter diesen Bedingungen wurden Null gesetzt. Bei 0 % NaCl kommt es zur maximalen Hämolyse, dieser Wert wurde als 100 % angesetzt. Um den prozentualen Anteil der Erythrozytenlyse bei jeder NaCl-Konzentration zu errechnen, wurden die berechneten Absorptionsdifferenzen mit 100 multipliziert und durch den Absorptionswert bei 0 % NaCl dividiert. Von allen Mäusen je Gruppe (Genotyp, Geschlecht, Alter) wurden der Mittelwert und die Standardabweichung dieser Prozentangaben errechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 34). Eine weitere statistische Auswertung erfolgt mit dem Wilcoxon-Test, der mit dem Softwarepaket GraphPad Prism, Version 8.2.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt wurde (Berechnung und Darstellung von Dr. D. Heydeck).

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die erhobenen Daten zu den vier Forschungsfragen, die unter „Ziele der Arbeit“ spezifiziert sind, vorgestellt und erläutert. Um einen besseren Lesefluss der Arbeit zu erreichen, wurden eine Vielzahl von Abbildungen und Tabellen sowie die detaillierte statistische Auswertung einiger experimentellen Rohdaten in den Anhang, Kapitel 7 verschoben.

3.1 Der ALOX15-Weg von *T. belangeri*

Die Untersuchungen am Spitzhörnchen waren von besonderem Interesse, da diese Tiere phänotypisch Ratten und Mäusen ähneln, evolutionär gesehen jedoch den hochentwickelten Säugetieren und insbesondere dem Menschen nächstehen, als die fast ausschließlich für Tierversuche verwendeten Nagetiere. Für Spitzhörnchen gab es zu Beginn dieser Arbeit noch keine experimentellen Daten zu Enzymen des Arachidonsäurestoffwechsels. Nachdem eine vorläufige Version des *T. belangeri*-Genoms von Yao Lab et al. veröffentlicht wurde (Yao Lab, Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, <http://www.treeshrewdb.org/index.html> (Stand: 10.2021)), extrahierte Dr. Yu Fan (ebenfalls vom Kunming Institute of Zoology) die Sequenzen von vier verschiedenen *ALOX15*-Genen und die dazu gehörigen cDNA-Sequenzen. Da alle vier cDNAs (tupALOX15a-d) offene Leserahmen für 75 kDa große Proteine enthielten und da die funktionell wichtigen Liganden des Nicht-Häm-Eisens in diesen Sequenzen streng konserviert waren, konnte vermutet werden, dass die identifizierten Gene für funktionelle ALOX15-Isoformen (tupALOX15a, tupALOX15b, tupALOX15c, tupALOX15d) kodieren. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der vier potenziellen ALOX15-Isoformen zeigte, dass die vier Enzyme in zwei Klassen eingeteilt werden können. Dabei bilden tupALOX15a und tupALOX15b eine Klasse hochgradig verwandter Enzyme, während tupALOX15c und tupALOX15d in eine zweite Klasse eingruppiert werden konnten. Für die Expression und funktionelle Charakterisierung wurde jeweils ein Vertreter der beiden Klassen (tupALOX15a, tupALOX15c) ausgewählt.

Zusammenfassung: Das Genom von *T. belangeri* enthält vier verschiedene Gene, die für vier verschiedene potenziell katalytisch aktive ALOX15-Isoformen kodieren. Diese Gene können auf der Basis ihrer Nukleotidsequenzen in zwei separate Genfamilien eingeteilt werden, wobei tupALOX15a und tupALOX15b eine Familie und tupALOX15c und tupALOX15d die andere Familie bilden.

3.1.1 Rekombinante Expression von *tupALOX15a* und *tupALOX15c*

Um zu erforschen, ob die identifizierten ALOX15-cDNA-Sequenzen von *T. belangeri* für funktionelle ALOX15-Isoformen kodieren, wurden die kodierenden cDNA-Sequenzen der *tupALOX15a* und der *tupALOX15c* in einen bakteriellen Expressionsvektor (pET28b) kloniert, der es erlaubt, die rekombinanten Enzyme als N-terminale his-tag-Fusionsproteine zu exprimieren.

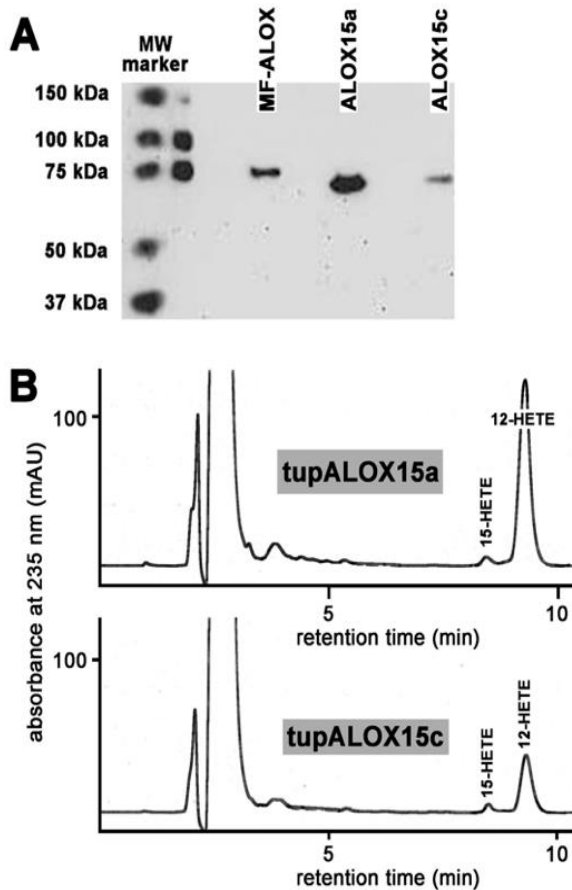


Abbildung 10: Expression der ausgewählten ALOX15-Isoformen von *T. belangeri*

(*tupALOX15a*, *tupALOX15c*) in *E. coli* (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die beiden *tupALOX15*-Isoformen wurden in *E. coli* (siehe Kapitel 2) als N-terminale his-tag-Fusionsproteine exprimiert und Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden zur Immunoblotanalyse und für *In-vitro*-ALOX15-Aktivitätsassays eingesetzt. A) Immunoblot-Analyse: 6 μ l bakterieller Lysatüberstand wurde zur SDS-PAGE aufgetragen und wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben analysiert. Zur Eichung wurde eine definierte Menge (250 ng) gereinigte rekombinante *Myxococcus fulvus*-ALOX aufgetragen, die ebenfalls als N-terminales his-tag-Fusionsprotein exprimiert wurde. Zwei unterschiedliche Mischungen von Markerproteinen wurden mitgeführt. B) ALOX15-Aktivitätsassays: 20 μ l des bakteriellen Lysatüberstandes wurden für den *In-vitro*-ALOX15-Aktivitätsassay eingesetzt. Die Menge der konjugierten Diene, die während der Inkubationszeit (5 min) gebildet wurden (repräsentiert durch die Peakflächen der Chromatogramme), kann als Maß für die ALOX15-Aktivität angesehen werden.

Die rekombinanten Expressionsplasmide wurden in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und die Expression der rekombinanten Fusionsproteine durch Zugabe von IPTG stimuliert. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und mithilfe einer Ultraschallsonde lysiert. Aliquots der Lysatüberstände wurden zur SDS-PAGE eingesetzt und der Western-Blot wurde mit einem Anti-his-tag-Antikörper angefärbt. Dabei konnte nachgewiesen werden (Abbildung 10 A), dass im Lysatüberstand der Zellen, die sowohl mit dem rekombinanten Expressionsplasmid für *tupALOX15a* als auch mit *tupALOX15c* transformiert wurden, eine immunoreaktive Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 75 kDa zu sehen war. Da die Bandenintensität für das *tupALOX15a*-Enzym deutlich höher als die für das *tupALOX15c*-

Ortholog war, ließ sich schlussfolgern, dass die tupALOX15a-Isoform auf deutlich höherem Niveau (5-fach) exprimiert wurde.

Die Intensitätsskala des Immunoblots wurde mit einer definierten Menge gereinigter rekombinanter ALOX aus *Myxococcus fulvus* geeicht, die ebenfalls als N-terminales his-tag-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert wurde (Goloshchapova et al. 2018). Auf diese Weise konnte im Western-Blot das Expressionsniveau der beiden tupALOX15-Isoformen abgeschätzt werden. Unter der Annahme, dass der verwendete Anti-his-tag-Antikörper mit der rekombinanten ALOX aus *Myxococcus fulvus* die gleiche Immunoreaktivität aufweist, wie mit den rekombinanten exprimierten tupALOX15-Fusionsproteinen, ergab sich, dass die tupALOX15 im zweistelligen Milligramm-Bereich pro Liter Bakterienkultur (40–60 mg/l Flüssigkultur) exprimiert wurde. Für tupALOX15c wurde eine 5-fach geringere Expression erreicht.

Um herauszufinden, ob es sich bei den rekombinant exprimierten tupALOX15-Isoformen um katalytisch aktive Enzyme handelt, wurden Aliquots der Lysatüberstände für *In-vitro*-ALOX15-Aktivitätsassays eingesetzt. Dazu wurde zu 0,5 ml PBS 0,5 µl einer methanolischen Arachidonsäurelösung hinzugegeben, sodass eine Fettsäurekonzentration von 100 µM im Reaktionsansatz erreicht wurde. Anschließend wurde die ALOX-Reaktion durch Zugabe eines Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände (20 µl) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die entstandenen AA-Oxygenierungsprodukte (konjugierte Diene) reduziert und mittels RP-HPLC (siehe Kapitel 2) quantifiziert (Abbildung 10 B). Zusätzlich zu den beiden tupALOX15-Isoformen wurde eine Nicht-Enzymkontrolle mitgeführt, bei der anstatt der 20 µl bakterieller Lysatüberstand ein entsprechendes Volumen PBS zum Aktivitätsassay zugegeben wurde. Bei dieser Kontrollinkubation konnte keine Bildung von konjugierten Dienen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurden bei den Inkubationen mit den bakteriellen Lysatüberständen konjugierte Diene gebildet, die in der RP-HPLC-Analyse mit authentischen Standards von 12-HETE und 15-HETE co-chromatografierten. Diese Daten belegen, dass beide tupALOX15-Isoformen katalytisch aktiv waren und dass bei tupALOX15a deutlich mehr konjugierte Diene gebildet wurden als bei tupALOX15c. Da tupALOX15a etwa 5-fach besser exprimiert wurde als tupALOX15c (Abbildung 10 A), kann abgeschätzt werden, dass die spezifischen Aktivitäten der beiden tupALOX-Isoformen vergleichbar waren.

Um die Expressionsraten genauer quantifizieren zu können und um herauszufinden, ob die gereinigten rekombinanten Enzyme ähnliche katalytische Eigenschaften aufweisen, wurden

Reinigungsversuche mittels Affinitätschromatografie an einer Nickel-Agarosesäule durchgeführt. Doch die rekombinanten Proteine wurden nicht an die stationäre Phase der Affinitätssäulen gebunden. Unter anderem könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass der N-terminale his-tag des Fusionsproteins in dessen Raumstruktur eingebunden wurde und somit eine Bindung des rekombinanten Proteins an die Affinitätsmatrix nicht möglich war.

Zusammenfassung: Zwei ausgewählte ALOX15-Isoformen von *T. belangeri* (tupALOX15a, tupALOX15c) konnten als funktionelle N-terminale his-tag-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden. Sie wurden als Arachidonsäure 12-lipoxygenierende Enzyme charakterisiert und folgen damit der Evolutionshypothese der ALOX15-Reaktionsspezifität. Versuche zur Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatografie an einer Nickel-Agarosesäule schlugen fehl, weil die N-terminalen his-tag-Fusionsproteine nicht an die Affinitätsmatrix gebunden wurden. Die molekularen Ursachen dafür konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

3.1.2 Identifizierung der chemischen Struktur der gebildeten ALOX15 Produkte

Aus den in Abbildung 10 B gezeigten RP-HPLC-Chromatogrammen der dominanten Reaktionsprodukte kann abgeleitet werden, dass bei der Oxygenierung von Arachidonsäure durch tupALOX15a und tupALOX15b die gleichen Oxygenierungsprodukte entstehen. Da das in Abbildung 10 verwendete chromatografische System aber nicht alle HETE-Isomeren vollständig voneinander trennt (z. B. können 12-HETE und 8-HETE unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht verlässlich voneinander getrennt werden) und da in der RP-HPLC auch keine Enantiomerentrennung möglich ist, wurden die Hauptprodukte der Arachidonsäureoxygenierung durch die beiden tupALOX15-Isoformen mittels NP-HPLC und CP-HPLC weiter analysiert. In Abbildung 11 sind die entsprechenden Analysedaten (exemplarisch ausgewählte Chromatogramme) zusammengefasst. Diese können wie folgt interpretiert werden: Beide tup-ALOX15-Isoformen wandeln Arachidonsäure zu einer Mischung aus 12-HETE und 15-HETE (Isomerenverhältnis von ca. 7:1) um. Um weiterführende Informationen zur Struktur der dominanten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte zu erhalten, wurden die Hauptprodukte in der RP-HPLC präpariert und anschließend mittels Normalphasen-HPLC analysiert. In diesem chromatografischen System werden alle HETE-Positionsisomere voneinander getrennt. Diese Analysen ergaben (siehe linke Insets in Abbildung 11), dass 8-HETE kein Produkt der Arachidonsäureoxygenierung durch die beiden tupALOX15-Isoformen ist. Diese Information konnte in der RP-HPLC unter den gegebenen analytischen Bedingungen nicht erhalten werden.

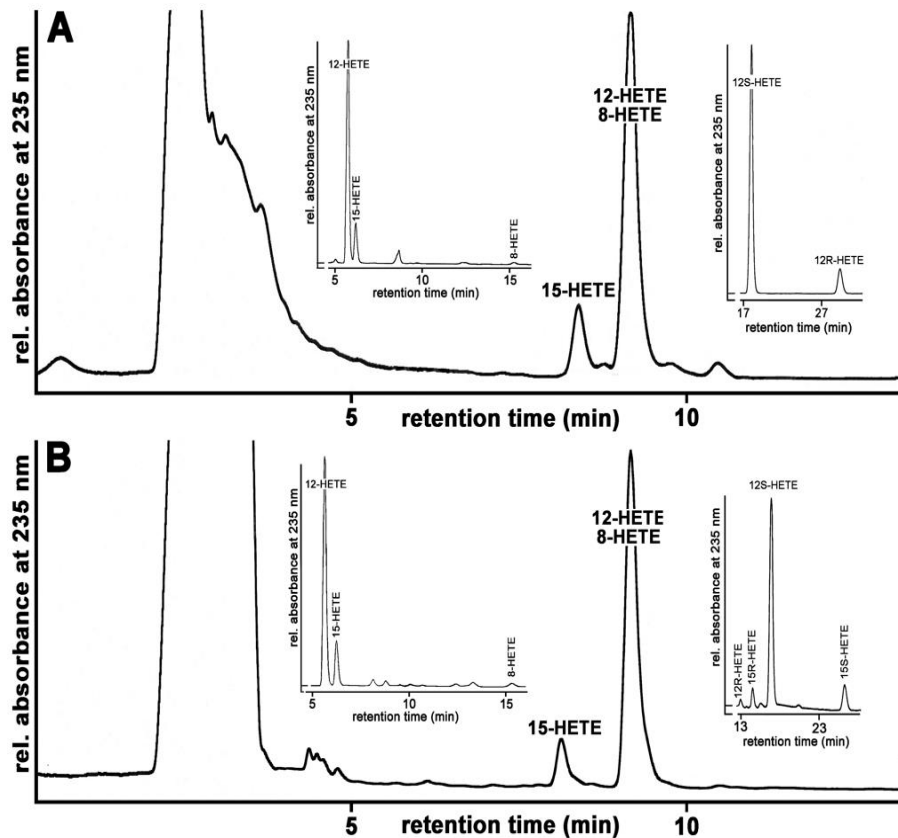


Abbildung 11: Identifizierung der chemischen Struktur der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte, die durch tupALOX15a (A) und tupALOX15c (B) gebildet wurden (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die beiden tupALOX15-Isoformen wurden in *E. coli* (siehe Kapitel 2) als N-terminale his-tag-Fusionsproteine exprimiert und Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden für *In-vitro*-ALOX15-Aktivitätsmessungen eingesetzt. Die beiden dominanten AA-Oxygenierungsprodukte (12-HETE, 15-HETE) wurden mittels Reversephasen (RP)-HPLC präpariert und anschließend mittels Normalphasen (NP)-HPLC (linke Insets) analysiert. Für die Quantifizierung der Enantiomerenzusammensetzung der Hauptprodukte wurden diese mittels Chiralphasen (CP)-HPLC weiter analysiert (rechte Insets). Dabei kamen zwei unterschiedliche CP-HPLC-Techniken zum Einsatz. Für die Produkte von tupALOX15a (A) wurde zunächst 12-HETE mittels NP-HPLC präpariert und anschließend durch CP-HPLC an einer Chiralcel-OD-Säule (Daicel Crop., Osaka, Japan) mit dem Lösungsmittelsystem n-Hexan:Isopropanol:Essigsäure (100:5:0,2 % Vol.) analysiert. Für die Produkte von tupALOX15c (B) wurden 12-HETE und 15-HETE zusammen in der NP-HPLC präpariert. Die Enantiomerenanalytik erfolgte anschließend durch kombinierte NP-/CP-HPLC, wobei eine Chiralpak-AD-H-Säule (Daicel Corp., Osaka, Japan) und ein Lösungsmittelsystem bestehend aus n-Hexan:Methanol:Ethanol:Essigsäure (96:3:1:0,1 % Vol., isokratische Elution) verwendet wurden. Die Retentionszeiten der authentischen Standards sind angegeben (klein Mitte/links).

Für die Quantifizierung der Enantiomerenzusammensetzung der Hauptprodukte wurden diese mittels CP-HPLC analysiert (Abbildung 11, rechte Insets). Für die Produkte von tupALOX15a (Panel A) wurde zunächst 12-HETE mittels NP-HPLC präpariert und anschließend durch CP-HPLC an einer Chiralcel-OD-Säule (Daicel Crop., Osaka, Japan) mit dem Lösungsmittelsystem n-Hexan:Isopropanol:Essigsäure (100:5:0,2 % Vol.) analysiert. Dabei ergab sich, dass das gebildete 12-HETE zu 90 % aus dem 12S-Enantiomer bestand (rechtes Inset, Abbildung 11 A). Für die Produkte von tupALOX15c (Panel B)

wurden 12-HETE und 15-HETE zusammen in der NP-HPLC präpariert und anschließend in einem kombinierten NP-/CP-HPLC-System analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass auch für dieses Enzym 12S-HETE das Hauptprodukt war. Auch wurde mehr 15S-HETE als 15R-HETE gebildet, das bei dieser Reaktion als Nebenprodukt nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassung: Mithilfe unterschiedlicher HPLC-Systeme (RP-HPLC, NP-HPLC, CP-HPLC) konnte das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung durch die beiden ausgewählten *tupALOX15*-Isoformen als 12S-HETE (12S-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure) identifiziert werden. 15S-HETE (15S-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure) wurde als Nebenprodukt (< 10 % der Gesamtproduktbildung) identifiziert, während 8-HETE (8-Hydroxy-5Z,9E,11Z,14Z-Eicosatetraensäure) nur in Spuren nachweisbar war.

3.1.3 Reaktionskinetische Parameter für die rekombinanten *tupALOX15*-Isoformen

Da die Versuche zur Reinigung der rekombinant exprimierten *tupALOX15*-Isoformen nicht erfolgreich waren, wurden nur die wesentlichen reaktionskinetischen Parameter der beiden Enzyme (*tupALOX15a* vs. *tupALOX15c*) unter Verwendung der ungereinigten Lysatüberstände ermittelt. Dabei wurde zunächst die Affinität der beiden Enzyme zur Arachidonsäure quantifiziert. Aliquots der beiden Lysatüberstände wurden bei verschiedenen Arachidonsäure-Konzentrationen für 5 min im Standardaktivitätsassay inkubiert und die Menge der gebildeten Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC quantifiziert. In Abbildung 12 sind die entsprechenden Michaelis-Menten-Diagramme dargestellt. Der K_m -Wert für *tupALOX15a* lag bei 232 μM und war damit doppelt so groß wie der K_m -Wert der *tupALOX15c*-Isoform (116 μM). Die durch die K_m -Werte charakterisierten Substrataffinitäten der beiden *tupALOX15*-Isoformen liegen deutlich unter entsprechenden Affinitäten, die für andere ALOX-Isoformen bestimmt wurden (Ludwig et al. 1987; Juránek et al. 1999; Deschamps et al. 2016). Diese geringen Substrataffinitäten können zumindest teilweise dadurch begründet werden, dass in dieser Arbeit in dem verwendeten Messsystem keine Lösungsvermittler (Detergenzien) für die Substratfettsäuren verwendet wurden. Detergenzien sind amphiphile Moleküle und können vor allem nicht-kovalente Bindungen zwischen den Seitenketten von Aminosäuren beeinflussen. Da hydrophobe Wechselwirkungen wesentlich zur Stabilisierung der nativen Struktur von Proteinen beitragen, kann die Zugabe von Detergenzien zu einer partiellen Denaturierung der Enzyme führen. Deshalb wurden in dieser Arbeit alle Aktivitätsmessungen in Abwesenheit von Detergenzien durchgeführt. Leider ist unter diesen Bedingungen die Wasserlöslichkeit von Fettsäuren eingeschränkt, was die Substratverfügbarkeit für die *tupALOX*-Isoformen limitiert haben könnte.

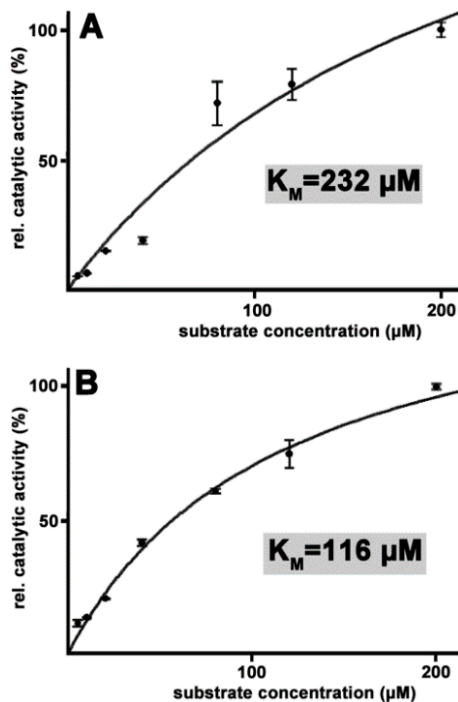


Abbildung 12: Bestimmung der Substrataffinitäten der ausgewählten tupALOX15-Isoformen (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die katalytischen Aktivitäten der beiden tupALOX15-Isoformen wurden durch *In-vitro*-Aktivitätsassays quantifiziert (siehe Kapitel 2), die bei sieben unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt wurden. Bei jeder Substratkonzentration wurden Doppelwerte gemessen. Mittelwerte und Standardabweichung sind angegeben. Aus diesem experimentellen Protokoll lässt sich ableiten, dass sich die berechneten K_M -Werte für jedes Enzym auf 14 unterschiedliche Messpunkte stützt. A) tupALOX15a, B) tupALOX15c.

Außerdem könnte die Anwesenheit von hochaffinen Fettsäure-bindenden Proteinen in den Überständen der Bakterienlysate dafür gesorgt haben, dass ein Teil der zugesetzten Substratfettsäuren gebunden wird, sodass die im Aktivitätsassay verfügbaren Arachidonsäurekonzentrationen deutlich geringer waren als die theoretisch berechneten Werte. Dadurch wären die experimentell ermittelten K_M -Werte überbilanziert und die Substrataffinitäten der Enzyme würde in Abwesenheit dieser hypothetischen Fettsäure-bindenden Proteine höher sein.

ALOX-Isoformen sind sauerstoff-metabolisierende Enzyme, die nach den derzeitigen Erkenntnissen selbst keinen Sauerstoff binden können (Saam et al. 2007; Schneider et al. 2007). Wenn sie allerdings ein Fettsäureradikal am aktiven Zentrum tragen, fungiert dieses radikalische Intermediat als hochaffiner Sauerstoffakzeptor. Die Affinitäten von verschiedenen ALOX-Fettsäurekomplexen wurden in unterschiedlichen Studien quantifiziert (vgl. Studien von Ludwig et al. 1987; Juránek et al. 1999; Saam et al. 2007; Kalms et al. 2017), wobei sich große enzymespezifische Unterschiede ergaben. So konnten z. B. für die ALOX12 des Menschen, die ALOX15 des Schweins, die ALOX15 des Kaninchens und die ALOX5 des Menschen K_M -Werte für Sauerstoff im Bereich von 10–26 µM bestimmt werden (Juránek et al. 1999). Diese Daten deuten auf hohe Sauerstoffaffinitäten der Enzym-Substrat-Komplexe hin. Für die ALOX15 aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde hingegen ein K_M -Wert für Sauerstoff von ca. 200 µM

bestimmt. Nach einem Alanin-420-Glycin-Aminosäureaustausch, stieg dieser K_m -Wert auf über $400 \mu\text{M}$ an (Kalms et al. 2017). Als molekulare Ursache dieser Veränderung wurde auf der Basis der Kristallstruktur der Ala420Gly-Mutante eine Aufzweigung eines potenziellen Sauerstoffkanals postuliert, was zu einer Behinderung der Sauerstoffdiffusion innerhalb der Enzymproteins führt (Kalms et al. 2017).

Um zu erfahren, ob es sich bei den ausgewählten tupALOX15-Isoformen in dieser Arbeit um Enzyme mit hoher oder niedriger Sauerstoffaffinität handelt, wurden die K_m -Werte für Sauerstoff für beide ALOX15-Isoformen bestimmt. Dazu wurde zunächst sauerstoffgesättigte PBS mit anaerober PBS zu unterschiedlichen Volumenanteilen gemischt und anschließend *In-vitro*-Aktivitätsanalysen durchgeführt. Jeder Aktivitätstest wurde als Doppelwert gemessen, so dass die ermittelten K_m -Werte auf 20 (tupALOX15a) bzw. 14 (tupALOX15c) unterschiedlichen Messwerten beruhen (Abbildung 13). Aus den erhaltenen experimentellen Rohdaten ließ sich ableiten, dass die tupALOX15a einem K_m -Wert für Sauerstoff von $18,5 \mu\text{M}$ aufweist. Damit liegt die Sauerstoffaffinität für diesen Enzym-Substrat-Komplex in der Nähe der Werte, die für die ALOX12 des Menschen, die ALOX15 des Schweins, die ALOX15 des Kaninchens und die ALOX5 des Menschen ermittelt wurden (Juránek et al. 1999). Im Gegensatz dazu liegt die Sauerstoffaffinität für die tupALOX15c mit einem K_m -Wert für Sauerstoff von ca. $90 \mu\text{M}$ 5-fach unter der von tupALOX15a. Die molekularen Ursachen für diesen Unterschied wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

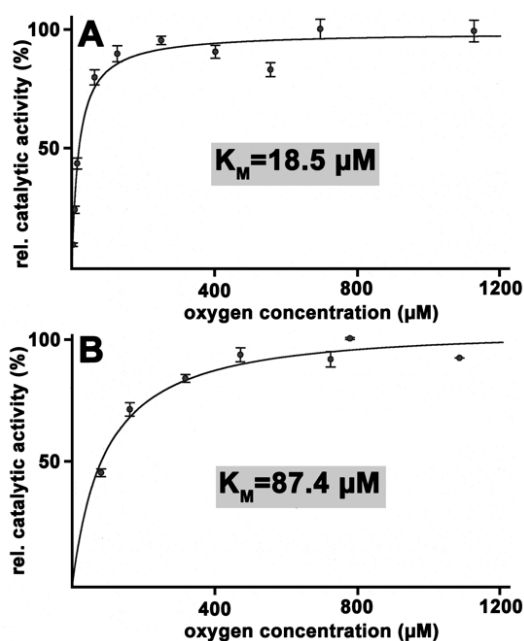


Abbildung 13: Bestimmung der Sauerstoffaffinitäten der tupALOX15-Isoformen (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die katalytischen Aktivitäten der beiden tupALOX15-Isoformen wurden durch *In-vitro*-Aktivitätsassays unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen quantifiziert (siehe Kapitel 2). Die Messlösungen mit den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen wurden durch Mischung verschiedener Volumenanteile von sauerstoffgesättigtem PBS und anaerobem PBS hergestellt. Die ALOX-Reaktion wurde durch Zugabe von Lysatüberstand als Enzymquelle gestartet. Bei jeder Sauerstoffkonzentration wurden Doppelwerte gemessen. Mittelwerte und Standardabweichung sind angegeben. A) tupALOX15a, B) tupALOX15c.

Enzymatische Reaktionen laufen bei unterschiedlichen pH-Werten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. Das liegt vor allem daran, dass Veränderungen im pH-Wert den Dissoziationsgrad von Aminosäureseitenketten des Enzymproteins verändern. Dabei wirken sich pH-Veränderungen im nahen physiologischen Bereich vor allem auf den Dissoziationsgrad der Histidin-Seitenkette aus, die mit einem pKs-Wert von 6,0 im pH-Bereich 5 bis 9 (Hansen and Kay 2014; Pogostin et al. 2019) besonders empfindlich gegen pH-Veränderungen reagieren. Verändert sich der Dissoziationsgrad von Aminosäureseitenketten innerhalb eines Proteins, kommt es zur Umlagerung von ionischen Wechselwirkungen und von Wasserstoffbrücken, was Änderungen in der 3D-Struktur der Proteine induzieren kann. Dadurch wird unter anderem die katalytische Aktivität von Enzymen beeinflusst. Bei Enzymen, die Fettsäuren als Substrate verwenden, kann auch die Wasserlöslichkeit der Substratfettsäuren durch Veränderungen des Dissoziationsgrades der Fettsäurecarboxylgruppe beeinflusst werden. Um herauszufinden, ob und in welcher Weise die katalytische Aktivität der ausgewählten *tup*ALOX15-Isoformen vom pH-Wert abhängt, wurden *In-vitro*-Aktivitätsassays bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden gleiche Volumina eines 10 mM Phosphatpuffers und eines 10 mM Boratpuffers gemischt und unterschiedliche pH-Werte durch Zugabe von 5 N NaOH bzw. 5 N HCl am pH-Meter bei Raumtemperatur eingestellt. Zu diesen Ansätzen wurde Arachidonsäure in einer Endkonzentration von 100 μ M gegeben und die katalytische Aktivität der Lysatüberstände mittels RP-HPLC quantifiziert. Die höchste gemessene katalytische Aktivität für jedes Enzym wurde 100 % gesetzt, die relativen katalytischen Aktivitäten (in %) wurden berechnet und deren Abhängigkeit vom pH-Wert wurde grafisch dargestellt (Abbildung 14).

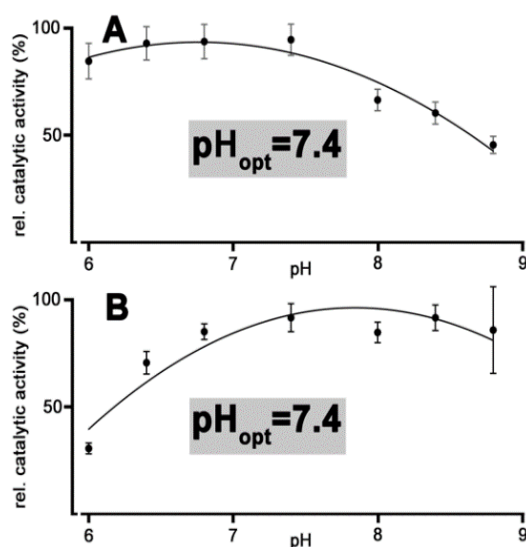


Abbildung 14: Bestimmung der pH-Profile von *tup*ALOX15a und *tup*ALOX15c (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die katalytischen Aktivitäten der beiden *tup*ALOX15-Isoformen wurden durch *In-vitro*-Aktivitätsassays bei unterschiedlichen pH-Werten quantifiziert (siehe Kapitel 2). Bei jedem pH-Wert wurden Doppelwerte bestimmt und Mittelwerte sowie Fehlerbalken dargestellt. A) *tup*ALOX15a, B) *tup*ALOX15c.

Für die tupALOX15a-Isoform konnten kaum Unterschiede in der katalytischen Aktivität im pH-Bereich zwischen 6,0–7,4 beobachtet werden. Erst bei pH-Werten von über 7,4 kam es zu einem graduellen Abfall der katalytischen Aktivität. Bei der tupALOX15c-Isoform war das Verhalten invers. Hier ergaben sich bei pH-Werten $> 7,4$ kaum sichtbare Unterschiede in den katalytischen Aktivitäten. Im Gegensatz dazu wurden bei pH-Werten $< 7,4$ niedrigere katalytische Aktivitäten gemessen. Bei beiden Enzymen wurde die maximale katalytische Aktivität bei $\text{pH} = 7,4$ gemessen. Das entspricht dem physiologischen pH-Wert im Blutplasma der meisten Säugetiere.

Als letzten reaktionskinetischen Parameter wurde die Temperaturabhängigkeit der beiden ausgewählten tupALOX15-Isoformen analysiert. Dazu wurden zunächst *In-vitro*-Aktivitätsassays bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die höchste gemessene katalytische Aktivität für jedes Enzym wurde 100 % gesetzt, die relativen katalytischen Aktivitäten (in %) berechnet und deren Abhängigkeit vom der Reaktionstemperatur grafisch dargestellt (Abbildung 15). Beim Vergleich der beiden Kurven fällt auf, dass das Temperaturprofil für tupALOX15c (Abbildung 15 B) eine Glockenkurve beschreibt, deren Scheitelpunkt bei ca. 25 °C (T_{opt}) liegt. Im Gegensatz dazu ist das Temperaturprofil von tupALOX15a (Abbildung 15 A) nach links verschoben. Für dieses Enzym wurde ein T_{opt} von 15 °C ermittelt und zwischen 5 °C und 20 °C gab es nur geringe Aktivitätsunterschiede. In diesem Temperaturbereich konnte keine sichere Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Aktivierungsenergie der AA-Oxygenierung für diese tupALOX15-Isoform eher gering sein sollte.

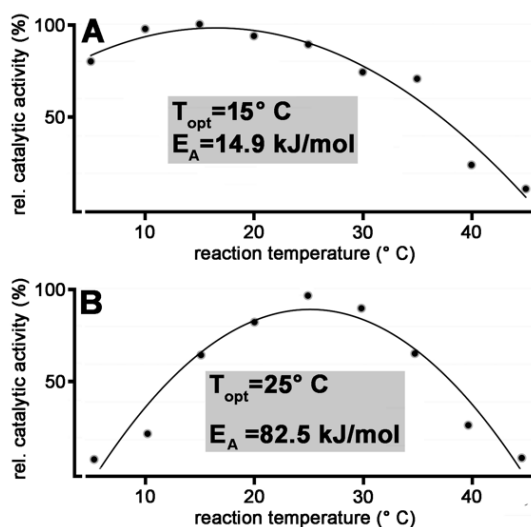


Abbildung 15: Bestimmung der Temperaturprofile von tupALOX15a und tupALOX15c (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die katalytischen Aktivitäten der beiden tupALOX15-Isoformen wurden durch *In-vitro*-Aktivitätsassays bei unterschiedlichen Temperaturen quantifiziert (siehe Kapitel 2). Bei jedem pH-Wert wurden Doppelwerte bestimmt und die Abhängigkeit der Aktivitätsmittelwerte von der Reaktionstemperatur dargestellt. A) tupALOX15a, B) tupALOX15c.

Aus dem Kurvenverlauf von *tupALOX15c* zwischen 5 °C und 25 °C (unterhalb T_{opt}) wurde mittels der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergie der Arachidonsäureoxygenierung errechnet. Für dieses Enzym lag die Aktivierungsenergie bei 82,5 kJ/mol (Abbildung 15 B). Dieser Wert gibt diejenige Energie an, die nötig ist, um den Übergangszustand der katalytischen Reaktion zu erreichen. Leider ist der Übergangszustand für die ALOX-Reaktion bisher strukturell nicht klar definiert, sodass sich aus der bestimmten Aktivierungsenergie keine mechanistischen Schlussfolgerungen ableiten lassen. Für *tupALOX15a* konnten für die Bestimmung der Aktivierungsenergie nur die Aktivitätswerte zwischen 5 °C und 15 °C verwendet werden, da bei höheren Temperaturen bereits eine partielle Proteindenaturierung einsetzte (Abfall der katalytischen Aktivität). Da die katalytischen Aktivitäten in diesem Temperaturbereich nur wenig anstiegen, konnte eine geringe Aktivierungsenergie der Arachidonsäureoxygenierung für dieses Enzym geschlussfolgert werden. Bei der Auswertung der Messwerte ergab sich eine Aktivierungsenergie von 14,9 kJ/mol. Eine ähnlich geringe Aktivierungsenergie konnte früher für die ALOX1 aus Sojabohnen und die ALOX15 aus Kaninchenretikulozyten, bei Verwendung von Linolsäure als Substrat, bestimmt werden (Tappel et al. 1953; Aoshima et al. 1981; Salzmann et al. 1984).

Zusammenfassung: Für die ausgewählten *tupALOX15*-Isoformen (*tupALOX15a*, *tupALOX15c*) wurden vergleichend verschiedene reaktionskinetische Parameter bestimmt. Die Affinitäten für Arachidonsäure (Km-Wert für *tupALOX15a* 232 μ M vs. *tupALOX15c* 116 μ M) und Sauerstoff (Km-Wert für *tupALOX15a* 18,5 μ M vs. *tupALOX15c* 87,4 μ M) unterschieden sich für beide Isoformen deutlich. Ähnliche Unterschiede ließen sich für die Temperaturoptima (T_{opt} für *tupALOX15a* 15 °C vs. *tupALOX15c* 25 °C) und die Aktivierungsenergien (E_A für *tupALOX15a* 14,9 kJ/mol vs. *tupALOX15c* 82,5 kJ/mol) feststellen. Für beide Enzyme konnten übereinstimmend pH-Optima von 7,4 ermittelt werden.

3.1.4 Substrat- und Produktspezifitäten der rekombinanten *tupALOX15*-Isoformen

Um die Substratspezifität der beiden *tupALOX*-Isoformen zu charakterisieren, wurden die biologisch wichtigsten Polyenfettsäuren als potenzielle Substrate (80 μ M) verwendet und die Mengen der Oxygenierungsprodukte durch HPLC quantifiziert, die während der Aktivitätsassays gebildet wurden. Für jedes Enzym wurde die Menge der Oxygenierungsprodukte, die aus der am besten metabolisierten Fettsäure gebildet wurden, 100 % gesetzt und die relativen Oxygenaseaktivitäten für die anderen Fettsäuren berechnet. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle getesteten Polyenfettsäuren durch die beiden *tupALOX15*-Isoformen oxygeniert werden, wobei quantitative Unterschiede zwischen den beiden Enzymen zu beobachten waren. Für die *tupALOX15a* wurde Linolsäure als bestes

Oxygenierungssubstrat identifiziert (Abbildung 16 A), gefolgt von Gamma-Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosahexaensäure und Alpha-Linolensäure.

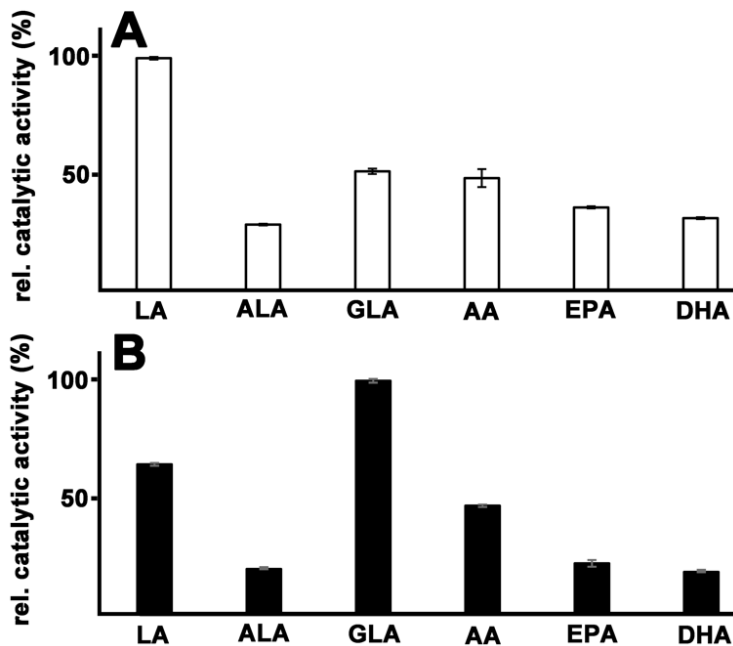


Abbildung 16: Substratspezifität von tupALOX15a und tupALOX15c für freie Polyenfettsäuren (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die katalytischen Aktivitäten der beiden tupALOX15-Isoformen wurden durch *In-vitro*-Aktivitätsassays (siehe Kapitel 2) bestimmt, wobei unterschiedliche freie Polyenfettsäuren (80 μ M) als Substrate eingesetzt wurden. Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden als Enzymquelle eingesetzt. Für jede Polyenfettsäure wurden Doppelwerte bestimmt. Der Mittelwert der katalytischen Aktivität der am besten umgesetzten Polyenfettsäure (LA für tupALOX15a, GLA für tupALOX15c) wurde 100 % gesetzt. Die relativen Oxygenaseaktivitäten aller Fettsäuren wurden für jedes Enzym getrennt berechnet und mit Standardabweichung dargestellt. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure, DHA: Docosahexaensäure, EPA: Eicosapentaensäure, ALA: Alpha-Linolensäure, GLA: Gamma-Linolensäure, LA: Linolsäure.

Für tupALOX15c (Abbildung 16 B) war Gamma-Linolensäure das bevorzugte Substrat, gefolgt von Linolsäure und Arachidonsäure. Die anderen Polyenfettsäuren wurden mit ähnlich geringeren Effizienzen oxygeniert. Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass die Omega-6-C18-Fettsäuren (LA, GLA) besser oxygeniert wurden als die Omega-3-C18-Fettsäure (ALA) und die C20- (AA, EPA) bzw. C22-Fettsäuren (DHA). Auch bei den C20-Fettsäure (AA, EPA) wurde die Omega-6-Fettsäure (AA) gegenüber der Omega-3-Fettsäure (EPA) als Substrat durch beide Enzyme bevorzugt. Das bedeutet, dass für tupALOX15a eine zusätzliche Doppelbindung im Methylschwanz der Fettsäure (LA vs. GLA und AA vs. EPA) die Oxygenierungseffizienz reduziert. Für tupALOX15c war das für die C20-Fettsäuren (AA vs. EPA) auch der Fall. Für C18-Fettsäuren (LA vs. GLA) konnte ein inverses Verhalten beobachtet werden. Hier war GLA ein besseres Substrat als LA. Nachdem das Substratverhalten verschiedener Polyenfettsäuren für die beiden tupALOX15-Isoformen charakterisiert worden war, ergab sich die Frage, welche Reaktionsprodukte aus den getesteten Substraten gebildet werden.

Da entsprechend der Evolutionshypothese (Adel et al. 2016) die ALOX15-Orthologen von Säugetieren, die evolutionär unterhalb des Gibbons einzuordnen sind (das trifft auch für *T. belangeri* zu), überwiegend 12-HETE aus Arachidonsäure bilden sollten, konnten folgende Vorhersagen für die dominanten Oxygenierungsprodukte der anderen Polyenfettsäuren durch die beiden tupALOX15-Isoformen getroffen werden:

i) LA wird dominant zu 13-Hydro(pero)xy-9Z,11E-Octadecadiensäure (13-H(p)ODE) oxygeniert. Da diese Fettsäure nur eine bisallylische Methylengruppe (C13) enthält und eine [+2]-Verschiebung des Fettsäureradikals durch das Enzym katalysiert wird, sollte 13-H(p)ODE das einzige Reaktionsprodukt sein.

ii) ALA wird hauptsächlich zu 13-Hydro(pero)xy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure [13-H(p)OTE] umgewandelt. ALA besitzt zwei bisallylische Methylengruppen (C11 und C14), die prinzipiell als Zielatome für die initiale Wasserstoffabstraktion fungieren könnten. Durch AA-12-lipoxygenierende Enzyme sollte jedoch eine Wasserstoffabstraktion vom C14 dieser Fettsäure nicht katalysiert werden. Damit sollte die Bildung von 13-H(p)OTE dominant sein.

iii) GLA sollte dominant zu 10-Hydro(pero)xy-6Z,8E,12Z-Octadecatriensäure (10-H(p)OTE, 10-HGLA) oxygeniert werden. GLA trägt ebenfalls zwei verschiedene bisallylische Methylengruppen (C8 und C11), die prinzipiell als Zielatome für eine Wasserstoffabstraktion fungieren könnten. Durch ALOX-Isoformen, die AA mit dualer Reaktionsspezifität zu einer Mischung aus 12-HETE und 15-HETE umwandeln (Abbildung 11), sollte GLA zu einer Mischung aus 10-H(p)OTE und 13-H(p)OTE oxygeniert werden, wobei 10-H(p)OTE dominant sein sollte. Die Bildung beider Produkte beinhaltet eine [+2]-Verschiebung des Fettsäureradikals.

iv) AA wird überwiegend zu 12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure [12-H(p)ETE] oxygeniert. Diese Vorhersage wurde in Abbildung 10 bereits experimentell bestätigt. Die Bildung dieses Oxygenierungsproduktes involviert eine Wasserstoffabstraktion vom C12 der Arachidonsäurekette und eine [+2]-Umlagerung des Fettsäureradikals.

v) EPA wird überwiegend zu 12-Hydro(pero)xy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-Eicosapentaensäure [12-H(p)EPE] oxygeniert. Wie bei AA erfolgt auch mit EPA eine Wasserstoffabstraktion vom C10 der Kohlenwasserstoffkette, was eine Oxygenierung des C12 der Fettsäurekette zur Folge hat. Es muss an dieser Stelle jedoch darauf hingewiesen werden, dass einige AA-12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere EPA mit ausgeprägter dualer Reaktionsspezifität oxygenieren, wobei ähnliche Mengen an 12-H(p)EPE und 15-H(p)EPE entstehen (Kutzner et al. 2020). Deshalb könnten die experimentellen Ergebnisse für diese Fettsäure von der hier getroffenen Vorhersage abweichen.

vi) DHA wird überwiegend zu 14-Hydro(pero)xy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-Docosahexaensäure (14-HDHA) oxygeniert. Da im Vergleich zur AA (Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C5=C6, C8=C9, C11=C12, C14=C15) die Doppelbindungen bei DHA an leicht verschobenen Positionen liegen (Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C4=C5, C7=C8, C10=C11, C13=C14, C16=C17, C19=C20), lässt sich die Produktspezifität der DHA-Oxygenierung nicht sicher aus der AA-Oxygenierung ableiten. Eine dominante Synthese von 14-HDHA ist wahrscheinlich, wobei 17-HDHA als Nebenprodukt gebildet werden sollte.

Um die oben genannten Vorhersagen zu überprüfen, wurden die verschiedenen Polyenfettsäuren zunächst mit *tup*ALOX15a umgesetzt und die Oxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC und anschließender Gaschromatografie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. In Abbildung 17 sind repräsentative Chromatogramme der RP-HPLC-Analytik dargestellt.

Daraus geht hervor, dass LA zu einem einzigen Oxygenierungsprodukt umgewandelt wurde, das mit einem authentischen Standard von 13-Hydroxy-9Z,11E-Octadecadiensäure (13-HODE) co-chromatografierte. Die anschließende GC-MS-Analyse, die von Dr. I. Ivanov (Moskau) durchgeführt wurde, bestätigte die chemische Struktur dieses Produktes (Schäfer et al. 2020).

Ein ähnliches Chromatogramm wurde für die Oxygenierungsprodukte von ALA erhalten, wobei das dominante Oxygenierungsprodukt in der RP-HPLC deutlich früher als 13-HODE eluiert wurde. Die GC-MS-Analyse dieses Produktes ergab die chemische Struktur von 13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure (13-HALA, 13-HOTrE). Da dieses Produkt

durch seine zusätzliche Doppelbindung polarer ist als das dominante LA-Oxygenierungsprodukt 13-HODE, wird es in der RP-HPLC deutlich früher eluiert.

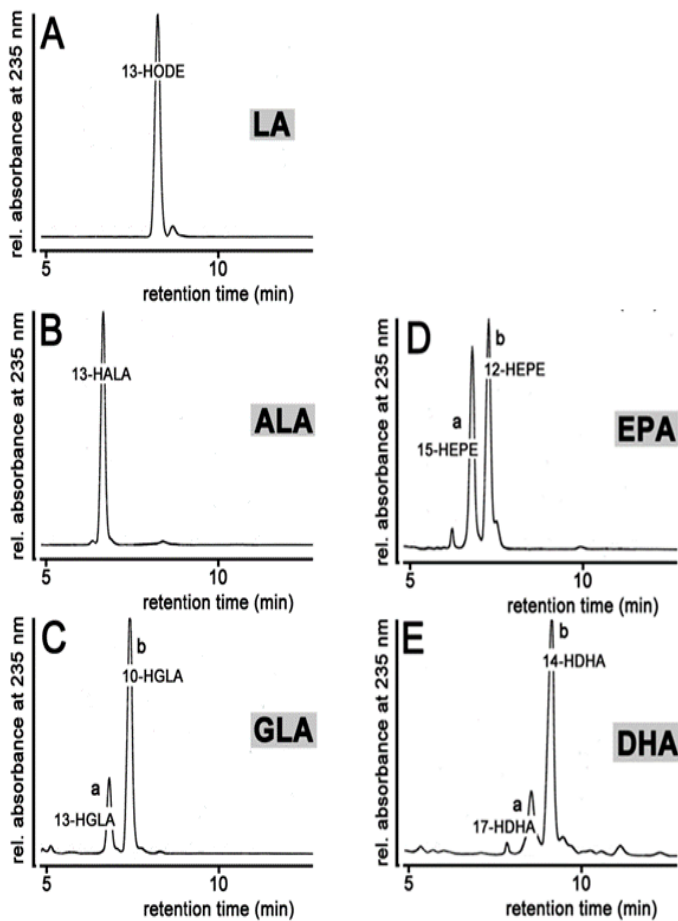


Abbildung 17: Produktspezifität für tupALOX15a bei der Oxygenierung verschiedener Polyenfettsäuren (Quelle: Schäfer et al. 2020). Aliquots des Ly-satüberstandes von tupALOX15a wurden in *In-vitro*-Aktivitätsassays (siehe Kapitel 2) mit verschiedenen Polyenfettsäuren (80 μ M) als Substrate inkubiert. Die dabei gebildeten Oxygenierungsprodukte wurden mit NaBH₄ reduziert und mittels RP-HPLC analysiert. Dabei wurde die Lichtabsorption bei 235 nm aufgezeichnet. Für jede Polyenfettsäure wurden Doppelwerte analysiert und hier als repräsentative Chromatogramme dargestellt. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure, DHA: Docosahexaensäure, EPA: Eicosapentaensäure, ALA: Alpha-Linolensäure, GLA: Gamma-Linolensäure, LA: Linolsäure, 13-HODE: 13-Hydroxy-9Z,11E-Octadecadiensäure, 13-HALA: 13-Hydroxy-9Z,-11E,15Z-Octadecatriensäure, 10-HGLA: 10-Hydro(pero)xy-6Z,8E,12Z-Octadecatriensäure, 12-HEPE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,-14Z,17Z-Eicosapentaensäure, 15-HEPE: 15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-Eicosapentaensäure, 14-HDHA: 14-Hydroxy-4Z,-7Z,10Z,-12E,16Z,19Z-Docosahexaensäure, 17-HDHA: 17-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,-13Z,15E,19Z-Docosahexaensäure.

Für GLA konnten zwei verschiedene Oxygenierungsprodukte (a + b) in einem Mengenverhältnis von ca. 1:4 identifiziert werden. Beim mit „a“ beschrifteten Minorprodukt handelt es sich den erhaltenen GC-MS-Daten zufolge um 13-Hydroxy-6Z,9Z,11E-Octadecatriensäure (13-HGLA, 13-HOTrE), während das mit „b“ beschriftete Hauptprodukt als die vorhergesagte 10-Hydro(pero)xy-6Z,8E,12Z-Octadecatriensäure (10-HGLA, 10-HOTrE) identifiziert wurde. Damit entsprechen die experimentellen Beobachtungen für GLA den vorhergesagten Erwartungen.

Für EPA wurde auf der Basis der Reaktionsspezifität der AA-Oxygenierung 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-Eicosapentaensäure (12-HEPE) als Hauptprodukt (Produkt b) vorhergesagt (Tabelle 26). Diese Vorhersage konnte experimentell bestätigt werden. Überraschenderweise wurden jedoch fast gleich große Mengen eines zweiten Reaktionsproduktes (Produkt a) gebildet, dass in der GC-MS als 15-HEPE

(15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-Eicosapentaensäure) identifiziert wurde. Ähnliche stark ausgeprägte duale Produktspezifitäten mit EPA als Substrat wurden auch für die AA-12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen von Ratte, Maus und Schwein beschrieben (Kutzner et al. 2017). Auf der Basis der AA-Oxygenierungsspezifität von tupALOX15a wurde 14-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-Docosahexaensäure (14-HDHA) als dominantes DHA Oxygenierungsprodukt vorhergesagt. Diese Vorhersage konnte experimentell bestätigt werden (Produkt b in Abbildung 17 E). Zusätzlich wurden geringere Mengen an 17-HDHA (17-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-Eicosatetraensäure) gebildet (Produkt a in Abbildung 17 E). Identische Experimente wurde auch mit tupALOX15c durchgeführt. Prinzipiell wurden die gleichen Reaktionsprodukte identifiziert, wobei sich der relative Anteil der Produkte an der Produktmischung geringgradig unterschied. Die Quantifizierung der Produktmuster der beiden tupALOX15-Isoformen mit den verschiedenen Polyenfettsäuren ist in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Quantifizierung der dominanten Oxygenierungsprodukte verschiedener Polyenfettsäuren durch tupALOX15a und tupALOX15c (Quelle: modifiziert nach Schäfer et al. 2020). Aliquots der Lysatüberstände der bakteriellen Expression von tupALOX15a und tupALOX15c wurden im Rahmen der Aktivitätsassays mit verschiedenen Polyenfettsäuren (80 µM) inkubiert, die Reaktionsprodukte mit NaBH₄ reduziert und anschließend mittel RP-HPLC analysiert (siehe Kapitel 2). Für jede Enzym-Substrat-Kombination wurde die Summe der beiden Hauptprodukte 100 % gesetzt und der relative Anteil jedes Produktes quantifiziert. Abkürzungen: LA: Linolsäure;13-Hydroxy-9Z,11E-Octadecadiensäure (13 HODE); ALA: Alpha-Linolensäure;13-Hydroxy-9Z,11E,15Z-Octadecatriensäure (13-HALA); GLA: Gamma-Linolensäure; 10-Hydro(pero)xy-6Z,8E,12Z-Octadecatriensäure (10 HGLA); 13-Hydroxy-6Z,9Z,11 E-Octadecatriensäure (13-HGLA); AA: Arachidonsäure; 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure (12-HETE);15S-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure (15-HETE); EPA: Eicosapentaensäure; 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-Eicosapentaensäure (12-HEPE); 15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-Eicosapentaensäure (15-HEPE); DHA: Docosahexaensäure; 14-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-Docosahexaensäure (14-HDHA) 17-Hydroxy-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-Docosahexaensäure (17-HDHA).

Substrat	tupALOX15a				tupALOX15c			
	Major	%	Minor	%	Major	%	Minor	%
LA	13-HODE	> 95	-	-	13-HODE	> 95	-	-
ALA	13-HALA	> 95	-	-	13-HALA	> 95	-	-
GLA	10-HGLA	77	13-HGLA	23	10-HGLA	63	13-HGLA	37
AA	12-HETE	85	15-HETE	15	12-HETE	92	15-HETE	8
EPA	12-HEPE	56	15-HEPE	44	15-HEPE	55	12-HEPE	45
DHA	14-HDHA	75	17-HDHA	25	14-HDHA	76	17-HDHA	24

Wie für tupALOX15a konnten für tupALOX15c 13-HODE und 13-HALA als einzige Oxygenierungsprodukte für die Oxygenierung von LA und ALA identifiziert werden. Für GLA war 10-HGLA das Hauptprodukt für beide tupALOX15-Isoformen, während 13-HGLA in geringeren Mengen synthetisiert wurde. EPA wurde durch beide Enzyme zu fast gleichen Teilen von 12-HEPE und 15-HEPE umgewandelt. Diese Daten bestätigen

frühere Ergebnisse, die zeigten, dass die ALOX15-Orthologen von Maus, Ratte und Schwein mit EPA ebenfalls eine duale Produktspezifität für diese Substratfettsäure aufweisen (Kutzner et al. 2017). Für DHA wurde für beide tupALOX15-Isoformen 14-HDHA als dominantes Oxygenierungsprodukt identifiziert, wobei 17-HDHA als Nebenprodukt nachgewiesen wurde.

Zusammenfassung: Beide tupALOX15-Isoformen akzeptieren die angebotenen Polyenfettsäuren (LA, ALA, GLA, AA, EPA, DHA) als Oxygenierungssubstrate, wobei LA und GLA unter den experimentellen Bedingungen in der vorliegenden Arbeit am effektivsten metabolisiert wurden. Für LA und ALA war eine C10-Oxygenierung aufgrund der Substratstruktur nicht möglich. Hier wurden 13-H(p)ODE, 13-H(p)ALA als Hauptprodukte gebildet. Für GLA, AA und DHA waren erwartungsgemäß 10-H(p)GLA, 12-H(p)ETE und 14-H(p)DHA die dominanten Oxygenierungsprodukte, während für EPA fast gleiche Mengen an 12-H(p)EPE und 15-H(p)EPE durch beide Enzyme gebildet wurden.

3.1.5 Mutagenese der Triadendeterminanten

In umfangreichen Untersuchungen konnte an einer großen Anzahl verschiedener Säugetier-ALOX15-Orthologen festgestellt werden, dass Mutationen der Triadendeterminanten zu einer vorhersagbaren Veränderung der Produktspezifität der Enzyme führt (Borngräber et al. 1999; Adel et al. 2016; Kozlov et al. 2019; Vogel et al. 2010; Heydeck et al. 2022). Hinsichtlich der Mutagenesestrategie folgten die Autoren der verschiedenen Studien dem Triadenkonzept, das davon ausgeht, dass die Einführung von Aminosäuren mit raumfüllenden Seitenketten an den Positionen 418 und 419 von AA-12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen die Enzyme zu AA-15-lipoxygenierenden Proteinen umwandelt. Da es sich bei beiden tupALOX15-Orthologen um AA-12-lipoxygenierende Enzyme handelt (Abbildung 11), konnte auf der Basis des Triadenkonzeptes vorhergesagt werden, dass ein Val418Ile- und ein Val419Met-Austausch zu einer Erhöhung des Anteils an 15-HETE in der Produktmischung führen sollte. Die Val418Ile+Val419Met-Doppelmutante sollte Arachidonsäure fast vollständig zu 15-HETE oxygenieren. Diese Veränderung in der Reaktionsspezifität sollte entsprechend des Triadenmodells durch die zusätzliche Einführung einer kleinen Aminosäure bei Phe353 (z. B. Phe353Ala) wieder rückgängig gemacht werden können. Damit sollten die Dreifachmutanten Val418Ile+Val419Met+Phe353Ala, ähnlich wie die Wildtyp-Enzyme, Arachidonsäure dominant zu 12-HETE oxygenieren. Die Ergebnisse der durchgeführten Mutageneseexperimente sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Produktspezifität von Triadendeterminanten der beiden tupALOX15-Isoformen (Quelle: Schäfer et al. 2020). Die Wildtyp-Enzyme und die aufgeführten Enzymmutanten wurden in *E. coli* als rekombinante his-tag-Fusionsproteine exprimiert und die Zellysatisüberstände als Enzymquelle eingesetzt. Aliquots der Lysatisüberstände wurden in den Aktivitätsassays mit AA (100 µM) für 3 min inkubiert (siehe Kapitel 2). Die gebildeten Oxygenierungsprodukte wurden mit NaBH₄ reduziert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Summe von 12-HETE+15-HETE wurde für jede Enzymvariante 100 % gesetzt und der relative Anteil der beiden Oxygenierungsprodukte berechnet. Für jede Enzymvariante wurden Doppelwerte angesetzt. Die Mittelwerte sind in der Tabelle aufgeführt. Die relativen Anteile der Hauptprodukte sind fettgedruckt. Aminosäurecode: Alanin (Ala), Isoleucin (Ile), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Valin (Val).

Enzyme	tupALOX15a		tupALOX15c	
	12-HETE (%)	15-HETE (%)	12-HETE (%)	15-HETE (%)
Wildtyp	93,3	6,7	92,3	7,7
Val418Ile	23,1	76,9	21,5	78,5
Val419Met	75,9	24,1	54,6	45,5
Val418Ile+Val419Met	5,1	94,9	5,9	94,1
Val418Ile+Val419Met+Phe353Ala	92,9	7,1	89,6	10,2

Beide Wildtyp-Enzyme wandeln Arachidonsäure dominant zu 12-HETE um (Abbildung 10). Die Einführung einer raumfüllenden Aminosäure bei Val418 (Val418Ile-Austausch) erhöhte den Anteil von 15-HETE an der Produktmischung beider tupALOX15-Isoformen. Ähnliche Veränderungen wurden für den Val419Met-Austausch beobachtet, wobei der Grad der Veränderung deutlich geringer war als beim Val418Ile-Austausch. Für die Val418+Val419Met-Doppelmutante konnte, wie vorhergesagt, fast ausschließlich 15-HETE als Oxygenierungsprodukt nachgewiesen werden. Wurde zusätzlich bei Phe353 ein kleines Alanin eingeführt (Val418Ile+Val419Met+Phe353Ala), wurden die durch die Doppelmutation (Val418Ile+Val419Met) induzierten Veränderungen in der Reaktionsspezifität vollständig rückgängig gemacht. Die Val418Ile+Val419Met+Phe353Ala-Dreifachmutante oxygenierte Arachidonsäure ähnlich wie das Wildtyp-Enzym dominant zu 12-HETE. Diese Daten belegen, dass beide tupALOX15-Isoformen dem Triadenkonzept uneingeschränkt folgen.

Zusammenfassung: Beide tupALOX15-Isoformen folgen dem Triadenkonzept der Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen. Mutationen der Triadendeterminanten (Val418Ile und Val419Met) verändern die Reaktionsspezifität von AA-12- in Richtung AA-15-Lipoxygenierung. Diese Veränderungen konnten durch einen zusätzlichen Phe353Ala-Austausch rückgängig gemacht werden.

3.1.6 Membranoxygenasaktivität der beiden tupALOX15-Isoformen

In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die ALOX15-Orthologen des Kaninchens (vgl. Zusammenfassung von Kuhn et al. 1990), des Schweins (Takahashi et al. 1993) und des Menschen (Kühn et al. 1993) in der Lage sind, Polyenfettsäuren zu

oxygenieren, die in Membranphospholipiden verestert sind. Um zu überprüfen, ob dies auch für die beiden *tup*ALOX-Isoformen der Fall ist, wurden Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände in PBS mit submitochondrialen Membranen (SMPs) inkubiert. Diese Modellmembranen stellen Vesikel von Mitochondrieninnenmembranen dar und sind für die Oxygenierung durch ALOX15-Orthologe besonders gut geeignet. Die dabei entstandenen Hydroperoxyesterlipide wurden mit NaBH₄ zu den stabileren Hydroxyverbindungen reduziert und die Membranlipide extrahiert. Durch alkalische Hydrolyse wurden die Esterlipide verseift und die entstandenen freien Fettsäurederivate mittels RP-HPLC analysiert (siehe Abschnitt 2.2.7). Die Chromatogramme der Lipidhydrolysate wurden simultan bei 235 nm und 210 nm verfolgt. Bei 235 nm konnten die oxygenierten Polyenfettsäuren (HETE- und HODE-Isomere) detektiert werden, während bei 210 nm die nicht-oxygenierten Polyenfettsäuren quantifizierbar waren.

In Abbildung 18 A ist beispielhaft ein Chromatogramm für den hydrolysierten Lipidextrakt einer Nicht-Enzymkontrollinkubation dargestellt. Bei diesem Experiment wurde dem Inkubationsansatz, der aus PBS und den Biomembranen bestand, anstatt des Lysatüberstandes von *tup*ALOX15a ein entsprechendes Volumen PBS zugesetzt. Wurde das Chromatogramm bei 210 nm verfolgt (unterer Teil der Abbildung 18 A) konnten AA und LA als dominierende Polyenfettsäuren in diesen Modellmembranen identifiziert werden. Da der molare Absorptionskoeffizient für AA aufgrund der höheren Anzahl von Doppelbindungen (4 Doppelbindungen bei AA vs. 2 Doppelbindungen bei LA) 5-mal höher ist als der von LA, muss davon ausgegangen werden, dass bei gleicher Peakfläche (Höhe) ca. 5-mal mehr LA in den Membranen vorhanden ist als AA. Beim Verlauf des Chromatogramms bei 235 nm wurde in der HODE-/HETE-Region (7–10 min) des Chromatogramms ein Peak eluiert, dessen UV-Spektrum jedoch kein konjugiertes Dien aufwies (Inset I). Folglich waren keine wesentlichen Mengen an oxygenierten Polyenfettsäuren in der Nichtenzymkontrolle vorhanden. Wurde das Lipidhydrolysat analysiert, das aus dem Ansatz hergestellt wurde, bei dem die Biomembranen mit einem Aliquot des bakteriellen Lysatüberstandes von *tup*ALOX15a inkubiert wurde (Abbildung 18 B), konnten in der HETE-HODE-Produktregion der RP-HPLC (7–10 min) zwei Peaks identifiziert werden, die beide ein charakteristisches konjugiertes Dienspektrum aufwiesen.

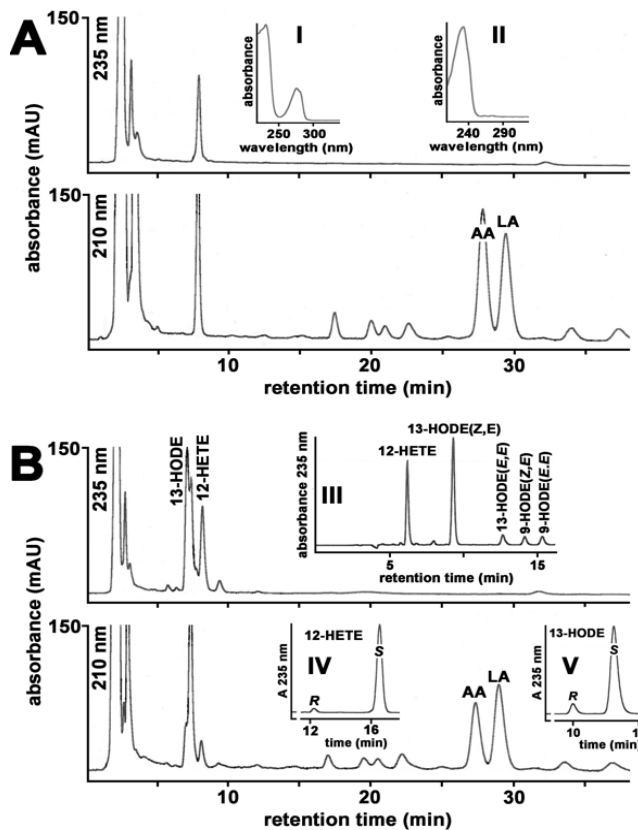


Abbildung 18: Membranoxygenaseaktivität von tupALOX15a (Quelle: Schäfer et al. 2020). Aliquots (50 μ l) des Lysatüberstandes von tupALOX15a wurden in 0,5 ml PBS für 5 min bei Raumtemperatur mit submitochondrialen Partikeln (1,4 mg/ml Membran-Endkonzentration) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaBH₄ gestoppt, die Membranlipide wurden extrahiert und verseift (siehe Kapitel 2). Nach Zugabe von 35 μ l konzentrierter Essigsäure zum Hydrolyseansatz wurde präzipitiertes Material abzentrifugiert und die Aliquots mittels RP-HPLC analysiert. A) Nicht-Enzym-kontrollansatz (Zugabe von PBS anstatt Lysatüberstand zum Inkubationsansatz), B) tupALOX15a (Zugabe von 50 μ l tupALOX15a Lysatüberstand zum Inkubationsansatz). Inset I: UV-Spektrum des HPLC-Peaks, der in Panel A (oben) mit einer Retentionszeit von ca. 8 min eluiert wurde. Inset II: UV-Spektrum des HPLC-Peaks der in Panel B (oben) mit einem Standard von 13-HODE eluiert wurde. Inset III: NP-HPLC der konjugierten Diene, die mittels RP-HPLC im Retentionszeitintervall von 6–10 min (Panel B oben) präpariert wurden (siehe Kapitel 2). Inset IV: CP-HPLC von 12-HETE, das mittels NP-HPLC (Inset III) präpariert wurde. Inset V: CP-HPLC von 13-HODE, das mittels NP-HPLC (Inset III) präpariert wurde. Abkürzungen: AA: Arachidonsäure; LA: Linolsäure; 9-HODE: 9-Hydroxy-10E,12Z-Octadecadiensäure; 12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure; 13-HODE: 13-Hydroxy-9Z,11E-Octadecadiensäure.

Inset II in Abbildung 18 A zeigt dieses UV-Spektrum für jenen Peak, der mit einem authentischen Standard von 13-HODE co-chromatografierte. Diese beiden dominanten Produktpeaks, die mit Standards von 13-HODE und 12-HETE co-chromatografierten, waren in der Nicht-Enzymkontrollinkubation nicht zu sehen und mussten damit bei der Interaktion von tupALOX15a mit den Biomembranen entstanden sein. Verfolgt man auch dieses Chromatogramm bei 210 nm, konnten ebenfalls die beiden Polyenfettsäurepeaks AA und LA detektiert werden. Die entsprechenden Peaks waren jedoch deutlich kleiner als bei der Nicht-Enzymkontrollinkubation. Diese Daten deuten daraufhin, dass LA und AA während der Interaktion von tupALOX15a mit den Biomembranen metabolisiert worden waren. Um den Oxygenierungsgrad der Membranlipide zu quantifizieren, wurden zunächst die Mengen der detektierten oxygenierten (235 nm) und nicht-oxygenierten (210 nm) Polyenfettsäuren quantifiziert und der Prozentsatz der oxygenierten Polyenfettsäuren am gesamten Polyenfettsäurebestand der Modellmembranen (oxygenierte + nichtoxygenierte

Fettsäurederivate) berechnet. Dabei ergab sich für die tupALOX15a Inkubation ein Wert von 5,7 %. Das bedeutet, dass nach der Inkubation der Biomembranen mit tupALOX15a ca. sechs von 100 Polyenfettsäureresten als oxygenierte Derivate vorlagen. Bei der entsprechenden Nicht-Enzymkontrollinkubation lag dieser Wert unter 0,01 %. Dies zeigt, dass native submitochondriale Membranen kaum oxygenierten Polyenfettsäuren enthalten. Nach Behandlung mit tupALOX15a konnten jedoch signifikante Mengen an oxygenierte Polyenfettsäuren nachgewiesen werden. Ähnliche Untersuchungen wurden im Anschluss mit tupALOX15c durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Auch hier konnten nach der Behandlung der Biomembranen mit dem Enzym konjugierte Diene nachgewiesen werden, wobei ein Oxygenierungsgrad der Membranlipide von nur 1,6 % berechnet wurde. Für die Interpretation dieser Daten muss darauf hingewiesen werden, dass gleiche AA-Oxygenaseaktivitäten von tupALOX15a und tupALOX15c für die Membranoxygenierungsansätze eingesetzt wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass tupALOX15a eine höhere Membranoxygenaseaktivität aufweist als tupALOX15c. Um nähere Informationen zu den bei der Membranoxygenierung entstandenen Oxygenierungsprodukten zu erhalten, wurden die konjugierten Diene, die im Bereich zwischen 7–10 min in der RP-HPLC eluierten, präpariert und mittels NP-HPLC (Inset III) sowie CP-HPLC (Insets IV und V) analysiert. Aus diesen Analysen ergab sich, dass 12S-HETE und 13S-HODE(Z,E) die dominanten Oxygenierungsprodukte darstellen. 12R-HETE, 13R-HODE(Z,E), 9-HODE(E,Z), 9-HODE(E,E) und 13-HODE(E,E) konnten nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Dieses spezifische Muster an Membranoxygenierungsprodukten deutet auf eine direkte Interaktion der tupALOX15a mit den Membranlipiden hin. Um zu beweisen, dass es sich bei den nachgewiesenen oxygenierten Polyenfettsäuren nicht um freie, sondern um veresterte Fettsäurederivate handelt, wurden Aliquots der nicht-hydrolysierten Lipidextrakte dem gleichen Analyseprotokoll unterworfen. Dabei konnten keine signifikanten Mengen an oxygenierten Polyenfettsäuren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung: Beide tupALOX15-Isoformen sind in der Lage, die Esterlipide von Biomembranen direkt zu oxygenieren. Dabei ist die Membranoxygenaseaktivität von tupALOX15a größer als die von tupALOX15c, wenn gleiche Arachidonsäureoxygenaseaktivitäten der beiden Enzyme zum Membranoxygenaseassay eingesetzt wurden. 12S-HETE und 13S-HODE konnten erwartungsgemäß als dominante Produkte der Membranoxygenaseaktivität identifiziert werden.

3.2 Evolutionäre Aspekte von Säugetier-ALOX15- und ALOX15B-Orthologen

ALOX-Isoformen kommen sowohl bei hochentwickelten Tieren als auch bei Pflanzen weit verbreitet vor. Bei niederen Organismen sind diese Enzyme zwar auch vereinzelt nachweisbar, werden aber deutlich seltener exprimiert. Für die ALOX15-Orthologen der Säugetiere konnte in bisherigen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Reaktionsspezifität dieser Enzyme von der evolutionären Stellung (Evolutionshypothese der Säugetier-ALOX15-Orthologen) der Säugetiere abhängt (Kuhn et al. 2018; Heydeck et al. 2022). Leider war zu Beginn der vorliegenden Arbeit die experimentelle Basis für die Evolutionshypothese noch nicht sehr fundiert, da bis dahin weniger als 20 ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetiere funktionell charakterisiert worden waren. Deshalb bestand der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit darin, zusätzliche experimentelle Daten zur Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen zu sammeln und in das Evolutionskonzept einzuordnen. Weiterhin sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob für die Reaktionsspezifität der Säugetier-ALOX15B-Orthologen eine ähnliche Abhängigkeit der Reaktionsspezifität der Enzyme von der evolutionären Stellung der Tiere besteht.

3.2.1 Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes auf ALOX15-Orthologe verschiedener Säugetiere

ALOX15-Orthologe von Säugetieren können hinsichtlich ihrer Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- i) Enzyme, die dominant eine 15-Lipoxygenierung der Arachidonsäure katalysieren. Bei diesen Enzymen ist 15-H(p)ETE das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung und dazu gehören unter anderem die ALOX15-Orthologen des Menschen, der großen Menschenaffen (Chaitidis et al. 2013; Adel et al. 2015) und des Kaninchens (Bryant et al. 1982).
- ii) Enzyme, die eine 12-Lipoxygenierung der Arachidonsäure katalysieren. Bei diesen Enzymen ist 12-H(p)ETE das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung und zu dieser Enzymklasse gehören unter anderem die ALOX15-Orthologen der Maus (Chen et al. 1994a; Freire-Moar et al. 1995), des Schweins (Yoshimoto, 1972, zitiert nach Yokoyama et al. 1986) und der Ratte (Watanabe et al. 1993; Pekárová et al. 2015).

Das Triadenmodell ist ein theoretisches Konzept, welches die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten der Säugetier-ALOX15-Orthologen erklärt. Dieses Modell besagt, dass die Größe der Seitenketten der Aminosäuren, die sich an den

Positionen 353, 418+419 und 593 der Primärstruktur der ALOX15-Orthologen befinden, für die Reaktionsspezifität wichtig sind. Eine ausführlichere Beschreibung des Triadenkonzeptes ist in Kapitel 1.2.1 gegeben.

3.2.1.1 Experimentelle Strategie

Zu Beginn dieser Arbeit basierte das Triadenkonzept auf der funktionalen Charakterisierung der Reaktionsspezifität von weniger als 20 verschiedenen Säugetier-ALOX15-Orthologen, die als native und/oder rekombinante Enzyme exprimiert und deren Reaktionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung experimentell bestimmt wurden (Adel et al. 2016). Die Verteilung der bis dahin funktionell charakterisierten Enzyme über die verschiedenen Säugetierklassen war jedoch eher zufällig, sodass für viele Säugetierklassen gar keine funktionellen Daten verfügbar waren. Die zweite Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, die experimentelle Basis für das Triadenkonzept zu erweitern. Dabei sollte vor allem untersucht werden, ob die ALOX15-Orthologen von bisher nicht charakterisierten Säugetieren ebenfalls dem Triadenkonzept folgen. Zu diesem Zweck wurden zunächst die ALOX15-cDNA-Sequenzen von Vertretern bisher nicht untersuchter Säugetierklassen aus den verfügbaren Datenbanken („ENSEMBL“ unter www.ensembl.org und das „National Center for Biotechnology Information“ unter www.ncbi.nlm.nih.gov/; Stand: 01.2020) extrahiert. Die kodierenden cDNA-Bereiche wurden chemisch synthetisiert, in pro- und/oder eukaryontische Expressionsvektoren inkloniert und die Enzyme als N-terminale his-tag-Fusionsproteine in *E. coli* (prokaryotische Expression), HEK293-Zellen oder Sf9-Zellen (eukaryontische Expression) exprimiert. Nachdem ein bestimmtes Enzym ausgewählt worden war, wurde zunächst versucht, es in *E. coli* zu exprimieren. Wenn das Enzym in diesem System nicht hinreichend gut exprimiert wurde oder wenn es als katalytisch inaktives Protein in sogenannten „Inclusion Bodies“ vorlag, wurde versucht, das Enzym in HEK293-Zellen zu exprimieren. Schlug auch dieser Versuch fehl, wurde versucht, das Enzym im Baculovirus-Insektzell-System (Sf9-Zellen) zu exprimieren. War auch das nicht möglich, wurde nach der ALOX15-cDNA einer nahe verwandten Säugetierspezies gesucht, um diese als funktionelles Enzym zu exprimieren. War die Proteinexpression in einem der drei beschriebenen Expressionssysteme erfolgreich, wurden die exprimierenden Zellen mit Ultraschall lysiert. Aliquots der Lysatüberstände konnten als Enzymquelle für *In-vitro*-Aktivitätsassays (AA als Substrat, siehe Abschnitt 2.2.6 ff.) eingesetzt werden. Die dominanten AA-Oxygenierungsprodukte (12-HETE, 15-HETE) wurden mittels RP-HPLC

separat voneinander quantifiziert. Somit konnte die Reaktionsspezifität der AA-Oxygenierung durch die bisher nicht charakterisierten ALOX-Isoformen ermittelt werden.

In einem zweiten Schritt des experimentellen Protokolls wurden durch duale Aminosäure-alignments mit der humanen ALOX15 die Triadendeterminanten der neuen ALOX15-Orthologen identifiziert und Mutageneseuntersuchungen an diesen Aminosäuren durchgeführt. Für zu erwartende AA-12-lipoxygenierende Enzyme wurden in Analogie zu den Experimenten mit den *T. belangeri*-ALOX15-Orthologen (siehe Abschnitt 3.1.5) Punktmutanten hergestellt, bei denen die Triadendeterminanten große Aminosäureseitenketten (z.B. Ile, Met) tragen. Anschließend sollten die so induzierten Veränderungen in der Reaktionsspezifität der Enzyme rückgängig gemacht werden, indem an der BG1-Determinante (Phe353) eine kleine Aminosäure (vorzugsweise Alanin) eingeführt wurde. Alle Enzymmutanten wurden ebenfalls als N-terminale his-tag-Fusionsproteine exprimiert und ihre Reaktionsspezifität mit AA wurde durch *In-vitro*-Aktivitätsassays ermittelt. Die während der *In-vitro*-Aktivitätsassays gebildeten dominanten Oxygenierungsprodukte (12-HETE, 15-HETE) wurden mittels RP-HPLC analysiert und ihr relativer prozentualer Anteil an der gesamten Produktmischung quantifiziert.

Zusammenfassung: Um zu überprüfen, ob das Triadenkonzept für alle Säugetier-ALOX15-Orthologen anwendbar ist, sollten die ALOX15-cDNA-Sequenzen ausgewählter Säugetierspezies, die unterschiedliche Säugetierklassen repräsentieren, aus Datenbanken extrahiert und die entsprechenden Enzyme als rekombinante N-terminale his-tag-Fusionsproteine exprimiert werden. Nach der Oxygenierung von Arachidonsäure durch die rekombinanten Enzyme sollte das Muster der entstandenen Oxygenierungsprodukte mittel RP-HPLC quantifiziert werden.

3.2.1.2 Reaktionsspezifitäten gezielt ausgewählter Säugetier-ALOX15-Orthologe

Säugetiere (*Mammalia*) werden in zwei große Untergruppen (*Prototheria*, *Theria*) unterteilt (Abbildung 19). Zu den *Prototheria* gehören die Kloakentiere (*Monotremata*), die nur zwei Artenfamilien umfassen (*Tachyglossidae* und *Ornithorhynchidae*). *Theria* können ihrerseits wieder in *Metatheria* und *Eutheria* klassifiziert werden. *Metatheria* können entsprechend ihres Lebensraumes in *Australodelphia* (Australien) und *Ameridelphia* (leben überwiegend in Nord- und Südamerika) unterschieden werden. Die Unterklasse der *Eutheria* kann in vier unterschiedliche Überordnungen (*Xenarthra*, *Afrotheria*, *Euarchontoglires*, *Laurasiatheria*) aufgegliedert werden. Zu den *Eutheria* gehören 95 % der derzeit lebenden Säugetiere. *Laurasiatheria* und *Euarchontoglires* sind die artenreichsten Überordnungen der *Eutheria*.

Laurasiatheria können aufgrund gemeinsamer molekulargenetischer Eigenschaften von *Euarchontoglires* abgegrenzt werden.

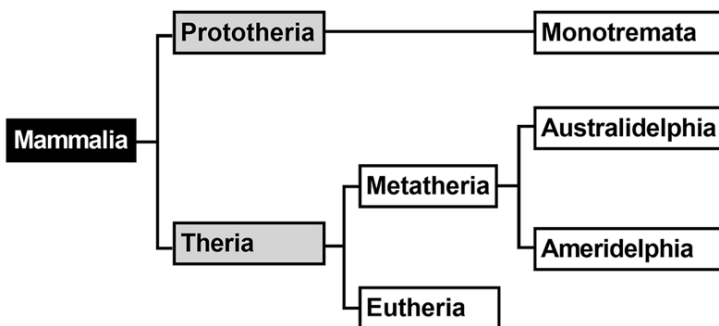


Abbildung 19: Vereinfachte Klassifizierung der Säugetiere (Quelle: modifiziert nach Heydeck et al. 2022). Erläuterungen siehe Text.

Der Name *Laurasiatheria* deutet darauf hin, dass diese Tiere ihren Ursprung auf dem früheren nördlichen Superkontinent Laurasia hatten. Dieser Superkontinent entstand vor ca. 200 Mio. Jahren, als aufgrund der Plattentektonik die einheitliche Landmasse der damaligen Erde (Pangea) zerbrach und dabei der nördliche Superkontinent Laurasia und der südliche Superkontinent Gondwana entstanden. Das Schwestertaxon der *Laurasiatheria* sind die *Euarchontoglires*, zu denen auch der Mensch und andere Primaten gehören. Zusammen mit den *Laurasiatheria* bilden die *Euarchontoglires* das Taxon der Boreoeutheria. Die gemeinsamen Vorfahren von *Laurasiatheria* und *Euarchontoglires* lebten vermutlich vor ca. 90 Mio. Jahren auf dem Superkontinent Laurasia, der zu dieser Zeit die größte Landmasse auf der Nordhalbkugel repräsentierte. Dieser Superkontinent wurde durch das Thetysmeer vom südlichen Superkontinent Gondwana getrennt.

Bisherige Untersuchungen zur Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen haben gezeigt, dass diese Enzyme in AA-12-lipoxygenierende und AA-15-lipoxygenierende Proteine eingeteilt werden können (siehe Abschnitt 3.2.1). Um die ALOX15-Orthologen weiterer ausgewählter Säugetiere funktionell einer der beiden Klassen zuordnen zu können, wurden zunächst die früheren Ergebnisse zur Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen des Menschen und der Maus bestätigt. Dafür wurden die beiden Enzyme als N-terminale his-tag-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und die Produkte der AA-Oxygenierung mittels RP-HPLC analysiert. Bei der Verwendung des menschlichen Enzyms konnte erwartungsgemäß 15-HETE als Hauptprodukt identifiziert werden. Das Nebenprodukt war 12-HETE. Umgekehrt wurde 12-HETE als Hauptprodukt der AA-Oxygenierung durch die Maus-ALOX15 synthetisiert, während 15-HETE als Nebenprodukt gebildet wurde. Diese Daten (Abbildung 20) bestätigen frühere Ergebnisse zur Reaktionsspezifität der beiden Enzyme.

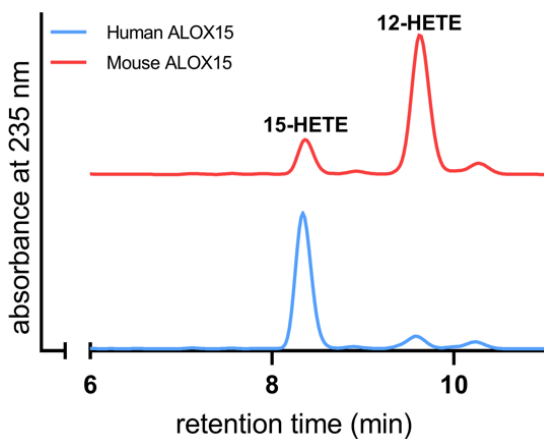


Abbildung 20: RP-HPLC-Analyse der dominanten AA-Oxygenierungsprodukte, die durch die ALOX15-Orthologen des Menschen und der Maus gebildet wurden (Quelle: Untersuchungen der AG-Kühn). Die ALOX15-Orthologen wurden als N-terminale his-tag-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden für *In-vitro*-Aktivitätsassays (siehe Kapitel 2) eingesetzt. Die Oxygenierungsprodukte wurden mit NaBH₄ reduziert und mittels RP-HPLC analysiert. Die chemische Struktur der beiden Hauptprodukte wurde durch Co-Chromatografie mit authentischen Standards geschlossen (Absorption bei 235 nm). (12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure, 15-HETE: 15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure).

Anschließend wurden die Lysatüberstände der ALOX15-Orthologen anderer ausgewählter Säugetiere für die *In-vitro*-ALOX15-Aktivitätsassays verwendet und die dabei erhaltenen Resultate in Tabelle 31 zusammengefasst. Die überwiegende Mehrzahl der für diese Arbeit ausgewählten Enzyme trug das Triadenmotiv Phe-Val+Val-Ile. Bei allen Orthologen war die Borngräber-1-Determinante (BG1-Determinante) (Phe353 beim menschlichen Enzym) durch ein großes Phe besetzt. An den beiden Sloane-Determinanten (SLO, Ile418+Met419) waren zwei kleine Aminosäuren (Val+Val) zu finden, während an der Borngräber-2-Position (BG2, Ile593 beim menschlichen Enzym) raumfüllende Aminosäuren (Ile bzw. Leu) positioniert waren. Da vorhergehende Untersuchungen gezeigt haben, dass die BG1- und die SLO-Determinanten entscheidend für die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen sind (Sloane et al. 1991; Borngräber et al. 1999) und die BG2-Determinante nur modifizierend wirkt, konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen vorwiegend auf die BG1- und die SLO-Determinanten. Wie aus der Besetzung der Haupttriadendeterminanten (BG1+SLO) abgeleitet werden konnte, sollte die Mehrzahl der neu charakterisierten Enzyme als AA-12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologen klassifiziert werden. Diese Vorhersage wurde durch die funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Enzyme bestätigt.

Tabelle 31: Reaktionsspezifitäten der ausgewählten Säugetier-ALOX15-Orthologen (Quelle: eigene Darstellung). Die ALOX15-Orthologen der hier ausgewählten Säugetiere wurden als rekombinante N-terminale his-tag-Fusionsproteine in einem der drei spezifizierten Expressionssysteme exprimiert. Zelllysatüberstände wurden als Enzymquelle für *In-vitro*-Aktivitätsassays eingesetzt und die dabei gebildeten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte mittels RP-HPLC quantifiziert (siehe Kapitel 2). Anzahl der Messwerte pro Enzym 3–7, Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. Abkürzungen: BG1: Borngräber-1-Determinante; SLO: Sloane-Determinante; H: Daten erstellt von Frau Dr. D. Heydeck, 12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure, 15-HETE: 15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure. Aminosäurecode: Phenylalanin (Phe/F); Valin (Val/V).

Taxon	Spezies	Determinanten		Produkte (%)	
		BG1	SLO	15-HETE	12-HETE
Euarchontoglires	<i>Colobus angolensis palliatus (E. coli)</i>	F	VV	2,8 \pm 2,6	97,2 \pm 2,6
	<i>Aotus nancymae (E. coli) H</i>	F	VV	8,2 \pm 0,2	91,8 \pm 0,2
	<i>Saimiri boliviensis (E. coli)</i>	F	VV	0,9 \pm 2,1	99,1 \pm 2,1
	<i>Callithrix jacchus (Sf9) H</i>	F	VV	1,2 \pm 1,5	98,8 \pm 1,5
	<i>Carlito syrichta (HEK293)</i>	F	VV	3,9 \pm 0,1	96,1 \pm 0,1
	<i>Ictidomys tridecemlineatus (E. coli)</i>	F	VV	0,5 \pm 0,6	99,5 \pm 0,6
Laurasiatheria	<i>Condylura cristata (E. coli)</i>	F	VV	5,1 \pm 0,5	94,9 \pm 0,5
	<i>Ailuropoda melanoleuca (E. coli)</i>	F	VV	4,4 \pm 5,1	95,6 \pm 5,1
Afrotheria	<i>Loxodonta africana (E. coli)</i>	F	VV	6,3 \pm 5,5	93,7 \pm 5,5
	<i>Chrysochloris asiatica (HEK293)</i>	F	VV	4,3 \pm 0,7	95,7 \pm 0,7
	<i>Elephantulus edwardi (E. coli)</i>	F	VV	0,4 \pm 0,5	99,6 \pm 0,5

Zusammenfassung: Die in dieser Arbeit neu charakterisierten Säugetier-ALOX15-Orthologen trugen alle das Triadenmotiv Phe-Val+Val-Ile (Leu). Die Sequenzdaten erlaubte die Vorhersage, dass es sich bei diesen Enzymen um AA-12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe handeln sollte. Diese Vorhersage konnte experimentell für alle ausgewählten ALOX15-Orthologen bestätigt werden.

3.2.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese der Triadendeterminanten

Die unter Abschnitt 3.2.1.2 beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass alle ausgewählten ALOX15-Orthologen AA-12-lipoxygenierende Enzyme waren (Tabelle 31). Obwohl diese Eigenschaft auf der Basis des Triadenmodells vorhergesagt werden konnte, lassen diese Daten nicht die Schlussfolgerung zu, dass das Triadenkonzept vollumfänglich auf diese Enzyme anwendbar ist. Um das zu überprüfen, wurden für jedes Enzym Mutageneseuntersuchungen durchgeführt, bei denen die Haupttriadendeterminanten zielgerichtet verändert wurden. Dabei wurde der Mutagenesestrategie gefolgt, die bereits für die ALOX15-Isoformen aus *T. belangeri* (siehe Abschnitt 3.1.5) angewandt wurde. Zunächst wurde das erste Val des Phe-Val+Val Motivs in ein Isoleucin (Ile) umgewandelt, weil an dieser Stelle bei der AA-15-lipoxygenierenden humanen ALOX15 ein Ile steht. Für alle hier untersuchten Enzyme sank dadurch der 12-HETE-Anteil in der Produktmischung ab (Tabelle 32). Anschließend wurde zusätzlich das zweite Valin des Sequenzmotivs

Phe-Val+Val zu Methionin (Met) mutiert, da an dieser Stelle bei der humanen ALOX15 ein Methionin lokalisiert ist. Dadurch wurde bei den meisten Enzymen eine weitere Senkung des 12-HETE-Anteils an der Produktmischung erreicht (SLO doppelt in Tabelle 32). Alle Val418Ile+Val419Met-Doppelmutanten waren dominant AA-15-lipoxygenierende Enzyme (Tabelle 32). Anschließend wurde das große Phe des Phe-Val+Val-Sequenzmotivs in kleinere Aminosäuren (Ile bzw. Ala) umgewandelt. Entsprechend des Triadenkonzeptes sollte dieser Aminosäureaustausch die durch die vorherigen Mutationen induzierten Veränderungen in der Reaktionsspezifität der Enzyme zumindest teilweise rückgängig machen.

Tabelle 32: Reaktionsspezifitäten der Triadenmutanten ausgewählter Säugetier-ALOX15-Orthologen (Quelle: eigene Darstellung). Die ALOX15-Orthologen der ausgewählten Säugetiere und deren Triadenmutanten wurden als rekombinante N-terminale his-tag-Fusionsproteine in einem der drei spezifizierten Expressionssysteme exprimiert. Zellysatisüberstände wurden als Enzymquelle für *In-vitro*-Aktivitätsassays eingesetzt. Die dabei gebildeten AA-Oxygenierungsprodukte wurden mittels RP-HPLC quantifiziert (siehe Kapitel 2). Der quantitative Anteil von 12-HETE an der Produktmischung (in %) ist für jede Enzymvariante angegeben, wobei für jede Mutante Doppelwerte gemessen wurden. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind angegeben. SLO: Sloane-Determinanten (Ile418-Met419 bei humanen ALOX15), BG1: Borngräber-1-Determinante (Phe353 bei humaner ALOX15), n.d.: not determined, H: in Kooperation mit Dr. D. Heydeck, Aminosäurecode: Alanin (Ala/A), Isoleucin (Ile/I), Methionin (Met/M), Phenylalanin (Phe/F), Valin (Val/V).

Spezies	Expression in	Anteil 12-HETE (%)			
		Wildtyp	Mutanten		
			SLO einzeln	SLO doppelt	BG1+ SLO doppelt
Phe-Val+Val	Phe-Ile+Val	Phe-Ile+Met	Leu*/Ala#-Ile+Met		
<i>Colobus angolensis palliatus</i> (H)	<i>E. coli</i>	97,2 \pm 2,6	n.d.	15,1 \pm 0,2	99,3 \pm 0,2*
<i>Aotus nancymae</i> (H)	<i>E. coli</i>	91,8 \pm 0,2	48,4 \pm 5,8	20,7 \pm 7,6	100,0 \pm 0,0 [#]
<i>Saimiri boliviensis</i> (H)	<i>E. coli</i>	99,1 \pm 2,1	87,3 \pm 0,3	36,0 \pm 9,5	98,6 \pm 0,8 [#]
<i>Callithrix jacchus</i> (H)	Sf9	98,8 \pm 1,5	62,4 \pm 0,2	23,5 \pm 5,3	95,6 \pm 0,6 [#]
<i>Carlito syrichta</i> (H)	HEK293	96,1 \pm 0,1	46,4 \pm 7,1	5,4 \pm 0,1	95,1 \pm 0,6*
<i>Ictidomys tridecemlineatus</i> (H)	<i>E. coli</i>	99,5 \pm 0,6	67,1 \pm 0,3	17,2 \pm 2,8	97,8 \pm 0,8 [#]
<i>Condylura cristata</i> (H)	<i>E. coli</i>	94,9 \pm 0,5	n.d.	8,3 \pm 0,1	96,7 \pm 0,4*
<i>Ailuropoda melanoleuca</i> (H)	<i>E. coli</i>	95,6 \pm 5,1	70,9 \pm 1,4	8,2 \pm 0,6	98,8 \pm 1,0 [#]
<i>Loxodonta africana</i>	<i>E. coli</i>	93,7 \pm 5,5	18,8 \pm 2,6	29,8 \pm 4,8	96,7 \pm 1,3 [#]
<i>Chrysochloris asiatica</i> (H)	HEK293	95,7 \pm 0,7	38,8 \pm 1,2	14,4 \pm 1,9	95,9 \pm 0,1*
<i>Elephantulus edwardii</i> (H)	<i>E. coli</i>	99,6 \pm 0,5	n.d.	5,8 \pm 0,2	96,6 \pm 0,3*

Zur Erreichung des Ziels wurden zunächst die Phe353Leu Mutanten (* in Tabelle 32) hergestellt und bei einigen Enzymen reichte diese Punktmutation bereits aus, um die durch den Aminosäureaustausch (Val418Ile+Val419Met) induzierten Veränderungen der Reaktionsspezifität vollständig rückgängig zu machen.

Bei anderen Enzymen war das nicht der Fall. Für diese ALOX15-Orthologen wurde die Phe353Ala-Mutante hergestellt. Da Alanin eine deutlich kleinere Seitenkette trägt als Leucin, war auf der Basis des Triadenkonzeptes anzunehmen, dass bei den Enzymen, bei denen durch die Phe353Leu-Mutation nur eine teilweise Reversibilität beobachtet wurde, die durch die Phe353Ala induzierten Veränderungen deutlicher ausfallen sollten. In der Tat waren fast alle Enzyme mit einem Phe353Ala-Austausch (# in Tabelle 32) dominant AA-12-lipoxygenierende Varianten. Beispielhaft zeigen die überlagerten Chromatogramme der ALOX15-Orthologen des Dreizehnstreifenhörnchens, die Veränderungen in der Reaktionsspezifität der Enzymmutanten an den Sloane-Positionen (Abbildung 21) und an der Borngräber-I-Position (Abbildung 22).

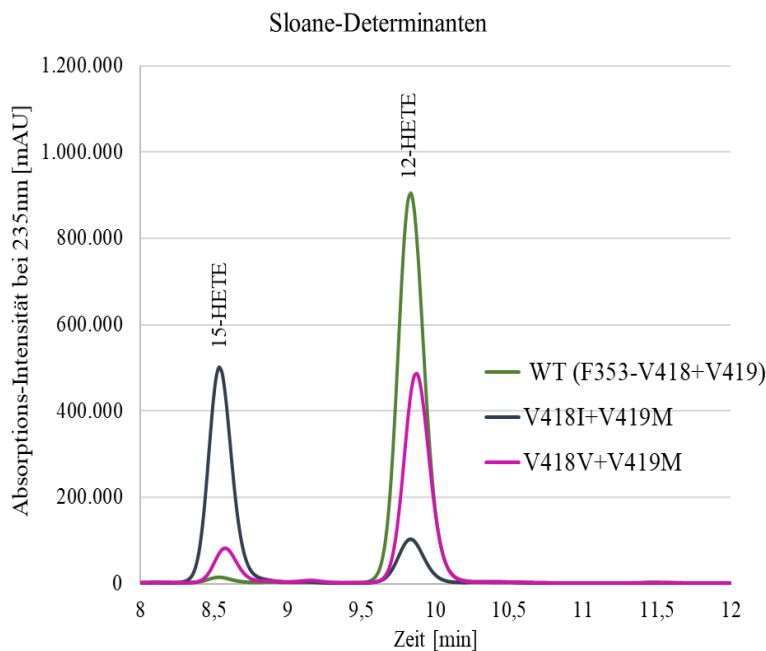


Abbildung 21: RP-HPLC-Chromatogramme der AA-Oxygenierungsprodukte der Wildtyp-ALOX15 des Dreizehnstreifenhörnchens und seiner Sloane-Mutanten (Quelle: eigene Untersuchungen). Die ALOX15-Orthologen wurden in *E. coli* exprimiert und mit Arachidonsäure (100 μ M) für 10 min inkubiert. Die während der Inkubationszeit gebildeten konjugierten Diene wurde mittels RP-HPLC (Absorption bei 235 nm) quantifiziert (siehe Kapitel 2); 12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,-10E,14Z-Eicosatetraensäure, 15-HETE: 15-hydroxy-5Z,8Z,-11Z,13E-Eicosatetraensäure, Aminosäurecode: Alanin (Ala /A), Isoleucin (Ile /I), Methionin (Met /M), Phenylalanin (Phe /F), Valin (Val /V).

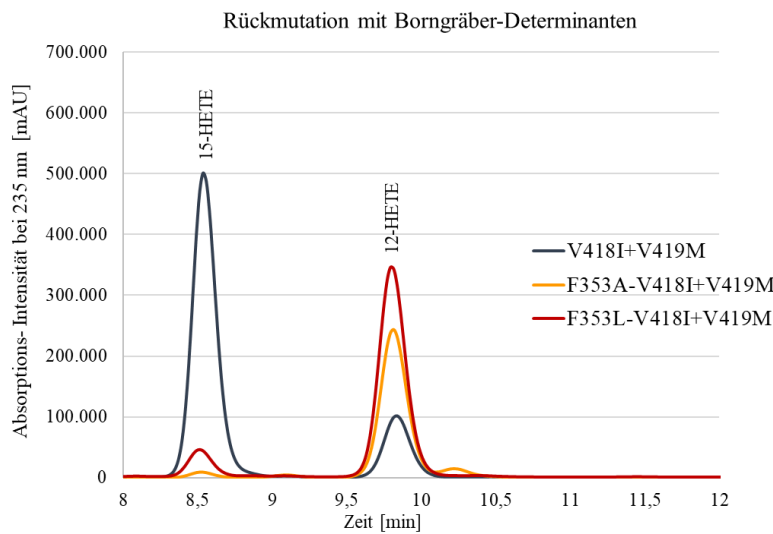


Abbildung 22: RP-HPLC-Chromatogramme der AA-Oxygenierungsprodukte der V418I+V419M-Doppelmutante der ALOX15 vom Dreizehnstreifenhörnchen und deren F353L- bzw. F353A-Dreifachmutanten (Quelle: eigene Untersuchungen). Die BG-1-Mutanten belegen die Rückmutation vom 15-lipoxygenierenden- in ein 12-lipoxygenierendes Enzym. Die ALOX15-Mutanten wurden in *E. coli* exprimiert und mit Arachidonsäure (100 μ M) für 10 min inkubiert. Nach Hydrolyse der Lipidextrakte wurden die gebildeten konjugierten Diene durch RP-HPLC (Absorption bei 235 nm) quantifiziert (siehe Kapitel 2), 12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure, 15-HETE: 15-hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-Eicosatetraensäure, Aminosäurecode: Alanin (Ala /A), Isoleucin (Ile /I), Methionin (Met /M), Phenylalanin (Phe /F), Valin (Val /V).

Zusammenfassung: Ortsgerichtete Mutagenese der Triadendeterminanten führte zu den vorhergesagten Veränderungen in der Reaktionsspezifität der neu untersuchten ALOX15-Orthologen. Die Einführung großer Aminosäuren an den Sloane-Positionen (Val418+Val419 zu Val418Ile+Val419Met) erhöhte den Anteil von 15-HETE im Produktmuster und führte damit zu einer Humanisierung der Produktspezifität der Enzyme. Diese Veränderung konnte durch das zusätzliche Einführen einer kleineren Aminosäure (Leu oder Ala) an der Borngräber-1-Position (Phe-353 zu Phe353Leu oder Phe353Ala) komplett rückgängig gemacht werden.

3.2.2 Die Evolutionshypothese der ALOX15-Reaktionsspezifität

Entsprechend der Evolutionshypothese der ALOX15-Spezifität (Adel et al. 2016) exprimieren Säugetiere, die evolutionär weiterentwickelt sind als Gibbons, AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Das trifft auch auf die ALOX15-Orthologen von *H. sapiens* (Sigal et al. 1988), *H. neandertalensis* und *H. denisovan* (Adel et al. 2016) zu. Auch die ALOX15-Orthologen der großen Menschenaffen (Vogel et al. 2010; Johannesson et al. 2010; Kutzner et al. 2017; Kuhn et al. 2018; Kozlov et al. 2019) exprimieren AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe. Im Gegensatz dazu wandeln die ALOX15-Orthologen von Säugetieren, die im evolutionären Rang unterhalb von Gibbons eingruppiert sind, Arachidonsäure dominant zu 12-HETE um. Das trifft für die ALOX15-Orthologen der Maus (Chen et al. 1994a; Freire-Moar et al. 1995), der Ratte

(Watanabe et al. 1993; Pekárová et al. 2015), des Schweins (Yoshimoto, 1972, zitiert nach Yokoyama et al. 1986) aber auch für die Enzyme von Makaken und Pavianen (Vogel et al. 2010; Johannesson et al. 2010; Kozlov et al. 2019) zu. Gibbons (*N. leucogenys*) stellen ein Übergangstaxon dar, da deren Vertreter ALOX15-Orthologe mit ausgeprägter dualer Reaktionsspezifität exprimieren (Adel et al. 2016; Heydeck et al. 2022).

3.2.2.1 Neu charakterisierte ALOX15-Orthologe folgen der Evolutionshypothese

Obwohl eine große Anzahl von Säugetier-ALOX15-Orthologen der Evolutionshypothese folgen, waren zu Beginn dieser Arbeit zwei Säugetierspezies (Kaninchen, Ord's Kängururatte) bekannt (Bryant et al. 1982; Sigal et al. 1990; Kuhn et al. 2018; Kozlov et al. 2019), die sich nicht an die Evolutionshypothese hielten. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit neu charakterisierten ALOX15-Orthologen der Evolutionshypothese folgen oder als Ausnahmen dagegen verstoßen, wurden die ausgewählten Säugetiere evolutionär klassifiziert und überprüft, ob sie oberhalb oder unterhalb des Gibbons eingruppiert werden können. Da es sich bei den neu charakterisierten ALOX15-Orthologen ausnahmslos um AA-12-lipoxygenierende Enzyme handelte (Tabelle 32) und da die entsprechenden Tiere im evolutionären Ranking alle unterhalb des Gibbons einzuordnen waren, konnte hergeleitet werden, dass alle in dieser Arbeit funktionell neu charakterisierten Enzyme der Evolutionshypothese entsprachen. Damit konnte die Evolutionshypothese bestätigt und auf eine breitere experimentelle Basis gestellt werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zur funktionellen Charakterisierung von Säugetier-ALOX15-Orthologen sind Bestandteil eines größeren Forschungsprojektes, an dem weitere Kollegen (F. Reisch, Dr. D. Heydeck, S. Stehling) der Arbeitsgruppe mitgearbeitet haben. Einige dieser Ergebnisse werden in der Dissertation von F. Reisch vorgestellt. Die hier präsentierten Resultate, die von F. Reisch gesammelten Daten und die von Frau Dr. D. Heydeck bzw. von Frau S. Stehling erhaltenen Resultate zu ALOX15-Orthologen anderer Säugetiere sind Bestandteil einer gemeinsamen Publikation. In Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit werden die hier vorgestellten Resultate in den Kontext der von den anderen Kollegen erhaltenen Ergebnisse gestellt und alle Daten gemeinsam diskutiert. Das trifft vor allem auf die wenigen Säugetierspezies zu, deren ALOX15-Orthologen sich nicht an die Evolutionshypothese halten. Ausnahmen von der Evolutionshypothese wurden bei den in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Enzymen nicht identifiziert.

Zusammenfassung: Alle in dieser Arbeit funktionell charakterisierten Säugetier ALOX15-Orthologen sind Arachidonsäure-12-lipoxygenierende Enzyme und folgen aufgrund ihrer evolutionären Einordnung unterhalb des Gibbons dem Evolutionskonzept der ALOX15-Reaktionsspezifität.

3.2.3 Reaktionsspezifität der Säugetier ALOX15B-Orthologen

Unter den humanen ALOX-Isoformen ist die ALOX15B neben der ALOX15 das zweite AA-15-lipoxygenierende Enzym. Ähnlich wie für die ALOX15 gibt es gravierende Unterschiede in der Reaktionsspezifität zwischen der humanen und murinen ALOX15B. Während das humane Enzym AA fast ausschließlich zu 15-H(p)ETE umwandelt (Brash et al. 1997), ist die Maus-Alox15b ein AA-8-lipoxygenierendes Enzym (Jisaka et al. 1997; Fürstenberger et al. 2002). Unklar war bislang, ob ALOX15B-Orthologe anderer Säugetiere sich wie die humane ALOX15B oder wie das murine Enzymortholog verhalten und ob es, ähnlich wie bei der ALOX15, eine Abhängigkeit der Reaktionsspezifität von der evolutionären Stellung der Tiere gibt. Jisaka et al. haben durch Mutageneseuntersuchungen an der Maus-Alox15b festgestellt, dass die Reaktionsspezifität des Enzyms bei einem Ser602Cys- bzw. Ser602Ala-Austausch kaum beeinflusst wird. Wie das murine Wildtyp-Enzym katalysierten auch die beiden Einfachmutanten eine dominante AA-8-Lipoxygenierung. Dagegen zeigte die Tyr603Asn+His604Val-Doppelmutante der murinen Alox15b eine dominante AA-15-Lipoxygenaseaktivität (Jisaka et al. 2000). Damit war es möglich, die Reaktionsspezifität der murinen Alox15b durch die Tyr603Asn+His604Val-Doppelmutation *in vitro* zu humanisieren. Um zu erforschen, ob die Reaktionsspezifitäten von anderen Säugetier-ALOX15B-Orthologen, ähnlich ist, wie die der humanen oder der murinen ALOX15B und ob die Reaktionsspezifität von der evolutionären Stellung der Tiere abhängt, wurden aus den öffentlichen Datenbanken einige willkürlich ausgewählte ALOX15B-cDNA-Sequenzen extrahiert und die Sequenzdeterminanten (Jisaka-Determinanten) durch duale Aminosäurealignments mit der humanen ALOX15B identifiziert. Die Daten sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Die humane ALOX15B trägt an den Positionen der Jisaka-Determinanten das Asp+Val-Motiv und wurde als AA-15-lipoxygenierendes Enzym klassifiziert (Jisaka et al. 2000). Ähnliche Sequenzmotive (Asp+Val, Asp+Ile) wurden für die große Mehrzahl der ALOX15B-Orthologen anderer Säugetiere festgestellt, wobei aufgrund fehlender funktioneller Daten derzeit noch unklar ist, ob die Asp+Val-tragenden Enzyme eine andere Reaktionsspezifität aufweisen als die Asp+Ile-tragenden ALOX15B-Orthologen. Nur für verschiedene Mausspezies (Reisfeldmaus, Spitzmaus, Hausmaus, westliche Mittelmeermaus) wurde ein anderes Sequenzmotiv (Tyr+His) an den Jisaka-Determinanten identifiziert (Tabelle 33).

Tabelle 33: Jisaka-Determinanten der ALOX15B-Orthologen verschiedener Säugetiere (Quelle: eigene Untersuchung). Die cDNA-Sequenzen der verschiedenen ALOX15B-Orthologen wurden aus der Sequenzdatenbank (www.ensembl.org, Stand: 11.2020) extrahiert und die Jisaka-Determinanten mittels Aminosäurealignments mit der humanen ALOX15B identifiziert. Aminosäurecode: Asparaginsäure (Asp/D), Histidin (His/H), Isoleucin (Ile/I), Methionin (Met/M), Tyrosin (Tyr/Y), Valin (Val/V).

Taxa	Spezies	Lateinischer Name	Jisaka-Determinante	
Primates	Mensch	<i>Homo sapiens</i>	Asp+Val (DV)	
	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	Asp+Ile (DI)	
	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>	Asp+Ile (DI)	
	Westlicher Flachland Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	Asp+Ile (DI)	
	Sumatra Orang-Utan	<i>Pongo abelii</i>	Asp+Val (DV)	
	Südlicher Schweineschwanzmakake	<i>Macaca nemestrina</i>	Asp+Val (DV)	
	Westliche Grünmeerkatze	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	Asp+Val (DV)	
	Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	Asp+Val (DV)	
	Goldstumpfnase	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	Asp+Val (DV)	
	Schwarze Stumpfnase	<i>Rhinopithecus bieti</i>	Asp+Val (DV)	
	Bolivianisches Totenkopffäffchen	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	Asp+Val (DV)	
	Nancy Ma Nachtaffe	<i>Aotus nancymaae</i>	Asp+Val (DV)	
	Philippinischer Koboldmaki	<i>Carlito syrichta</i>	Asp+Val (DV)	
	Grauer Mausmaki	<i>Microcebus murinus</i>	Asp+Ile (DI)	
Euarchoptogliares	Andere Euarchoptogliares	Chinesische Baumspitzmaus	<i>Tupaia chinensis D1</i>	Asp+Ile (DI)
		Amerikanische Pika	<i>Ochotona princeps</i>	Asp+Ile (DI)
		Gewöhnlicher Degu	<i>Octodon degus</i>	Asp+Ile (DI)
		Kaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Asp+Val (DV)
		Dreizehnstreifen-Hörnchen	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Asp+Ile (DI)
		Chinesischer Hamster	<i>Cricetulus griseus</i>	Asp+Val (DV)
		Goldhamster	<i>Mesocricetus auratus</i>	Asp+Val (DV)
		Meeresschweinchen	<i>Cavia aperea</i>	Asp+Ile (DI)
		Langschwänziger Chinchilla	<i>Chinchilla lanigera</i>	Asp+Ile (DI)
		Hirschmaus	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Asp+Val (DV)
		Feldwühlmaus	<i>Microtus arvalis</i>	Asp+Val (DV)
		Reisfeldmaus	<i>Mus caroli</i>	Tyr+His (YH)
		Spitzmäuse	<i>Soricidae</i>	Tyr+His (YH)
	CL57/BL6-Maus	<i>Mus musculus</i>	Tyr+His (YH)	
Westliche Mittelmeermaus	<i>Mus spretus</i>	Tyr+His (YH)		
Wanderratte	<i>Rattus norvegicus</i>	Asp+Val (DV)		
Transbaikal-Blindmull	<i>Myospalax psilurus</i>	Asp+Ile (DI)		
Laurasiatheria	Eisbär	<i>Ursus maritimus</i>	Asp+Ile (DI)	
	Amerikanischer Schwarzbär	<i>Ursus americanus</i>	Asp+Ile (DI)	
	Großer Panda	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Asp+Ile (DI)	
	Walross	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	Asp+Ile (DI)	

Taxa	Spezies	Lateinischer Name	Jisaka-Determinante
	Weddellrobbe	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Asp+Ile (DI)
	Nordlicher Seebär	<i>Callorhinus ursinus</i>	Asp+Ile (DI)
	Dingo	<i>Canis lupus dingo</i>	Asp+Ile (DI)
	Rotfuchs	<i>Vulpes vulpes</i>	Asp+Ile (DI)
	Seeotter	<i>Enhydra lutris kenyonii</i>	Asp+Ile (DI)
	Domestizierte Katze	<i>Felis catus</i>	Asp+Ile (DI)
	Löwe	<i>Panthera leo</i>	Asp+Ile (DI)
	Leopard	<i>Panthera pardus</i>	Asp+Ile (DI)
	Tiger	<i>Panthera tigris</i>	Asp+Ile (DI)
	Hausrind	<i>Bos taurus</i>	Asp+Val (DV)
	Wilder Yak	<i>Bos mutus</i>	Asp+Val (DV)
	Bison	<i>Bison bison bison</i>	Asp+Val (DV)
	Ziege	<i>Capra hircus</i>	Asp+Val (DV)
	Alpaka	<i>Vicugna pacos</i>	Asp+Met (DM)
	Hausschwein	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Asp+Val (DV)
	Chaco-Pekari	<i>Catagonus wagneri</i>	Asp+Val (DV)
	Killerwal	<i>Orcinus orca</i>	Asp+Val (DV)
	Pottwal	<i>Physeter catodon</i>	Asp+Val (DV)
	Blauwal	<i>Balaenoptera musculus</i>	Asp+Val (DV)
	Belugawal	<i>Delphinapterus leucas</i>	Asp+Val (DV)
	Östlicher Glattschweinswal	<i>Neophocaena asiaeorientalis</i>	Asp+Val (DV)
	Langflossen-Grindwal	<i>Globicephala melas</i>	Asp+Val (DV)
	Großer Tümmler	<i>Tursiops truncatus</i>	Asp+Val (DV)
	Narwal	<i>Monodon monoceros</i>	Asp+Val (DV)
	Pferd	<i>Equus caballus</i>	Asp+Val (DV)
	Esel	<i>Equus asinus</i>	Asp+Val (DV)
	Europäischer Igel	<i>Erinaceus europaeus</i>	Asp+Val (DV)
	Großer Flughund	<i>Pteropus vampyrus</i>	Asp+Ile (DI)
Afrotheria	Afrikanischer Elefant	<i>Loxodonta africana</i>	Asp+Ile (DI)
	Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	Asp+Val (DV)
Prototheria	Schnabeltier	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Asp+Ile (DI)

Dieses Sequenzmotiv ist auch bei der Hausmaus (*M. musculus*) zu finden und das entsprechende Enzym zeigt eine dominante AA-8-Lipoxygenaseaktivität (Jisaka et al. 2000). Deshalb sollten auch die ALOX15B-Orthologen von Reisfeldmaus, Spitzmaus, Hausmaus und westlicher Mittelmeermaus AA-8-lipoxygenierende Enzyme sein. Im

Gegensatz dazu sollten die ALOX15B-Orthologen der Hirschmaus, der Feldwühlmaus und der Wanderratte (*R. norvegicus*) AA-15-lipoxygenierende Enzyme darstellen.

Zusammenfassend kann aus den hier präsentierten Sequenzdaten hergeleitet werden, dass es sich bei den Säugetier-ALOX15B-Orthologen mehrheitlich um AA-15-lipoxygenierende Enzyme handeln sollte. Lediglich einige (jedoch nicht alle) Spezies der Gattung Maus exprimieren AA-8-lipoxygenierende ALOX15B-Orthologe. Interessanterweise exprimiert das Alpaka ein ALOX15B-Ortholog, welches ein Asp+Met-Motiv an den Jisaka-Determinanten trägt. Die Reaktionsspezifität dieses Enzyms kann bei der derzeitigen Datenlage nicht sicher vorausgesagt werden. Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die hier gemachten Vorhersagen aufgrund fehlender funktioneller Daten nicht als gesichert angesehen werden können.

Zusammenfassung: Aus den verfügbaren Sequenzdaten von Säugetier ALOX15B-Orthologen konnte geschlussfolgert werden, dass es sich bei der überwiegenden Mehrzahl dieser Enzyme um AA-15-lipoxygenierende Proteine handelt. Das Enzym der Hausmaus (*M. musculus*) stellt dabei eine seltene Ausnahme dar, was auch für andere Vertreter der Gattung Maus zutrifft. Die extrahierten ALOX15B-Sequenzdaten belegen, dass die Reaktionsspezifität der Säugetier-ALOX15B-Orthologen nicht von der evolutionären Stellung der Tiere abhängt.

3.3 Katalytische Eigenschaften der Maus-Alox15b und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Mutante

In Vorbereitung der geplanten *In-vivo*-Mutageneseuntersuchungen der Maus-Alox15b, die zur Humanisierung der Reaktionsspezifität dieses Enzyms führen sollten, wurde zunächst das murine Wildtyp-Enzym und dessen Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante als rekombinantes, N-terminales his-tag-Fusionsprotein exprimiert und die wesentlichen katalytischen Eigenschaften der beiden Enzymvarianten miteinander verglichen. Diese Experimente sollten zum einen die bisher beschriebenen Eigenschaften der Maus-Alox15b und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante, die als Grundlage für die *In-vivo*-Mutagenesestrategie dienen, bestätigen. Zum anderen sollten die beiden Enzyme hinsichtlich weiterer Enzymeigenschaften charakterisiert werden. Das galt vor allem für die Substratspezifität der beiden Enzymvarianten mit unterschiedlichen Polyenfettsäuren und für das Muster der Reaktionsprodukte, die aus diesen Substraten gebildet werden. Diese Informationen sind essenziell, um eventuell existierende Unterschiede im Muster der Oxylipine von Alox15b-Knock-in-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen besser interpretieren zu können.

3.3.1 Reaktionsspezifität der beiden Enzymvarianten mit Arachidonsäure

Bevor die Strategie zur *In-vivo*-Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b begonnen wurde, musste sichergestellt sein, dass die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Reaktionsspezifität des rekombinanten Enzyms reproduziert werden konnten. Deshalb wurde die murine Alox15b und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante in *E. coli* nach dem gleichen experimentellen Protokoll wie die tupALOX15-Isoformen (siehe Abschnitt 2.2.1.5) exprimiert. Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden als Enzymquelle für *In-vitro*-Aktivitätsassays mit Arachidonsäure als Substrat (100 μ M) eingesetzt und die Muster der dominanten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte wurden zunächst miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass das Wildtyp-Enzym AA dominant zu einem Produkt umwandelt, das in der RP-HPLC mit einem authentischen Standard von 8-HETE co-chromatografierte (Abbildung 23 A).

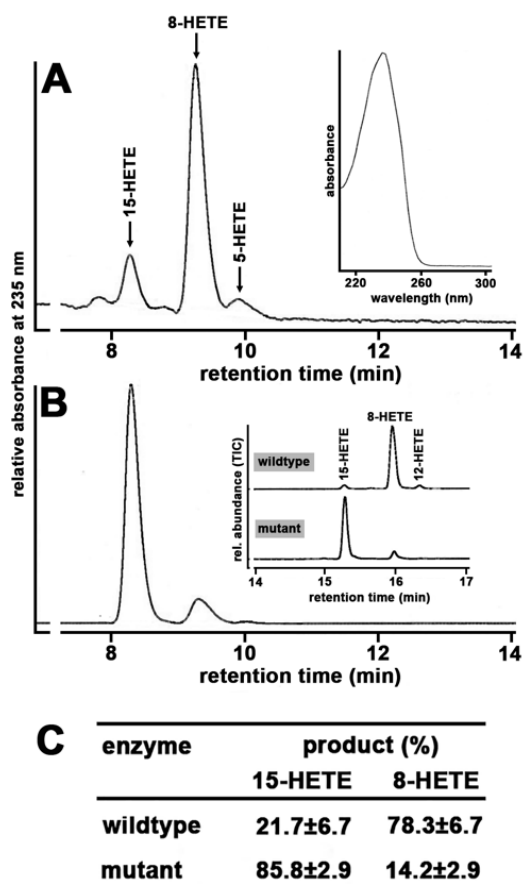


Abbildung 23: Reaktionsspezifität der rekombinanten Maus-Alox15b und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante mit Arachidonsäure als Substrat (Quelle: Schäfer et al. 2022). Die Maus-Alox15b und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante wurden als N-terminale his-tag-Fusionsproteine exprimiert und Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurde für *In-vitro*-Aktivitätsassays (100 μ M Substratkonzentration) eingesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die primären Reaktionsprodukte mit NaBH₄ reduziert und mittels RP-HPLC (siehe Kapitel 2) analysiert. A) Repräsentatives Partialchromatogramm der AA-Oxygenierungsprodukte der Maus Wildtyp-Alox15b. Inset: UV-Spektrum des dominanten Oxygenierungsproduktes (8-HETE). B) Repräsentatives Partialchromatogramm der AA-Oxygenierungsprodukte der Maus-Alox15b-Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante. Inset: Die Hauptprodukte der AA-Oxygenierung durch beide Enzym-varianten wurden mittels RP-HPLC präpariert und anschließend in der LC-MS (siehe Kapitel 2) analysiert. Dabei konnten die chemischen Strukturen des beiden dominierenden AA-Oxygenierungsprodukte als 8-HETE (Wildtyp-Enzym) und 15-HETE (Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante) bestätigt werden. C) Statistische Auswertung (Mittelwert und Standardabweichung) der Produktprofile (RP-HPLC), die durch die beiden Enzymvarianten gebildet wurden (je n = 4).

Dieses Produkt war gekennzeichnet durch ein klassisches UV-Spektrum eines konjugierten Dienes (Inset Abbildung 23 A). In geringen Mengen konnte 15-HETE als Nebenprodukt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte 15-H(p)ETE als dominantes

AA-Oxygenierungsprodukt für die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante identifiziert werden (Abbildung 23 B). Da unter den beschriebenen chromatografischen Bedingungen der RP-HPLC 12-HETE und 8-HETE nicht sicher voneinander getrennt werden konnten, wurden die Hauptprodukte der beiden Enzymvarianten (8-HETE-Peak des Wildtyp-Enzyms und 15-HETE-Peak der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante) mittels RP-HPLC präpariert und anschließend mittels LC-MS-/MS analysiert. In diesem System waren 8-HETE und 12-HETE gut voneinander abzugrenzen (Inset Abbildung 23 B). Das Hauptprodukt der AA-Oxygenierung durch die Maus-Alox15b konnte als 8-HETE identifiziert werden. Zusammengenommen bestätigen diese experimentellen Daten die Literaturangaben und belegen, dass ein Tyr603Asp+His604Val-Austausch zu einer Humanisierung der Rektionsspezifität der Maus-Alox15b führt.

Zusammenfassung: Die rekombinante Maus-Alox15b oxygeniert AA dominant zu 8-H(p)ETE, während das Hauptprodukt der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante 15-H(p)ETE ist. Damit humanisiert ein Tyr603Asp+His604Val-Austausch die Reaktionsspezifität der Maus-Alox15b.

3.3.2 Produktspezifität der beiden Enzymvarianten mit anderen Polyenfettsäuren

In vivo gehört Arachidonsäure zwar zu den dominanten Polyenfettsäuren in Säugetierzellen, aber andere PUFAs (z. B. 9,12-Octadecadiensäure, 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure, 4,7,10,13,16,19-Docosahexanensäure) stehen den ALOX-Isoformen ebenfalls als Oxygenierungssubstrate zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob eine Humanisierung der AA-Oxygenaseaktivität der Maus-Alox15b sich *in vivo* auf das Muster der Oxygenierungsprodukte anderer PUFAs auswirkt, musste untersucht werden, welche Produkte durch die rekombinante Maus-Alox15b und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante aus anderen PUFAs gebildet werden. Wenn sich die Reaktionsspezifitäten der beiden Enzymvarianten mit Arachidonsäure als Substrat 1:1 auf die anderen PUFAs übertragen ließen, könnten folgende Vorhersagen zur Reaktionsspezifität des Wildtyp-Enzyms und seiner Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren gemacht werden:

- i) 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (EPA) sollte durch die Maus-Alox15b dominant zu 8-HEPE umgewandelt werden, wobei geringe Mengen an 15-HEPE als Nebenprodukt entstehen könnte. Im Gegensatz dazu sollte die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante dominant 15-HEPE bilden.
- ii) 4,7,10,13,16,19-Docosahexanensäure (DHA) sollte durch die Maus-Alox15b dominant zu 10-HDHA umgewandelt werden, wobei 17-HDHA als

Nebenprodukt entstehen könnte. Als Alternative wäre aber auch eine Bildung von 7-HDHA möglich, was aber nicht sicher vorhersagbar ist. Die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante sollte dominant 17-HDHA bilden.

- iii) Für 9,12-Octadecadiensäure (LA) war eine fundierte Vorhersage des Produktmusters aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen LA und AA kaum möglich. Am ehesten sollte 9-HODE durch die Maus-Alox15b synthetisiert werden, während das dominante Reaktionsprodukt der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante 13-HODE sein sollte. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass ALOX15B-Orthologe mit LA nur eine geringe katalytische Aktivität aufweisen (Brash et al. 1997; Kilty et al. 1999). Deshalb muss zunächst geklärt werden, ob die murine Alox15b (Alox8) und deren Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante überhaupt mit LA reagiert.

Um diese Vorhersagen experimentell zu überprüfen, wurden Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände mit EPA und DHA getrennt voneinander inkubiert. Die primären Oxygenierungsprodukte wurden mit NaBH₄ reduziert und in verschiedenen RP-HPLC-Systemen analysiert. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 24 zusammengefasst. Wegen der direkten Vergleichbarkeit wurden im Rahmen dieser Experimente die Produktmuster der AA-Oxygenierung nochmals mit analysiert. Aus Abbildung 24 A kann entnommen werden, dass das Hauptprodukt der AA-Oxygenierung durch die Wildtyp-Maus-Alox15b 8-HETE war, während die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante dominant 15-HETE bildet. Diese Daten bestätigen die Reaktionsspezifitäten der beiden Enzymvarianten, die unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurden. Wenn EPA als Substrat unter den gleichen experimentellen Bedingungen eingesetzt wurde, konnte 8-HEPE als dominantes Oxygenierungsprodukt des Wildtyp-Enzyms identifiziert werden (Abbildung 24 B). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass für die Analyse der EPA-Oxygenierungsprodukte ein anderes Analysesystem (mobile-Phase: Acetonitril:Wasser:Essigsäure = 60:40:0,1 % Vol.) verwendet wurde, um die entstandenen Oxygenierungsprodukte eindeutig voneinander unterscheiden zu können. Diese Veränderung im analytischen System bedingte die deutlich längeren Retentionszeiten der Metabolite in der RP-HPLC. Im Gegensatz dazu war 15-HEPE das Hauptprodukt der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante. Diese Daten belegen, dass die Unterschiede, die bei der Oxygenierung von AA durch die Maus-Alox15b und durch deren

Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante bestehen, auch für die Oxygenierung von EPA zutreffen. DHA wurde durch die Maus-Alox15b dominant zu 10-HDHA umgewandelt (Abbildung 24 C). Hauptprodukt der DHA-Oxygenierung durch die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante war, wie vorhergesagt, 17-HDHA. Kein gutes Substrat für die Maus-Alox15b war LA. Trotzdem konnte verglichen mit den Nicht-Enzymkontrollen (Kontrolldaten nicht gezeigt) die Bildung signifikanter Mengen konjugierter Diene während der *In-vitro*-Aktivitätsassays durch beide Enzymvarianten in der RP-HPLC beobachtet werden. Da die Auftrennung im verwendeten RP-HPLC-Analysesystem von 13-HODE und 9-HODE nicht möglich war, konnte auf der Basis der RP-HPLC-Analysen nicht entschieden werden, welches der beiden Oxygenierungsprodukte von welcher Enzymvariante dominant gebildet wurde. Um diese Frage zu klären, wurden die konjugierten Diene mittels RP-HPLC präpariert und anschließend in einer kombinierten NP-/CP-HPLC weiter analysiert. Dabei ergab sich (Abbildung 24 D), dass 9S-HODE das Hauptprodukt der LA-Oxygenierung durch die Maus-Alox15b war. Geringe Mengen an 9R-HODE, 13R-HODE und 13S-HODE wurden ebenfalls gefunden, wobei nicht sicher geklärt werden konnte, ob diese Nebenprodukte nicht Autoxidationsprodukte in der Substratpräparation waren. Die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante oxigenierte LA dominant zu 13S-HODE und in geringen Mengen 13R-HODE als Nebenprodukt.

Die Daten bestätigen die Vorhersagen zum Muster der Linolsäureoxygenierungsprodukte. Aus den Produktmustern der verschiedenen Polyenfettsäuren kann abgeleitet werden, dass die beobachteten Unterschiede für die Oxygenierung von Arachidonsäure in der Produktspezifität von Maus-Alox15b und seiner Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante auch auf die anderen getesteten PUFAs übertragen werden können. Die Daten zu der rekombinanten Analyse der PUFA-Produktspezifität befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.4). Die auf der Basis der AA-Oxygenierung getroffenen Vorhersagen ließen sich experimentell bestätigen. Die hier gewonnenen Ergebnisse erleichtern die Interpretation der Daten, die bei der Analyse der Plasmaoxylipine von Alox15b-Knock-in-Mäusen zu erwarten waren.

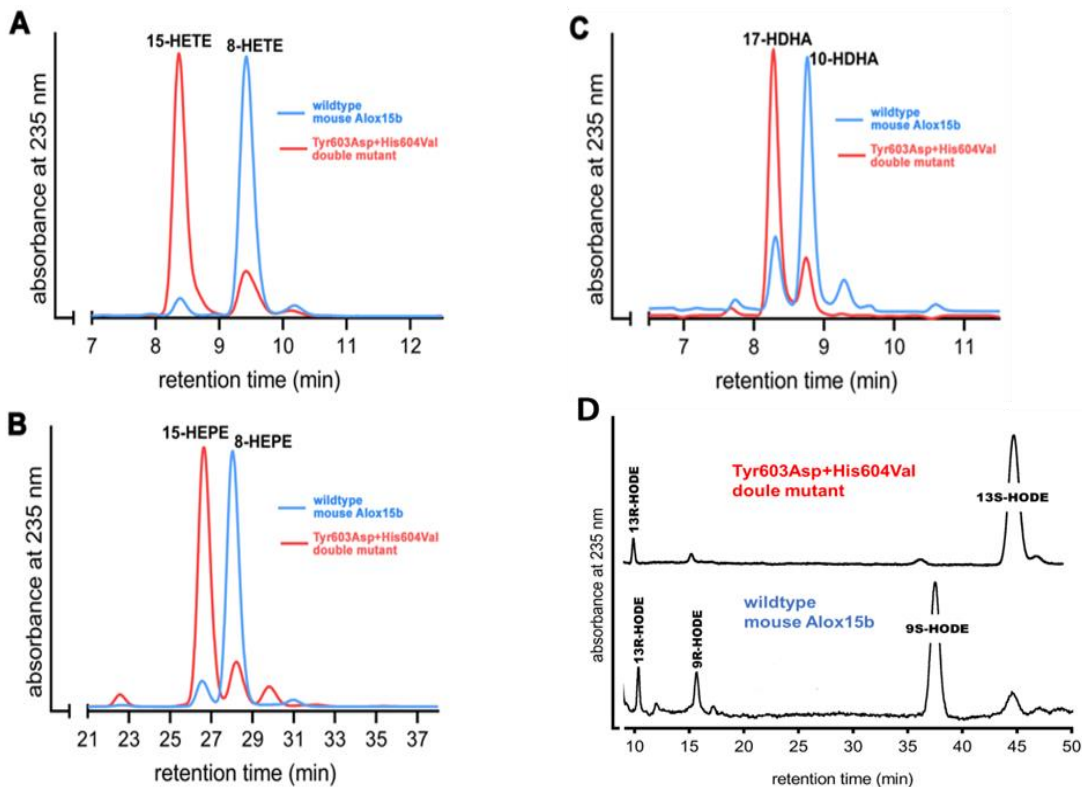


Abbildung 24: Muster der Oxygenierungsprodukte, die aus verschiedenen PUFAs durch die Maus-Alox15b und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante gebildet werden (Quelle: Untersuchung gemeinsam mit Dr. K. Kakularam, AG-Kühn). Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurden mit AA, EPA, DHA oder LA inkubiert und die dabei entstandenen Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC bzw. NP-/CP-HPLC analysiert (siehe Kapitel 2). A) AA-Oxygenierungsprodukte, B) EPA-Oxygenierungsprodukte, C) DHA-Oxygenierungsprodukte, D) LA-Oxygenierungsprodukte.

Zusammenfassung: Die rekombinante Maus-Alox15b oxygeniert EPA dominant zu 8-HEPE, während das Hauptprodukt der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante 15-HEPE war. Für DHA wurde 10-HDHA als Hauptprodukt des Wildtyp-Enzyms identifiziert, während 17-HDHA durch die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante synthetisiert wurde. 9S-HODE war Hauptprodukt der LA-Oxygenierung durch das Wildtyp-Enzym, während 13S-HODE dominant durch die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante synthetisiert wurde.

3.4 Charakterisierung von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Alox15b der Maus ein AA-8-lipoxygenierendes Enzym ist und dass die Reaktionsspezifität des rekombinanten Enzyms durch einen Tyr603Asp+His604Val-Austausch humanisiert werden konnte. Die Tyr603Asp+His604Val-Mutante oxygenierte AA dominant zu 15-H(p)ETE. Um zu überprüfen, ob die gleiche Mutagenese-strategie auch *in vivo* zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität des Enzyms führt, wurden Alox15b-Knock-in-Mäuse (Alox15b-KI-Mäuse) hergestellt, die anstatt des Alox15b-Wildtyp-Gens eine Genvariante tragen, die für die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante des Enzyms kodiert. Diese Tiere sollten

zunächst auf phänotypische Auffälligkeiten hin untersucht werden. In anschließenden Experimenten sollte das Verhalten dieser Mäuse in verschiedenen tierischen Entzündungsmodellen näher charakterisiert werden.

3.4.1 Herstellung der Alox15b-Knock-in-Mäuse und ausgekreuzter Wildtyp-Kontrollen

Für die Herstellung solcher Alox15b-KI-Mäuse wurde der *Alox15b*-Genlocus von befruchteten Eizellen mithilfe der CRISPR/Cas9-Strategie durch Modifizierung von zwei Nukleotidtriplets selektiv verändert (Abbildung 25). Die Herstellung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Cyagene (Santa Clara, USA) durchgeführt. Für den gezielten Nukleotidaustausch wurden *in vitro* ein gRNA-Vektor und ein Donoroligonukleotid konstruiert, welche die veränderte Zielsequenz enthielt, die von homologen Sequenzen (130 Basenpaaren) auf beiden Seiten der Zielsequenz flankiert waren. Die Tyr603Asp+His604Val-Mutation (TAT-CAC zu GAC-GTC) im Donoroligonukleotid wurde durch homologiebasierte Reparaturmechanismen ins Exon 13 des Wildtyp-*Alox15b*-Gens eingefügt. Zusätzlich wurde eine stille Mutation (CTC zu CTG) stromaufwärts der Zielsequenz eingefügt, um zu verhindern, dass das mutierte Konstrukt nach der Mutation wieder herausgeschnitten wurde. Die Cas9-mRNA, die gRNA und das Donoroligonukleotid wurden anschließend in befruchtete Eizellen mikroinjiziert.

Die erhaltenen Nachkommen wurde mittels PCR genotypisiert und die Amplifizierungsprodukte sequenziert. Die heterozygoten Alox15b-KI-Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit exklusiv von der Firma Cyagen (Santa Clara, USA) hergestellt und nach Deutschland an die Charité versandt. Heterozygote Foundertiere wurden zunächst mit C57BL/6-Mäusen verpaart und heterozygote Merkmalsträger im *Alox15b*-Genlocus isoliert. Diese Tiere wurden anschließend untereinander verpaart und homozygote Wildtyp-Mäuse sowie homozygote Alox15b-KI-Mäuse isoliert. Aus den homozygoten Wildtyp-Tieren wurde eine Kolonie von Mäusen gezüchtet, die als Kontrolltiere verwendet wurden. Aus den homozygoten Alox15b-KI-Mäusen wurde die Alox15b-KI-Kolonie gezüchtet. Zufällig ausgewählte Vertreter dieser beiden Kolonien wurden für die folgenden Charakterisierungsexperimente eingesetzt.

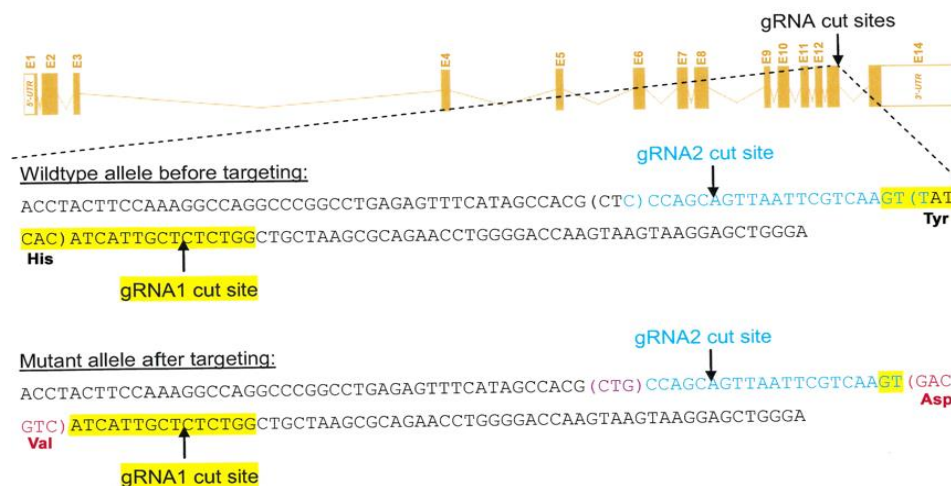


Abbildung 25: CRISPR/Cas9-Strategie zur Herstellung von Alox15b-Knock-in-Mäusen (Quelle: Cyagen, Santa Clara, USA; modifiziert in Schäfer et al. 2022). Die hergestellten Alox15b-KI-Mäuse exprimieren anstatt des AA-8-lipoxygenierenden Wildtyp-Enzyms die AA-15-lipoxygenierende Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante. Für die Herstellung dieser Tiere wurden *in vitro* ein gRNA-Vektor und Donoroligonukleotide konstruiert, welche die Zielsequenz flankiert und von homologen Sequenzen (130 Basenpaaren) auf beiden Seiten der Zielsequenz flankiert waren. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden durch die Firma Cyagen, Santa Clara, USA durchgeführt. Heterozygote Merkmalsträger wurden genotypisiert und an die AG-Kühn (Charité, Berlin) geliefert.

Wenn die CRISPR/Cas9-Strategie zur gezielten *In-vivo*-Mutagenese von Zielgenen eingesetzt wird, zeigt diese Methode in aller Regel eine hohe Selektivität für die Zielsequenz. Trotzdem können auch hier Off-target-Veränderungen (Mutationen an anderen Stellen des Mausgenoms) nicht völlig ausgeschlossen werden. Um die Wahrscheinlichkeit solcher Off-target-Mutationen im Rahmen der hier verwandten Mutagenese-strategie abzuschätzen, wurden zunächst mögliche Off-target-Sequenzen im Mausgenom identifiziert (Tabelle 34). Die entsprechenden genomischen Sequenzen wurden mittels genomischer PCR bei den Alox15b-KI-Foundertieren amplifiziert und die Nukleotidsequenz der Amplifizierungsprodukte bestimmt. Dabei ergab sich, dass alle potenziellen Off-target-Sequenzen bei den Alox15b-KI-Mäusen als Wildtyp-Allele identifiziert wurden. Auf der Basis dieser Daten konnte geschlussfolgert werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Off-target-Mutation durch die hier angewandte CRISPR/Cas9-Strategie als gering eingeschätzt werden kann.

Tabelle 34: Mögliche Off-target-Mutationen bei der Herstellung der Alox15b-KI-Mäuse (Quelle: Schäfer et al. 2022). Für die Identifizierung möglicher Off-target-Veränderungen wurde das Mausgenom *in silico* mit den Sequenzen der Zieloligonukleotide durchsucht, wobei fünf potenzielle Off-target-Sequenzen identifiziert werden konnten. Die Sequenzierung der entsprechenden Genomregionen ergab bei den Alox15b-KI-Mäusen in allen fünf Fällen Wildtyp-Sequenzen.

Location	Number of mismatches	Sequencing result
Chr2 13819347 - 13819369	5	wildtype
Chr2 52611563 - 52611585	3	wildtype
Chr16 14176363 - 14176385	4	wildtype
Chr9 25478640 - 25478662	4	wildtype
Chr15 92238427 - 92238449	5	wildtype

Zusammenfassung: Mithilfe der CRISPR/Cas9-Strategie wurden heterozygote Alox15b-Knock-in-Mäuse hergestellt, die anstatt des AA-8-lipoxygenierenden Alox15b-Wildtyp-Enzyms die AA-15-lipoxygenierende Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante exprimieren. Die heterozygoten Gründertiere wurden miteinander verpaart, um homozygote Alox15b-KI-Mäuse und homozygote Wildtyp-Kontrolltiere auszukreuzen, aus denen zwei unabhängige Mauskolonien gezüchtet wurden. Die Wahrscheinlichkeit von funktionell bedeutsamen Off-target-Mutationen konnten auf der Basis der erhaltenen Sequenzdaten als gering eingeschätzt werden.

3.4.2 Expression der verschiedenen ALOX-Isoformen in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen

Um zu überprüfen, ob die subtile genetische Manipulation des *Alox15b*-Gens die Expression der anderen ALOX-Isoformen bei den Alox15b-KI-Tieren beeinflusst, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von ausgekreuzten Wildtyp-Tieren isoliert und die Gleichgewichtskonzentration der Alox15b-mRNA bestimmt (Abbildung 26 A). Dabei konnte festgestellt werden, dass das Enzym in den meisten Geweben nur auf geringem Niveau ($< 10^4$ Alox15b-mRNA-Kopien pro 10^6 Kopien der GAPDH-mRNA) exprimiert wird. Lediglich in der Leber, der Haut und in der Lunge konnten höhere Expressionsraten der Alox15b-mRNA beobachtet werden. Auch in diesen Geweben war die Konzentration der Alox15b-mRNA, verglichen mit der GAPDH-mRNA, gering.

Um zu erforschen, ob sich die subtile genetische Veränderung des *Alox15b*-Gens auf die Expressionshöhen der anderen Alox-Isoformen auswirkt, wurde die PMA-behandelte Schwanzhaut als leicht zugängliches Gewebe gewählt. In der Literatur wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, dass das Expressionsniveau der Alox15b in der Haut durch Behandlung mit Phorbolmyristat (PMA) deutlich hochreguliert werden kann (Jisaka et al. 1997; Krieg et al. 1998).

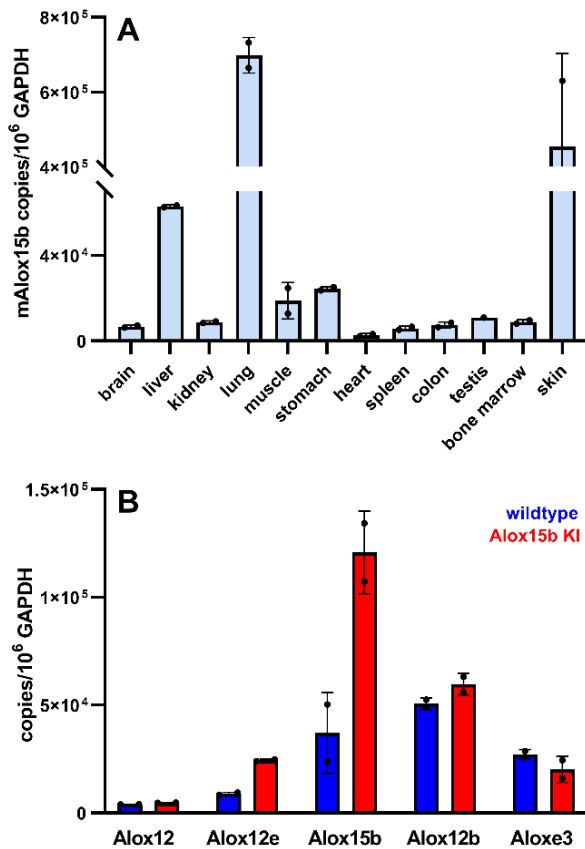


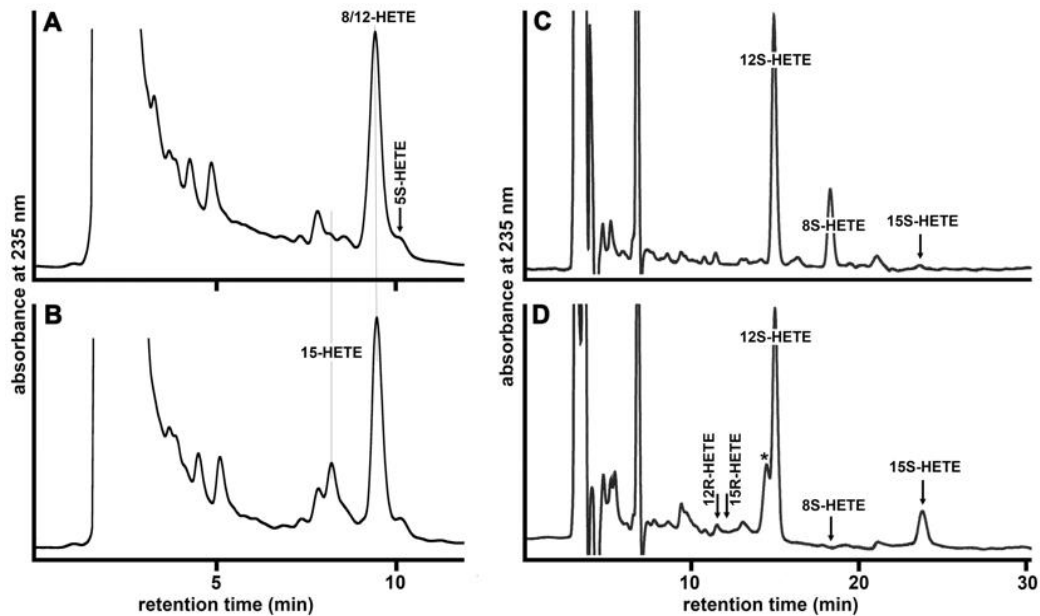
Abbildung 26: Expression der Alox-Isoformen in verschiedenen Mausextrakten (Quelle: Schäfer et al. 2022). A) Gewebespezifische Expression der Alox15b in verschiedenen Mausextrakten. Aus verschiedenen Mausextrakten einer C57BL/6-Maus wurde Gesamt-RNA extrahiert und die Expression der Alox15b mittels qRT-PCR quantifiziert (siehe Kapitel 2). Zwei unabhängige Messungen wurden mit jedem Gewebeextrakt durchgeführt. Mittelwerte und Fehlerbalken sind angegeben. B) Expression der verschiedenen Alox-Isoformen in PMA-behandelter Schwanzhaut. Amputierte Schwänze von 3 Mäusen (je Genotyp) wurden für 2 h bei 37 °C in PMA-haltigem PBS (5 µM) inkubiert. Nach der Präparation der Epidermis wurde Gesamt-RNA extrahiert und die Expression der verschiedenen Alox-Isoformen mittels qRT-PCR unter Verwendung von externen Amplifizierungsstandards quantifiziert (siehe Kapitel 2). Die Anzahl der Alox-mRNA-Kopien wurde auf die Anzahl der GAPDH-mRNA-Kopien in den RNA-Extrakten bezogen. Zwei unabhängige Messungen wurden für jedes RNA-Extrakt durchgeführt. Mittelwerte und Fehlerbalken sind angegeben.

Für diese Experimente wurden die amputierten Schwänze von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen für 2 h in PBS mit 5 µM PMA inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis präpariert und aus einem Teil des Gewebes die Gesamt-RNA extrahiert. Der andere Teil wurde für *Ex-vivo*-Aktivitätsassays verwendet. Aliquots der RNA-Präparationen wurden in cDNA umgeschrieben und die Gleichgewichtskonzentrationen der für die verschiedenen Alox-Isoformen kodierenden cDNAs wurden mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 26 B zusammengefasst. Dabei konnte festgestellt werden, dass die *Aloxe3* und die *Alox12b* in PMA-behandelter Schwanzhaut auf ähnlichem Niveau exprimiert wird. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Für die *Alox12*, die *Aloxe12* und die *Alox15b* wurden bei den Alox15b-KI-Mäusen signifikant höhere Expressionsniveaus beobachtet. Die molekularen Ursachen für die erhöhte Expression dieser Alox-Isoformen in den Alox15b-KI-Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Für die *Alox15* und die *Alox5* waren die Expressionsniveaus so gering, dass keine spezifischen Signale in der qRT-PCR erhalten werden konnten.

Zusammenfassung: In normalen Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) wird die *Alox15b* in Lunge, Leber und Haut auf mittlerem Niveau exprimiert. Durch die Humanisierung der Reaktionsspezifität der *Alox15b* erhöhte sich die Expression dieses Enzyms und der *Aloxe12* in der Haut 2–3-fach, während sich die Expression der anderen Alox-Gene kaum veränderte. *Alox15* und *Alox5* wurden in PMA-behandelter Haut nicht exprimiert.

3.4.3 *Ex-vivo*-Aktivitätsassays der Alox-Isoformen mit PMA behandelte Maushaut

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebene *In-vivo*-Mutagenese des *Alox15b*-Gens auch wirklich zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität des Enzyms geführt hat, wurden mit Gewebehomogenaten von PMA-behandelter Schwanzhaut *Ex-vivo*-Aktivitätsassays durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde aus mit PMA-behandelter Schwanzepidermis ein Gewebehomogenat hergestellt und Aliquots des Homogenatüberstandes in PBS mit exogen zugegebener Arachidonsäure inkubiert. Die während der Inkubationsperiode entstandenen AA-Oxygenierungsprodukte wurden mit NaBH₄ reduziert und anschließend mit Ethylacetat zweimal extrahiert. Die Lipidextrakte wurden vereint, das Lösungsmittel abgedampft und die zurückbleibenden Lipide in Methanol aufgenommen. Anschließend wurden die Lipidextrakte durch verschiedene HPLC-Techniken (RP-HPLC, kombinierte NP-/CP-HPLC, siehe Kapitel 2) analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 27 zusammengestellt. Wenn der Homogenatüberstand vom PMA-behandelter Epidermis von Wildtyp-Mäusen mit AA inkubiert wurde, konnte die Bildung von konjugierten Dienen nachgewiesen werden, die in der RP-HPLC mit authentischen Standards von 12-HETE und 8-HETE eluierten (Abbildung 27 A). Bei diesen Analysen konnte keine Bildung von 15-HETE nachgewiesen werden. Da unter den verwendeten chromatografischen Bedingungen 12-HETE und 8-HETE nicht sicher voneinander getrennt werden konnten, wurden die konjugierten Diene mittels RP-HPLC präpariert und anschließend durch kombinierte NP-/CP-HPLC weiter analysiert (Abbildung 27 C). Dabei ergab sich, dass neben dem dominanten 12S-HETE, ca. 25 % 8S-HETE gebildet wurde. Diese 8S-HETE-Bildung könnte auf die katalytische Aktivität der nichtmutierten *Alox15b* zurückzuführen sein. Wenn dies der Fall ist, sollte die Bildung dieses AA-Oxygenierungsproduktes bei Verwendung von PMA-behandelter Schwanzepidermis von *Alox15b*-KI-Mäusen nicht mehr nachweisbar sein. Zusätzlich sollte die Bildung ähnlicher Mengen von 15S-HETE detektiert werden, da die humanisierte *Alox15b* AA dominant zur 15S-HETE umsetzt. Bereits in der RP-HPLC (Panel B) zeigte sich die zu erwartende 15-HETE-Bildung durch den Homogenatüberstand von PMA-behandelter Schwanzepidermis von *Alox15b*-KI-Mäusen. Dieses Ergebnis konnte durch kombinierte NP-/CP-HPLC (Panel D) bestätigt werden. Die quantitative Auswertung aller durchgeführten HPLC-Analysen ist in Abbildung 27 E zusammengestellt.



E

product	wildtype	knock-in
12S-HETE	80.4±4.2 %	79.1±0.2 %
8S-HETE	19.6±4.2 %	< 1 %
15S-HETE	< 1%	20.9±0.2 %

Abbildung 27: Ex-vivo-Alox15b-Aktivitätsassays mit Homogenatsüberständen von PMA-behandelter Schwanzepidermis (Quelle: Schäfer et al. 2022). Die Schwänze von 3 Alox15b-KI-Mäusen und 3 Wildtyp-Kontrollen wurden für 2 h bei 37 °C in PBS inkubiert, die 5 µM PMA enthielt. Danach wurden die Schwänze in PBS gewaschen, die Epidermis präpariert und Gewebehomogenate hergestellt. Aliquots der Homogenatüberstände wurden mit AA inkubiert und die gebildeten AA-Oxygenierungsprodukte mit NaBH₄ reduziert. Nach Lipidextraktion wurden die Produkte sequenziell mit verschiedenen HPLC-Techniken analysiert (siehe Kapitel 2). A) RP-HPLC der AA-Oxygenierungsprodukte, die durch PMA-behandelte Schwanzepidermis von Wildtyp-Mäusen gebildet wurden. B) RP-HPLC der AA-Oxygenierungsprodukte, die durch PMA-behandelte Schwanzepidermis von Alox15b-KI-Mäusen gebildet wurden. C) Die konjugierten Diene, die während der Inkubation von PMA-behandelter Schwanzepidermis von Wildtypmäusen mit AA entstanden sind, wurden mittels RP-HPLC (Panel A) präpariert und anschließend durch kombinierte NP-/CP-HPLC analysiert. D) Die konjugierten Diene, die während der Inkubation von PMA-behandelter Schwanzepidermis von Alox15b-KI-Mäusen mit AA entstanden sind, wurden mittels RP-HPLC (Panel B) präpariert und anschließend durch kombinierte NP-/CP-HPLC analysiert. Der mit * gekennzeichnete Peak zeigt kein konjugiertes Dienspektrum. E) Statistische Auswertung der Produktmuster.

Diese Daten belegen, dass der Homogenatüberstand von PMA-behandelter Epidermis von Wildtyp-Mäusen 12S-HETE als Hauptprodukt (ca. 80 % der Produktmischung) bildet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht weiter untersucht, welche Enzyme für die Bildung dieses Produktes verantwortlich sind. Da andere Alox-Isoformen (z. B. Alox12) nur auf niedrigem Niveau in PMA-behandelter Epidermis exprimiert werden (Abbildung 27 B), sollten Alox-unabhängige Biosynthesewege dabei eine Rolle spielen. Neben 12S-HETE wurde 8S-HETE als Nebenprodukt (ca. 20 %) gebildet. Wenn der Lysatüberstand von PMA-behandelter Epidermis, von Alox15b-KI-Mäusen als Enzymquelle eingesetzt wurde, konnte ebenfalls 12S-HETE als Hauptprodukt (79,1 %) identifiziert werden. Als Nebenprodukt

(20 %) wurde auch 15S-HETE identifiziert. Zusammengenommen deuten die erhaltenen Daten aus den *Ex-vivo*-Aktivitätsassays darauf hin, dass die subtile genetische Manipulation des *Alox15b*-Gens der Maus zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b geführt hat.

Zusammenfassung: *Ex-vivo*-Alox15b-Aktivitätsassays haben gezeigt, dass die *In-vivo*-Mutagenese des Maus-*Alox15b*-Gens (Tyr603Asp+His604Val) zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b führt.

3.4.4 Fellstruktur und Mobilität

Beim Menschen wird die ALOX15B u. a. in der Haut exprimiert und das menschliche Enzym wurde zunächst aus Haarwurzeln kloniert (Brash et al. 1997). Auch in der Haut von Mäusen konnte die Alox15b-mRNA nachgewiesen werden (Abschnitt 3.4.2, Abbildung 26), wobei die Enzymexpression durch PMA-Behandlung signifikant erhöht werden kann (Jisaka et al. 1997). Eine Humanisierung der Reaktionsspezifität der Maus Alox15b könnte damit Veränderungen in der Fellbeschaffenheit hervorrufen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Fellbeschaffenheit von Alox15b-KI-Mäusen und den ausgekreuzten Wildtypen im Laufe ihrer Individualentwicklung beschreibend verglichen (Abbildung 28).

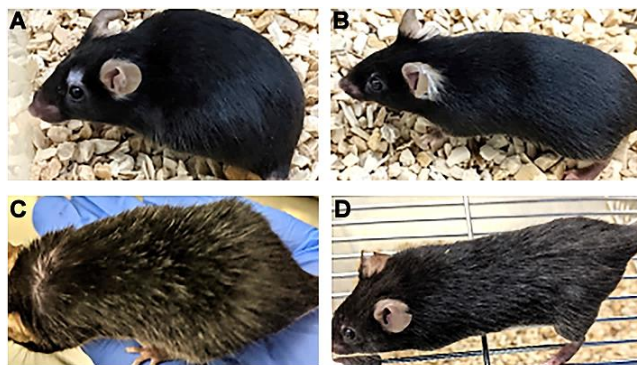


Abbildung 28: Fellstruktur von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: eigene Aufnahmen).

A) weibliche Wildtyp-Maus, 6 Monate alt;
B) weibliche Alox15b-KI-Maus, 6 Monate alt;
C) männliche Wildtyp-Maus, 6 Monate alt;
D) männliche Alox15b-KI-Maus, 6 Monate alt.

Weibliche Individuen trugen bis zu einem Alter von mehr als einem Jahr ein glänzendes, kaum ergrautes Fell. Im Gegensatz dazu zeigten die männlichen Individuen bereits nach 6 Monaten eine Graufärbung des Fells. Diese Fellveränderungen der Individuen wurden nicht quantitativ verfolgt, sodass eine sichere Aussage nicht möglich ist. Jedoch wurde bei männlichen Mäusen bisher ein Zusammenhang zu Haarausfall sowie der Störung der strukturellen Integrität der Rückenhaut bei einem Alox15-Knock-out festgestellt (Kim et al. 2018). Vielleicht ist das *Alox15*-Gen entscheidender für die Fellbeschaffenheit als Alox15b

und damit ein Grund für die Unauffälligkeit gewesen. Die Haut sah bei einem Beispiel auch bei histologischer Betrachtung unauffällig aus (siehe Anhang, Abschnitt 7.7).

Bei ausgekreuzten weiblichen Wildtyp-Mäusen wurde des Öfteren ein sogenanntes Barbering-Verhalten beobachtet, sodass mehrere Individuen vereinzelt, behandelt oder sogar getötet werden mussten. Das Barbering-Verhalten beschreibt das Ausreißen von Haaren bei anderen Käfigmitgliedern. Dieses Verhalten wird bei C57BL/6-Weibchen häufiger beobachtet als bei anderen Rassen (vgl. Zusammenfassung von Garner et al. 2004 b; Kalueff et al. 2006). Ob die Ursache ein artspezifisches Dominanzverhalten, ein genetischer Defekt, eine psychische Verhaltensstörung aufgrund der Käfighaltung oder Stress ist, ist bislang unbekannt (Long 1972; Sarna et al. 2000; Garner et al. 2004 a). Auch hier konnten keine systematischen Unterschiede zwischen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen nachgewiesen werden.

Alox15b-KI-Mäuse zeigten im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich zu ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen keine offensichtlichen Einschränkungen in ihrer Mobilität. Die Bewegungsraten der Tiere wurden im Rahmen der Untersuchungen jedoch nicht systematisch quantifiziert. Aus der regelmäßigen Langzeitbeobachtung der Mäuse ergaben sich keine Anhaltspunkte dafür, die Tiermobilität eingehender vergleichend zu untersuchen.

Zusammenfassung: Hinsichtlich der Fellstruktur und des Mobilitätsverhalten konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden.

3.4.5 Vergleich der Gewichte ausgewählter Organe von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen

Da die Alox15b in verschiedenen Organen exprimiert wird (Abbildung 26), wäre es möglich, dass dieses Enzym für die Funktion dieser Organe bedeutsam ist. Durch die Humanisierung der Alox15b-Reaktionsspezifität könnte sich die Funktion des Enzyms verändern. Dies könnte sich darin ausdrücken, dass sich die Organgewichte von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen voneinander unterscheiden. Um diesen Überlegungen nachzugehen, wurden die Organgewichte der Milz, der Nieren, des Gehirns und der Hoden bestimmt. Beim Vergleich der beiden Genotypen ergab sich, dass sich die Organgewichte zwischen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 35 und 36). Ausnahmen waren dabei das absolute Milzgewicht von jungen weiblichen Alox15b-KI-Mäusen, das signifikant über dem der Wildtyp-Tiere lag,

und das absolute Hodengewicht der männlichen Wildtyp-Kontrollen, das signifikant über dem der Alox15b-KI-Mäusen lag.

Tabelle 35: Absolute und relative Organgewichte von weiblichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: eigene Darstellung und Berechnung). Zufällig ausgewählte weibliche Alox15b-KI-Mäuse und ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen des gleichen Geschlechts wurden in zwei unterschiedliche Altersgruppen (10–20 Wochen, 30–40 Wochen) klassifiziert. Die ausgesuchten Tiere wurden durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, die Organe präpariert und gewogen. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). KG: Körpergewicht; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Tiere; * : signifikanter Unterschied in der Altersgruppe; Ergebnis zum Milzgewicht: U (N1 = 5; N2 = 9) = 1,0; Z = -2,88; p = 0,02; r = 0,8 = starker Effekt.

	Alter			
	jung (10.–20. Woche)		mittelalt (30.–40. Woche)	
	<i>MW + SD</i>	<i>n</i>	<i>MW + SD</i>	<i>n</i>
Homozygot Alox15-KI-Weibchen				
Alter [Wochen]	15,83 ± 1,75	9	34,74 ± 4,31	13
Körpergewicht [g]	22,94 ± 1,16	6	26,56 ± 2,08	13
Absolute Organgewichte				
Milz [g]	0,11 ± 0,02 *	9	0,11 ± 0,02	13
Niere (paarig) [g]	0,3 ± 0,02	5	0,33 ± 0,05	7
Gehirn [g]	0,45 ± 0,01	5	0,44 ± 0,02	7
Relative Organgewichte				
Milz/KG [%]	0,48 ± 0,07	6	0,43 ± 0,06	13
Niere/ KG [%]	1,27 ± 0,04	5	1,22 ± 0,12	7
Gehirn/KG [%]	1,92 ± 0,09	5	1,68 ± 0,10	7
Wildtyp Alox15-KI-Weibchen				
Alter [Wochen]	16,57 ± 0	5	36,2 ± 5,42	11
Körpergewicht [g]	21,66 ± 0,98	5	26,76 ± 2,52	11
Absolute Organgewichte				
Milz [g]	0,09 ± 0 *	5	0,12 ± 0,01	11
Niere (paarig) [g]	0,29 ± 0,03	5	0,37 ± 0,06	5
Gehirn [g]	0,45 ± 0,01	5	0,44 ± 0,02	5
Relative Organgewichte				
Milz/KG [%]	0,42 ± 0,02	5	0,45 ± 0,04	11
Niere/ KG [%]	1,35 ± 0,08	5	1,30 ± 0,09	5
Gehirn/KG [%]	2,06 ± 0,09	5	1,57 ± 0,12	5

Tabelle 36: Absolute und relative Organgewichte von männlichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: eigene Darstellung und Berechnung). Zufällig ausgewählte männliche Alox15b-KI-Mäuse und ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen des gleichen Geschlechts wurden in zwei unterschiedliche Altersgruppen (10–20 Wochen, 30–40 Wochen) klassifiziert. Die ausgesuchten Tiere wurden durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, die Organe präpariert und gewogen. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). KG: Körpergewicht; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n: Anzahl der Tiere; * : signifikanter Unterschied in der Altersgruppe; Ergebnisse zum Hodengewicht: U (N1 = 6; N2 = 4) = 0,0; Z = -2,56; p = 0,01; r = 0,8 = starker Effekt; relatives Verhältnis Hoden/Körpergewicht: U (N1 = 6; N2 = 4) = 1,0; Z = -2,35; p = 0,19; r = 0,7 = starker Effekt.

	Alter			
	jung (10.–20. Woche)		mittelalt (30.–40. Woche)	
	<i>MW + SD</i>	<i>n</i>	<i>MW + SD</i>	<i>n</i>
Homozygot Alox15b-KI-Männchen				
Alter [Wochen]	9,48 ± 0,12	6	33,93 ± 3,79	10
Körpergewicht [g]	26,10 ± 1,83	6	33,79 ± 1,74	10
Absolute Organgewichte				
Milzgewicht [g]	0,10 ± 0,02	6	0,12 ± 0,02	10
Niere (paarig) [g]	0,34 ± 0,03	6	0,48 ± 0,03	4
Gehirn [g]	0,43 ± 0,01	6	0,44 ± 0,02	4
Hoden (paarig) [g]	0,18 ± 0,02	6	0,21 ± 0,01 *	4
Relative Organgewichte				
Milz/KG [%]	0,38 ± 0,06	6	0,35 ± 0,06	10
Niere/ KG [%]	1,30 ± 0,06	6	1,43 ± 0,11	4
Gehirn/KG [%]	1,67 ± 0,10	6	1,32 ± 0,09	4
Hoden/KG [%]	0,70 ± 0,05	6	0,62 ± 0,04	4
Wildtyp Alox15b-KI-Männchen				
Alter [Wochen]	9,64 ± 0,61	6	35,52 ± 5,11	12
Körpergewicht [g]	25,53 ± 0,083	6	32,65 ± 1,39	12
Absolute Organgewichte				
Milzgewicht [g]	0,09 ± 0,01	6	0,11 ± 0,02	12
Niere (paarig) [g]	0,35 ± 0,02	6	0,46 ± 0,02	6
Gehirn [g]	0,43 ± 0,02	6	0,44 ± 0,01	6
Hoden (paarig) [g]	0,19 ± 0,01	6	0,22 ± 0,01 *	6
Relative Organgewichte				
Milz/KG [%]	0,35 ± 0,02	6	0,033 ± 0,04	12
Niere/ KG [%]	1,35 ± 0,07	6	1,42 ± 0,07	6
Gehirn/KG [%]	1,66 ± 0,07	6	1,36 ± 0,08	6
Hoden/KG [%]	0,73 ± 0,04	6	0,69 ± 0,04	6

Zusammenfassung: Mit zwei Ausnahmen konnten beim Vergleich der Organgewichte zwischen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen in zwei unterschiedlichen Alterskategorien (jung, mittelalt) keine signifikanten Unterschiede der Organgewichte festgestellt werden.

3.4.6 Einzelfallbeschreibung von Tumoren während der Alterung der Alox15b-KI-Mäuse

Bei der Blutabnahme (siehe Abschnitt 2.3.2.1 und Abschnitt 3.4.8) wurde neben dem Brustkorb auch der Bauchraum der Tiere eröffnet, um mögliche anatomische Auffälligkeiten erkennen zu können. Dabei wurde festgestellt, dass bei drei Alox15b-KI-Mäusen der Altersgruppe „ca. 70. bis ca. 80. Woche“ Bauchraumtumore nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu wurden keine Tumore bei ausgekreuzten Wildtyp-Mäusen gefunden. Bei einem männlichen Tier wurde ein Tumor der Bläschendrüsen festgestellt, der sich durch einen vergrößerten, verhärteten und bräunlich gefärbten Samenstrang mit gelblichen Enden zeigte (Abbildung 29). Das Tumorgewebe zeigte sich in der Histologie unauffällig, jedoch enthielt der Samenstrang teilweise kristallines Sekret. Eine genaue histologische Klassifizierung des Tumors konnte nicht vorgenommen werden, da der Tumor als Zufallsbefund entdeckt wurde.

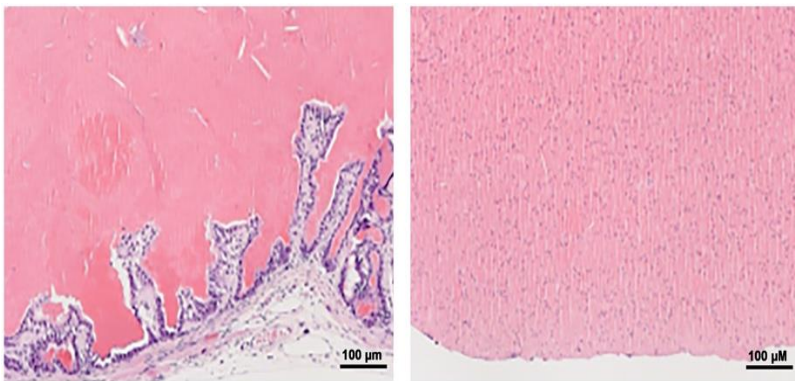


Abbildung 29: Samenstrang-tumor einer männlichen Alox15b-KI-Maus (Quelle: iPATH der Charité, Berlin). Nach Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation unter Narkose wurde ein Samenstrangtumor entnommen und in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Die histologische Aufarbeitung und HE-Färbung erfolgte durch die Core-Unit iPATH der Charité (Berlin).

Bei einem weiblichen Tier (Abbildung 30) wurde ein Tumor mit einer Zyste im Bauchraum festgestellt. Der Kern des Tumors sah nekrotisch aus, am Rand des Tumors befanden sich Granulozyten als Zeichen einer akuten Entzündung. Begleitet wurde dieser Tumor von einer vergrößerten Milz mit deutlichen Zeichen einer extramedullären Hämatopoese. Außerdem konnten zahlreiche unreife und reife Granulozyten, sowie Megakaryozyten in der Milz nachgewiesen werden, die aber auch üblicherweise an diesen Stellen vorhanden sind. Auch hier war eine genauere histologische Klassifizierung des Tumors nicht möglich, da keine klinischen Daten verfügbar waren.

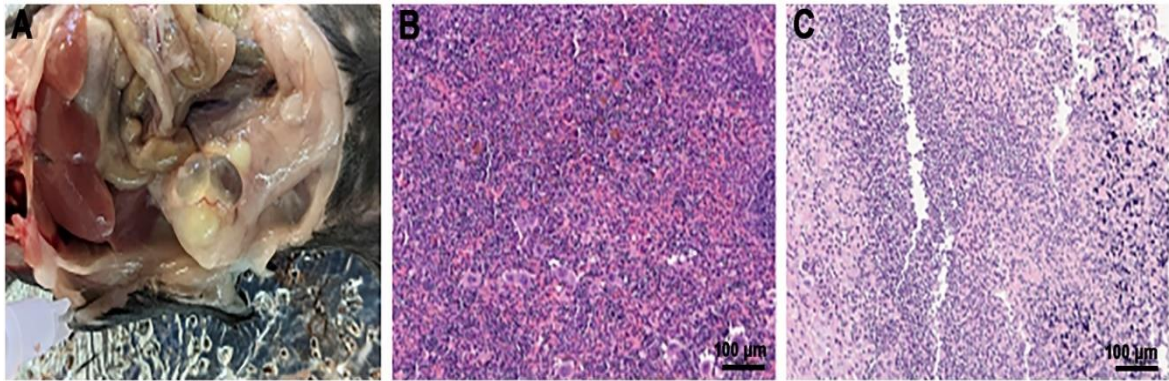


Abbildung 30: Weibliche Alox15b-KI-Maus mit einem nicht näher definierten Bauchraumtumor (Quelle: A: eigene Aufnahme; B+C: Core-Unit iPATH der Charité, Berlin). Nach Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation unter Narkose wurde der Tumor sowie die Milz entnommen und in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Die histologische Aufarbeitung und HE-Färbung erfolgte durch die Core-Unit iPATH der Charité (Berlin). A) Eröffneter Bauchraum mit prominentem Tumor, B) HE-Färbung der Milz, C) HE-Färbung des Tumorgewebes.

Bei einem weiteren weiblichen Tier wurde im Mesenterium ein mögliches Lipom nachgewiesen (Abbildung 31). Dabei fielen mehrfache Knoten im Fettgewebe auf, die durch Infiltrate von Entzündungszellen gekennzeichnet waren und vielfach mehrkernige Riesenzellen enthielten. Auch hier konnte keine genauere histologische Identifizierung des Tumors vorgenommen werden.



Abbildung 31: Weibliche Alox15b-KI-Maus mit einem nicht näher definierten Lipom im Mesenterium (Quelle: A+B: eigene Aufnahmen; C: Core-Unit iPATH der Charité, Berlin). Nach Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation unter Narkose wurde der Tumor entnommen und in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Die histologische Aufarbeitung und HE-Färbung erfolgte durch die Core-Unit iPATH der Charité (Berlin). A) Eröffneter Bauchraum mit prominentem Tumor, B) Isolierter Tumor des Mesenteriums, C) HE-Färbung des Tumorgewebes.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen der Untersuchungen nicht gezielt nach Tumoren bei den Mäusen gesucht wurde. Deshalb stellen die geschilderten Beobachtungen Zufallsbefunde dar, die bei der Tötung der Mäuse der Alterskategorie „ca. 70. bis ca. 80. Woche“ zum Zwecke der Blutgewinnung gemacht wurden (siehe Abschnitt 3.4.8). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden mindestens 5 männliche

und 5 weibliche Mäuse beider Genotypen (Alox15b-KI vs. Wildtyp-Kontrollen) getötet, um Blut zu gewinnen. Von den 10 untersuchten Alox15b-KI-Mäusen wurden bei den drei oben beschriebenen Individuen Tumore beobachtet. Keiner der 10 Wildtyp-Kontrollen hatte einen Tumor. Es konnte nicht geklärt werden, ob die Entstehung der Tumore im kausalen Zusammenhang mit der genetischen Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b steht. Deshalb sollten in Zukunft Untersuchungen mit diesen Tieren in verschiedenen murinen Tumormodellen durchgeführt werden. Entsprechende Untersuchungen werden auch dadurch unterstützt, dass die Alox15b an der Entstehung verschiedener Tumoren beteiligt zu sein scheint (Tang et al. 2002; Jiang et al. 2006; Roffeis et al. 2007).

Zusammenfassung: Als Zufallsbefund konnte bei der Tötung von zehn alten Alox15b-KI-Mäusen, zum Zweck der Blutabnahme, drei Individuen mit Tumoren verschiedener Organe beobachtet werden. Das war bei keinem der zehn Individuen der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen der Fall.

3.4.7 Charakterisierung der Körpergewichtsentwicklung

Um zu überprüfen, ob die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Maus-Alox15b zu phänotypischen Veränderungen führt, wurden zunächst die Körpergewichtskinetiken von männlichen und weiblichen Alox15b-KI-Mäusen, mit denen von ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen verglichen. Dazu wurden die männlichen und weiblichen Tiere der beiden Genotypen (10 Individuen pro Genotyp und Geschlecht) in verschiedenen Käfigen unter Standardbedingungen gehalten, wobei Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung stand. Einmal pro Woche wurde das Körpergewicht bestimmt und eine visuelle Beurteilung des Gesundheitszustandes (Mobilität, Fellbeschaffenheit) vorgenommen. Die dargestellte Beobachtungsperiode begann mit einem Alter von 10 Wochen und endete nach 64 Wochen. Für die absoluten Werte wurden je Altersgruppe Mittelwert und Standardabweichung mit Microsoft-Excel bestimmt und dann mit der Anzahl (n) an einbezogenen Messwerten in Graph-Pad der Wilcoxon-Test durchgeführt. Die Eingliederung der Versuchstiere in eine Altersgruppe erfolgte nach mathematischen Rundungsregeln (> 0,6 aufgerundet). Zum Beispiel wurden ein 12,8 Wochen altes Tier und ein 13,3 Wochen altes Tier der Gruppe „13. Woche“ zugeordnet.

In Abbildung 32 A sind die absoluten Körpergewichtskinetiken von weiblichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen vergleichend dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass die Kurven fast deckungsgleich sind. Die statistische Auswertung der absoluten Körpergewichtsdaten mit dem Wilcoxon-Test ergab keine signifikante Differenz ($p = 0,66$) zwischen den Alox15b-KI-Mäusen und den ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.

Bei den männlichen Versuchstieren ergab sich dagegen ein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test, $p < 0,0001$) zwischen den beiden Genotypen. Die Körpergewichtskurven lagen in den frühen Stadien der Individualentwicklung (10–24 Wochen) wie bei den weiblichen Individuen ebenfalls übereinander. In den späteren Entwicklungsstadien lag die Kurve der Alox15b-KI-Mäuse (rot) jedoch konsistent unter der Kurve der Wildtyp-Kontrollen (blau). Der Unterschied zwischen den beiden Kurven schien sich mit fortschreitendem Alter der Mäuse immer weiter zu vergrößern.

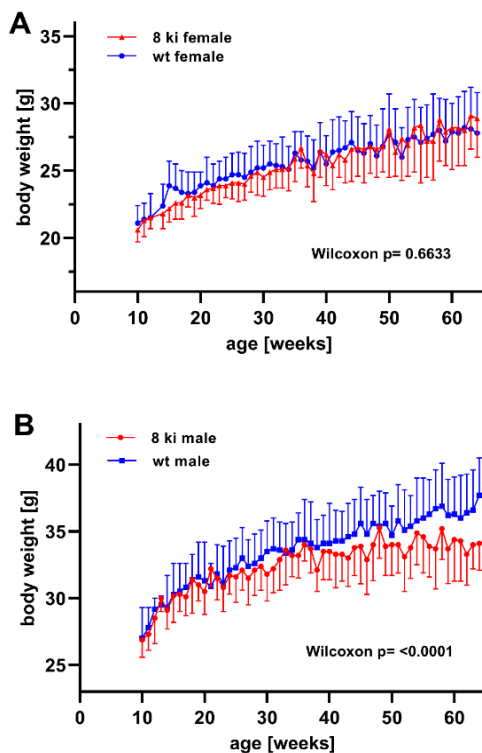


Abbildung 32: Absolute Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Schäfer et al. 2022). Männliche und weibliche Tiere von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (10 Individuen pro Genotyp und Geschlecht) wurden unter Standardbedingungen der FEM-Charité gehalten. Futter und Trinkwasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Einmal pro Woche wurde das Körpergewicht bestimmt und eine visuelle Beurteilung des Gesundheitszustandes (Mobilität, Fellbeschaffenheit) vorgenommen. Die dargestellte Beobachtungsperiode begann mit einem Alter von 10 Wochen und endete nach 64 Wochen. Der Mittelwert und einseitige Standardabweichung sind angegeben.

Aus diesen Körpergewichtsverläufen kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass männlichen Alox15b-KI-Mäuse während ihrer Individualentwicklung signifikant weniger Körpergewicht zunahmten als ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen. Da ein ähnlicher Effekt bei weiblichen Individuen nicht zu beobachten war, könnte die beobachtete körperliche Entwicklungsretardierung geschlechtsspezifisch sein. Aus Zeitgründen war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, weiterführende Untersuchungen zu den möglichen Ursachen der geschlechtsspezifischen Entwicklungsretardierung vorzunehmen.

Zusammenfassung: Die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Maus-Alox15b induziert eine statistisch signifikant geringere Körpergewichtszunahme während der Individualentwicklung männlicher Individuen. Da dieser Effekt bei weiblichen Alox15b-KI-Mäusen nicht nachweisbar war, kann von einem geschlechtsspezifischen Effekt ausgegangen werden, dessen mechanistische Basis nicht untersucht wurde.

3.4.8 Beeinträchtigte Erythropoese der männlichen Alox15b-KI-Mäuse im fortgeschrittenen Alter

Die möglichen Ursachen für die beobachtete geringere Gewichtszunahme der männlichen Alox15b-KI-Mäuse können vielfältig sein. Eine der Ursachen könnte ein teilweise defektes erythropoetisches System sein, was zu einer reduzierten Bildung von roten Blutzellen führen könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden vergleichend hämatologische Grundparameter von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen bestimmt. Da sich subtile hämatopoetische Defekte erst im fortgeschrittenen Lebensalter bemerkbar machen könnten, wurden zunächst männliche und weibliche Alox15b-KI-Mäuse und die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen in drei Alterskategorien eingeteilt: i) jung (10–20 Wochen, $n \geq 5$ pro Geschlecht und Genotyp), ii) mittelalt (30–40 Wochen, $n \geq 5$ pro Geschlecht und Genotyp), iii) alt (ab ca. 70–80 Wochen, $n \geq 5$ pro Geschlecht und Genotyp). Zur Blutabnahme wurden die Mäuse in Narkose durch zervikale Dislokation getötet und EDTA-Blut gewonnen. Anschließend wurden folgende hämatologische Parameter bestimmt: Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokritwert (HK), Erythrozytenzahl (Ery), Leukozytenzahl (Leuko), mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC). Dabei stellen Hb, HK und Ery direkte Messwerte dar, während sich MCV, MCH und MCHC aus den direkt gemessenen Werten berechnen lassen. So ergibt sich z. B. MCHC aus dem Quotienten von Hb und Ery. Dieser Parameter charakterisiert die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration in den Erythrozyten einer Blutprobe. Die Berechnung wurde vom Labor durchgeführt. Auffälligkeiten im Blutbild sind im Anhang (Abschnitt 7.5) aufgeführt. Aus Abbildung 33 kann entnommen werden, dass es bei jungen und mittelalten Mäusen beiderlei Geschlechts keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gab. Detaillierte Ergebnisse befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.6). Interessanterweise wurden jedoch bei alten Männchen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) zwischen den beiden Genotypen beobachtet. Sowohl für die Erythrozytenanzahl, den Hämatokritwert und den Hämoglobingehalt lagen die Werte der alten Alox15b-KI-Mäuse signifikant unter denen der Wildtyp-Kontrollen.

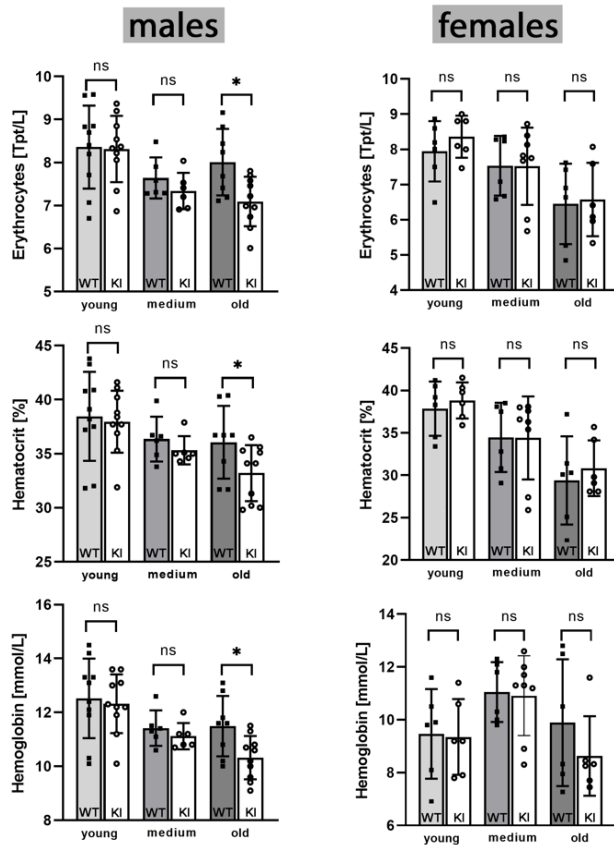


Abbildung 33: Basale hämatologische Parameter von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen in verschiedenen Alterskategorien (Quelle: Schäfer et al. 2022). Alox15b-KI-Mäuse und entsprechende ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen (je $n \geq 5$ je Genotyp und Geschlecht, sowie die Kategorien: jung (10–20 Wochen), mittelalt (30–40 Wochen), alt (ca. 70–80 Wochen)) wurden in Narkose durch zervikale Dislokation getötet und EDTA-Blut durch Herzpunktion gewonnen. Anschließend wurden die folgenden basalen hämatologischen Parameter quantifiziert (siehe Kapitel 2): Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MHC), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC). Für die Parameter Leukozyten, MCV, MHC und MCHC konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in keiner der drei Altersklassen beobachtet werden. Deshalb sind die experimentellen Daten hier nicht gezeigt. Mittelwert, Standardabweichung und einzelne Datenpunkte sind dargestellt. Weitere Ergebnisse befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.6).

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b in geschlechtsspezifischer Art und Weise das erythropoetische System der Tiere beeinträchtigt. Hinsichtlich ihres Ausmaßes sind die beobachteten hämatologischen Unterschiede trotz ihrer statistischen Signifikanz eher subtil. In jungen und mittelalten Mäusen sind möglicherweise undefinierte Kompensationsmechanismen wirksam, welche die hämatopoetischen Abweichungen ausgleichen. Im höheren Alter scheinen diese Kompensationsmechanismen nicht mehr auszureichen, sodass es zur Ausprägung eines defekten hämatologischen Phänotyps kommt.

Zusammenfassung: Die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Maus-Alox15b induziert geschlechtsspezifisch eine eingeschränkte Erythropoese bei gealterten männlichen Individuen. Dieser Effekt drückt sich in einer signifikanten Reduktion des Hämoglobingehalts, des Hämatokrits und der Erythrozytenzahl bei alten männlichen Alox15b-KI-Mäusen aus. Bei weiblichen Individuen konnten solche Unterschiede zwischen den Genotypen nicht nachgewiesen werden.

3.4.9 Erhöhte osmotische Erythrozytenresistenz bei alten männlichen Alox15b-KI-Mäuse

Bei einer gestörten Erythropoese kommt es häufig zu Veränderungen der Eigenschaften von roten Blutzellen, die sich u. a. darin bemerkbar machen können, dass die osmotische

Resistenz der Zellen beeinträchtigt ist. Wenn Erythrozyten in einer hypotonen Flüssigkeit (im Extremfall Wasser) resuspendiert werden, nehmen sie aufgrund des onkotischen Drucks des Hämoglobins Wasser auf, schwellen an und platzen. Dadurch gelangt Hämoglobin in den Extrazellularraum und kann als Maß der Zellschädigung im Zellüberstand nachgewiesen werden. Wenn Wasser als hypotones Medium verwendet wird, sind nach 30 min Inkubation alle Erythrozyten geplatzt und die Hämoglobinkonzentration im Zellüberstand kann als 100 % Hämolyse definiert werden. Werden die roten Blutzellen in 0,85%iger NaCl-Lösung (isotone Flüssigkeit) inkubiert, überleben alle Zellen die Inkubationszeit ohne zu hämolysieren. Erfolgt die Inkubation in abgestuft hypotonen Lösungen (z. B. 0,3 % NaCl, 0,4 % NaCl, 0,5 % NaCl) kommt es zu einer graduellen Hämolyse. Die Form und die Lage solcher Hämolysekurven kann als Maß für die osmotische Resistenz der roten Blutzellen angesehen werden (Godal et al. 1980; Liem and Gallagher 2005; King and Zanella 2013). Um die osmotische Resistenz der roten Blutzellen von Alox15b-KI-Mäusen mit der von ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen zu vergleichen, wurden die Zellen von jungen (10–20 Wochen), mittelalten (30–40 Wochen) und alten (ca. 70–80 Wochen) Individuen präpariert und entsprechende Hämolysekurven aufgenommen. Für die grafische Darstellung der erhaltenen experimentellen Daten wurden aus Gründen der Anschaulichkeit einseitige Fehlerbalken dargestellt. Daten zu den einbezogenen Tieren je Altersgruppe befinden sich im Anhang (Abschnitt 7.8).

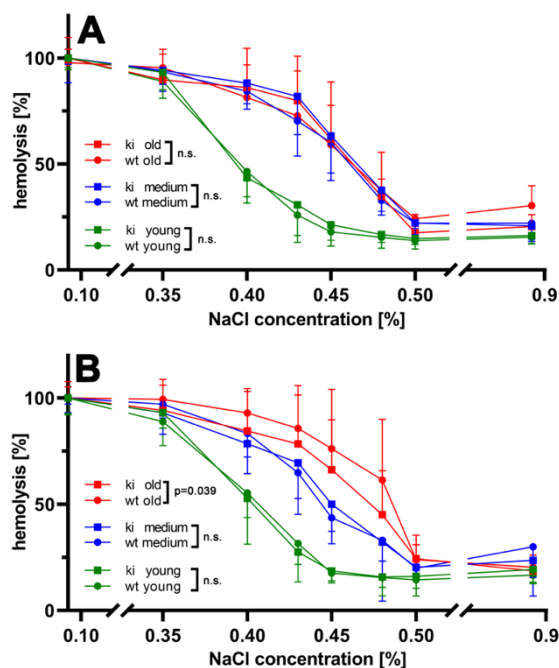


Abbildung 34: Osmotische Resistenz von murinen Alox15b-KI-Erythrozyten und entsprechenden Zellen von ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen verschiedener Alterskategorien (Quelle: Schäfer et al. 2022). Die Erythrozyten von jungen (10–20 Wochen), mittelalten (30–40 Wochen) und alten (ca. 70–80 Wochen) Individuen (n = 5–11) wurden präpariert und die Hämolysekurven aufgenommen (siehe Kapitel 2). Der Hämolysegrad der Zellen wurde gegen die Osmolarität der Inkubationslösung (% NaCl) aufgetragen. Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Wilcoxon-Test statistisch ausgewertet (ns: kein signifikanter Unterschied). A) weibliche Individuen, B) männliche Individuen.

In Abbildung 34 A sind die Hämolysekurven für weibliche Individuen zusammengestellt. Erwartungsgemäß zeigen die Erythrozyten von jungen, weiblichen Mäusen eine hohe osmotische Stabilität, da der Hämolysegrad selbst bei NaCl-Konzentrationen von 0,40 % bzw. 0,45 % noch gering ist. Im Gegensatz dazu, sind die Hämolysekurven für mittelalte und alte Individuen deutlich nach rechts verschoben. Diese Rechtsverschiebung bedeutet, dass die Erythrozyten dieser Individuen hohe Hämolyse bei höheren NaCl-Konzentrationen aufweisen und damit sensitiver auf osmotischen Stress reagieren. Das wichtigste Resultat dieser Experimente ist jedoch, dass in keiner der drei Altersgruppen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen besteht. Die Hämolysekurven der beiden Genotypen liegen in allen Altersgruppen praktisch übereinander. Bei männlichen Individuen ergab sich ein anderes Bild (Abbildung 34 B). Auch hier besaßen die Erythrozyten junger Individuen (grüne Kurven) die größte osmotische Resistenz, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden konnte. Bei mittelalten Individuen (blaue Kurven) war die osmotische Resistenz deutlich abgeschwächt, was an der Rechtsverschiebung der Hämolysekurve ablesbar ist. Für alte männliche Erythrozyten (rote Kurve) war die Rechtsverschiebung noch ausgeprägter, was auf eine weitere Einschränkung der osmotischen Stabilität hindeutet. Insgesamt war das wichtigste Ergebnis dieses Experimentes, dass sich die Hämolysekurven der alten Erythrozyten beim Vergleich der beiden Genotypen beim Wilcoxon-Test signifikant ($p = 0,039$) voneinander unterschieden. Die Kurve der *Alox15b*-KI-Zellen war im Vergleich zur Kurve der Wildtyp-Erythrozyten nach links verschoben, was auf eine erhöhte osmotische Resistenz der *Alox15b*-KI-Erythrozyten hindeutet. Im Hinblick auf die untersuchten hämatologischen Blutparameter (siehe Abschnitt 3.4.8) war dieses Ergebnis unerwartet. Die hämatologischen Daten scheinen darauf hinzudeuten, dass die Erythropoese bei *Alox15b*-KI-Mäusen funktionell beeinträchtigt ist. Dies sollte sich in einer höheren Suszeptibilität der Zellen gegenüber osmotischem Stress ausdrücken. In dem Experiment wurde aber herausgefunden, dass alte *Alox15b*-KI-Erythrozyten weniger anfällig gegenüber einer osmotischen Hämolyse sind als entsprechende Wildtyp-Zellen, was aus der Linksverschiebung der Hämolysekurve geschlussfolgert werden kann (Abbildung 34 B). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte sein, dass die genetische Manipulation des *Alox15b*-Gens durch endogene Kompensationsmechanismen beantwortet wird, welche darauf gerichtet sind, die veränderte Erythropoese zu normalisieren. Von diesem Standpunkt aus gesehen, wäre es funktionell sinnvoll, wenn die gebildeten roten Blutzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber externen Belastungen (Shear Stress, osmotische Veränderungen) aufweisen und damit ihre

Lebensdauer erhöht sein würde. Insofern könnte die Bildung osmotisch resistenterer Erythrozyten den Mangel an roten Blutzellen zumindest teilweise kompensieren. Aus Zeitgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit aber keine *In-vivo*-Lebensdaueruntersuchungen der roten Blutzellen durchgeführt werden, um das oben beschriebene Szenario zu überprüfen.

Zusammenfassung: Die osmotische Resistenz von Alox15b-KI-Erythrozyten und entsprechenden Wildtyp-Zellen unterscheidet sich bei weiblichen Individuen nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden für männliche Erythrozyten von jungen und mittelalten Individuen ermittelt. Im Gegensatz dazu konnte bei alten männlichen Alox15b-KI-Erythrozyten eine erhöhte osmotische Resistenz beobachtet werden. Dieses Ergebnis könnte die funktionelle Konsequenz von Kompensationsreaktionen darstellen, um die Auswirkungen des eingeschränkten erythropoetischen Systems von Alox15b-KI-Mäusen auszugleichen.

3.4.10 Untersuchungen zum Blutplasmaoxylipidom von Alox15b-KI-Mäusen

Im Blutplasma von Mäusen können oxygenierte PUFA-Derivate mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden. Da diese Metabolite jedoch nicht nur durch verschiedene Alox-Isoformen sondern auch durch andere Fettsäure-oxygenierende Enzyme (z. B. Zytochrom-P450 abhängige Monooxygenasen) und/ oder durch metallkatalysierte Autoxidation synthetisiert werden können, war bislang unklar, ob sich genetische Manipulationen an den verschiedenen Alox-Isoformen auch im Muster der Plasmaoxylipine widerspiegeln. Um diese Frage zu beantworten, wurde Blutplasma von männlichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen gewonnen und die Plasmaoxylipidome mittels LC-MS/MS analysiert. Die wichtigsten Resultate dieser Analyse sind Abbildung 35 zusammengestellt. Die Auswahl der Metabolite ergab sich aus den Vorhersagen, die aufgrund der veränderten Reaktionsspezifität der rekombinanten Alox15b mit verschiedenen PUFAs (AA, DHA, EPA, LA) erwartet werden konnte. Weitere Daten zur rekombinanten Alox15b finden sich im Anhang (Abschnitt 7.4). Die Summe aller quantifizierten freien Plasmaoxylipine ergab, dass bei den Alox15b-KI-Mäusen fast doppelt so viele oxygenierte PUFAs im Blutplasma vorhanden waren, als bei den ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltieren (Abbildung 35 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Alox15b-KI-Mäuse unter einer größeren oxidativen Belastung stehen als die Wildtyp-Kontrollen. Auf der Grundlage dieser Daten ließ sich jedoch nicht herausfinden, warum die doppelte Punktmutation im *Alox15b*-Gen zu einem erhöhten oxidativen Stress führt. Zusätzliche genehmigungspflichtige Tierversuche wären zur Beantwortung dieser Frage nötig gewesen.

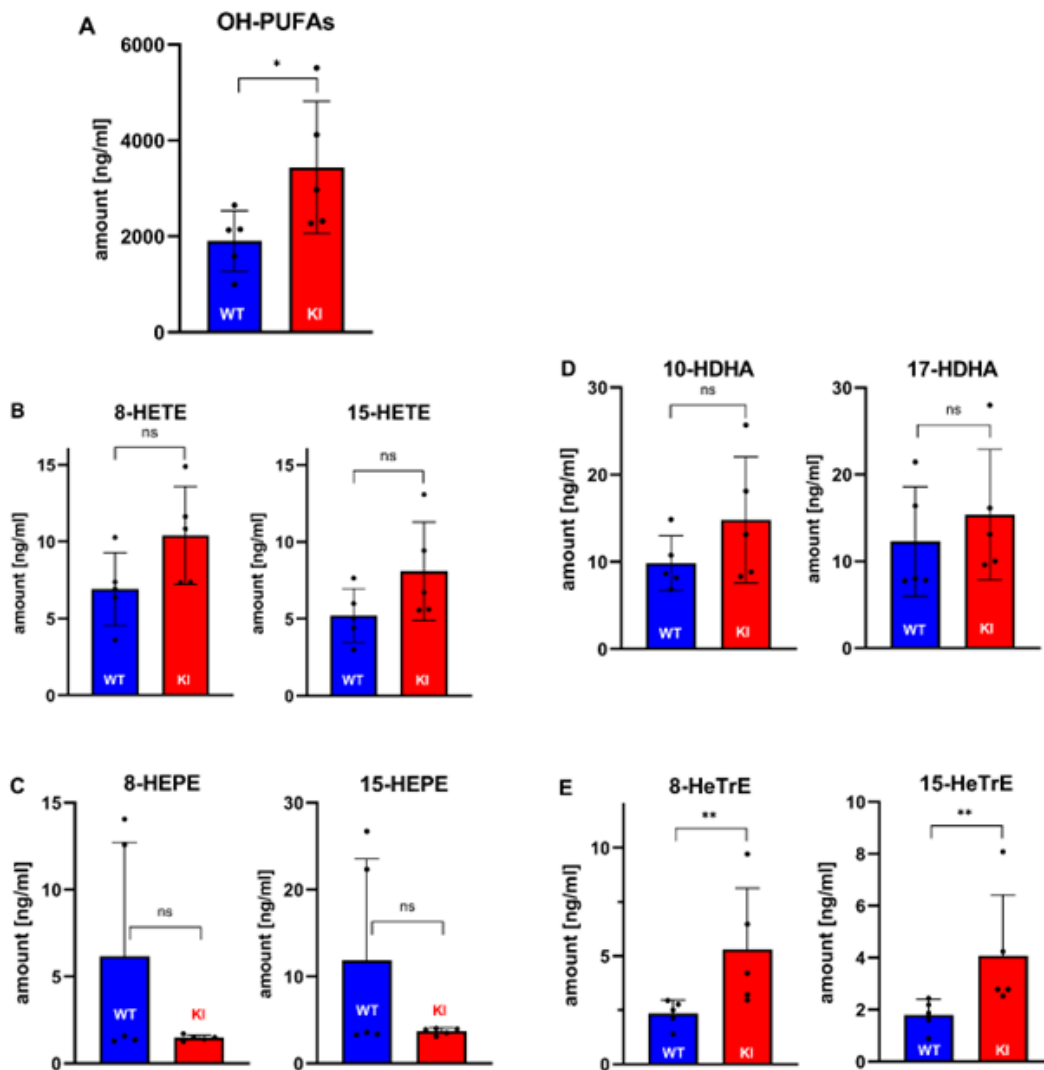


Abbildung 35: Plasmakonzentrationen ausgewählter Eikosanoide bei Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Schäfer et al. 2022). Blutplasma wurde von männlichen Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (je n = 5) gewonnen und die Plasmaeikosanome wurden mittels LC-MS/MS (siehe Kapitel 2) analysiert. Ausgewählte Metabolite sind dargestellt. (A) Summe aller quantifizierten Oxylipine (OH-PUFAs). (B) Quantifizierung der wichtigsten Metaboliten der Arachidonsäure (AA). (C) Quantifizierung der wichtigsten Metabolite von 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (DHA). (D) Quantifizierung der wichtigsten Metabolite von 8,11,14-Eicosatriensäure-Metaboliten (ETE); * signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$; ** signifikanter Unterschied bei $p < 0,01$; ns: kein signifikanter Unterschied.

Das Hauptprodukt der *In-vitro*-AA-Oxygenierung durch die Maus-Alox15b ist 8-HETE (siehe Abschnitt 3.3.1, Abbildung 23). Im Gegensatz dazu wandelt die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante (humanisiertes Enzym) dieses Substrat fast ausschließlich zu 15-HETE um. Wenn die Alox15b signifikant zum Vorkommen von 8-HETE in Blutplasma von Wildtyp-Mäusen beitragen würde, müssten die Plasmakonzentrationen von 8-HETE bei den Alox15b-KI-Mäusen geringer sein als bei den Wildtyp-Tieren. In Gegensatz dazu müssten die Alox15b-KI-Mäuse höhere

Plasmakonzentrationen an 15-HETE aufweisen. Die Analysen der Plasmaeikosanome zeigten jedoch (Abbildung 35 B), dass es keine signifikanten Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von 8-HETE und 15-HETE beim Vergleich von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Tieren gibt. Diese Daten deuten darauf hin, dass die veränderte Reaktionsspezifität der Alox15b sich nicht oder in zu geringem Maße auf die Plasmakonzentrationen der beiden Metabolite auswirkt. Mit anderen Worten bedeuten diese Ergebnisse, dass die Plasmakonzentrationen von 8-HETE bei Wildtyp-Mäusen nicht auf die katalytische *In-vivo*-Aktivität der Alox15b zurückzuführen ist. Andere AA-oxygenierende Reaktionen scheinen dafür von höherer Relevanz zu sein.

Das Hauptprodukt der *In-vitro*-EPA-Oxygenierung durch die Maus-Alox15b ist 8-HEPE (siehe Abschnitt 3.3.2, Abbildung 24). Im Gegensatz dazu wandelt die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante (humanisiertes Enzym) dieses Substrat fast ausschließlich zu 15-HEPE um. Wenn die Alox15b signifikant zum Vorkommen von 8-HEPE im Blutplasma von Wildtyp-Mäusen beitragen würde, müssten die Plasmakonzentrationen von 8-HEPE bei den Alox15b-KI-Mäusen geringer sein als bei den Wildtyp-Tieren. In Gegensatz dazu müssten die Alox15b-KI-Mäuse höhere Plasmakonzentrationen an 15-HEPE aufweisen. Die Analysen der Plasmaoxylipide zeigten jedoch (Abbildung 35 C), dass es keine signifikanten Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von 8-HEPE und 15-HEPE beim Vergleich von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Tieren gibt. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass sich die veränderte Reaktionsspezifität der Alox15b nicht oder in zu geringem Maße auf die Plasmakonzentrationen der beiden EPA-Metabolite auswirkt. Mit anderen Worten deuten diese analytischen Daten darauf hin, dass die Plasmakonzentrationen von 8-HEPE bei Wildtyp-Mäusen nicht die katalytische *In-vivo*-Aktivität der Alox15b widerspiegelt.

Das Hauptprodukt der *In-vitro*-DHA-Oxygenierung durch die Maus-Alox15b ist 10-HEPE (siehe Abschnitt 3.3.2). Im Gegensatz dazu wandelt die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante (humanisiertes Enzym) dieses Substrat dominant zu 17-HDHA um. Wenn die Alox15b signifikant zum Vorkommen von 10-HDHA im Blutplasma von Wildtyp-Mäusen beitragen würde, müssten die Plasmakonzentrationen von 10-HDHA bei den Alox15b-KI-Mäusen geringer sein als bei den Wildtyp-Tieren. In Gegensatz dazu müssten die Alox15b-KI-Mäuse höhere Plasmakonzentrationen an 17-HDHA aufweisen. Die Analysen der Plasmaoxylipide zeigten jedoch (Abbildung 35 D), dass es keine signifikanten Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von 10-HDHA und 17-HDHA beim Vergleich

von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Tieren gibt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die veränderte Reaktionsspezifität der Alox15b sich nicht oder nur in sehr geringem Maße auf die Plasmakonzentrationen der beiden DHA-Metabolite auswirkt. Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass die katalytische Aktivität der Alox15b *in vivo* sich kaum auf die Plasmakonzentrationen ihrer Hauptmetabolite (8-HETE, 8-HEPE, 10-HDHA) auswirkt. Offensichtlich stammen die im Blutplasma nachweisbaren Konzentrationen dieser Metabolite überwiegend aus anderen Oxygenierungsreaktionen, die mit der Alox15b nur wenig zu tun haben. Um welche Reaktionen bzw. Enzyme es sich dabei aber handelt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden.

Zusammenfassung: Verglichen mit ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen zeigen Alox15b-KI-Mäuse fast doppelt so hohe Plasmakonzentrationen an oxygenierten PUFAs. Die Daten deuten an, dass die gentechnisch veränderten Tiere einem höheren Grad an oxidativer Belastung ausgesetzt sind. Die Alox15b trägt nur in begrenztem Maße zu den Gleichgewichtskonzentrationen an oxygenierten PUFAs im Blutplasma bei.

3.5 Testung der Alox15b-KI-Mäuse in *In-vivo*-Entzündungsmodellen

Da die ALOX15 und die ALOX15B bei der Differenzierung von antiinflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen beteiligt zu sein scheinen (Wuest et al. 2012; Mabalirajan et al. 2013; Martinez and Gordon 2014; Snodgrass et al. 2021) und da beide Enzyme auch bei der Synthese von pro- bzw. antiinflammatorischen Mediatoren involviert sein können (Levy et al. 1993; Magnusson et al. 2012; Ringholz et al. 2014; Green et al. 2016; Perry et al. 2020), sollte getestet werden, ob sich die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b auf den Verlauf einer Entzündungsreaktion auswirkt. Dazu wurden Alox15b-KI-Mäuse und ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen in zwei unterschiedlichen murinen Entzündungsmodellen (DSS-Kolitis und CFA-Pfotenödem) getestet, wobei bei beiden Entzündungsmodellen verschiedene klinische Readout-Parameter Anwendung fanden, um den Schweregrad der Entzündungsreaktion zu quantifizieren. Das experimentelle Protokoll der DSS-Experimente wurde so strukturiert, dass sowohl die akute Entzündungsreaktion als auch die Heilungsphase quantifiziert werden konnten. Im CFA-Modell wurde hingegen nur die akute Entzündungsreaktion quantifiziert.

3.5.1 Modell der DSS-Kolitis

Bei der DSS-Kolitis handelt es sich um ein Darmentzündungsmodell, bei dem durch die Gabe von DSS im Trinkwasser eine Entzündungsreaktion in der Darmwand ausgelöst wird,

die auf die DSS-induzierten Schädigung des Darmepithels zurückzuführen ist (Zijlstra et al. 1992; Kimura et al. 1993; Araki 2010). Durch Variation des DSS-Gehalts im Trinkwasser kann gesteuert werden, ob die Entzündungsreaktion einen schweren (z. B. 3 % DSS im Trinkwasser, Erfahrungen aus der AG-Kühn) oder einen leichten Verlauf (z. B. 1,5 % DSS im Trinkwasser) haben soll. Durch die Gabe von DSS wird das Darmepithel geschädigt, was einerseits zur Einwanderung von Entzündungszellen in die Darmwand führt, aber andererseits auch die Barrierefunktion des Darmepithels beeinträchtigt (Kitajima et al. 1999; Vidal-Lletjós et al. 2019). Dadurch kommt es zu einem verstärkten Wasserverlust, der sich in einer Reduktion des Körpergewichtes manifestiert. Aus dem Ausmaß der Körpergewichtsreduktion kann auf den Schweregrad der Entzündung geschlussfolgert werden. Deshalb stellt das Körpergewicht den wichtigsten (nicht aber den alleinigen) klinischen Readout-Parameter für dieses Entzündungsmodell dar.

Im Rahmen der akuten Phase der DSS-Kolitis kommt es zu einem Wasserverlust der Darmwand und dadurch zu einer Umstrukturierung des Gewebes. Als messbare Konsequenz dieser Veränderungen ergibt sich eine Schrumpfung des Kolons, die als zweiter klinischer Readout-Parameter angesehen werden kann. Wie der Körpergewichtsverlust ist auch die Kolonschrumpfung reversibel, sodass sich beide Parameter im Rahmen der Heilungsphase weitgehend normalisieren. Der Nachteil der Kolonschrumpfung als klinischer Readout-Parameter besteht darin, dass er nicht kontinuierlich verfolgt werden kann, sondern dass die Tiere dazu getötet werden müssen.

Da verschiedene Mausstämme unterschiedlich auf einen DSS-Reiz reagieren, musste zunächst in Vorversuchen die optimale DSS-Konzentration zur Induktion einer milden Kolitis für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass mit 1,5 % DSS im Trinkwasser nur eine subtile Entzündungsreaktionen beobachtet wurde. Als die entzündungsinduzierte Abnahme des Körpergewichtes als klinischer Readout-Parameter für den Grad der Entzündungsreaktion verfolgt wurde, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen DSS-behandelten Wildtyp-Mäusen (n = 3) und entsprechenden Kontrolltieren (n = 3), ohne DSS im Trinkwasser, beobachtet werden (siehe Anhang, Abschnitt 7.10). Nachfolgend wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Tiere 2 % DSS im Trinkwasser verabreicht bekamen. Bei diesen Versuchen kam es zu einem deutlichen Gewichtsverlust der DSS-behandelten Wildtyp-Mäuse und zu einer signifikanten Kolonschrumpfung. Aus diesen Daten (siehe Anhang, Abschnitt 7.10) ergab sich, dass der Hauptversuch mit 2 % DSS im Trinkwasser durchgeführt werden sollte.

Zusammenfassung: In Vorversuchen konnte ermittelt werden, dass die Behandlung der von Wildtyp-Mäusen mit 1,5 % DSS im Trinkwasser nicht zur Induktion einer Darmentzündung führt. Deshalb wurde für den Hauptversuch die Gabe von 2 % DSS im Trinkwasser ausgewählt. Bei der Applikation dieser DSS-Konzentration konnte eine milde experimentelle Darmentzündung bei Wildtyp-Mäusen induziert werden.

3.5.1.1 Klinische Readout-Parameter der experimentell induzierten DSS-Kolitis

3.5.1.1.1 Vergleich der Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen

Um zu überprüfen, ob sich die Alox15b-KI-Mäuse im DSS-Kolitismodell anders verhalten als die ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen, wurden gemäß dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen experimentellen Protokoll, 18 weibliche Tiere jeden Genotyps in drei Gruppen zu je 6 Individuen eingeteilt: 0-Tage-Gruppe, 5-Tage-Gruppe, 15-Tage-Gruppe. Die Tiere der 0-Tage-Gruppe wurden vor der ersten DSS-Gabe getötet, um Ausgangswerte zu bestimmen. Die verbleibenden 12 Tiere der beiden Genotypen wurden anschließend mit 2 % DSS im Trinkwasser behandelt, wobei die Tiere jeden Tag gewogen wurden. Aus diesen Daten wurden die individuellen relativen Körpergewichte berechnet, wobei das Körpergewicht jedes Individuums beim Eintritt in den Versuch (unmittelbar vor der ersten Gabe von DSS) 100 % gesetzt wurde. Nach 5 Tagen wurde die DSS-Gabe eingestellt und den Tieren wurde DSS-freies Trinkwasser angeboten. Nach 7 Tagen (erwarteter Höhepunkt der akuten Entzündungsphase) wurden 6 Tiere pro Genotyp getötet und für die Auswertung verwendet. Die verbleibenden 6 Tiere beider Genotypen wurden 15 Tage nach Versuchsbeginn (Ende der Heilungsphase) getötet und ebenfalls für die Auswertung verwendet. Leider mussten 3 Alox15b-KI-Tiere aus der 15-Tage-Gruppe nach 5 Tagen DSS Behandlung aus Tierschutzgründen getötet werden, sodass am Ende des Versuchs nur noch drei Individuen in dieser Versuchsgruppe vorhanden waren. Zusätzlich zu den oben beschriebenen zwei DSS-Gruppen (Alox15b-KI+DSS und Wildtyp+DSS) wurden zwei gleich große Kontrollgruppen (je n = 6, Alox15b-KI, ausgekreuzter Wildtyp) mitgeführt, bei denen die Tiere kein DSS verabreicht bekamen.

In Abbildung 36 sind die relativen Körpergewichtskinetiken von DSS-behandelten Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen dargestellt. Dabei fällt auf, dass es sowohl bei den Wildtyp-Mäusen (blaue Kurve) als auch bei den Alox15b-KI-Tieren (rote Kurve) ab dem 4. Tag der DSS-Behandlung zu einer graduellen Abnahme der relativen Körpergewichte kam. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei beiden Genotypen nach einer Latenzzeit von 3–4 Tagen ein Körpergewichtsverlust nachweisbar war, der dahingehend interpretiert werden konnte, dass die DSS-Behandlung bei beiden Genotypen

eine Entzündungsreaktion induziert hat. Bei den beiden Kontrollgruppen (kein DSS im Trinkwasser) war dieser Körpergewichtsverlust nicht nachweisbar. Es konnte sogar im Gegenteil bei beiden Kontrollgruppen eine entwicklungsabhängige Zunahme des Körpergewichtes festgestellt werden (Daten siehe Anhang, Abschnitt 7.11). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es nach Beendigung der DSS-Behandlung bei beiden Genotypen zu einer Zunahme der relativen Körpergewichte kam, sodass am Ende des Experimentes die Ausgangsgewichte wieder erreicht (Alox15b-KI-Mäuse) oder sogar überschritten (Wildtyp-Kontrollen) wurden.

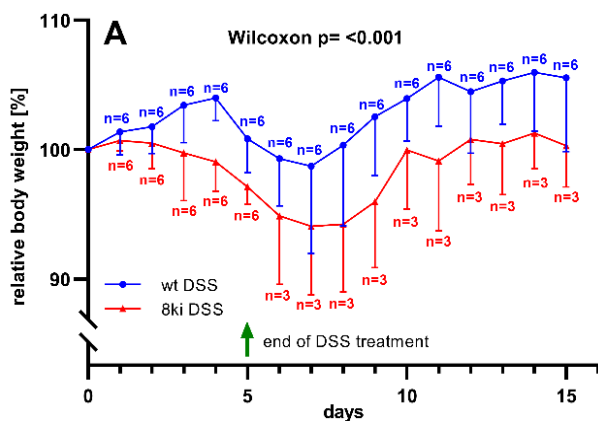


Abbildung 36: Relative Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen unter DSS-Behandlung (Quelle: eigene Messwerte, Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck,). Bis zum 5. Tag des experimentellen Protokolls wurde 2 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Aus Tierschutzgründen mussten 3 von 6 Alox15b-KI-Mäuse aus der 15-Tage-Gruppe am Tag 5 aus dem Versuch genommen werden, sodass am Ende des Versuchs nur noch 3 Individuen (n) verfügbar waren. Die Tiere wurden täglich gewogen und die relativen Körpergewichte errechnet. Die statistische Auswertung der Körpergewichtskinetiken wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt ($p < 0,001$). Aus optischen Gründen sind nur negative Standardabweichungen angegeben.

Als wichtigstes Ergebnis dieses Experiments konnte festgestellt werden, dass sich die Kurve für die relative Körpergewichtskinetik der Alox15b-KI-Mäuse (rote Kurve) im gesamten Verlauf des Experiments (mit Ausnahme des 0-Tage-Wertes) unterhalb der Kurve für die ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen befand. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Alox15b-KI-Mäuse empfindlicher auf die DSS-Gabe reagierten als die entsprechenden Kontrollmäuse. Obwohl ein paarweiser Vergleich der relativen Körpergewichte der beiden Genotypen zu keinem Zeitpunkt der Kurven einen signifikanten Unterschied ergab, konnte im Wilcoxon-Test nachgewiesen werden, dass sich die beiden Genotypen in diesem Entzündungsmodell signifikant ($p < 0,001$) anders verhielten. Dabei scheint die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b die Tiere sensitiver gegenüber DSS zu machen. In welchem mechanistischen Zusammenhang die veränderte Reaktionsspezifität der Alox15b zur erhöhten Sensitivität der Tiere gegenüber DSS-Behandlung steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Zusammenfassung: Eine DSS-Behandlung (2 % DSS im Trinkwasser) induziert sowohl bei Alox15b-KI-Mäusen als auch bei ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen eine experimentelle Kolitis, die nach Absetzen des DSS wieder abheilt. Da der Körpergewichtsverlust bei den Alox15b-KI-Mäusen statistisch signifikant größer ist, als es bei den Wildtyp-Kontrollen war, kann geschlossen werden, dass die Alox15b-KI-Mäuse empfindlicher auf das DSS reagieren als die Kontrolltiere. Damit induziert die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b in diesem Entzündungsexperiment einen proinflammatorischen Effekt.

3.5.1.1.2 Vergleich der Kolonlängen von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen

Wie in Abschnitt 3.5.1 erläutert, stellt die Kolonlänge einen zweiten klinischen Readout-Parameter dar, um den Schweregrad der DSS-induzierten Kolitis einzuschätzen. In Abbildung 37 ist die Bestimmung der Kolonlängen anhand ausgewählter Beispiele dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Darmwand nach DSS-Behandlung (Abbildung 37 C, D) verdickter wirkte und mit mehr Blutgefäßen durchzogen war, was vermutlich auf den Wasserverlust des Gewebes und auf Umbauprozesse innerhalb der Darmwand zurückzuführen war. Auch der Blinddarm zeigte Verfärbungen oder Einblutungen beim Zerschneiden in einzelne Segmente für die weiterführenden Experimente (vgl. Abbildung 37 D mit Abbildung 37 B).



Abbildung 37: Quantifizierung der Kolonlängen (Quelle: eigene Aufnahmen). Von Tag 1–5 des experimentellen Protokolls wurde 2 % DSS im Trinkwasser oder DSS-freies Trinkwasser verabreicht. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Kolonlänge bestimmt. A) Wildtyp-Maus, kein DSS, B) Alox15b-KI-Maus, kein DSS, C) Wildtyp-Maus + 5 Tage DSS, D) Alox15b-KI-Maus + 5 Tage DSS.

Nach statistischer Auswertung der ermittelten Kolonlängen (Abbildung 38) kann geschlossen werden, dass eine DSS-Behandlung zu einer hoch signifikanten Kolonschrumpfung bei beiden Genotypen führt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet wurde (vgl. „no DSS“ vs. „5d DSS group“ in Abbildung 38).

Im Rahmen der Heilungsphase kam es bei beiden Genotypen zu einem Wiederanstieg der Kolonlängen, sodass die Werte der 0-Tage-Gruppe („no DSS“) wieder erreicht wurden. Diese Daten bestätigen die unter Abschnitt 3.5.1.1 gemachte Schlussfolgerung, dass die

DSS-Behandlung bei beiden Genotypen zur Induktion einer Kolonentzündung führte. Da der Grad der durch DSS induzierten Kolonschrumpfung bei beiden Genotypen vergleichbar war (vgl. „no DSS“-Gruppe vs. „5d DSS“-Gruppe in Abbildung 38), kann aus diesen Daten nicht geschlussfolgert werden, dass die Alox15b-KI-Mäuse sensitiver gegenüber einer DSS-Behandlung reagieren als die ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen, wie das bei den Körpergewichtskinetiken (Abbildung 36) der Fall war.

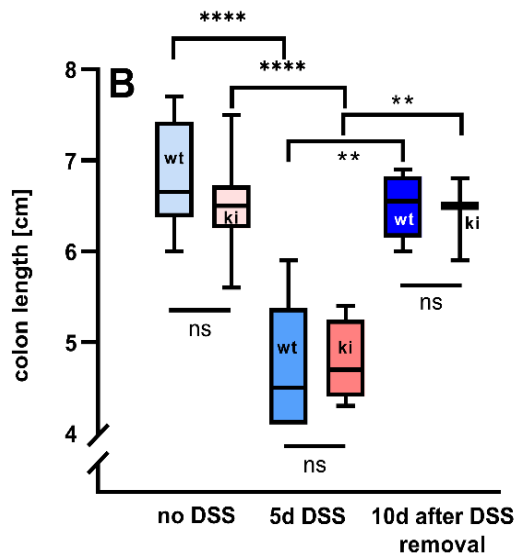


Abbildung 38: Kolonlängen von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen unter DSS-Behandlung (Quelle: eigene Messwerte, Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Von Tag 1–5 des experimentellen Protokolls wurde 2 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Leider mussten aus Tierschutzgründen 3 Alox15b-KI-Mäuse aus der 15-Tage-Gruppe am Tag 5 aus dem Versuch genommen werden, sodass am Ende des Versuchs nur noch 3 Individuen verfügbar waren. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, ns: kein signifikanter Unterschied).

Zusammenfassung: Wurde der Grad der Kolonschrumpfung als Readout-Parameter für den Schweregrad der experimentellen Kolitis verwendet, konnte festgestellt werden, dass die DSS-Behandlung beider Genotypen zu einer experimentellen Kolitis führte. Es konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen ermittelt werden.

3.5.1.1.3 Morphologischer Vergleich und histologische Entzündungsmerkmale der beiden Genotypen

Bei der Inspektion der Bauchorgane in den Kontrollgruppen gab es keine morphologischen Besonderheiten. Der Magen-Darm-Trakt war normal strukturiert und beim Vergleich der großen Bauchorgane (Leber, Milz, Nieren) sowie der Geschlechtsorgane (Eierstöcke, Gebärmutter) ließen sich keine Unterschiede zwischen den jungen Alox15b-KI-Mäusen und den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren feststellen. Nach einer DSS-Behandlung war teilweise der Magen-Darm-Trakt der Tiere leer oder mit gelblich-visköser Flüssigkeit gefüllt. Die Darmwand war unterschiedlich durchblutet, teilweise wirkte sie gerötet oder blass. Ausgeprägte morphologische Unterschiede gab es zwischen den Genotypen nicht.



Abbildung 39: Eröffneter Bauchsitus einer Alox15b-KI- und ausgekreuzten Wildtyp-Maus nach 2%iger DSS-Behandlung (Quelle: eigene Aufnahmen).
A) Wildtyp-Kontrollmaus,
B) Alox15b-KI-Maus.

Um auf der Ebene der histologischen Veränderungen nachzuweisen, dass die Gabe von DSS eine experimentelle Kolitis induziert und zu überprüfen, ob die Alox15b-KI-Mäuse deutlichere Entzündungssymptome entwickelten, wurden Kolongewebeproben histologisch untersucht (Abbildung 40).

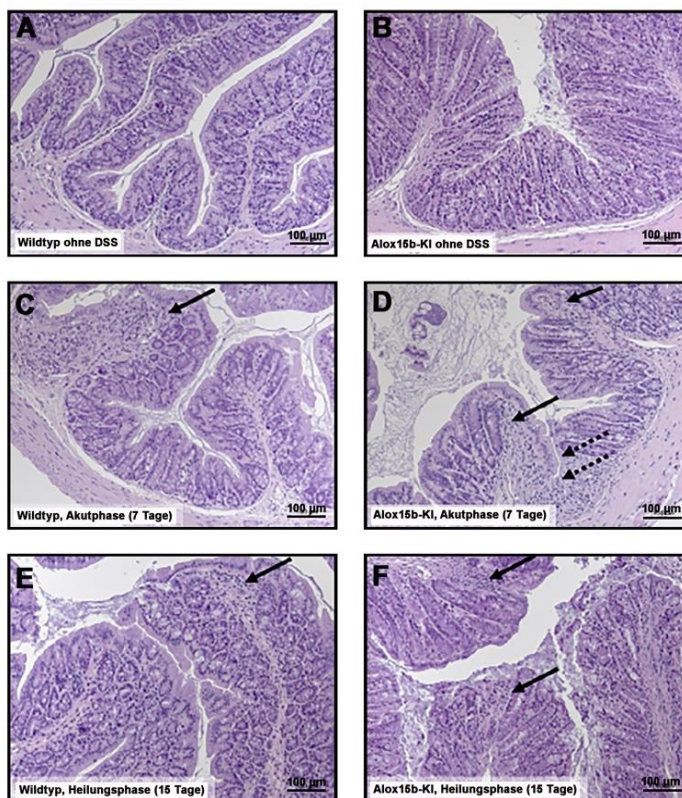


Abbildung 40: HE-Färbungen von Kolonschnitten verschiedener Versuchstiere (Quelle: iPATH Charité, Berlin). Die Herstellung der Schnitte, deren Färbung und die Auswertung der histologischen Präparate wurde durch die Core-Unit iPATH, der Charité vorgenommen. Schwarze Pfeile kennzeichnen mucosale Entzündungszellinfiltrationen; gestrichelte Pfeile weisen auf Schleimhauterosion hin. A) Wildtyp ohne DSS, B) Alox15b-KI ohne DSS, C) Wildtyp in Akutphase (7 Tage), D) Alox15b-KI in Akutphase (7 Tage), E) Wildtyp in Heilungsphase (15 Tage), F) Alox15b-KI in Heilungsphase (15 Tage), Auflösung: 100-fach, Maßstab: unten rechts [100µm].

Wie erwartet, hatten Kontrolltiere beider Genotypen eine reguläre Schichtenstruktur der Darmwand. Es existierten weder Schleimhauterosionen noch Schleimhautulcerationen (Abbildung 40 A = Wildtyp, Abbildung 40 B = Alox15b-KI). Nachdem die Tiere für 5 Tage DSS verabreicht bekommen hatten (Abbildung 40 C und D), waren nachweislich Entzündungssymptome bei beiden Genotypen vorhanden. So waren bei beiden Genotypen histologisch die Infiltration von Entzündungszellen (schwarze Pfeile) und Schleimhauterosionen (gestrichelte Pfeile) sichtbar. Klare Schleimhautulcerationen, bei

denen die Schichtstruktur der Darmwand lokal aufgelöst wird, konnten nicht nachgewiesen werden. Nach der Heilungsphase (10 Tagen nach Absetzen des DSS) waren noch vereinzelt bei beiden Genotypen mukosale Infiltrationen von Entzündungszellen sichtbar (Abbildung 40 E und F). In Tabelle 37 ist die semiquantitative Auswertung der histologischen Entzündungsparameter zusammengefasst. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass eine DSS-Behandlung bei Alox15b-KI-Mäusen unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen im Durchschnitt schwerere Entzündungssymptome induziert, als das bei ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen der Fall war. Damit scheinen die histologischen Daten die Schlussfolgerungen zu bestätigen, die aus den Körpergewichtskinetiken (Abschnitt 3.5.1.1.1) gezogen wurden.

Tabelle 37: Semiquantitative Auswertung der histologischen Entzündungsparameter (Quelle: iPATH Charité, Berlin). Für drei unterschiedliche Individuen jedes Genotyps wurden histologische Schnitte semiquantitativ ausgewertet. Score: 0 = keine Entzündungssymptome, 1 = milde entzündliche Schleimhautinfiltrate bei intaktem Epithel, 2 = Entzündungszellen infiltrieren in Schleimhaut und Submukosa mit intaktem Epithel.

Genotyp	Entzündungsscore		
	Kein DSS	Akute Entzündung	Heilungsphase
Wildtyp	0	1	1
	0	1	1
	0	1	1
Alox15b-KI	0	2	2
	0	2	0
	0	1	1

Zusammenfassung: Die morphometrische Auswertung der histologischen Schnitte ergab, dass durch DSS-Gabe eine experimentelle Kolitis in Alox15b-KI-Mäusen und in ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert werden konnte, wobei der Schweregrad der entzündlichen Gewebeveränderungen bei den Alox15b-KI-Mäusen höher war.

3.5.1.2 Oxylinprofile im entzündlich veränderten Darmgewebe

Eikosanoide sind klassische pro- oder antiinflammatorisch/ proresolutorisch wirkende Botenstoffe (Williams and Higgs 1988; Aoki and Narumiya 2012; Dennis and Norris 2015; Esser-von Bieren 2019), die an der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes beteiligt sind (Isselbacher 1987; Sharon and Stenson 1984; Donowitz 1985; Wang et al. 2018; Wallace 2019). Ein funktioneller Knock-out des *Alox15*-Gens bei Mäusen führt zu einer Verringerung der Sensitivität der Tiere gegenüber einer DSS-induzierten Kolitis, was darauf hindeutet, dass die Alox15 in diesem Modell eine proinflammatorische Rolle spielt (Kroschwald et al. 2018). Die pathophysiologische Rolle

der Alox15b bei der DSS-induzierten Kolitis wurde bislang nicht untersucht. Da aber die Alox15b – ähnlich wie die Alox15 – an der Biosynthese von pro- bzw. antiinflammatorisch wirkenden Entzündungsmediatoren beteiligt ist, besteht die Möglichkeit, dass die Humanisierung der Reaktionsspezifität dieses Enzyms das Muster der Eikosanoide im entzündlich veränderten Darmgewebe beeinflusst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in diesem Zusammenhang zwei wesentliche Fragen beantwortet werden:

1. Verändert sich das Muster der verschiedenen Oxylipide im zeitlichen Verlauf einer DSS-induzierten experimentellen Kolitis bei Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen?
2. Gibt es Unterschiede im Oxylipidmuster der zwei Genotypen im zeitlichen Verlauf der experimentellen Kolitis, welche die erhöhte Sensitivität der Alox15b-KI-Mäuse in diesem Entzündungsmodell erklären?

3.5.1.2.1 *Summe aller quantifizierten Oxylipine*

Aus Proben des entzündlich veränderten Kolongewebes wurden die Totallipide extrahiert und die Extrakte unter milden alkalischen Bedingungen hydrolysiert. Die dabei entstandenen freien Fettsäurederivate wurden anschließend mittels LC-MS/MS (Lipidomix GmbH, Berlin-Buch) auf ihren Gehalt an oxygenierten PUFA-Derivaten analysiert. Das analytische Protokoll umfasste mehr als 50 verschiedene Oxylipine (siehe Anhang, Abschnitt 7.3), die simultan während eines einzigen chromatografischen Laufes analysiert wurden. Folgende asservierte Gewebeproben wurden für die Oxylipidomanalysen zur Verfügung gestellt: a) Wildtyp-Mäuse, „no DSS“ (n = 21); b) Alox15b-KI-Mäuse, „no DSS“ (n = 21); c) Wildtyp-Mäuse, 5 Tage mit DSS, „7d DSS“ (n = 9); d) Alox15b-KI-Mäuse, 5 Tage DSS, „7d DSS“ (n = 12); e) Wildtyp-Mäuse, 15 Tage, davon 5 Tage mit DSS, „8d after DSS removal“ (n = 6); f) Alox15b-KI-Mäuse, 15 Tage, davon 5 Tage mit DSS, „8d after DSS removal“ (n = 3).

Für die initialen Analysen wurde die Summe aller nachgewiesenen Oxylipine berechnet und den verschiedenen Zeitpunkten des Kolitisverlaufs zugeordnet (Abbildung 41). Bei den Wildtyp-Mäusen waren zum Höhepunkt der DSS-Kolitis (Tag 7) deutlich mehr Oxylipine im Kolongewebe vorhanden als zu Beginn des Experiments. Nach der Heilungsphase ging die Gewebekonzentration der Oxylipine wieder auf den Ausgangswert zurück. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten waren statistisch signifikant ($p < 0,01$). Ein ähnlicher Zeitverlauf war für die Alox15b-KI-Mäuse nachweisbar, wobei hier der

Unterschied zwischen den Werten des 7. und des 15. Tages des experimentellen Protokolls nicht mehr statistisch signifikant war. Einzelne Mediane zu den Metaboliten sind im Anhang (Abschnitt 7.11.3 bis 7.11.4) angegeben. Das wichtigste Ergebnis der Oxylipidomanalysen war jedoch, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen zum jeweils untersuchten Zeitpunkt des Entzündungsverlaufs gab.

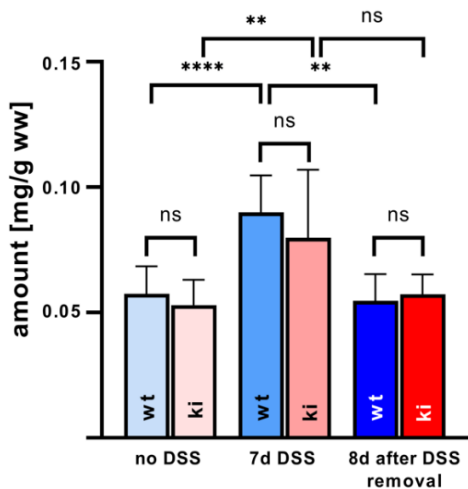


Abbildung 41: Oxylipinkinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert. Die Gesamtheit hydroxylierter Fettsäuremetabolite im Kolon pro g Frischgewicht sind dargestellt. Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (** p < 0,01, **** p < 0,0001, ns: kein signifikanter Unterschied) angegeben.

Zusammenfassung: Verfolgt man die Summe aller quantifizierten Oxylipine im zeitlichen Verlauf der DSS-Kolitis von Wildtyp-Mäusen, kann festgestellt werden, dass auf dem Höhepunkt der Entzündungsreaktion signifikant mehr Oxylipine im Darmgewebe nachweisbar waren als zu Beginn des Experiments. Nach Ablauf der Heilungsphase wurden die Initialwerte wieder erreicht. Ein ähnlicher Zeitverlauf konnte bei den Alox15b-KI-Mäusen nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt des Entzündungsverlaufes waren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen nachweisbar.

3.5.1.2.2 Oxygenierte Arachidonsäure-Metabolite

Im nächsten Schritt der Untersuchungen wurden einige der ausgewählten Oxylipine gesondert betrachtet. Arachidonsäure ist eine der dominanten PUFAs in vielen Säugetiergeweben und über den ALOX-Weg können prinzipiell sechs unterschiedliche Oxygenierungsprodukte mit konjugiertem Dien-Charakter gebildet werden. Die Biosynthese von 15-HETE und 11-HETE verläuft über eine Wasserstoffabstraktion vom C13 der AA-Kette. Aus dem dabei entstehenden C13-Fettsäureradikal werden über eine [+2]- bzw. [-2]-Radikalumlagerung 15-HETE bzw. 11-HETE gebildet.

Aus Abbildung 42 A und B ist ersichtlich, dass beide Produkte im Darmgewebe in hohen Konzentrationen nachweisbar waren. Beim Vergleich der Gewebekonzentrationen aller quantifizierten Oxylipine von nicht mit DSS behandelten Tieren („no DSS“-Säulen in den Abbildung 42 bis 45), kann festgestellt werden, dass 15-HETE, 11-HETE, 12-HETE (Abbildung 42), sowie die beiden LA-Oxygenierungsprodukte 13-HODE und 9-HODE (Abbildung 45) mit bis zu 10000 ng Metabolit/g Feuchtwicht die dominanten Oxylipine

darstellen. Die Oxygenierungsmetabolite von EPA (Abbildung 43), DHA (Abbildung 44) und anderer PUFAs (Abbildung 45) waren in deutlich geringeren Konzentrationen nachweisbar. Unter Berücksichtigung früherer Daten zur Fettsäurezusammensetzung verschiedener tierischer Gewebe, welche AA and LA als mengenmäßig dominante Polyenfettsäuren in den meisten Säugetierzellen ausweisen (vgl. Zusammenfassung nach Spector and Yorek 1985; Abbott et al. 2012), sind die hier ermittelten Daten der Oxylipidomanalyse nachvollziehbar. Beim Vergleich der Gewebekonzentrationen von 15-HETE und 11-HETE im Zeitverlauf der DSS-Kolitis und den beiden Genotypen war lediglich für die 15-HETE-Konzentration (Abbildung 42 A) zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns („no DSS“) ein geringer, jedoch statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,049$) zwischen den beiden Genotypen nachweisbar. Für die anderen Zeitpunkte der 15-HETE-Bildung (Abbildung 42 A) und 11-HETE-Bildung (Abbildung 42 B) konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden. Auf der Grundlage der genetischen Manipulation (Umwandlung der AA-8-lipoxygenierenden *Alox15b* der Wildtyp-Tiere in ein AA-15-lipoxygenierendes Enzym) war allerdings erwartet worden, dass die Gewebekonzentrationen von 15-HETE bei den *Alox15b*-KI-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen höher sein sollte. Dieses Ergebnis konnte zu keinem Zeitpunkt des Entzündungsverlaufs beobachtet werden (Abbildung 42 A). Diese Daten deuten darauf hin, dass die genetische Manipulation des *Alox15b*-Gens sich nicht signifikant auf die 15-HETE Konzentration im Darmgewebe auswirkt. Im Vergleich zum Ausmaß anderer AA-oxygenierender Prozesse scheint die Wirkung der *Alox15b* unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine wesentliche Rolle zu spielen.

Die Produkte 8-HETE ([-2]-Radikalumlagerung) und 12-HETE ([$+2$]-Radikalumlagerung) entstehen über eine Wasserstoffabstraktion vom C10 der AA. Für beide Metabolite (Abbildung 42 C und D) konnten keine bzw. nur geringgradige Unterschiede zwischen den beiden Genotypen im zeitlichen Verlauf der Kolitis nachgewiesen werden. Interessanterweise ergab sich bei Wildtyp-Mäusen für 12-HETE (Abbildung 42 C) eine ähnliche Kinetik wie für die Summe aller Oxylipine (Abbildung 41). Bei Mäusen ohne DSS-Behandlung (Abbildung 42 C) konnten signifikant geringere ($p < 0,001$) 12-HETE-Gewebekonzentrationen nachgewiesen werden als am Ende der akuten Entzündungsphase („7d DSS“). Nach der Heilungsphase (8 Tage nach Absetzen von DSS) gingen die 12-HETE-Gewebekonzentrationen wieder auf die Ausgangswerte zurück. Ein ähnliches Zeitprofil wurde auch für die *Alox15b*-KI-Mäuse beobachtet (Abbildung 42 C).

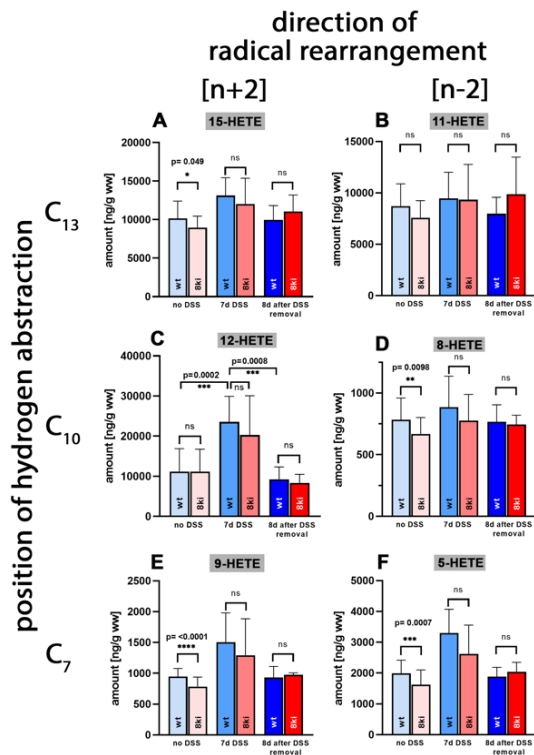


Abbildung 42: HETE-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert (n = 3–6). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt der verschiedenen HETE-Isomere mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Zu keinem Zeitpunkt des Entzündungsverlaufs war ein signifikanter Unterschied in der 12-HETE-Konzentration zwischen den beiden Genotypen zu beobachten. Für 8-HETE (Abbildung 42 D) ergab sich eine andere Metabolitenkinetik, aber auch für diese Oxylipine konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

Die Produkte 5-HETE ([−2]-Radikalumlagerung) und 9-HETE ([+2]-Radikalumlagerung) entstehen über eine Wasserstoffabstraktion vom C7 der AA. Obwohl 5-HETE (Abbildung 42 F) in fast doppelt so großen Mengen im Darmgewebe gefunden wurde wie 9-HETE (Abbildung 42 E), gab es bei beiden Metaboliten nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Die zeitlichen Verläufe der beiden AA-Oxygenierungsprodukte waren ähnlich.

Zusammenfassung: Oxygenierte AA-Derivate wurden in großen Mengen im Kolongewebe nachgewiesen, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen gab. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass weder die Alox15b bei den Wildtyp-Tieren noch die Doppelmutante mit humanisierter Reaktionsspezifität signifikant an der HETE-Bildung im Darm beteiligt ist. Andere AA-Oxygenierungsreaktionen scheinen eine größere Rolle zu spielen.

3.5.1.2.3 Oxygenierte Eicosapentaensäure-Metabolite

Obwohl sich die Strukturen von AA und EPA sehr ähneln, besitzt EPA im Vergleich zu AA eine zusätzliche bisallylische Methylengruppe. Deshalb werden theoretisch zwei zusätzliche

Oxygenierungsprodukte gebildet (18-HEPE und 14-HEPE, Wasserstoffabstraktion vom C16 von EPA), die bei AA nicht auftreten. Im Rahmen der hier durchgeführten Oxylipidomanalysen wurden außer 14-HEPE alle anderen EPA-Oxygenierungsprodukte quantifiziert (Abbildung 43). Ein Vergleich der beiden Genotypen zeigt, dass es zu keinem Zeitpunkt der Entzündungsreaktion einen signifikanten Unterschied in der Gewebekonzentration der analysierten EPA-Metabolite gab. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da die rekombinante Wildtyp-Alox15b EPA dominant zu 8-HEPE umwandelt (vgl. Abbildung 24 B). Deshalb war eigentlich erwartet worden, dass 8-HEPE im Darmgewebe von Wildtyp-Mäusen in höheren Konzentrationen gefunden wird als bei den Alox15b-KI-Mäusen. Im Gegensatz dazu sollte die 15-HEPE-Konzentration bei Alox15b-KI-Mäusen höher sein als bei den ausgekreuzten Kontrolltieren. Beide Vorhersagen konnten experimentell jedoch nicht bestätigt werden. Auch diese Daten weisen darauf hin, dass die Alox15b weder bei den Wildtyp-Tieren noch bei den Alox15b-KI-Mäusen wesentlich an der Bildung der EPA-Oxygenierungsprodukte im Darm beteiligt ist, was für alle Zeitpunkte der Entzündungsreaktion gilt. Eine ähnliche Schlussfolgerung konnte in Abschnitt 3.5.1.2.2 bereits für die dominanten AA-Oxygenierungsprodukte der Alox15b (8-HETE) und der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante (15-HETE) gezogen werden. Auch hier gab es keine Anzeichen dafür, dass sich die funktionelle Konsequenz der gentechnischen Manipulation auf der Ebene der Reaktionsprodukte im präparierten Kolongewebe niederschlägt. Für 15-HEPE (Abbildung 43 C) konnte ein ähnlicher Zeitverlauf des Metaboliten im Rahmen der Entzündungsreaktion beobachtet werden wie bei der Summe der Oxylipine (Abbildung 41) und bei 12-HETE (Abbildung 42 C). Ohne DSS-Gabe waren geringere Mengen an 15-HEPE als nach 7 Tagen unter DSS-Behandlung nachweisbar. Zehn Tage nach Absetzen des DSS gingen die 15-HEPE-Konzentrationen wieder auf ihre Ausgangswerte zurück. Für alle anderen HEPE-Metabolite konnte kein klares Zeitprofil im Entzündungsverlauf beobachtet werden.

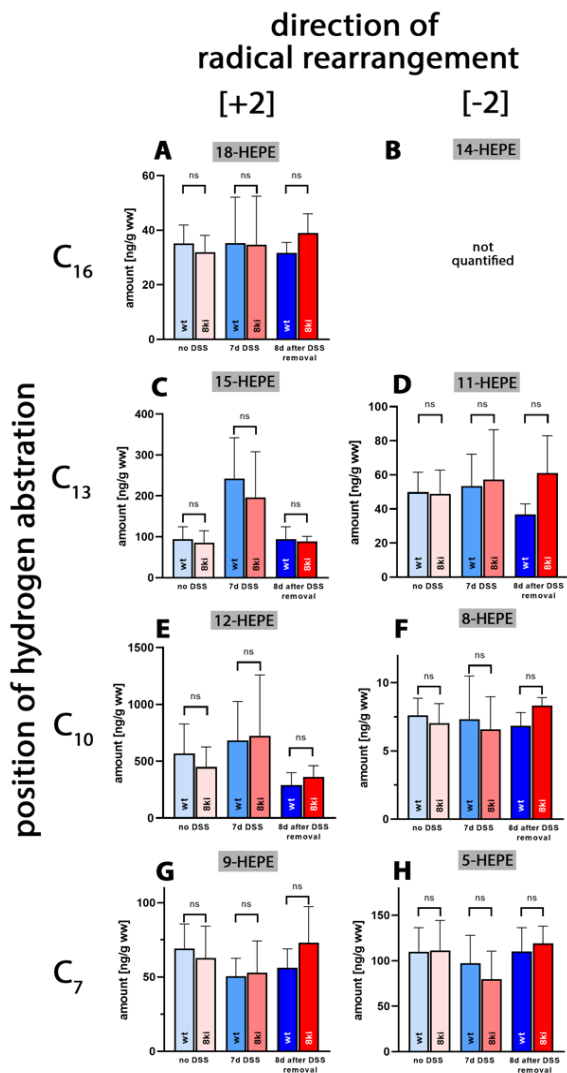


Abbildung 43: HEPE-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert (n = 3–6). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt der verschiedenen HEPE-Isomere mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Zusammenfassung: Oxygenierte EPA-Derivate wurden in unterschiedlichen Mengen im Kolongewebe nachgewiesen, wobei es für kein individuelles Oxylipin einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen gab. Das galt für alle untersuchten Zeitpunkte der experimentellen Kolitis. Auch diese Daten deuten darauf hin, dass weder die Alox15b bei den Wildtyp-Tieren noch deren Doppelmutante mit humanisierter Reaktionsspezifität bei den Alox15b-KI-Mäusen signifikant an der HEPE-Bildung in der Kolonwand beteiligt ist. Andere EPA-Oxygenierungsreaktionen scheinen eine größere Rolle zu spielen.

3.5.1.2.4 Oxygenierte Docosahexaensäure-Metabolite

Die Kohlenwasserstoffkette von DHA ist um zwei Kohlenstoffatome länger als die von AA und EPA und die Doppelbindungen sitzen bei dieser Omega-3-PUFA an anderen Positionen. Deshalb kann aus der Reaktionsspezifität einer ALOX-Isoform mit AA als Substrat nicht sicher auf das Produktmuster dieser ALOX-Isoform geschlossen werden, wenn DHA als Oxygenierungssubstrat verwendet wird. Da DHA fünf unterschiedliche bisallylische Methylengruppen trägt und bei einer Wasserstoffabstraktion zwei unterschiedliche konjugierte Diene gebildet werden können, sind prinzipiell zehn unterschiedliche HDHA

Isomere als primäre ALOX-Produkte möglich. In Abschnitt 3.3.2 wurde gezeigt, dass die murine Alox15b DHA dominant zu 10-HDHA oxygeniert, während 17-HDHA als Hauptprodukt der DHA-Oxygenierung durch die humanisierte Alox15b identifiziert wurde. Wenn die *In-vivo*-Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b ähnliche Auswirkungen auf die Produktmuster haben sollte, wie die *In-vitro*-Mutagenese, konnte erwartet werden, dass bei den Wildtyp-Tieren mehr 10-HDHA nachzuweisen sein sollte als bei den Alox15b-KI-Mäusen. Umgekehrt sollte bei den Alox15-KI-Mäusen mehr 17-HDHA nachweisbar sein als bei den Wildtyp-Kontrollen. Beide Vorhersagen konnten jedoch experimentell nicht untermauert werden (Abbildung 44 C und F).

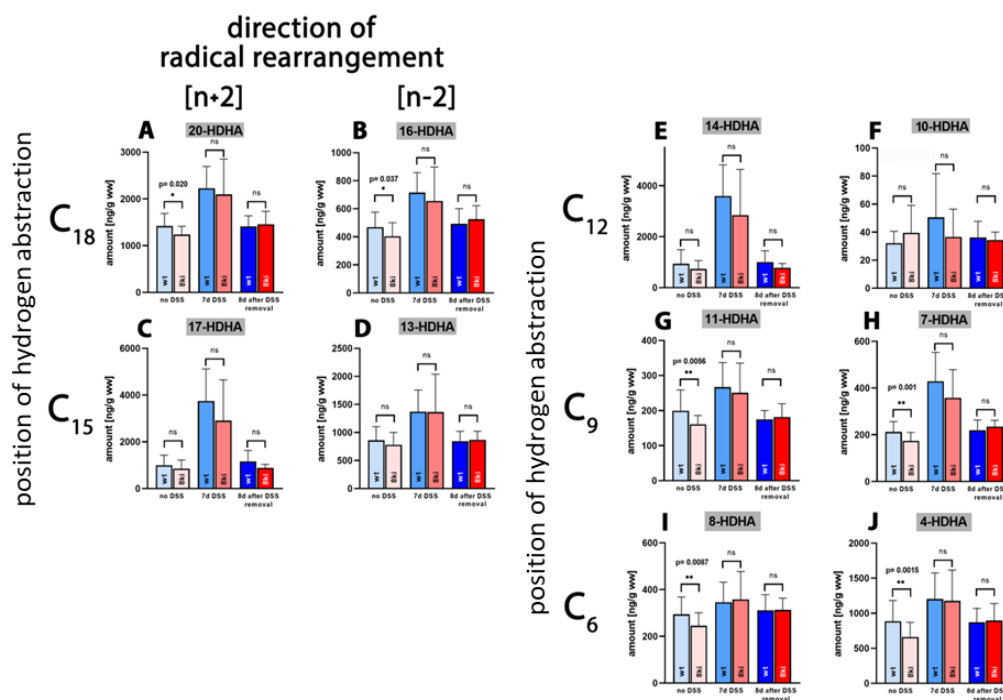


Abbildung 44: HDHA-Kinetik während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert (n = 3–6). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt der verschiedenen HDHA-Isomere mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (* p < 0,05, ** p < 0,01, ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Auch diese Daten deuten darauf hin, dass die Alox15b weder bei den Wildtyp-Tieren noch bei den Alox15b-KI-Mäusen an der Bildung der DHA-Oxygenierungsprodukte im Darm beteiligt ist. Ähnliche Schlussfolgerungen konnte im Abschnitt 3.3.1 für die dominanten Oxygenierungsprodukte von Arachidonsäure (8-HETE vs. 15-HETE) und in Abschnitt 3.3.2 für die Produkte der Oxygenierung von Eicosapentaensäure (8-HEPE vs. 15-HEPE) gezogen

werden. Auch bei diesen Readout-Parametern ergaben sich keine eindeutigen Anzeichen dafür, dass sich die funktionelle Konsequenz der hier durchgeführten gentechnischen Manipulation auf der Ebene der Reaktionsprodukte im Darmgewebe widerspiegelt. Welchen metabolischen Ursprung die hier analysierten Oxygenierungsprodukte haben, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Zur Beantwortung dieser Frage wäre es möglicherweise hilfreich, das Enantiomerenverhältnis der dominanten PUFA-Oxygenierungsprodukte zu bestimmen. Dies erfordert jedoch eine aufwendige Chiralphasenanalytik, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus verschiedenen Gründen (limitierte Zeit und Gewebemengen) nicht durchgeführt werden konnten. Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Metabolitenprofile, kann festgestellt werden, dass für 17-HDHA (Abbildung 44 C), 14-HDHA (Abbildung 44 E) und 7-HDHA (Abbildung 44 H) ein ähnlicher Zeitverlauf beobachtet werden konnte wie für die Summe der Oxylipine (Abbildung 41), für 17-HETE (Abbildung 42 C) und 15-HEPE (Abbildung 43 C). Ohne DSS-Gabe waren geringere Mengen an 17-HDHA (Abbildung 44 C), 14-HDHA (Abbildung 44 E) und 7-HDHA (Abbildung 44 H) nachweisbar als zum Ende der akuten Entzündungsphase (nach 7 Tagen DSS-Behandlung).

Zehn Tage nach dem Absetzen des DSS gingen die Konzentrationen von 17-HDHA, 14-HDHA und 7-HDHA wieder auf ihre Ausgangswerte zurück. Für alle anderen DHA-Metaboliten ergab sich kein klares Zeitprofil im Rahmen des Entzündungsverlaufs. Da auch bei den DHA-Metaboliten, mit wenigen Ausnahmen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet wurden, kann hergeleitet werden, dass die Alox15b nur unbedeutend zur Bildung der verschiedenen HDHA-Derivate in der Darmwand von Wildtyp-Mäusen und Alox15b-KI-Tieren beiträgt.

Zusammenfassung: Auch oxygenierte DHA-Derivate wurden in unterschiedlich großen Mengen im Kolongewebe nachgewiesen, wobei auch hier zu keinem Zeitpunkt des Erkrankungsverlaufs ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet wurde. Auch diese Daten deuten darauf hin, dass weder die Alox15b bei den Wildtyp-Tieren noch deren Doppelmutante mit humanisierter Reaktionsspezifität bei den Alox15b-KI-Mäusen signifikant an der HDHA-Bildung im Darm beteiligt sind. Wie für andere PUFAs scheinen auch für DHA andere Fettsäureoxygenierungsreaktionen eine größere Rolle zu spielen.

3.5.1.2.5 Oxygenierungsmetabolite anderer Polyfettsäuren

In vielen tierischen Zellen ist Linolsäure (9,12-Octadecadiensäure, LA) die am häufigsten vorkommende PUFA. Im normalen sowie entzündlich veränderten Darmgewebe befinden sich große Mengen der LA-Oxygenierungsprodukte 13-HODE und 9-HODE (Abbildung 45 A und B). Wie bei fast allen anderen Oxylipinen konnten auch bei diesen

Metaboliten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Alox15b-KI vs. Wildtyp) festgestellt werden. Weiterhin war keine klare Abhängigkeit der Metabolitenkonzentrationen vom Zeitpunkt der Entzündung nachweisbar.

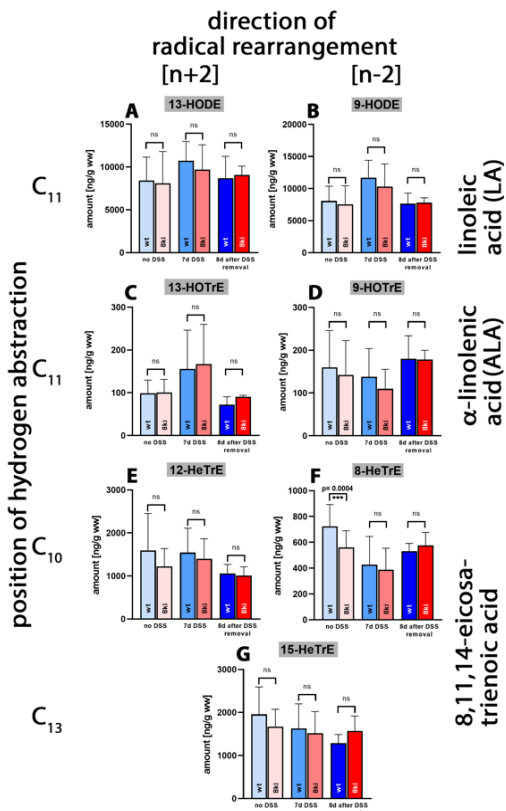


Abbildung 45: PUFA-Kinetiken anderer Oxylipine während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in Alox15b-KI Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert (n = 3–6). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt der verschiedenen Oxylipine mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (***) p < 0,001, ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Ähnliche Daten wurden für die analysierten Oxygenierungsprodukte von Alpha-Linolensäure (9,12,15-Octadecatriensäure) (Abbildung 45 C und D) und 8,11,14-Eicosatriensäure (Abbildung 45 E bis G) erhalten. Obwohl die Reaktionsspezifitäten der rekombinanten murinen Alox15b und seiner Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante für beide PUFAs in dieser Arbeit nicht experimentell untersucht wurden, konnte aus dem Produktmuster der AA-Oxygenierung abgeleitet werden, dass es dominant zu 8-HETrE oxygeniert werden sollte. Das Hauptprodukt der Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante sollte 15-HETrE sein. Bei der Oxylipidomanalyse wurde festgestellt, dass 8-HETrE in signifikant höheren Konzentrationen im Darmgewebe von Wildtyp-Mäusen vorkam als in Alox15b-KI-Mäusen (Abbildung 45 F). Somit könnte möglicherweise die Alox15b an der Biosynthese von 8-HETrE im Darmgewebe beteiligt sein. Allerdings wäre in diesem Fall zu erwarten gewesen, dass bei den Alox15b-KI-Mäusen 15-HETrE in höheren Konzentrationen im Darmgewebe nachweisbar ist. Dies war jedoch nicht der Fall (Abbildung 45 G). Auch diese Daten lieferten keine überzeugenden Hinweise dafür, dass sich die gentechnische

Manipulation des *Alox15b*-Gens auf der Ebene der Fettsäureoxygenierungsprodukte im Darmgewebe widerspiegelt.

Zusammenfassung: Oxygenierte Derivate verschiedener Polyenfettsäuren wurden im Kolongewebe nachgewiesen, wobei es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen gab. Auch diese Daten deuten darauf hin, dass weder die *Alox15b* bei den Wildtyp-Tieren noch deren Doppelmutante mit humanisierter Reaktionsspezifität bei *Alox15b*-KI-Mäusen signifikant an der Bildung dieser Oxylipine in der Darmwand beteiligt ist.

3.5.1.2.6 Komplexe Oxygenierungsmetabolite unterschiedlicher Polyenfettsäuren

Leukotrien B4 ist ein klassischer proinflammatorischer Botenstoff, der chemotaktisch auf Entzündungszellen wirkt (Crooks and Stockley 1998), die Gefäßpermeabilität erhöht (Björk et al. 1982; Erlansson et al. 1989) und damit zur Bildung des Entzündungsödems beiträgt. Im Rahmen der hier durchgeführten Oxylipidomanalysen war wenig LTB4 in der Darmwand von Wildtyp-Tieren nachweisbar, denen kein DSS verabreicht wurde (Abbildung 46 A). Nach einer DSS-Behandlung stieg die LTB4-Konzentration stark an, um in der Heilungsphase wieder auf ähnliche Messwerte abzufallen wie vor Beginn der DSS-Applikation. Eine nahezu identische LTB4-Kinetik wurde für die *Alox15b*-KI-Mäuse gemessen, wobei zu keinem Zeitpunkt des Erkrankungsverlaufs ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden konnte. Diese Daten beweisen, dass die DSS-Behandlung eine Entzündungsreaktion in der Darmwand induziert. Ähnliche Zeitabhängigkeiten wurden auch für einen der wichtigsten LTB4-Metaboliten (18-Carboxy-dinor LTB4) und für das entsprechende LTB4-Derivat von EPA (LTB3) beobachtet (Abbildung 46 B und C).

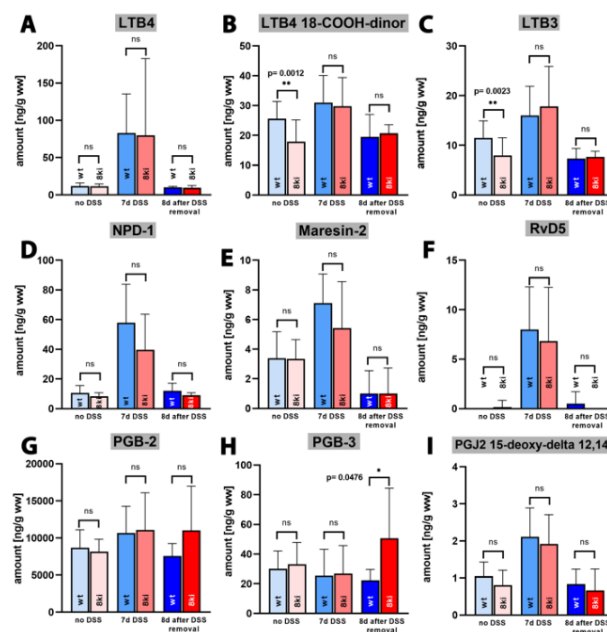


Abbildung 46: Kinetiken komplexer Oxylipine während der DSS-Kolitis von *Alox15b*-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Analysedaten von Lipidomix GmbH, Berlin-Buch; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine DSS-Kolitis wurde in *Alox15b*-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen induziert (n = 3–6). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation in Narkose getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt der verschiedenen Oxylipine mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (* p < 0,05, ** p < 0,01, ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Neuroprotectin-D1, Maresin-2 und Resolvin D5 sind klassische Vertreter der sogenannten „Specialized Pro-resolving Mediators“, denen antiinflammatorische und proresolutorische Wirkungen zugeschrieben werden (Bazan 2009a; Deng et al. 2014; Gobbetti et al. 2017). Im Rahmen in der hier durchgeführten Oxylipidomanalysen wurde festgestellt, dass diese drei Metabolite ähnliche Kinetiken im Rahmen der Entzündungsreaktion aufwiesen (Abbildung 46 D-F). Vor Induktion der Entzündung („no DSS“) waren sie nur in geringen Konzentrationen im Darmgewebe nachweisbar. Durch DSS-Behandlung („7d DSS“) stieg die Gewebekonzentration deutlich an, um nach der Heilungsperiode wieder auf die Ausgangswerte abzusinken. Damit zeigten alle drei Metabolite im hier verwendeten Entzündungsmodell ähnliche Zeitverläufe wie das klassischerweise proinflammatorisch wirkende LTB4 (Abbildung 46 A). Interessanterweise konnte ein ähnlicher Zeitverlauf auch für den PGJ2-Metaboliten 15-desoxy-delta-12,14-PGJ2 ermittelt werden. PGJ2 ist ein klassischer PPAR-Gamma-Koaktivator und soll über die Stimulierung dieses nukleären Rezeptors antiinflammatorische Aktivitäten vermitteln (Gilroy et al. 1999; Shimada et al. 2002; Bell-Parikh et al. 2003; Rajakariar et al. 2007). Die Gewebekonzentrationen dieser Oxylipine passen nicht zur postulierten antiinflammatorischen bzw. proresolutorischen Wirkung dieser Metabolite. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion näher eingegangen.

Zusammenfassung: LTB4 als klassischer proinflammatorischer Mediator konnte auf dem Höhepunkt der akuten Entzündungsreaktion im Kolongewebe in großen Mengen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die LTB4-Gewebekonzentrationen zu Beginn des Experimentes (keine DSS-Gabe) und nach Ablauf der Heilungsphase sehr gering. Interessanterweise zeigten die potenziell antiinflammatorisch wirkenden Oxylipine Neuroprotectin-2, Maresin-2 und Resolvin-D5 ähnliche Zeitprofile im Rahmen der Entzündungsreaktion. Bei keinem der analysierten komplexen Oxylipine war ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu beobachten gewesen. Diese Daten sprechen dafür, dass die Alox15b nicht direkt an der Biosynthese dieser Oxylipine beteiligt war.

3.5.2 Induktion des CFA-induzierten Pfotenödems

Das CFA-induzierte Pfotenödem ist ein Entzündungsmodell der Haut (Abschnitt 2.5). Durch die Injektion von CFA in die Plantarhaut einer Maus wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die Pfote schwillt daraufhin an und die Volumenzunahme der Pfote kann dann als Maß für den Entzündungsgrad quantifiziert werden (Morris 2003; Shejawal et al. 2014). Als Kontrolle wurden in der vorliegenden Arbeit vor der Injektion die Volumina der beiden Hinterpfoten gemessen und als Baseline-Werte (BL) protokolliert. Anschließend erfolgte die Adjuvans-Injektion in die rechte Hinterpfote und eine NaCl-Injektion (gleiches Volumen) in die linke Hinterpfote. Erfahrungsgemäß erreicht die Entzündungsreaktion nach zwei

Tagen ihren Höhepunkt, sodass die Volumina beider Hinterpfoten nach zwei Tagen erneut gemessen wurden.

3.5.2.1 Das Pfotenvolumen als Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung

Durch die Injektion des CFA in die Haut kommt es zunächst zu einer Aktivierung von hautspezifischen Immunzellen (Langerhans-Zellen) (Clausen and Kel 2010), die ihrerseits andere Immunzellen (B- und T-Zellen) aktivieren (vgl. Zusammenfassung bei Klechevsky et al. 2008; Seneschal et al. 2012). Dadurch wird eine komplexe Immunreaktion ausgelöst, die unter anderem dazu führt, dass sich an der Injektionsstelle ein Entzündungsödem ausbildet.

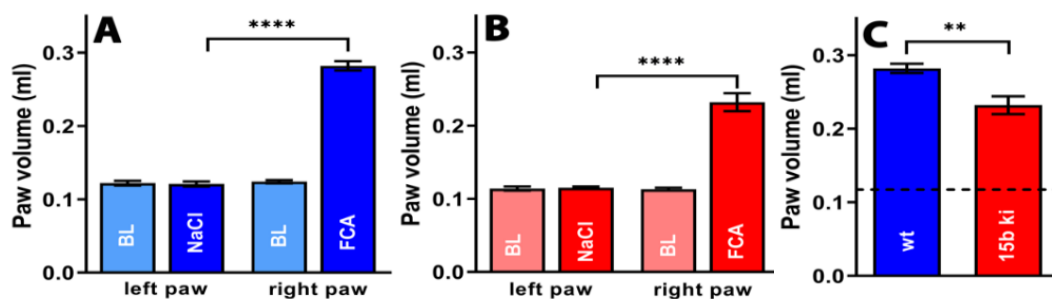


Abbildung 47: Quantifizierung des inflammatorischen Pfotenödems bei Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen (Quelle: Durchführung von Dr. D. Labuz; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine Adjuvans-induzierte Hautentzündung wurde durch die CFA-Injektion (20 μ l) in die rechte Hinterpfote von Mäusen ausgelöst (siehe Kapitel 2). Zu Kontrollzwecken wurde physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, 20 μ l) in die linke Hinterpfote injiziert. Die Volumina beider Hinterpfoten wurden am lebenden Tier bestimmt und als klinischer Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung gewertet. Als weitere Kontrolle wurde vor der Injektion das Volumen der jeweiligen Hinterpfote gemessen und als Baseline-Werte (BL) protokolliert. Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) ist angegeben. A) Wildtyp-Kontrolle (n = 10), B) Alox15b-KI-Mäuse (n = 10), C) Vergleich Pfotenödem-Volumen von Wildtyp-Kontrollen (wt) und Alox15b-KI-Mäusen (15bki), gestrichelte Linie = BL.

Als dieses Entzündungsmodell bei ausgekreuzten Wildtyp-Mäusen (Abbildung 47 A, blaue Säulen) angewandt wurde, zeigte sich, dass das Pfotenvolumen der rechten Hinterpfote ca. 2,5-fach zunahm. Bei der Kontrollinjektion von NaCl in die kontralaterale Pfote konnte keine Volumenzunahme verglichen mit dem BL-Wert nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass es bei den Wildtyp-Mäusen zur Induktion einer Hautentzündung kam. Eine ähnliche Entzündung wurde auch für die Alox15b-KI-Mäuse induziert (Abbildung 47 B, rote Säulen). Auch bei diesen Tieren konnte durch die Adjuvans-Injektion ein Pfotenödem induziert werden, was bei der NaCl-Injektion nicht der Fall war. Diese Daten belegen, dass durch die Adjuvans-Injektion sowohl bei Alox15b-KI-Tieren als auch bei den ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen eine Entzündungsreaktion induziert werden konnte. Um zu ermitteln,

ob sich der Schweregrad der Entzündung zwischen den beiden Genotypen unterschied, wurden die Pfotenvolumina der beiden Genotypen miteinander verglichen (Abbildung 47 C). Dabei zeigte sich, dass die Volumenzunahme bei Alox15b-KI-Mäusen signifikant ($p < 0,01$) geringer ausfiel als bei den ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltieren. Daraus kann gefolgert werden, dass die Alox15b-KI-Mäuse in diesem Entzündungsmodell weniger sensitiv reagierten als die Kontrollmäuse. Beim Vergleich der erhaltenen Daten mit denen der DSS-Kolitis (siehe Abschnitt 3.5.1) lässt sich feststellen, dass die Alox15b-KI-Mäuse im DSS-Kolitismodell sensitiver gegen den Entzündungsinduktor reagierten als die Kontrolltiere. Im Gegensatz dazu waren die Alox15b-KI-Mäuse im Pfotenödemmodell geschützt. Diese Daten deuten darauf hin, dass beide Entzündungsmodelle unterschiedliche molekulare Mechanismen beinhalten und dass die Alox15b in beiden Modellen eine gegensätzliche Rolle zu spielen scheint. Auf die möglichen Ursachen des gegensätzlichen Verhaltens der Alox15b-KI-Tiere in den beiden Entzündungsmodellen wird in der Diskussion in Abschnitt 4.5 genauer eingegangen.

Zusammenfassung: Durch die Injektion von CFA konnte sowohl bei Alox15b-KI-Mäusen als auch bei ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltieren eine Entzündungsreaktion induziert werden, was durch die Erhöhung des Pfotenvolumens zum Ausdruck kam. Dabei war das Ausmaß der Volumenerhöhung bei Alox15b-KI-Tieren signifikant kleiner als bei ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen.

3.5.2.2 Die Schmerzreaktion als Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung

Entsprechend der von Celsus, Galen (Rather 1971) und später auch R. Virchow (Rather 1971; Liu et al. 2017) definierten Kardinalsymptome einer Entzündungsreaktion (*Rubor, Calor, Dolor, Tumor, Functio laesa*) ist jede Entzündungsreaktion dadurch ausgezeichnet, dass es nicht nur zur Entstehung eines Entzündungsödems (*Tumor*) kommt, sondern, dass sich auch ein Entzündungsschmerz (*Dolor*) entwickelt. Die Intensität des Entzündungsschmerzes hängt von der Art der Entzündung ab und kann bei einer gegebenen Entzündungsreaktion als Maß für den Schweregrad der Entzündung angesehen werden. Zur Bestimmung des Schmerzempfindens bei kleinen Nagetieren wurden der Hargreaves-Test (Hargreaves et al. 1988; Cheah et al. 2017) und der Von-Frey-Test (Chaplan et al. 1994; Cunha et al. 2004; Bradman et al. 2015) entwickelt. Beim Hargreaves-Test wird die hitzeinduzierte Schmerzreaktion getestet. Dazu werden die Tiere auf eine Heizplatte gesetzt, die in standardisierter Art und Weise hochgeheizt wird. Dabei wird die Zeit gemessen, nach der die Tiere die entzündete Hinterpfote erstmals von der Heizplatte hochziehen. Danach wird der Heizvorgang beendet und das Hochheizen mehrfach wiederholt. Der ermittelte Wert der Paw Withdrawal Latency wird in Sekunden angegeben. Je empfindlicher das

entzündlich veränderte Gewebe auf den thermischen Reiz reagiert, desto kleiner ist die sogenannten Paw Withdrawal Latency.

Beim Von-Frey-Test wird die Schmerzreaktion mechanisch induziert. Dazu wird ein Haarfilament mit einer veränderlichen Kraft auf das entzündlich veränderte Areal der Hinterpfote aufgesetzt. Wenn die Versuchstiere Schmerzen empfinden, ziehen sie die Pfote weg. Die geringste Kraft (bzw. das Gewicht), mit der das Filament auf das entzündlich veränderte Gewebe einwirkt, bevor die Tiere ihre Hinterpfote wegziehen, wird als Paw Withdrawal Threshold bezeichnet und kann als Maß für die Sensitivität des Gewebes gegenüber mechanischer Stimulation angesehen werden. Bei kleinen Werten für die Paw Withdrawal Threshold ist das Gewebe schmerzempfindlicher als bei hohen Werten. Bei einer schweren Entzündungsreaktion sollte sich demnach eine geringe Paw Withdrawal Threshold bestimmen lassen. Im Gegensatz dazu sind die numerischen Werte für die Paw Withdrawal Threshold bei leichten Entzündungsreaktionen höher.

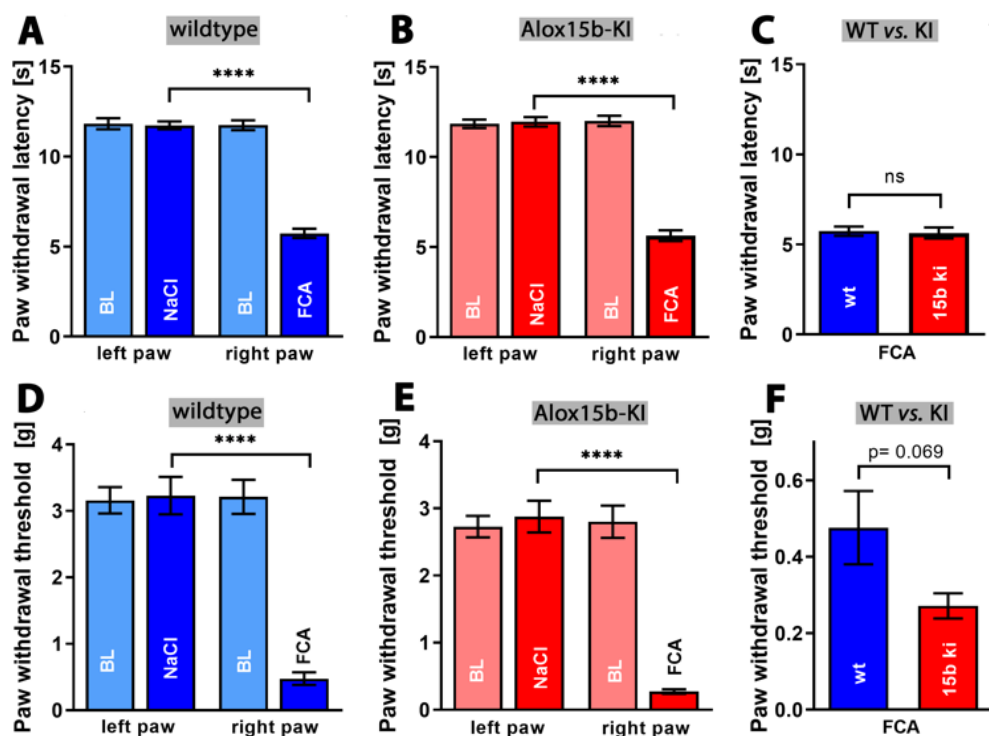


Abbildung 48: Quantifizierung der Schmerzempfindung beim CFA-Entzündungsmodell (Quelle: Durchführung von Dr. D. Labuz; Darstellung und Berechnung von Dr. D. Heydeck). Eine Adjuvans-induzierte Hautentzündung wurde durch die CFA-Injektion (20 μ l) in die rechte Hinterpfote von Mäusen ausgelöst. Nach zwei Tagen wurde die Schmerzempfindlichkeit des entzündlich veränderten Gewebes mithilfe des Hargreaves-Tests (A–C) und des Von-Frey-Tests (D–F) quantifiziert (siehe Kapitel 2). Zu Kontrollzwecken wurde physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, 20 μ l) in die linke Hinterpfote injiziert. Als weitere Kontrolle wurden die jeweiligen Tests vor den Injektionen an den verschiedenen Genotypen (je n = 10 Tiere) durchgeführt und als Baseline-Werte (BL) protokolliert. Die experimentellen Rohdaten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der Grad der Signifikanz (**** p < 0,0001, ns: kein signifikanter Unterschied) ist angegeben.

Erwartungsgemäß zeigen die in Abbildung 48 A (blaue Säulen) dargestellten Daten, dass im Hargreaves-Test die Paw Withdrawal Latency der CFA-behandelten Hinterpfoten von Wildtyp-Kontrollmäusen signifikant geringer war als die der Kontrollen. Nahezu identische Ergebnisse ergaben sich, wenn Alox15b-KI-Mäuse verwendet wurden (Abbildung 48 B, rote Säulen). Ein direkter Vergleich beider Genotypen ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 48 C).

Ähnliche Schlussfolgerungen lassen sich aus den Ergebnissen des Von-Frey-Tests ziehen. Auch hier konnten sowohl bei den Wildtyp-Mäusen (Abbildung 48 D, blaue Säulen) als auch bei den Alox15b-KI-Tieren (Abbildung 48 E, rote Säulen) deutlich geringere Paw Withdrawal Thresholds bei den mit CFA behandelten Hinterpfoten nachweisen. Beim Vergleich der beiden Genotypen (Abbildung 48 F) ergaben sich borderline-signifikant ($p = 0,069$) geringere numerische Werte für die Paw Withdrawal Threshold der Alox15b-KI-Tiere. Das lässt darauf schließen, dass die Alox15b-KI-Mäuse sensitiver auf den mechanischen Stimulus reagierten als die Wildtyp-Kontrollen. Eine detaillierte statistische Ergänzung zu den Ergebnissen befindet sich im Anhang (Abschnitt 7.12.2 bis 7.12.4).

Zusammenfassung: Alox15b-KI-Mäuse und ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen zeigten nach Induktion der Entzündungsreaktion die gleiche Schmerzempfindlichkeit bei vergleichbaren thermischen Reizen (Hargreaves-Test). Beim Von-Frey-Test (mechanische Schmerzauslösung) waren Alox15b-KI-Mäuse sensitiver, was sich in einer geringeren Paw Withdrawal Threshold zeigte.

4 Diskussion

In diesem Kapitel werden die wesentlichsten experimentellen Daten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu den eingangs vier definierten Fragestellungen geführt haben, zusammengefasst, diskutiert und in den Kontext des derzeitigen Wissens gestellt. Dabei wird auch darauf eingegangen, welchen Wissensfortschritt die durchgeführten Experimente gebracht haben und welche neuen Fragestellungen sich aus diesen Erkenntnissen ergeben.

4.1 Funktionelle Gene der ALOX15-Isoformen in *T. belangeri*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals funktionelle ALOX15-Orthologe in *T. belangeri* nachgewiesen. Dabei konnten vier unterschiedliche *ALOX15*-Gene im Genom identifiziert und die zugehörigen cDNA-Sequenzen extrahiert werden. Entsprechend ihrer Sequenzhomologie konnten die vier ALOX15-Enzyme in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum Vergleich mit ALOX15-Orthologen anderer Säugetiere wurde je ein Vertreter (*tupALOX15a*, *tupALOX15c*) der beiden Familien als rekombinantes Protein exprimiert und hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Bei der Arachidonsäureoxygenierung zeigten die beiden *tupALOX15*-Isoformen 12S-HETE als Hauptprodukt. 15-HETE wurde als Nebenprodukt (< 10 % der Gesamtproduktbildung) identifiziert. Beide *tupALOX15*-Isoformen können Esterlipide von Biomembranen oxygenieren. Als dominante Produkte der Membranoxygenaseaktivität konnten 13S-HODE und 12S-HETE identifiziert werden.

Beim Vergleich der reaktionskinetischen Parameter unterschieden sich beide Isoformen geringfügig voneinander. So waren z. B. die Affinitäten für Arachidonsäure (K_m für *tupALOX15a* 232 μM vs. *tupALOX15c* 116 μM) und Sauerstoff (K_m für *tupALOX15a* 18,5 μM vs. *tupALOX15c* 87,4 μM) unterschiedlich. Die ermittelten K_m -Werte für Substratfettsäuren sind höher als die für andere ALOX15-Orthologe ermittelten Werte (Ludwig et al. 1987; Kühn et al. 1993), aber ähnlich denen von Meeressäugern (Reisch et al. 2021) und *P. aeruginosa* (Banthiya et al. 2016). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich in den verschiedenen Untersuchungen die Testbedingungen teilweise deutlich voneinander unterschieden, was einen direkten Vergleich der reaktionskinetischen Parameter unmöglich macht. So wurde z. B. in vorhergehenden Untersuchungen die Fettsäureoxygenaseaktivität in Anwesenheit von Detergenzien (Ludwig et al. 1987)

durchgeführt, was die Wasserlöslichkeit der Substratfettsäuren und damit deren Verfügbarkeit für die untersuchten Enzyme verbessert.

Für beide hier charakterisierte *tupALOX*-Isoformen konnten pH-Optima von 7,4 ermittelt werden. Dies deutet darauf hin, dass beide Isoformen beim physiologischen pH-Wert des Blutplasmas (7,4) ihre optimale katalytische Aktivität entfalten. Dabei sind die meisten der bisher charakterisierten *ALOX*-Isoformen intrazelluläre Enzyme. In den meisten Säugetierzellen liegt der intrazelluläre pH-Wert aufgrund der Anwesenheit von nicht-diffusiblen, organischen Makromolekülen (z. B. Proteine, Nukleinsäuren) und wegen des Donnan-Gleichgewichts bei ca. 7,2 (Casey et al. 2010; Donahue et al. 2021). Der Unterschied zwischen extra- und intrazellulärem pH-Wert ist nicht sehr groß (7,2 vs. 7,4) (Roos and Boron 1981; Casey et al. 2010), sodass davon ausgegangen werden kann, dass beide Enzyme auch intrazellulär nahe an ihrem pH-Optimum arbeiten. Das ist jedoch nicht für alle *ALOX*-Isoformen so. Die Sojabohnen-*LOX1* besitzt z. B. einen pH_{opt} im alkalischen Bereich (Gardner 1989; Kühn et al. 1990) und würde damit bei pH-Werten von 7,4 unter suboptimalen Reaktionsbedingungen arbeiten. Je nach Pflanzenart sind die pH-Optima verschiedener *LOX*-Isoformen unterschiedlich (Bowsher et al. 1992; Clemente et al. 2000; Szymanowska et al. 2009; Aanangi et al. 2016; Liburdi et al. 2017) und auch andere funktionelle Eigenschaften von Lipoxygenasen (z. B. die Reaktionsspezifität) können sich in Abhängigkeit vom pH-Wert verändern (vgl. die Zusammenfassung bei Gardner 1989; Chedea et al. 2008). Für die beiden *ALOX15*-Isoformen von *T. belangeri* konnte keine nennenswerte Veränderung der Reaktionsspezifität in Abhängigkeit vom pH-Wert beobachtet werden.

Unklar bleibt am Arachidonsäurestoffwechsel von *T. belangeri*, warum das Genom vier hochgradig homologe *ALOX15*-Gene enthält, deren Genprodukte ähnliche katalytische Eigenschaften aufweisen (Schäfer et al. 2020). Beim Menschen, der Maus und bei vielen anderen Säugetierspezies stellen die *ALOX15*-Gene Einzelkopie-Gene (Single-copy Genes) dar. Dies wirft die Frage auf, warum sich bei *T. belangeri* eine derartige genomische Multiplizität entwickelt hat, die bei anderen Säugetieren fehlt. Damit einher geht die Frage, warum die vier Gene seit ihrer Entstehung aus einem gemeinsamen Vorläufergen nicht durch Mutationen inaktiviert wurden. Daraus kann abgeleitet werden, dass entweder der Genduplikationsprozess erst kürzlich abgelaufen ist oder dass die vier Gene unter einem ähnlichen funktionellen Evolutionsdruck stehen, der ihre Mutation verhindern könnte. Derzeit liegen jedoch noch keine Informationen zur biologischen Bedeutung der *ALOX15*-Isoformen bei *T. belangeri* vor, sodass der hypothetische Evolutionsdruck derzeit noch nicht

näher charakterisiert werden kann. Weiterhin bleibt unklar, ob eine vergleichbare genomische Multiplizität bei anderen *Scandentia*-Spezies vorkommt. An dieser Stelle darf nicht unerwähnt bleiben, dass die tupALOX15 im Gehirn auf hohem Niveau exprimiert wird (Schäfer et al. 2020). Das konnte bislang für keine andere Säugetierspezies beschrieben werden. Da die PCR-Untersuchungen mit Primer-Kombinationen durchgeführt wurden, die an alle ALOX15-Transkripte binden, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht differenziert werden, um welche tupALOX15-Isoform es sich dabei handelt. Im Herz, in der Lunge, in der Leber und im Darm sind die Expressionsniveaus deutlich geringer. Nichtsdestoweniger sind diese Ergebnisse von großem Interesse, weil die Alox15 im Gehirn der Maus nur auf sehr geringem Niveau exprimiert wird (van Leyen et al. 2006; Kriska et al. 2012).

Evolutionär sind *Scandentia* näher mit dem Menschen verwandt als die zu den Nagetieren gehörigen Mäuse und Ratten (Abbildung 5). Deshalb wurde *T. belangeri* auch als alternatives Tiermodell für Untersuchungen zu den Pathomechanismen menschlicher Erkrankungen vorgeschlagen (Tsukiyama-Kohara and Kohara 2014; Xiao et al. 2017).

Zwar unterscheiden sich die ALOX15-Orthologen von *T. belangeri* und der Maus als AA-12-lipoxygenierende Enzyme von der humanen ALOX15, aber die Genome vom Menschen und der Maus besitzen im Unterschied zu *T. belangeri*, die *ALOX15*-Gene als Einzelkopie-Gen. Diese genomische Multiplizität von *T. belangeri* erschwert die Herstellung von Loss-of-function-Modellen erheblich. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die Maus ein besseres Kleintiermodell für die Untersuchung menschlicher Erkrankungen darstellt, wenn die Rolle des ALOX15-Weges untersucht werden sollte.

4.2 Bestätigung des Triadenkonzepts in verschiedenen Säugetierklassen

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die experimentelle Basis für das Triadenkonzept und die Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen zu überprüfen und auf eine breitere experimentelle Basis zu stellen. Zu Beginn der Untersuchung der vorliegenden Arbeit existierten funktionelle Daten für weniger als 20 zufällig ausgewählte ALOX15-Orthologen verschiedener Säugetierspezies. *ALOX15*-Gene und die entsprechenden Enzyme kommen weit verbreitet in *Metatheria* und *Eutheria* vor, jedoch fehlen sie nach dem derzeitigen Stand des Wissens in *Prototheria* (Heydeck et al. 2022). Die bisher durchgeführten Aminosäurevergleiche, die funktionelle Charakterisierung der rekombinant exprimierten Wildtyp-Enzyme und die Reaktionsspezifitäten der ausgewählten Triadenmutanten zeigten, dass all diese Enzyme

dem Triadenkonzept folgen. Die AA-12-lipoxygenierenden, rekombinanten Wildtyp-Enzyme konnten durch ortsgerichtete Mutagenese der Sloane-Determinanten (Val418Ile und Val419Met) in AA-15-lipoxygenierende Enzyme umgewandelt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden im Vorfeld der hier geschilderten Experimente für mehrere andere Säugetier-ALOX15-Orthologen beobachtet (Sloane et al. 1991; Suzuki et al. 1994; Borngräber et al. 1999; Pekárová et al. 2015). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Sloane-Determinanten des humanen *ALOX15*-Gens zu einer Reduktion der 15S-HETE-Produktion und zu einer gleichzeitigen Erhöhung des 12S-HETE-Anteils im Muster der AA-Oxygenierungsprodukte führt (Sigal et al. 1990). Die Humanisierung der Produktspezifität der untersuchten Enzyme, die durch die Doppelmutationen der Sloane-Determinanten an Position 418+419 induziert wurde, konnte durch die zusätzliche Mutation an der Borngräber-1-Position (Phe353Leu, Phe353Ala) rückgängig gemacht werden (Tabelle 32).

Auch die beiden tupALOX15-Isoformen folgen dem Triadenkonzept der Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen. Mutationen der Sloane-Determinanten verändern die Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen von AA-12-Lipoxygenierung (Wildtyp-Enzyme) zu 15-Lipoxygenierung. Diese Veränderung konnte durch einen zusätzlichen Phe353Ala-Austausch rückgängig gemacht werden (Tabelle 30). Die hier erhobenen funktionellen Daten der neu beschriebenen Säugetier-ALOX15-Orthologen bestätigen das Triadenkonzept, das auf der Basis der Charakterisierung anderer Säugetier ALOX15-Orthologen aufgestellt wurde (Adel et al. 2016; Kuhn et al. 2018; Saura et al. 2018; Kozlov et al. 2019; Heydeck et al. 2022). Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass alle Säugetier-ALOX15-Orthologen dem Triadenkonzept folgen. Diese Schlussfolgerung wurde kürzlich in einer breit angelegten systematischen Studie (Heydeck et al. 2022), zu der die hier beschriebenen Resultate beigetragen haben, bestätigt. Das Triadenkonzept scheint somit eine verlässliche Methode zu sein, um basierend auf der Primärstruktur von Säugetier-ALOX15-Orthologen Schlussfolgerungen auf deren Reaktionsspezifität zu ziehen. Durch die hier geschilderten Untersuchungen wurde das Triadenkonzept auf eine breitere experimentelle Grundlage gestellt. Damit verbesserte sich die Zuverlässigkeit von Vorhersagen, die auf der Basis des Triadenkonzepts zukünftig gemacht werden können. Einschränkend muss dabei angemerkt werden, dass das Triadenkonzept derzeit nur die Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen mit AA sicher abbildet. Wie gut es die Reaktionsspezifität dieser Enzyme mit anderen PUFAs vorhersagt, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass

die Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen mit EPA und DHA auf der Basis des Triadenkonzepts nicht immer verlässlich vorhergesagt werden kann (Kutzner et al. 2017). So oxygeniert z. B. die Maus-ALOX15 AA entsprechend des Triadenkonzepts dominant zu 12-H(p)ETE. Aus den Studiendaten von Kutzner et al. wurde geschlussfolgert, dass dieses Enzym EPA dominant zu 12-HEPE umwandelt. Die experimentelle Charakterisierung des Musters der EPA Oxygenierungsprodukte, die durch die murine Alox15 gebildet wurden, ergab jedoch, dass dominant 15-H(p)EPE gebildet wurde, wobei 12-H(p)EPE als Nebenprodukt (25–35 % der Gesamtproduktbildung) anfällt (Kutzner et al. 2017; Jin et al. 2021). Diese Daten belegen, dass aus der Reaktionsspezifität eines Säugetier-ALOX15-Orthologen mit AA als Substrat nicht sicher auf dessen Reaktionsspezifität mit anderen PUFAs geschlossen werden kann.

Unbekannt bleibt, welche molekularen Eigenschaften der Maus-Alox15 für diese Unterschiede in der Reaktionsspezifität in Abhängigkeit vom Oxidationssubstrat verantwortlich sind. Bei anderen Spezies scheint sich die Reaktionsspezifität nicht zwischen verschiedenen Fettsäuresubstraten zu unterscheiden. So werden durch die ALOX15-Orthologen des Menschen, des Orang-Utans und des Schimpansen AA, DHA, EPA und GLA dominant zu den jeweiligen Omega-6-Oxygenierungsprodukten umgewandelt. Ebenfalls produzieren die AA-12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen des Schweins und der Rhesusaffen hauptsächlich die Omega-9-Oxygenierungsprodukte aus den oben genannten Fettsäuren (Kutzner et al. 2017). Um die Frage nach der Anwendbarkeit des Triadenkonzeptes für die Oxygenierung anderer PUFAs durch Säugetier-ALOX15-Orthologen zu beantworten, müssten für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme die Produktprofile analysiert werden, die bei der Oxygenierung von EPA, DHA und anderen PUFAs entstehen. Da die entsprechenden Enzyme als katalytisch aktive rekombinante his-tag-Fusionsproteine verfügbar sind, könnten entsprechende Experimente problemlos durchgeführt werden.

4.3 Bestätigung der Evolutionshypothese in verschiedenen Säugetierklassen

Folgender Abschnitt befasst sich mit der dritten Forschungsfrage aus der Einleitung.

4.3.1 Bestätigung der Evolutionshypothese durch alle in dieser Arbeit funktionell charakterisierten ALOX15-Orthologen

Die ALOX15-Orthologe von Säugetieren lassen sich, wie bereits beschrieben, in zwei verschiedene Untergruppen einteilen: i) Arachidonsäure-12-Lipoxygenierungsenzyme und ii)

Arachidonsäure-15-Lipoxygenierungsenzyme. Die Evolutionshypothese besagt, dass bei allen Säugetieren, die evolutionär unter dem Gibbon stehen, ALOX15-Orthologe als 12-lipoxygenierendes Enzym funktionieren (Adel et al. 2016; Kuhn et al. 2018). Säugetiere, die evolutionär einen höheren Rang einnehmen als Gibbons, einschließlich der ausgestorbenen menschlichen Subspezies (*H. neandertalensis*, *H. denisovan*), besitzen AA-15-Lipoxygenierungsenzyme (Sigal et al. 1988; Chaitidis et al. 2013; Adel et al. 2015; Adel et al. 2016). Die meisten bisher untersuchten Säugetierspezies, die niedriger im evolutionären Ranking stehen, exprimieren hingegen AA-12-lipoxygenierende Enzyme (Freire-Moar et al. 1995; Vogel et al. 2010; Schäfer et al. 2020; Heydeck et al. 2022). Diese Schlussfolgerung konnte durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt werden (Tabelle 32). Alle in dieser Arbeit neu charakterisierten ALOX15-Orthologen sind evolutionär unterhalb des Gibbons einzuordnen und zeigten alle eine dominante 12-HETE-Bildung. Einschränkend muss zur Gültigkeit des Triadenkonzepts jedoch gesagt werden, dass vereinzelt Säugetiere, die unterhalb des Gibbons eingeordnet werden müssen, AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Enzyme exprimieren. So exprimieren nach dem derzeitigen Stand der Erkenntnis das Kaninchen (Triadenmotiv: Phe353-Ile418+Met419-Motiv, Bryant et al. 1982), die Ord's-Kängururatte (Triadenmotiv: Phe353-Ile418+Met419-Motiv, Kozlov et al. 2019), der Schneehase (Triadenmotiv: Phe353-Ile418+Met419-Motiv, Heydeck et al. 2022), die Bambusratte (Triadenmotiv: Phe353+Val418+Met419-Motiv, Kozlov et al. 2019), der Halsbandameisenbär und der Riesenameisenbär (Triadenmotiv: Phe353+Leu418+Met419-Motiv, Heydeck et al. 2022) AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe, obwohl diese Säugetiere unterhalb des Gibbons eingruppiert sind. Von den bisher mehr als 150 charakterisierten Säugetier-ALOX15-Orthologen halten sich mehr als 95 % an die Evolutionshypothese, während weniger als 5 % der Enzyme dagegen verstoßen (Heydeck et al. 2022). Auch wenn sich diese Tiere nicht an die Evolutionshypothese halten, sind auch hier die Triadendeterminanten für ihre Reaktionsspezifität entscheidend. Mutageneseuntersuchungen an den Triadendeterminanten führten bei allen untersuchten Enzymen zu Veränderungen der Reaktionsspezifität der Enzyme, die in den meisten Fällen auf der Basis des Triadenkonzeptes vorhergesagt werden konnten.

Unklar bleibt jedoch, warum es im Rahmen der späten Primatenentwicklung zur Änderung der ALOX15-Reaktionsspezifität von AA-12-Lipoxygenierung zu 15-Lipoxygenierung gekommen ist. Diese Funktionsveränderung, die wahrscheinlich auf der Evolutionsstufe des Gibbons stattfand, sollte zu einem evolutionären Vorteil für die AA-15-lipoxygenierenden Enzyme geführt haben, sonst hätte sie sich in der Evolution nicht durchgesetzt. Worin dieser

Evolutionenvorteil allerdings genau besteht, ist derzeit noch völlig offen. *In-vitro*-Untersuchungen zur Synthesekapazität von AA-12-lipoxygenierenden und AA-15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen weisen darauf hin, dass AA-15-lipoxygenierende Enzyme höhere Synthesekapazitäten für antiinflammatorisch wirkende Lipoxine (Adel et al. 2016) und proresolutorisch wirkende Resolvine (Heydeck et al. 2022) besitzen. Sollten sich diese Ergebnisse *in vivo* bestätigen, könnte die evolutionäre Transformation der ALOX15-Orthologen, von AA-12-lipoxygenierenden zu AA-15-lipoxygenierenden Enzymen, Teil eines evolutionären Optimierungsprozesses des Immunsystems sein. Eine erhöhte Synthesekapazität für antiinflammatorisch bzw. proresolutorisch wirkende Mediatoren durch die ALOX15-Orthologen hochentwickelter Primaten könnte bedeuten, dass eine Entzündungsreaktion von diesen Säugetieren besser kontrolliert werden könnte, was als Evolutionenvorteil interpretiert werden kann. Sollte dies der Fall sein, müssten Mäuse, die eine ALOX15-Variante mit humanisierter Reaktionsspezifität exprimieren, in tierischen Entzündungsmodellen verglichen mit Wildtyp-Tieren weniger stark ausgeprägte Entzündungssymptome entwickeln. Da solche Mäuse bereits im FEM-Labor der Charité-Berlin hergestellt wurden, wäre diese Arbeitshypothese überprüfbar.

Eine alternative Ursache für die evolutionäre Umschaltung der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen könnte darin bestehen, dass AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologen LA und ALA besser metabolisieren können als AA-12-lipoxygenierende Enzyme. AA-12-lipoxygenierende Enzyme benötigen eine Omega-11-bisallylische Methylengruppe (C10 in AA und EPA) in ihren Fettsäuresubstraten. Eine solche Gruppe fehlt in LA und in ALA. Auf der Basis dieser Überlegungen sollten diese Fettsäuren keine guten Substrate für AA-12-lipoxygenierende Enzyme darstellen. AA-15-lipoxygenierende Enzyme benötigen hingegen Omega-8-bisallylische Methylengruppen (C11 in LA und ALA, C13 in AA und EPA) in ihren Oxygenierungssubstraten. Diese Strukturvoraussetzung ist bei den meisten vorkommenden Polyenfettsäuren gegeben. Damit sollten AA-15-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe ein breiteres Substratspektrum haben, als ihre AA-12-lipoxygenierenden Verwandten, da sie neben AA und EPA auch LA und ALA gut oxygenieren können. Auch das könnten den AA-15-lipoxygenierenden Enzymen einen evolutionären Vorteil verschafft haben. Leider gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine vergleichenden systemischen Untersuchungen zur Substratspezifität von AA-12- und AA-15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen. Da diese Enzyme jetzt als rekombinante Proteine zur Verfügung stehen, könnten solche Untersuchungen jedoch durchgeführt werden.

ALOX15-Orthologe sind in der Lage, Polyenfettsäuren zu oxygenieren, die in den Phospholipiden von Biomembranen enthalten sind. Da die Biomembranen der meisten Säugetierzellen große Mengen an LA enthalten, die zwar von AA-15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe aber weniger effektiv von AA-12-lipoxygenierenden Enzymen angegriffen werden, müssten AA-15-lipoxygenierende Enzyme eine höhere Membranoxygenaseaktivität aufweisen, als AA-12-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologe. Vorläufige *In-vitro*-Untersuchungen zur Membranoxygenaseaktivität von ausgewählten AA-12- und AA-15-lipoxygenierenden ALOX15-Orthologen, die kürzlich von Dr. K. Kakularam in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kühn (Charité, Berlin) durchgeführt, aber noch nicht publiziert wurden, haben in der Tat gezeigt, dass die AA-15-lipoxygenierenden Enzyme eine ca. dreifach höhere Membranoxygenaseaktivität aufweisen als ihre AA-12-lipoxygenierenden Verwandten, wenn die zugegebene Enzymmenge auf eine vergleichbare AA-Oxygenaseaktivität normiert wurde. Sollten ALOX15-Orthologe bei zellulären Reifungs- und Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen, bei denen die Membranoxygenaseaktivität der Enzyme bedeutsam ist (Schewe et al. 1975; Rapoport et al. 1986; Schewe et al. 1986; van Leyen et al. 1998; van Leyen et al. 2006), sollte die AA-15-Lipoxygenierung einen Evolutionsvorteil mit sich bringen.

4.3.2 Evolutionsgrad unabhängige Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15B-Orthologen

Wie bereits mehrfach erwähnt, können bei Säugetier ALOX15-Orthologen AA-12- und AA-15-lipoxygenierende Enzyme unterschieden werden. Die Evolutionshypothese (Ivanov et al. 2010; Kuhn et al. 2018) der Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15-Orthologen deutet darauf hin, dass die Umschaltung von AA-12- auf AA-15-lipoxygenierenden Enzyme auf der Evolutionsstufe des Gibbons erfolgte. Ein ähnlicher Unterschied in der Reaktionsspezifität wurde für die ALOX15B von Mäusen und Menschen experimentell festgestellt (Jisaka et al. 2000), wobei die humane ALOX15B als AA-15-lipoxygenierendes-, die Alox15b der Maus als AA-8-lipoxygenierendes Enzym charakterisiert wurde. Bislang war jedoch unklar, ob die Umstellung der Reaktionsspezifität von Säugetier-ALOX15B-Orthologen auch einem evolutionären Konzept folgt, oder ob es sich dabei um eine zufällige Veränderung handelt. Die hier präsentierten Sequenzdaten (Tabelle 33) deuten darauf hin, dass eine systematische evolutionsbasierte Änderung der Reaktionsspezifität bei den untersuchten Säugetieren nicht vorzuliegen scheint. Die große Mehrzahl der Säugetier-ALOX15B-Enzyme tragen an den entscheidenden Positionen ihrer

Primärstruktur (Jisaka-Determinanten) ein Asp+Val(Ile)-Sequenzmotiv. Das trifft auch für die menschliche ALOX15B und die Enzyme aller hier untersuchten Primaten zu (Tabelle 33). Da für das menschliche Enzym eine AA-15-Lipoxygenierung beschrieben wurde (Brash et al. 1997), kann angenommen werden, dass auch die anderen ALOX15B-Orthologen, die ein ähnliches Sequenzmotiv [Asp+Val(Ile)] tragen, AA-15-lipoxygenierende Enzyme sein sollten. Leider sind derzeit noch keine experimentellen Daten zur Bestätigung dieser Hypothese publiziert. In der Arbeitsgruppe Lipoxygenaseforschung, am Institut für Biochemie der Charité-Berlin wird jedoch an der Beantwortung dieser Frage gearbeitet und die bisher vorliegenden funktionellen Daten für die ALOX15B-Orthologen von *H. neandertalensis*, *H. denisovan*, *G. gorilla*, die ähnlich wie das humane Enzym das kanonische Asp+Val-Motiv enthalten, konnten als dominante AA-15-lipoxygenierende ALOX15B-Orthologe identifiziert werden.

Bei einigen Nagetieren der Gattung Hausmäuse (*Mus*) (Tabelle 33) tragen die ALOX15B-Orthologen ein deutlich differentes Sequenzmotiv an den Positionen der Jisaka-Determinanten (Tyr603+His604). Das trifft auch für die Alox15b von *M. musculus* zu, das in früheren Untersuchungen als AA-8-lipoxygenierendes Enzym identifiziert wurde (Fürstenberger et al. 1991; Jisaka et al. 2000; Fürstenberger et al. 2002). Auf der Basis dieser Datenlage kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei anderen ALOX15B-Orthologen mit dem Tyr+His-Sequenzmotiv auch um AA-8-lipoxygenierende Enzyme handelt. Die Richtigkeit dieser Hypothese konnte jedoch bislang noch nicht experimentell bestätigt werden. Völlig unbeantwortet ist derzeit die Frage, warum einige, aber nicht alle Vertreter der Gattung Hausmäuse (*Mus*), AA-8-lipoxygenierende Alox15b-Orthologe exprimieren. Da die biologische Funktion der ALOX15B-Orthologen in den verschiedenen Spezies noch nicht klar definiert werden konnte, ist diese Frage derzeit kaum zu beantworten. Möglich wäre auch, dass die Reaktionsspezifität mit AA für die biologische Rolle dieser Enzyme nicht wesentlich ist. Beim Alpaka (Asp+Met) wurde ein nichtkanonisches Sequenzmotiv an den Jisaka-Positionen gefunden, sodass eine Vorhersage der Reaktionsspezifität dieses Enzyms derzeit nicht sicher erfolgen kann.

4.4 Funktionelle Unterschiede zwischen humaner und muriner ALOX15B

Es ist bereits seit mehreren Jahren bekannt, dass die murine Alox15b ein AA-8-lipoxygenierendes Enzym ist (Fürstenberger et al. 1991; Jisaka et al. 2000; Fürstenberger et al. 2002). Die funktionelle Veränderung von AA-8-Lipoxygenierung durch das Wildtypenzym zu AA-15-Lipoxygenierung konnte durch einen gezielten Austausch von

zwei konsekutiven Aminosäuren am aktiven Zentrum der Maus-Alox15b erreicht werden. Die Asp603Tyr+Val604His-Doppelmutante der murinen Alox15b oxygenierte *in vitro* AA dominant zu 15-HETE (Jisaka et al. 2000). Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten (siehe Abschnitt 3.3.1) bestätigen diese Ergebnisse vollumfänglich. Sollte diese Mutagenesestrategie auch *in vivo* funktionieren, müssten entsprechende Knock-in-Mäuse eine Alox15b-Mutante mit humanisierter Reaktionsspezifität (15-lipoxygenierend) exprimieren. In vorherigen Untersuchungen wurde eine mögliche antiinflammatorische Funktion der humanen ALOX15B bei entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben (Pochard et al. 2016). In dieser Studie wurde dargestellt, dass humane enterale Gliazellen ALOX15B exprimierten und große Mengen an 15-HETE produzierten. Dies sorgt für eine Erhöhung des Widerstands der Darmepithelbarriere und eine Verringerung in der Durchlässigkeit (Pochard et al. 2016). Mäuse exprimieren natürlicherweise ein Alox15b-Ortholog, das AA zu 8-HETE und nicht zu 15-HETE umsetzt. Deshalb war bislang fraglich, ob die Daten der humanen Experimente 1:1 ins Mausmodell übertragen werden können. Wäre das der Fall, müssten die für diese Arbeit hergestellten Alox15b-Knock-in-Mäuse im Tierversuch einer experimentell induzierten Kolitis geschützt sein (siehe Abschnitt 4.5).

4.4.1 Erfolgreiche *In-vivo*-Humanisierung der Reaktionsspezifität bei Alox15b-KI-Mäusen

Für die Herstellung des Alox15b-KI-Mausmodells wurde die CRISPR/Cas9-Technologie genutzt. Das Wildtyp *Alox15b*-Gen der Maus wurde *in vivo* so mutiert, dass die Tiere die Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante anstatt des Wildtyp-Enzyms exprimierten. Aus den heterozygoten Gründertieren wurden zunächst homozygote Alox15b-KI-Mäuse und ausgekreuzte Alox15b-Wildtyp-Kontrolltiere gezüchtet und hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs des Alterungsprozesses, des Körpergewichtsverlauf und des Blutbildes verglichen. Die Sequenzierung des *Alox15b*-Genortes der genetisch veränderten Mäuse belegte, dass die geplanten Mutationen (zwei konsekutive Punktmutationen) des *Alox15b*-Gens bei den Alox15b-KI-Tieren auch tatsächlich eingeführt wurden. Außerdem konnten bei genomweiten Off-target-Analysen keine zusätzlichen genetischen Veränderungen identifiziert werden. Diese Resultate sind vor allem deshalb von Bedeutung, weil die CRISPR/Cas9-*in-vivo*-Mutagenesestrategie in der Regel zwar eine hohe Spezifität aufweist, aber nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass dadurch auch an anderen Stellen des

Genoms Mutationen eingeführt worden sind. Diese Off-target-Mutationen könnten ebenso für phänotypische Veränderungen verantwortlich sein, wie die beabsichtigte On-target-Mutation.

Die humanisierte Reaktionsspezifität der mutierten Alox15b ließ sich durch *Ex-vivo*-Aktivitätsassays nachweisen (Abschnitt 3.4.3). Dafür wurden Homogenate der Schwanzepidermis hergestellt, die vorher mit Phorbolmyristat behandelt wurden. Diese Gewebhomogenate wurden mit exogen zugesetzter Arachidonsäure inkubiert und die dabei entstandenen oxygenierten AA-Derivate mittels RP-HPLC analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurde sowohl bei den ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltieren als auch bei den Alox15b-KI-Mäusen 12S-HETE als Hauptoxygenierungsprodukt identifiziert. Daneben konnte bei den Wildtyp-Kontrolltieren die Bildung von 8S-HETE nachgewiesen werden (ca. 15–20 % der Gesamtproduktmenge, Abbildung 27 A und C). Bei Alox15b-KI-Mäusen konnte keine 8S-HETE-Bildung beobachtet werden. Dafür wurde bei diesen Tieren eine zusätzliche Bildung von 15S-HETE beobachtet werden (ca. 15–20 % der Gesamtproduktbildung, Abbildung 27 B und D). Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen konnte nicht aufgeklärt werden, auf welche metabolischen Reaktionen die 12S-HETE-Bildung zurückzuführen ist. Der Alox12-Weg wäre eine mögliche metabolische Quelle. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Alox12 in normaler Maushaut auf hohem Niveau exprimiert wird (Krieg and Fürstenberger 2014). Alox12-Knock-out-Mäuse leiden an einem erhöhten epidermalen Wasserverlust (Johnson et al. 1999; Kim et al. 2009) und zusammengenommen kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass die Alox12 in der normalen Epidermis vorkommt. *Ex-vivo*-Aktivitätsassays, die mit Mausschwanzepidermis von Alox12-Knock-out-Mäusen durchgeführt wurden, könnten zweifelsfrei bestätigen, dass die Alox12 als dominante metabolische Quelle der epithelialen 12S-HETE-Bildung angesehen werden kann. Leider waren Alox12-Knock-out-Mäuse zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Arbeiten nicht verfügbar.

4.4.2 Geschlechtsspezifische Veränderungen im Alterungsprozess

4.4.2.1 Veränderung des Körpergewichts durch Genetik und/ oder Alter

Das Körpergewicht der homozygoten Alox15b-KI-Tiere war dem der Wildtypen im Studienverlauf ähnlich, ebenso wie das Blutbild und die Organgewichte. Besonders die Körpergewichtskinetik-Kurven zeigten, dass nur die männlichen Alox15b-KI-Mäuse ab einem Alter von 24 Wochen signifikant weniger Körpergewicht ($p < 0,001$) als ausgezüchtete Wildtyp-Kontrollen zunahmen (Abbildung 32). Die Körpergewichtskurven

der Weibchen überlagerten sich bis zu einem Alter von 64 Wochen. Im Alter von unter 10 Wochen gab es Hinweise darauf, dass sich die Körpergewichte der beiden Genotypen ebenfalls unterscheiden. Diesen Hinweisen wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen. Die molekulare Grundlage für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht untersucht werden. Beim Vergleich der in dieser Arbeit quantifizierten Körpergewichtskinetiken der Alox15b-KI-Mäuse und der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrolltiere mit entsprechenden Daten, die im Jackson Laboratory für C57BL/6-Mäuse bestimmt wurden (Website: Jackson Laboratory, Stand: 09. 2021; <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>; <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-aged-b6>), kann festgestellt werden, dass die Körpergewichte der hier untersuchten Tiere im normalen Bereich liegen. Trotzdem gab es beim direkten Vergleich der beiden Genotypen einen signifikanten Unterschied. Bei der Interpretation dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass die Mäuse im Jackson Laboratory unter anderen Bedingungen gehalten wurden, was einen direkten Vergleich deutlich erschwert. So erhielten die Jackson-Mäuse ein Futter mit 6 % Fettanteil. Unter den Haltungsbedingungen der Charité betrug der Fettanteil lediglich 3,3 %.

In der vorliegenden Arbeit könnten die auffälligen Gewichtsunterschiede der Männchen auch auf die erzwungene Einzelhaltung einiger Tiere zurückzuführen sein. Aufgrund von starkem Revierverhalten mussten sieben Wildtyp-Tiere und ein Alox15b-KI-Tier vereinzelt werden. Möglicherweise hatten die einzeln gehaltenen Tiere durch fehlende soziale Kontakte weniger Bewegung und/oder fraßen deshalb mehr. In vorhergehenden Untersuchungen zum Sozialverhalten von weiblichen C57BL/6-Mäusen (Martin and Brown 2010) konnte festgestellt werden, dass Einzelhaltung die Kalorienaufnahme erhöht. In einer anderen Studie zeigten vereinzelt C57BL/6-Mäuse eine Zunahme des Fettgewebes und eine geänderte Fettzusammensetzung (Sun et al. 2014). Meist änderte sich jedoch dadurch kaum das Körpergewicht (Hohlbaum et al. 2022). Zu den differentiellen Körpergewichtseffekten von Alox15b-KI-Mäusen und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen könnten auch subtile Unterschiede im genetischen Background der beiden Tiergruppen beitragen. Zwar wurde versucht, die Unterschiede im genetischen Background zwischen den verwendeten homozygoten Alox15b-KI-Tieren und den homozygoten Wildtyp-Kontrollen durch Auskreuzung beider Genotypen aus heterozygoten Alox15b-KI-Mäusen so gering wie möglich zu halten. Trotzdem könnten zwischen den beiden Genotypen subtile Unterschiede

im genetischen Hintergrund bestehen, die zu den beobachteten Körpergewichtsunterschieden beitragen. Diese genetischen Unterschiede sollten bei der Interpretation der Ergebnisse ebenfalls bedacht werden.

4.4.2.2 Veränderungen des Blutbildes durch Genetik und/ oder Alter

Die veränderten männlichen Gewichtskinetiken der Alox15b-KI-Mäuse könnten aber auch als Konsequenz der beobachteten signifikanten Abweichungen im erythropoetischen System der Alox15b-KI-Tiere aufgetreten sein (Abbildung 33). Nur die alten (ca. 70.–ca. 80. Woche) männlichen Alox15b-KI-Tiere hatten verglichen mit den alten Wildtyp-Männchen signifikant niedrigere Erythrozyten-, Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte. Dies könnte bestätigen, dass die Humanisierung der Alox15b in der alten Maus einen Effekt auch auf das Körpergewicht hat. Bei den Weibchen waren diese Veränderungen nicht nachzuweisen. Allerdings zeigten Weibchen im mittleren Alter (30–40 Wochen) beim Vergleich von Alox15b-KI-Tieren und ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen Unterschiede in der Gesamtanzahl an Leukozyten, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Werte der Alox15b-KI-Tiere waren signifikant erhöht. Bei alten Weibchen ließen sich diese Unterschiede jedoch nicht mehr erkennen. Trotzdem ist dies ein interessantes Ergebnis, denn es legt nahe, dass Alox15b eine Rolle bei der Funktion des Immunsystems spielen könnte. In diesem Zusammenhang sollte auf die Arbeit von Alfardan et al. hingewiesen werden, in der gezeigt wurde, dass sich Alox15b-Knock-out-Mäuse zwar normal entwickelten, aber dass ihre Immunreaktion bei einer experimentell induzierten Influenzavirusinfektion signifikant verringert war. Die Alox15b-defizienten-Tiere entwickelten schwerere Krankheitssymptome und benötigten längere Zeiten, um sich von den Erkrankungssymptomen zu erholen (Alfardan et al. 2019).

Normalerweise wird nach einer Virusinfektion zuerst das nichtadaptive (angeborene) Immunsystem aktiviert. Dabei töten vor allem natürliche Killerzellen (NK) virusinfizierte Zellen ab (Biron et al. 1999; Brandstadter and Yang 2011). Zudem werden neutrophile Granulozyten und Monozyten sowie Makrophagen an die Infektionsstelle rekrutiert, um die abgetöteten, infizierten Zellen zu phagozytieren (Hashimoto et al. 2007; Prame Kumar et al. 2018). Anschließend kommt es im Rahmen der systemischen Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur Stimulation von zytotoxischen T-Zellen, die ebenfalls virusinfizierte Zellen töten (Andersen et al. 2006; Frank and Paust 2020). Wenn der Knock-out des *Alox15b*-Gens und die damit verbundene Unfähigkeit der Mäuse zur Synthese von 8-HETE zur Verlängerung der Immunantwort führt, könnte der in dieser Arbeit induzierte Knock-in

des Enzyms, der ebenfalls mit einer Unfähigkeit der Zellen für die Synthese von 8-HETE einhergeht, ähnliches bewirken. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen insgesamt, dass die hämatopoetischen Werte bei beiden Genotypen und Geschlechtern in einem normalen physiologischen Bereich liegen, wenn diese mit Daten zum Background-Genotyp von C57BL/6-Mausstämmen der Firmen von Charles River oder Jackson Laboratory sowie weiteren Studien (Silva-Santana et al. 2020) verglichen werden. Trotzdem zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, wenn Alox15b-KI Mäuse und ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen unter identischen experimentellen Bedingungen gehalten wurden.

Als interessante Nebenbefunde konnte auch festgestellt werden, dass bei der Untersuchung der Blutparameter der älteren Tiere öfter Anisozytosen, Poikilozytosen und Polychromasien beobachtet wurden. Diese Beobachtungen konnten bei beiden Geschlechtern und beiden Genotypen gemacht werden (siehe Anhang, Abschnitt 7.5). Die mittelalten Mäuse zeigten bei beiden Geschlechtern und Genotypen am wenigsten Auffälligkeiten. In verschiedenen Literaturstudien wurde gefunden, dass sich während der Alterung von Mäusen die hämatologischen Parameter verändern (Morrison et al. 1996; Sletvold 1987; Porto et al. 2015; van Beek et al. 2018). Vielleicht liegen die Veränderungen auch an hormonalen Änderungen beider Geschlechter im Alterungsgeschehen. Ein weiterer Grund könnte eine altersabhängige gestörte Funktionalität der hämatopoetischen Stammzellen sein (Morrison et al. 1996; Porto et al. 2015; van Beek et al. 2018). Polychromasie und Poikilozytose gehen häufig mit einer Anämie einher, können aber auch bei nichtanämischen Individuen auftreten. Anisozytose tritt oft auch mit Splenomegalie auf. Bei Poikilozytose treten im strömenden Blut unterschiedlich geformte Erythrozyten auf, wobei sich in den Zellen Howell-Jolly-Körperchen vermehrt nachweisen lassen. Howell-Jolly-Körperchen sind Mikrokerne in Erythrozyten, welche sich bei Erkrankungen des blutbildenden Systems (Anämie, myeloproliferative Erkrankungen) oder sich bei unzureichender Milzfunktion entwickeln (Shimizu et al. 1983; Morohashi et al. 1999; Everds 2007; Yamada et al. 2009; O'Connell et al. 2015). Solche Einschluss-Körperchen können bereits in frühen Stadien solcher Erkrankungen auftreten, wenn andere hämatologische Parameter noch unauffällig sind. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden solche Einschluss-Körperchen sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren beider Genotypen gefunden (siehe Anhang, Tabelle 43 und 44).

Da primäre Veränderungen des hämatopoetischen Systems häufig mit Veränderungen der Größe der Milz (Splenomegalie) einhergehen, wurde dieses Organ stichprobenartig von

jungen und mittelalten Tieren gewogen. Bei mittelalten Tieren (30–40 Wochen) zeigten sich keine messbaren Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Nur im jungen Alter von 10–20 Wochen waren die Milzgewichte der *Alox15b*-KI-Männchen um 0,02 g größer als bei entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (Tabelle 36). Für alte Tiere liegen keine auswertbaren Daten vor. In einigen Blutproben wurden verstärkt Thrombozytenaggregate detektiert. Diese könnten unter anderem bei der Blutabnahme entstanden sein. Problematisch ist, dass trotz vieler weltweit durchgeführter Tierstudien, es für die Blutabnahme bei Mäusen keine standardisierte Methode gibt. Einheitliche Referenzwerte des murinen Blutbildes sind bisher durch eine gewisse Variabilität gekennzeichnet, welche es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen gilt. Deswegen wurden die hier verwendeten Versuchstiere trotz verändertem *Alox15b*-Genotyp mit dem ähnlichen Background-Genotyp verglichen. Lymphatische Reizformen, die eine abweichende Lymphozytenstruktur aufweisen, traten überwiegend bei mittelalten Wildtyp-Weibchen (5 von 6 Tieren) auf und weisen auf eine Immunabwehr gegen Viren hin. Da die Tiere unter Standardbedingungen des FEM der Charité mit regulärem Gesundheitschecks lebten und sich auch normal verhielten, ist kein Grund für das Vorkommen dieser Reizformen erkennbar.

Die osmotische Stabilität der Erythrozyten war bei beiden Geschlechtern und Genotypen in jungem Alter höher als in fortgeschrittenen Altersstufen und verschlechterte sich mit zunehmendem Alter. Dies ist ein normaler Verlauf. Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,039$) zwischen den beiden Genotypen war nur bei Erythrozyten sichtbar, die von alten *Alox15b*-KI-Tieren präpariert wurden. Interessanterweise besaßen *Alox15b*-KI-Erythrozyten eine höhere osmotische Stabilität als die entsprechenden Wildtyp-Zellen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Anpassungsreaktion des erythropoetischen Systems von *Alox15b*-KI-Tieren sein. Wenn die Veränderung der katalytischen Aktivität der *Alox15* bei den KI-Tieren zu einer Kompromittierung des hämatopoetischen Systems geführt hat, wäre die Reduktion der Erythrozyten im strömenden Blut eine mögliche biologische Konsequenz. Um diesen Effekt funktionell auszugleichen, könnte das hämatopoetische System Erythrozyten mit erhöhter osmotischer Stabilität produzieren, die eine verlängerte Lebensdauer aufweisen. Diese Hypothese könnte in der Zukunft für weitere Studien genutzt werden.

4.4.2.3 Nicht beurteilbarer Effekt des *Alox15b*-Knock-ins auf die Tumorentstehung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht gezielt nach dem Auftreten von Tumoren bei gentechnisch veränderten Mäusen gesucht. Deshalb stellen die geschilderten Beobach-

tungen (siehe Abschnitt 3.4.6) Zufallsbefunde dar, die auch pathologisch nicht weiter bewertet wurden. Trotzdem scheinen die erhaltenen Daten darauf hinzuweisen, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen der Humanisierung der ALOX15b-Reaktionsspezifität und der Tumorentstehung geben könnte. Bei drei von zehn untersuchten Alox15b-KI-Tieren, aber keinem der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen, entwickelten sich verschiedene Tumore (Abbildung 29–31). Tumore treten bei Mäusen im Alter häufig auf und die Tatsache, dass bei keinem der untersuchten Wildtyp-Tiere ein Tumor nachweisbar war, könnte reiner Zufall sein. Nichtsdestoweniger muss hier erwähnt werden, dass in früheren Untersuchungen die humane ALOX15b als Tumorsuppressorgen beschrieben wurde (Nie et al. 2001; Bhatia et al. 2003; Suraneni et al. 2014). In *In-vitro*-Studien zeigte sich, dass die Aktivierung des ALOX15B-Weges zu einer replikativen Seneszenz menschlicher Prostatavorläuferzellen führt. Damit könnte das *ALOX15B*-Gen beim Menschen ein Prostataseneszenzgen darstellen und damit eine tumorsupprimierende Funktion erfüllen. Auch wurde beobachtet, dass die Tumorsuppressorwirkung der ALOX15B vom Alter der menschlichen Prostatazellen abhängt (Bhatia et al. 2005). Tang et al. konnten in ihren Arbeiten zur Rolle der ALOX15B beim Prostatakrebs zeigen, dass die Expression des VEGF-Gens durch ALOX15B unterdrückt wurde, was zu einem Stopp des Wachstums der Tumorzellen führte (Tang et al. 2009). In humanen Proben von Adenokarzinomen der Prostata konnte eine deutliche Reduktion der 15-HETE-Bildung (> 90 %) und ALOX15B-Expression ermittelt werden. Bei benignen Prostataveränderungen war das jedoch nicht der Fall (Shappell et al. 1999). Auch bei verschiedenen gynäkologischen Karzinomen scheinen ALOX15 und ALOX15B tumorsuppressiv zu wirken. Bei Brustkrebs ist die Expression von beiden ALOX15-Isoformen reduziert (Jiang et al. 2006). Dagegen zeigte sich während der Entwicklung von Ovarialkarzinomen die ALOX15B-Expression stark erhöht im Vergleich zum Normalgewebe. Interessanterweise wurden bei dieser Untersuchung auch hohe Konzentrationen von ALOX15B-mRNA im metastatischem Gewebe nachgewiesen (Roffeis et al. 2007). Da die ALOX15B-Orthologen von Menschen und Maus jedoch eine unterschiedliche Reaktionsspezifität aufweisen (Fürstenberger et al. 1991; Brash et al. 1997), bleibt abzuwarten, ob die Ergebnisse im humanen System 1:1 auf murine Systeme übertragen werden können. Experimente mit der prä-malignen Maus-Keratinocyten-Zelllinie 308 haben gezeigt, dass die humane ALOX15B und ihr murines Ortholog trotz ihrer unterschiedlichen Reaktionsspezifität möglicherweise gemeinsame Signalwege verwenden, um eine Wachstumshemmung in diesen Zellen zu erzielen. Für diese Untersuchungen wurde ein induzierbares Tetracyclin-kontrolliertes (Tet-On)-Expressionssystem für die humane und

die murine ALOX15B in der premalignen Maus-Keratinocyten-Zelllinie 308 erstellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression der beiden ALOX15B-Orthologen ähnliche Effekte auf das Wachstum der Zellen hatte (Schweiger et al. 2007). Diese Befunde wurden durch Supplementierungsstudien unterstützt, bei denen den Zellen 15-HETE (AA-Oxygenierungsprodukt der humanen ALOX15B) und 8-HETE (AA-Oxygenierungsprodukt der murinen Alox15b) zugegeben wurde. In beiden Fällen wurde eine Wachstumshemmung der Zellen beobachtet. Wenn diese Befunde, die an einem interessanten zellulären *In-vitro*-System erhalten wurden, sich 1:1 auf die *In-vivo*-Situation übertragen ließen, sollte es keine Unterschiede zwischen den hier erzeugten Alox15b-KI-Mäusen und den ausgezüchteten Wildtyp-Kontrollen in geeigneten murinen Tumormodellen geben. Zusammengefasst belegen die verschiedenen Studien, dass das ALOX15B-Gen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Tumorerkrankungen spielt (Bhatia et al. 2003; Kim et al. 2005; Jiang et al. 2006; Daurkin et al. 2011; Benatzy et al. 2022). Die in dieser Arbeit hergestellten Alox15b-KI-Mäuse könnten dazu genutzt werden, *in vivo* zu überprüfen, ob die unterschiedliche Reaktionsspezifität der ALOX15B von Mensch und Maus für die beobachteten Effekte ausschlaggebend ist.

4.5 Beeinflussung von Entzündungsreaktionen durch die Humanisierung der Reaktionsspezifität der Alox15b

Die folgenden Unterpunkte diskutieren, ob die humanisierte Reaktionsspezifität des murinen Alox15b-Gens die biologischen Funktionen im Rahmen von Entzündungsreaktionen veränderte.

4.5.1 Verstärkung der Entzündungssymptome der Alox15b-KI-Mäuse im DSS-Kolitismodell

Im Kolitismodell zeigte sich bei den Knock-in-Tieren mit Ausnahme des normalisierten Ausgangswertes im gesamten Studienverlauf ein signifikant reduziertes Körpergewicht im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 36). Die Alox15b-KI-Tiere schienen auf die DSS-Behandlung sensibler zu reagieren. Diese Sensitivierung der Tiere gegenüber der DSS-Behandlung kam auch dadurch zum Ausdruck, dass fünf Alox15b-KI-Mäuse wegen schwerer Entzündungssymptome aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Versuch genommen werden mussten (n = 2 der Gruppe D-8D, n = 3 der Gruppe D16-8D). Im Vergleich dazu traf das nur auf zwei ausgekreuzte Wildtyp-Tiere (Gruppe D-8C) zu. Zudem wiesen die Alox15b-KI-Tiere im Durchschnitt ein stärkeres Entzündungsgeschehen im

Kolon auf (Abbildung 37 und 40). Wenn allerdings die Kolonlänge als klinischer Readout-Parameter für den Schweregrad der Kolitis verwendet wurde, zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 38). Als weiterer klinischer Readout-Parameter wurde das Kolongewicht bestimmt (siehe Anhang, Abschnitt 7.11.2). Dieser Parameter ist jedoch nicht geeignet, um den Schweregrad der Entzündungsreaktion abzubilden, da zu viele teils gegenläufige Prozesse das Kolongewicht beeinflussen. So kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer Kolonverkürzung, die zu einer Verringerung des Kolongewichtes führen sollte. Gleichzeitig bewirkt das Entzündungsödem eine Gewichtszunahme. In Abhängigkeit davon, welcher der beiden Prozesse stärker ausgeprägt ist, kann es also im Rahmen der Kolitis zu einer Zunahme bzw. Abnahme des Kolongewichtes kommen. Deshalb wurde auf die detaillierte Bewertung der Kolongewichtsdaten verzichtet.

Bei der Auswertung der Oxylipinkonzentrationen im Kolongewebe (Abbildung 41 ff.) konnte vor allem geschlussfolgert werden, dass sich die Funktionsveränderungen, die aufgrund der *In-vivo*-Mutagenese-strategie erwartet worden waren (Reduktion des 8-HETE-Spiegels bei gleichzeitiger Erhöhung des 15-HETE-Spiegels), sich nicht auf der Ebene der Gewebeoxylipine nachweisen ließen. Dies gilt sowohl für die dominanten AA-Oxygenierungsprodukte (8-HETE vs. 15-HETE) als auch für jene Oxylipine, die aus EPA (8-HEPE vs. 15-HEPE), DHA (10-HDHA vs. 17-HDHA) und anderen PUFAs hergestellt werden. Trotzdem ließen sich aus den präsentierten Oxylipinprofilen einige pathophysiologisch interessante Schlussfolgerungen ableiten. Die Dickdarmspiegel der Summe aller bestimmten Oxylipine zeigte eine interessante Kinetik im zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion (Abbildung 41). Vor Beginn der Entzündungsreaktion waren geringe Kolonkonzentrationen an Oxylipinen nachweisbar. Diese stiegen zum Höhepunkt der Entzündung an, um in der Heilungsphase wieder auf ihre Ausgangswerte abzufallen. Ähnliche Kinetiken wurden für das proinflammatorisch wirkende LTB₄ gemessen (Abbildung 46). Überraschend war jedoch, dass auch die Gewebekonzentrationen von Neuroprotectin-2, Maresin-2 und Resolvin-D5 eine ähnliche Kinetik zeigten. Sollten diese Oxylipine im DSS-Kolitismodell wirklich antiinflammatorisch wirken, würde eine deutliche Steigerung dieser Mediatoren in der Phase der Entzündungsausheilung zu erwarten sein. Dies war aber für keinen der quantifizierten Metaboliten der Fall. In weiterführenden Experimenten sollten die zeitabhängigen Mediatorprofile in einem engeren zeitlichen Raster untersucht werden, um detailliertere Informationen zu deren Zeitverlauf im Rahmen der DSS-Kolitis zu erhalten.

Die DSS-Kolitis wird dadurch induziert, dass das DSS zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Darmwandepithelzellen führt (Kitajima et al. 1999). Dadurch können Bestandteile des Darminhaltes in die Darmwand eindringen und dort eine Entzündungsreaktion induzieren. Die Humanisierung der Alox15b-Reaktionsspezifität könnte die Darmepithelzellen gegenüber einer DSS-induzierten Epithelzellschädigung sensibilisieren, was unter anderem, zu einem stärkeren Wasserverlust und damit zu einer stärkeren Absenkung des Körpergewichtes führen sollte. Dabei müsste die Beeinflussung der Expression von Tight Junction-Proteinen und deren regelhafte Anordnung zur Abdichtung der enteralen Wasserbarriere eine entscheidende Rolle zukommen. Im Verlauf einer DSS-Kolitis sinkt die Expression von Tight-Junction-Proteinen (Poritz et al. 2007; Mennigen et al. 2009), was zu einer Reduktion der enteralen Wasserbarriere führt (Kitajima et al. 1999; Poritz et al. 2007; Iwaya et al. 2012; Carlsson et al. 2013). Die dadurch bedingte erhöhte Durchlässigkeit des Darmepithels erleichtert den Einstrom von Entzündungszellen, die in Abhängigkeit vom Genotyp der Tiere und vom enteralen Mikrobiom den Verlauf der akuten Entzündung beeinflussen (Melgar et al. 2005; Mennigen et al. 2009; Eichele and Kharbanda 2017). Direkte Untersuchungen zur Intaktheit bzw. zum Funktionsverlust der enteralen Wasserbarriere von Alox15b-KI-Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

In einer vorangegangenen Studie von Kroschwald et al. entwickelten Alox15-defiziente-Mäuse signifikant weniger schwere Entzündungssymptome als entsprechende Wildtyp-Kontrollen (Kroschwald et al. 2018). Dieses Ergebnis wurde unter anderem darauf zurückgeführt, dass es bei diesen gentechnisch veränderten Tieren zu einer nachhaltigen Verbesserung der enteralen Wasserbarriere kommt. Die Expression der Alox15 scheint die Ausbildung dieser Wasserbarriere zu beeinträchtigen. In diesen Untersuchungen konnten keine signifikanten Differenzen bei der Expression der Alox15b und der Alox5 zwischen den Alox15-Knock-out-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. In einer *In-vitro*-Studie, bei der aus der Darmwand von Ratten isolierte Gliazellen verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der 15-HETE-Produktion zu einer erhöhten Permeabilität der intestinalen Epithelbarriere des Dickdarms führt (Pochard et al. 2016). Da 15-HETE jedoch nicht das Hauptprodukt der murinen Alox15 ist, können diese *In-vitro*-Daten nicht auf das murine *In-vivo*-Modell (Kroschwald et al. 2018) übertragen werden.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse des DSS-Kolitismodells darauf hin, dass zwischen den beiden Genotypen ein signifikanter Unterschied bei den Körpergewichten im Verlauf

einer DSS-Kolitis besteht. Damit sollte die Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b einen protektiven Einfluss in diesem Entzündungsmodell haben. Diese Protektion scheint hier aber nicht auf eine verstärkte Synthese von Neuroprotectin-2, Maresin-2 und Resolvin-D5 zurückzuführen zu sein.

4.5.2 Divergente Entzündungsauswirkung im CFA-Pfotenödemmodell der murinen Alox15b-KI-Mäuse

Im CFA-induzierten Pfotenödemmodell war das Pfotenvolumen als Parameter für die Schwere der Entzündungsreaktion von Alox15b-Tieren signifikant niedriger ($n = 10$; $p < 0,01$; 6,4 %) als bei ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (Abbildung 47). Das bedeutet, dass die Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b die Entzündungsreaktion in der Pfote abschwächte (siehe Anhang, Abschnitt 7.12.2). Diese Daten stimmen nicht mit den Ergebnissen des DSS-Kolitismodells überein, bei dem die gleiche genetische Manipulation zu einer Sensibilisierung der Tiere gegen den entzündungserregenden Reiz geführt hatte.

Um die Intensität des entzündungsinduzierten Schmerzes zu quantifizieren, wurden zwei verschiedene Testsysteme (Hargreaves-Test, Von-Frey-Test) angewandt. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Latenzzeit und in der Rückzugsschwelle zwischen Alox15b-KI-Tieren und den ausgekreuzten Wildtypen (Abbildung 48). Die Humanisierung der Reaktionsspezifität von Alox15b hatte damit keine Auswirkungen auf die Schmerzwahrnehmung.

4.5.3 Zusammenfassende Diskussion zur Rolle der Humanisierung der Alox15b-Spezifität bei der Entzündungsreaktion

Die geschilderten Befunde zeigen, dass die gewählte Mutagenesestrategie *in vitro* und *in vivo* zu einer Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b geführt hat (Abschnitt 3.4.3). In den beiden getesteten murinen Entzündungsmodellen (DSS-Kolitis, CFA-Pfotenödem) induziert die gleiche genetische Manipulation gegensätzliche Nettoeffekte. Im DSS-Modell wurde ein proinflammatorischer Effekt der genetischen Manipulation beschrieben, während ein antiinflammatorischer Effekt bei der Quantifizierung des Pfotenödems beobachtet werden konnte. Diese gegensätzlichen Beobachtungen in beiden Modellen deuten darauf hin, dass ALOX15B unter bestimmten Umständen proinflammatorisch wirken kann, bei anderen entzündlichen Erkrankungen jedoch eher antiinflammatorische Funktionen ausübt. Die molekularen Mechanismen für

diesen Schutz wurden nicht erforscht. Eine mögliche antiinflammatorische Funktion der Alox15b bei entzündlichen Darmerkrankungen, die bei den *In-vitro*-Versuchen von Pochard et al. postuliert wurde (Pochard et al. 2016), konnte im hier beschriebenen *In-vivo*-DSS-Modell nicht bestätigt werden.

4.6 Limitationen

Die vorliegende Studie weist in ihren vier Fragekomplexen eine Reihe von Limitationen auf, von denen einige im Folgenden kritisch diskutiert werden sollen:

Teil 1: Der ALOX15-Weg von *T. belangeri*

T. belangeri ist ein rattenähnliches Kleintier, das aufgrund seiner größeren evolutionären Nähe zu den hoch-entwickelten Säugetieren als Alternative zu den häufig verwendeten Ratten und Mäusen für Untersuchungen zum Pathomechanismus humaner Erkrankungen vorgeschlagen wurde (Cao et al. 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass der ALOX15-Weg der Arachidonsäurekaskade bei *T. belangeri* anders strukturiert ist als bei Mäusen, Ratten und Menschen. Mäuse, Ratten und Menschen haben in ihren Genomen nur ein einzelnes *ALOX15*-Gen (Funk et al. 2002), während vier ähnliche *ALOX15*-Gene im Genom von *T. belangeri* vorkommen (Schäfer et al. 2020). Warum sich diese genomische Multiplizität bei *T. belangeri* entwickelte und ob diese Kodierungsvielfalt der ALOX15 dieser Spezies einen evolutionären Vorteil bringt, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht geklärt werden. Ungeklärt bleibt ebenfalls, ob die vier *ALOX15*-Gene ähnlichen oder verschiedenen Regulationsprinzipien unterliegen. Um sich diesem Problem zu nähern, müssten vergleichende Promotoranalysen durchgeführt werden. Ein interessanter Unterschied zwischen Menschen, Ratten und Mäusen auf der einen Seite und *T. belangeri* auf der anderen besteht darin, dass die ALOX15 im Gehirn von *T. belangeri* auf vergleichsweise hohem Niveau exprimiert wird (Schäfer et al. 2020). Bei Menschen, Mäusen und Ratten finden sich dagegen nur geringe Mengen an ALOX15 im normalen Gehirn (van Leyen et al. 2006). Ob diese Überexpression der ALOX15 im Gehirn von *T. belangeri* von biologischem Interesse ist, konnte in Rahmen der Untersuchungen nicht aufgeklärt werden.

Teil 2: Evolutionäre Aspekte von ALOX15 und ALOX15B

Um das Triadenkonzept (Borngräber et al. 1999) und die Evolutionshypothese (Adel et al. 2016; Heydeck et al. 2022) der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit ALOX15-Orthologe ausgewählter Säugetiere als

rekombinante Proteine exprimiert und hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass bei repetitiven Expressionsansätzen deutlich unterschiedliche Expressionsniveaus beobachtet wurden. Deshalb war es auch nicht möglich, detailliertere kinetische Messungen (z. B. die Bestimmung kinetischer Parameter wie Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximalen Umsatzgeschwindigkeit v_{max}) mit diesen Enzympräparaten durchzuführen. Weiterhin gelang es nicht, die exprimierten rekombinanten Enzyme aufzureinigen, um Charakterisierungsexperimente (z. B. die Bestimmung des Eisengehaltes) mit den reinen Proteinen durchzuführen. Die teilweise geringen Expressionshöhen der rekombinanten Enzyme erschwerte auch die routinemäßige Quantifizierung der Membranoxygenaseaktivitäten der ALOX15-Orthologen. Diese Experimente konnten deshalb nur beispielhaft mit Enzymen durchgeführt werden, die auf hohem Niveau exprimiert wurden (Schäfer et al. 2020). Diese technischen Probleme bei der Enzymexpression beeinflussten aber nicht die Untersuchungen zur Reaktionsspezifität der ALOX15-Orthologen. Selbst bei sehr geringen Expressionshöhen konnten eindeutige Aussagen zur Reaktionsspezifität der Enzyme gemacht werden. Bei Enzymen, die in *E. coli* nicht exprimierbar waren, wurden andere Expressionssysteme (transfizierte HEK-Zellen, Baculovirus-Insektenzellsystem) verwendet. Es blieb jedoch weitgehend unklar, warum bei den repetitiven Expressionsansätzen so unterschiedliche Expressionshöhen beobachtet wurden und warum die ALOX15-Orthologen mancher Säugetiere in *E. coli* nur unzureichend exprimiert werden konnten.

Für die Reaktionsspezifität der Säugetier-ALOX15B-Orthologen konnte keine Abhängigkeit dieser Enzymeigenschaft von der evolutionären Stellung der Tiere nachgewiesen werden (Tabelle 33). Fast alle Säugetiere exprimieren entsprechend ihrer Primärstruktur (Jisaka-Determinanten) AA-15-lipoxygenierende Enzyme. Nur einige Spezies der Gattung *Mus* (*M. musculus*, *M. spretus*, *M. caroli*), aber auch Vertreter der *Soricidae* (Spitzmäuse), die trotz ihrer äußeren Ähnlichkeit mit Mäusen nicht zum Taxon der Nagetiere, sondern zu den Insektenfressern gehören, sollten entsprechend ihrer Primärstruktur AA-8-lipoxygenierende ALOX15B-Orthologe exprimieren. Leider existieren derzeit außer für die ALOX15B des Menschen (*H. sapiens*) und der Maus (*M. musculus*) noch keine funktionellen Daten zur Reaktionsspezifität der ALOX15B-Orthologen von anderen Säugetieren und entsprechende Funktionsdaten wurden auch während dieser Arbeit nicht erhoben. Hier ergibt sich ein Ansatz für weiterführende Experimente.

Teil 3: Herstellung und Charakterisierung von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Mäuse herzustellen, die eine AA-15-lipoxygenierende Enzymmutante anstatt ihres AA-8-lipoxygenierenden Wildtyp-Enzyms der Alox15b exprimieren. Dazu wurde der *Alox15b*-Genlocus *in vivo* durch zwei nebeneinander liegende Punktmutationen (Tyr603Asp+His604Val, TAT-CAC zu GAC-GTC) verändert. Vorherige *In-vitro*-Untersuchungen an rekombinanten Proteinen hatten gezeigt, dass diese Mutagenesestrategie die murine Alox15b in ein AA-15-lipoxygenierendes Enzym verwandelt. *Ex-vivo*-Aktivitätsassays, bei denen PMA-behandelte Schwanzhaut als Enzymquelle verwendet wurde, haben im Rahmen dieser Arbeiten gezeigt, dass diese Mutationsstrategie auch *in vivo* zur Humanisierung der Reaktionsspezifität der Maus-Alox15b führte. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden, ob diese Veränderung auch bei der Verwendung von endogenen Substraten nachweisbar wäre. Dafür wurde untersucht, ob bei den Alox15b-Knock-in-Mäusen Produkte der gentechnisch veränderten Alox15b im Blutplasma nachweisbar waren. Leider konnte bei diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, dass bei Wildtyp-Mäusen geringere Mengen von 15-HETE im Blutplasma vorkommen als bei den Alox15b-Knock-in-Tieren. Weiterhin ergaben die hier vorgestellten Analysen nicht, dass die Mengen an 8-HETE im Blutplasma bei Wildtyp-Mäusen signifikant über den 8-HETE-Plasmakonzentrationen der Alox15b-Knock-in-Mäuse lag. Eine plausible Erklärung dieser Daten besteht darin, dass die lokale Aktivität der Alox15b in den Organen (eventuell in der Haut) sich nicht im Blutplasma widerspiegelt. Damit fehlt jedoch ein eindeutiger Beweis, dass die gentechnisch eingeführte Mutation des *Alox15b*-Gens die *In-vivo*-Reaktionsspezifität des Enzyms mit endogenem Substrat verändert hat. Das liegt aber auch daran, dass das authentische *In-vivo*-Substrat der Säugetier-ALOX15-Orthologen noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Bei der Bestimmung der verblindeten Blutparameter wurde ein externes, unabhängiges Labor beauftragt, sodass ein Bias vermieden werden konnte.

Teil 4: Verhalten von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität in tierischen Entzündungsmodellen

Alox15b-Knock-in-Mäuse, die ein Alox15b-Ortholog mit humanisierter Reaktionsspezifität exprimieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit weltweit erstmals hergestellt. Deshalb existierten zu Beginn dieser Arbeiten mit diesen Tieren noch keine Daten dazu, wie sich diese Mäuse in tierischen Entzündungsmodellen verhalten. Für die Planung der

Tierexperimente, vor allem für die Festlegung der Gruppengrößen, musste deswegen auf experimentelle Daten zurückgegriffen werden, die in der Vergangenheit mit Alox15-Knock-out-Mäusen ermittelt wurden (Kroschwald et al. 2018). Da sich während des Versuchs aber herausstellte, dass sich die Alox15-Knock-out-Mäuse in den Entzündungsmodellen anders verhielten als die Alox15b-Knock-in-Tiere (geringere Effektstärken bei den Alox15b-Knock-in-Mäusen) wurden die Gruppengrößen eher knapp kalkuliert. Für die Planung der Experimente wurden somit überbewertete Effektstärken für die beiden experimentellen Gruppen (Alox15b-Knock-in-Mäuse vs. ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen) angenommen. Die knappe Planung der n-Zahlen wurde noch problematischer, da im DSS-Kolitismodell einzelne Tiere der beiden experimentellen Gruppen (Alox15b-Knock-in-Mäuse vs. ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen) aus Tierschutzgründen aus dem Versuch genommen werden mussten. Dadurch waren die n-Zahlen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Körpergewichtskinetiken (Abbildung 36) unterschiedlich, jedoch ergaben sich zu keinem Zeitpunkt der akuten Entzündung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (in den p-Werten nicht gezeigt). Dennoch ergab sich, dass die Kurve der Körpergewichtsentwicklung der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen im gesamten Zeitverlauf des Experimentes über der Kurve der Alox15b-Knock-in-Tiere lag und dass zwischen den beiden Kurven über den gesamten Zeitraum des Experimentes betrachtet ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) bestand. Für das zweite im Rahmen dieser Arbeit verwendete Entzündungsmodell ergaben sich diese Probleme nicht. Beim CFA-induzierten-Pfotenödemmodell wurden pro Gruppe mehr Tiere geplant ($n = 13$), aber aufgrund von Kapazitätsgründen der Versuchsdurchführung nur 10 Tiere verwendet. Die histologischen Schnitte der DSS-Kolitis-Gewebeproben wurde zwar von unabhängigen Pathologen durchgeführt, aber die Bewertung erfolgte nicht doppelt verblindet. Den Pathologen war ersichtlich, welche Probe zu welchem Genotyp gehörte. Dadurch könnte ein Bias entstanden sein, der durch die geringe Anzahl der histologisch untersuchten Proben noch verstärkt wurde.

4.7 Ausblick

Aus den oben beschriebenen Limitationen der verschiedenen Teilprojekte der vorliegenden Arbeit ergeben sich unmittelbare Ansatzpunkte für weiterführende Forschungen, von denen einige in der Arbeitsgruppe Kühn-Lipoxygenaseforschung der Charité in Berlin bereits initiiert worden sind.

Teil 1: Der ALOX15-Weg von *T. belangeri*

In der vorliegenden Arbeit wurde der ALOX15-Weg von *T. belangeri* als ein Vertreter der *Scandentia* erstmals untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass es bei diesen Tieren im Unterschied zu Maus und Mensch mehrere strukturähnliche *ALOX15*-Gene gibt. Ungeklärt blieb jedoch die Frage, ob eine derartige Kodierungsvielfalt der ALOX15 auch bei anderen Vertretern der taxonomischen Ordnung *Scandentia* nachweisbar ist oder ob diese Kodierungsvielfalt ein Spezifikum von *T. belangeri* darstellt. An der Beantwortung dieser Frage arbeiten derzeit das Kunming Institut für Zoologie in China, welche die Genome anderer *Scandentia*-Spezies sequenzieren wollen.

Die hohen Expressionsniveaus der ALOX15 im Gehirn von *T. belangeri* (Schäfer et al. 2020) sind ein sehr interessanter Befund, der darauf hindeutet, dass dieses Enzym für die Funktionalität des Gehirns dieser Tiere eine Rolle spielen könnte. Worin diese Rolle jedoch besteht und welche Auswirkungen eine Unterdrückung der ALOX15-Expression oder eine *In-vivo*-Hemmung ihrer katalytischen Aktivität auf die Gehirnfunktion haben könnte, ist völlig offen. Da es bislang noch keine spezifischen Hemmstoffe der ALOX15 gibt und da ein spezifisches genetisches Silencing der ALOX15-Expression in *T. belangeri* derzeit noch nicht möglich ist, kann diese Frage beim derzeitigen Stand des Wissens nicht beantwortet werden. Sollten in Zukunft die nötigen Forschungswerkzeuge verfügbar werden, könnten entsprechende weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Teil 2: Evolutionäre Aspekte von ALOX15 und ALOX15B

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zur Reaktionsspezifität der Säugetier-ALOX15-Orthologen bestätigen das Triadenkonzept der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen und die Evolutionshypothese. Allerdings konnten außerhalb der vorliegenden Arbeit einzelne Säugetierspezies identifiziert werden, die nicht der Evolutionshypothese folgen. Von den bisher mehr als 150 untersuchten Säugetierspezies sind das weniger als 5 % (Heydeck et al. 2022).

Für die ALOX15B-Orthologen gibt es bislang nur funktionelle Daten für die Orthologen von Mensch (Brash et al. 1997) und Maus (Fürstenberger et al. 1991; Jisaka et al. 2000). Die Enzyme anderer Säugetiere wurden bislang nicht funktionell charakterisiert. Entsprechende Arbeiten laufen jedoch derzeit in der Arbeitsgruppe Kühn-Lipoxygenaseforschung an der Charité in Berlin. Die ALOX15B-Orthologen der großen Menschenaffen (Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan) und von ausgestorbenen Menschenarten (*H. neandertalensis*, *H. denisovan*) wurden bereits als rekombinante Proteine exprimiert und erwartungsgemäß

als AA-15-lipoxygenierende Enzyme identifiziert. Es ist geplant, ca. 30 verschiedene ALOX15B-Orthologen aus verschiedenen *Prototheria*-, *Metatheria*- und *Eutheria*-Spezies als rekombinante Proteine zu exprimieren und deren Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure und anderen Fettsäuren zu ermitteln.

Teil 3: Herstellung und Charakterisierung von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität

Bei der basalen Charakterisierung der Alox15b-Knock-in-Mäuse ergab sich, dass die genetisch veränderten männlichen Tiere durch eine geringere Gewichtszunahme gekennzeichnet waren (Abbildung 32). Bei den weiblichen Individuen konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Die zugrunde liegenden geschlechtsspezifischen Mechanismen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Mögliche Ansatzpunkte zur Aufklärung der Ursachen wären detaillierte Studien zum Fress- bzw. Bewegungsverhalten der Alox15b-Knock-in-Tiere, zu deren Stoffwechselaktivität und zum Einfluss von Sexualhormonen. Dazu müssten die Tiere in Stoffwechselkäfigen gehalten und durch ein entsprechendes Bewegungsmonitoring überwacht werden. Bei den Reproduktionsraten der Tiere konnten bislang keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden.

Ein interessanter Zufallsbefund, der sich bei der Beobachtung der Alox15b-Knock-in-Tiere ergab, war, dass diese Tiere offenbar häufiger Spontantumore entwickeln. Diese Beobachtungen könnten der Ausgangspunkt für gezielte Untersuchungen sein, bei denen die Alox15b-Knock-in-Mäuse und ihre ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen in verschiedenen murinen Tumormodellen untersucht werden können. Diese Untersuchungen wären vor allem auch deshalb sinnvoll, da für die humane ALOX15B gezeigt werden konnte, dass dieses Enzym beim Ovarialkarzinom vermehrt in Gewebe nachweisbar ist (Roffeis et al. 2007) und auch beim Prostatakarzinom von Relevanz ist (Bhatia et al. 2005; Tang et al. 2007).

Teil 4: Verhalten von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität in tierischen Entzündungsmodellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Alox15b-Knock-in-Mäuse in zwei unterschiedlichen tierischen Entzündungsmodellen (DSS-Kolitis, CFA-Pfotenödem) getestet. Vordergründig konnte festgestellt werden, dass die genetisch veränderten Tiere im DSS-Kolitismodell empfindlicher waren als die ausgekreuzten Wildtyp-Mäuse (Abbildung 36). Die subtile genetische Veränderung des *Alox15b*-Gens hatte einen

proinflammatorischen Effekt. Im CFA-Pfotenödemmodell konnte hingegen ein antiinflammatorischer Effekt der genetischen Manipulation beobachtet werden, wenn die Ausbildung des Pfotenödems als Readout-Parameter verwendet wurde (Abbildung 47 C). Diese Daten deuten darauf hin, dass sich die genetische Manipulation des *Alox15b*-Gens in verschiedenen Entzündungsmodellen unterschiedlich auswirkt. Um diese Auswirkungen besser einschätzen zu können, sollten die Tiere in weiteren Entzündungsmodellen getestet werden. Derzeit laufen entsprechende Untersuchungen im Labor der AG-Kühn-Lipoxygenaseforschung, bei denen die *Alox15b*-Knock-in-Mäuse mit apoE-defizienten-Mäusen gekreuzt werden und der Grad der Lipidablagerung in der Aorta als Readout-Parameter für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen quantifiziert wird. Nach der derzeit gültigen Definition ist die Atherosklerose eine entzündliche Arterienerkrankung, bei der die Entzündung der Arterienwand als auslösender Faktor für die Entwicklung von Gefäßwandläsionen gilt.

Ein weiterer interessanter Befund, der sich bei Oxylipidomanalyse des entzündlich veränderten Kolongewebes ergab, war die Kinetik einiger Oxylipine im Laufe der Entzündungsreaktion. Im gesunden Kolongewebe konnten nur geringe Mengen an proinflammatorischen (LTB₄) und proresolutorischen (Neuroprotectin-D1, Maresin-2, Resolvin-D5) Oxylipinen nachgewiesen werden (Abbildung 46 A, D, E, F). Am Höhepunkt der Entzündungsreaktion waren die Gewebekonzentrationen dieser Metabolite deutlich erhöht. Nach der akuten Entzündung wurden Metabolitenkonzentrationen gemessen, die im Bereich der Ausgangswerte (nicht entzündlich verändertes Gewebe) lagen. Solche zeitlichen Verläufe sind für proinflammatorische Mediatoren, wie z. B. LTB₄, gut nachvollziehbar, können aber für proresolutorisch wirkende Botenstoffe nur schwer interpretiert werden. Es ist zwar möglich, dass die Entzündungsheilung bereits während der akuten Entzündungsphase einsetzt und deshalb auch während der akuten Entzündung bereits proresolutorische Oxylipine gebildet werden. Dann sollten diese Mediatoren jedoch auch während des zeitlichen Verlaufs der Heilungsphase nachweisbar sein. Um diese Frage zu klären, müssten in nachfolgenden Untersuchungen zeitlich besser aufgelöste Oxylipinprofile aufgenommen werden.

5 Zusammenfassung

Die Oxygenierung von Polyenfettsäuren ist ein wichtiger Schritt in der Biosynthese verschiedener immunologisch relevanter Lipidderivate und Lipoxygenasen sind an diesen Synthesereaktionen beteiligt. Für die Entzündungsreaktion sind vier (Alox15, Alox15b, Alox12, Alox5) der sieben bei Mäusen vorkommenden Lipoxygenase-Isoformen bedeutsam. Diese vier Enzyme sind sich strukturell zwar sehr ähnlich, besitzen aber unterschiedliche Reaktionsspezifitäten. Dadurch bilden die Enzyme unterschiedliche Reaktionsprodukte, was ihre biologischen Funktionen beeinflussen könnte. Die ALOX15- und die ALOX15B-Orthologen von Mensch und Maus weisen ebenfalls unterschiedliche Reaktionsspezifitäten auf. Dieser Unterschied könnte dazu führen, dass die biologische Rolle der beiden Enzymorthologen nicht vergleichbar ist. Die vorliegende Arbeit, die sich mit der prinzipiellen Bedeutung der Reaktionsspezifität der ALOX15 und der ALOX15B für die biologische Rolle der beiden Enzyme in der Maus beschäftigt, ist in vier verschiedene Unterprojekte gegliedert, deren wesentliche Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden können:

Teilprojekt 1: Der ALOX15-Weg von *T. belangeri*

T. belangeri wurde aufgrund seiner evolutionären Nähe zu den hoch entwickelten Säugetieren als Alternative zu den häufig verwendeten Labortieren (Maus, Ratte) vorgeschlagen. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass der ALOX15-Weg der Arachidonsäurekaskade bei *T. belangeri* anders strukturiert ist als bei Maus, Ratte und Mensch. So konnten bei dieser Säugetierspezies vier verschiedene, strukturell jedoch ähnliche *ALOX15*-Gene identifiziert werden, während die Genome von Menschen, Maus und Ratte nur ein einziges *ALOX15*-Gen besitzen. Die Reaktionsspezifität der durch diese Gene kodierten ALOX15-Isoformen folgt wie alle anderen bisher funktionell charakterisierten ALOX15-Orthologen dem Triadenkonzept und bestätigt die Evolutionshypothese der ALOX15-Reaktionsspezifität. Trotz dieser Ähnlichkeiten mit anderen Säugetier-ALOX15-Orthologen wird zusammenfassend festgestellt, dass die Multiplizität der *ALOX15*-Gene und der Arachidonsäurestoffwechsel von *T. belangeri* komplexer zu sein scheint als beim Menschen. Deshalb scheint dieses Säugetier kein gutes Modell für den menschlichen Arachidonsäurestoffwechsel zu sein.

Teilprojekt 2: Evolutionäre Aspekte der Reaktionsspezifität von ALOX15 und ALOX15B

Die Reaktionsspezifität von bisher nicht charakterisierten Säugetier-ALOX15-Orthologen kann unter Verwendung des Triadenkonzepts auf der Basis der Aminosäuresequenz der Enzyme vorhergesagt werden. Dieses Konzept wurde durch Untersuchungen an den rekombinanten ALOX15-Orthologen des Kaninchens, der Maus und des Menschen eingeführt und konnte im Folgenden für mehrere andere ALOX15-Orthologen bestätigt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen durchgeführten Experimente belegen, dass das Triadenkonzept auch für alle elf in dieser Studie untersuchten Säugetier-ALOX15-Orthologe anwendbar ist. Weiterhin halten sich alle hier untersuchten ALOX15-Orthologe an die Evolutionshypothese der Reaktionsspezifität von ALOX15-Orthologen. Säugetier-ALOX15B-Orthologe zeigen keine Abhängigkeit ihrer Reaktionsspezifität von der evolutionären Stellung der Tiere. Aus den hier durchgeführten Aminosäuresequenzvergleichen konnte geschlussfolgert werden, dass fast alle Säugetier-ALOX15B-Orthologen die Reaktionsspezifität des humanen Enzyms teilen. Nur einige Vertreter der Gattung *Mus* (z. B. *M. musculus*) zeigen eine abweichende Reaktionsspezifität. Warum das so ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Teil 3: Herstellung und Charakterisierung von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität

Die Reaktionsspezifität der humanen ALOX15 (Arachidonsäure-12-Lipoxygenierung) mit freien Polyenfettsäuren unterscheidet sich deutlich von der des Mausenzyms (Arachidonsäure-8-Lipoxygenierung). Untersuchungen zur ortsgerichteten Mutagenese der Maus-ALOX15b haben gezeigt, dass durch einen Tyr603Asp+His604Val-Austausch die Reaktionsspezifität des rekombinanten murinen Enzyms humanisiert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutagenese-strategie auf die *In-vivo*-Situation übertragen und Knock-in-Mäuse hergestellt, die anstatt des AA-8-lipoxygenierenden Wildtyp-Enzyms die AA-15-lipoxygenierende Doppelmutante (Tyr603Asp+His604Val) exprimieren. Die genetisch veränderten Tiere waren lebensfähig und wiesen ein ähnliches Reproduktionsverhalten wie ausgekreuzte Wildtyp-Kontrollen auf. Dennoch ergab deren phänotypische Grundcharakterisierung, dass die genetisch veränderten Mäuse eine leicht eingeschränkte Erythropoese aufwiesen und dass die männlichen Tiere im Rahmen ihrer Individualentwicklung weniger Körpergewicht zunahmen. Die molekularen Ursachen für diese beiden Einschränkungen, die in einem kausalen Zusammenhang zueinanderstehen könnten, wurden im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt.

Teil 4: Verhalten von Alox15b-Knock-in-Mäusen mit humanisierter Reaktionsspezifität in tierischen Entzündungsmodellen

Da die Humanisierung der Reaktionsspezifität der murinen Alox15b zu einer verbesserten *In-vivo*-Biosynthese von proresolutorischen Entzündungsmediatoren führen sollte, konnte erwartet werden, dass die Alox15b-Knock-in-Mäuse in verschiedenen *In-vivo*-Entzündungsmodellen geschützt sein sollten. Diese Vorhersage konnte im Modell des CFA-induzierten Pfortenödems bestätigt werden, wenn das Pfortenvolumen als Read-out-Parameter für die Entzündungsreaktion verwendet wurde. Die Schmerzempfindlichkeit der Tiere wurde dabei nicht beeinflusst. Wurden die Tiere hingegen im Entzündungsmodell der DSS-Kolitis getestet, entwickelten die genetisch veränderten Mäuse eine schwerere Entzündungsreaktion, was an der stärkeren Körpergewichtsabnahme dieser Tiere im Verlaufe der Entzündungsreaktion ablesbar war. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die subtile genetische Modifizierung des *Alox15*-Gens die Intensität der Entzündungsreaktion in verschiedenen tierischen Entzündungsmodellen unterschiedlich beeinflusst.

Die Untersuchung der Gewebekonzentrationen ausgewählter proinflammatorischer (Leukotrien-B₄) und antiinflammatorischer (Neuroprotectin-D1, Maresin-2, Resolvin-D5) Oxylipine im entzündlich veränderten Darmgewebe ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Weiterhin konnten aus den beobachteten Veränderungen dieser Lipidmediatoren im Zeitverlauf der Entzündungsreaktion keine sicheren Schlussfolgerungen auf eine proresolutorische Wirkung von Neuroprotectin-D1, Maresin-2 und Resolvin-D5 in diesem Entzündungsmodell gezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aanangi, Raveendra; Kotapati, Kasi Viswanath; Palaka, Bhagath Kumar; Kedam, Thyagaraju; Kanika, Nirmala Devi; Ampasala, Dinakara Rao (2016): Purification and characterization of lipoxygenase from mung bean (*Vigna radiata* L.) germinating seedlings. In *3 Biotech* 6 (1), p. 113. DOI: 10.1007/s13205-016-0427-5.
- Abbott, Sarah K.; Else, Paul L.; Atkins, Taleitha A.; Hulbert, A. J. (2012): Fatty acid composition of membrane bilayers: importance of diet polyunsaturated fat balance. In *Biochimica et biophysica acta* 1818 (5), pp. 1309–1317. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.01.011.
- Adel, Susan; Kakularam, Kumar Reddy; Horn, Thomas; Reddanna, Pallu; Kuhn, Hartmut; Heydeck, Dagmar (2015): Leukotriene signaling in the extinct human subspecies *Homo denisovan* and *Homo neanderthalensis*. Structural and functional comparison with *Homo sapiens*. In *Archives of biochemistry and biophysics* 565, pp. 17–24. DOI: 10.1016/j.abb.2014.10.012.
- Adel, Susan; Karst, Felix; González-Lafont, Àngels; Pekárová, Mária; Saura, Patricia; Masgrau, Laura et al. (2016): Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (30), E4266-75. DOI: 10.1073/pnas.1604029113.
- Aharony, David; Redkar-Brown, Denise G.; Hubbs, Stephen J.; Stein, Ross L. (1987): Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. In *Prostaglandins* 33 (1), pp. 85–100. DOI: 10.1016/0090-6980(87)90307-8.
- Alfardan, Rana; Guo, Changxiong; Toth, Linda A.; Nie, Daotai (2019): Impaired Recovery from Influenza A/X-31(H3N2) Infection in Mice with 8-Lipoxygenase Deficiency. In *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 7 (4). DOI: 10.3390/medsci7040060.
- Andersen, Mads Hald; Schrama, David; Thor Straten, Per; Becker, Jürgen C. (2006): Cytotoxic T cells. In *The Journal of investigative dermatology* 126 (1), pp. 32–41. DOI: 10.1038/sj.jid.5700001.
- Andreou, Alexandra-Zoi; Vanko, Marian; Bezakova, Lydia; Feussner, Ivo (2008): Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. In *Phytochemistry* 69 (9), pp. 1832–1837. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.03.002.
- Aoki, Tomohiro; Narumiya, Shuh (2012): Prostaglandins and chronic inflammation. In *Trends in pharmacological sciences* 33 (6), pp. 304–311. DOI: 10.1016/j.tips.2012.02.004.
- Aoshima, Hitoshi; Kajiwara, Tadahiko; Hatanaka, Akikazu (1981): Decomposition of Lipid Hydroperoxide by Soybean Lipoxygenase-1 under Aerobic Conditions Studied by High Performance Liquid Chromatography and the Spin Trapping Method. In *Agricultural and Biological Chemistry* 45 (10), pp. 2245–2251. DOI: 10.1080/00021369.1981.10864863.
- Araki (2010): Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. In *Oncol Rep.* DOI: 10.3892/or_00000932.

- Arita, Makoto; Bianchini, Francesca; Aliberti, Julio; Sher, Alan; Chiang, Nan; Hong, Song et al. (2005): Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. In *The Journal of experimental medicine* 201 (5), pp. 713–722. DOI: 10.1084/jem.20042031.
- Bagga, Dilprit; Wang, Ling; Farias-Eisner, Robin; Glaspy, John A.; Reddy, Srinivasa T. (2003): Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (4), pp. 1751–1756. DOI: 10.1073/pnas.0334211100.
- Banthiya, Swathi; Kalms, Jacqueline; Galemou Yoga, Etienne; Ivanov, Igor; Carpena, Xavi; Hamberg, Mats et al. (2016): Structural and functional basis of phospholipid oxygenase activity of bacterial lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa*. In *Biochimica et biophysica acta* 1861 (11), pp. 1681–1692. DOI: 10.1016/j.bbali.2016.08.002.
- Basavarajappa, Devaraj; Wan, Min; Lukic, Ana; Steinhilber, Dieter; Samuelsson, Bengt; Rådmark, Olof (2014): Roles of coactosin-like protein (CLP) and 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in cellular leukotriene biosynthesis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (31), pp. 11371–11376. DOI: 10.1073/pnas.1410983111.
- Bazan, Nicolas G. (2006): Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. In *Trends in neurosciences* 29 (5), pp. 263–271. DOI: 10.1016/j.tins.2006.03.005.
- Bazan, Nicolas G. (2009a): Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. In *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 81 (2-3), pp. 205–211. DOI: 10.1016/j.plefa.2009.05.024.
- Bazan, Nicolas G. (2009b): Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. In *Journal of lipid research* 50 Suppl, S400-5. DOI: 10.1194/jlr.R800068-JLR200.
- Bazan, Nicolas G.; Calandria, Jorgelina M.; Gordon, William C. (2013): Docosahexaenoic acid and its derivative neuroprotectin D1 display neuroprotective properties in the retina, brain and central nervous system. In *Nestle Nutrition Institute workshop series* 77, pp. 121–131. DOI: 10.1159/000351395.
- Bell, E.; Creelman, R. A.; Mullet, J. E. (1995): A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19), pp. 8675–8679. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8675.
- Bell-Parikh, L. Chastine; Ide, Tomomi; Lawson, John A.; McNamara, Peter; Reilly, Muredach; FitzGerald, Garret A. (2003): Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. In *The Journal of clinical investigation* 112 (6), pp. 945–955. DOI: 10.1172/JCI18012.
- Benatzky, Yvonne; Palmer, Megan A.; Brüne, Bernhard (2022): Arachidonate 15-lipoxygenase type B: Regulation, function, and its role in pathophysiology. In *Front. Pharmacol.* 13, Article 1042420. DOI: 10.3389/fphar.2022.1042420.

- Berger, M.; Schwarz, K.; Thiele, H.; Reimann, I.; Huth, A.; Borngräber, S. et al. (1998): Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. In *Journal of molecular biology* 278 (5), pp. 935–948. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1737.
- Bhatia, Bobby; Maldonado, Carlos J.; Tang, Shaohua; Chandra, Dhyan; Klein, Russell D.; Chopra, Dharam et al. (2003): Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. In *Journal of Biological Chemistry* 278 (27), pp. 25091–25100. DOI: 10.1074/jbc.M301920200.
- Bhatia, Bobby; Tang, Shaohua; Yang, Peiying; Doll, Andreas; Aumüller, Gerhard; Newman, Robert A.; Tang, Dean G. (2005): Cell-autonomous induction of functional tumor suppressor 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) contributes to replicative senescence of human prostate progenitor cells. In *Oncogene* 24 (22), pp. 3583–3595. DOI: 10.1038/sj.onc.1208406.
- Biron, C. A.; Nguyen, K. B.; Pien, G. C.; Cousens, L. P.; Salazar-Mather, T. P. (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. In *Annual review of immunology* 17, pp. 189–220. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.189.
- Biteman, Benjamin; Hassan, Iram R.; Walker, Everaldo; Leedom, Alexander J.; Dunn, Michael; Seta, Francesca et al. (2007): Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (9), pp. 2257–2266. DOI: 10.1096/fj.06-7918com.
- Björk, J.; Hedqvist, P.; Arfors, K. E. (1982): Increase in vascular permeability induced by leukotriene B4 and the role of polymorphonuclear leukocytes. In *Inflammation* 6 (2), pp. 189–200. DOI: 10.1007/BF00916243.
- Boeglin, W. E.; Kim, R. B.; Brash, A. R. (1998): A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12), pp. 6744–6749. DOI: 10.1073/pnas.95.12.6744.
- Borgeat, P.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. (1976): Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. In *Journal of Biological Chemistry* 251 (24), pp. 7816–7820. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)57008-9.
- Borngräber, S.; Browner, M.; Gillmor, S.; Gerth, C.; Anton, M.; Fletterick, R.; Kühn, H. (1999): Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. In *The Journal of biological chemistry* 274 (52), pp. 37345–37350. DOI: 10.1074/jbc.274.52.37345.
- Borngräber, S.; Kuban, R. J.; Anton, M.; Kühn, H. (1996): Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. In *Journal of molecular biology* 264 (5), pp. 1145–1153. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0702.
- Bowsher, C. G.; Ferrie, B. J.; Ghosh, S.; Todd, J.; Thompson, J. E.; Rothstein, S. J. (1992): Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. In *Plant physiology* 100 (4), pp. 1802–1807. DOI: 10.1104/pp.100.4.1802.

- Boyington, J. C.; Gaffney, B. J.; Amzel, L. M. (1993): The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. In *Science (New York, N.Y.)* 260 (5113), pp. 1482–1486. DOI: 10.1126/science.8502991.
- Bradman, Matthew J. G.; Ferrini, Francesco; Salio, Chiara; Merighi, Adalberto (2015): Practical mechanical threshold estimation in rodents using von Frey hairs/Semmes-Weinstein monofilaments: Towards a rational method. In *Journal of neuroscience methods* 255, pp. 92–103. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.08.010].
- Brandstadter, Joshua D.; Yang, Yiping (2011): Natural killer cell responses to viral infection. In *Journal of innate immunity* 3 (3), pp. 274–279. DOI: 10.1159/000324176.
- Brash, A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. In *The Journal of biological chemistry* 274 (34), pp. 23679–23682. DOI: 10.1074/jbc.274.34.23679.
- Brash, A. R.; Boeglin, W. E.; Chang, M. S. (1997): Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (12), pp. 6148–6152. DOI: 10.1073/pnas.94.12.6148.
- Brash, Alan R.; Yu, Zheyong; Boeglin, William E.; Schneider, Claus (2007): The hepoxilin connection in the epidermis. In *The FEBS journal* 274 (14), pp. 3494–3502. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05909.x.
- Brinckmann, R.; Schnurr, K.; Heydeck, D.; Rosenbach, T.; Kolde, G.; Kühn, H. (1998): Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. In *Blood* 91 (1), pp. 64–74.
- Brogliato, Ariane R.; Moor, Andrea N.; Kesl, Shannon L.; Guilherme, Rafael F.; Georgii, Janaína L.; Peters-Golden, Marc et al. (2014): Critical role of 5-lipoxygenase and heme oxygenase-1 in wound healing. In *The Journal of investigative dermatology* 134 (5), pp. 1436–1445. DOI: 10.1038/jid.2013.493.
- Bryant, R. W.; Bailey, J. M.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. (1982): Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. In *The Journal of biological chemistry* 257 (11), pp. 6050–6055.
- Buchmann, Kurt (2014): Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. In *Frontiers in immunology* 5, p. 459. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00459.
- Bundy, G. L.; Nidy, E. G.; Epps, D. E.; Mizsak, S. A.; Wnuk, R. J. (1986): Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral *Pseudoplexaura porosa*. In *The Journal of biological chemistry* 261 (2), pp. 747–751.
- Bürger, F.; Krieg, P.; Marks, F.; Fürstenberger, G. (2000): Positional- and stereo-selectivity of fatty acid oxygenation catalysed by mouse (12S)-lipoxygenase isoenzymes. In *The Biochemical journal* 348 (Pt 2), pp. 329–335.
- Bushfield, M.; McNicol, A.; MacIntyre, D. E. (1985): Inhibition of platelet-activating-factor-induced human platelet activation by prostaglandin D2. Differential sensitivity of platelet transduction processes and functional responses to inhibition by cyclic AMP. In *The Biochemical journal* 232 (1), pp. 267–271. DOI: 10.1042/bj2320267.

- Campbell, Eric L.; Louis, Nancy A.; Tomassetti, Sarah E.; Canny, Geraldine O.; Arita, Makoto; Serhan, Charles N.; Colgan, Sean P. (2007): Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (12), pp. 3162–3170. DOI: 10.1096/fj.07-8473com.
- Cao, J.; Yang, E-B; Su, J-J; Li, Y.; Chow, P. (2003): The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research. In *Journal of medical primatology* 32 (3), pp. 123–130. DOI: 10.1034/j.1600-0684.2003.00022.x.
- Carlsson, Anders H.; Yakymenko, Olena; Olivier, Isabelle; Håkansson, Fathima; Postma, Emily; Keita, Asa V.; Söderholm, Johan D. (2013): Faecalibacterium prausnitzii supernatant improves intestinal barrier function in mice DSS colitis. In *Scandinavian journal of gastroenterology* 48 (10), pp. 1136–1144. DOI: 10.3109/00365521.2013.828773.
- Carolis, E. de; Denis, D.; Riendeau, D. (1996): Oxidative inactivation of human 5-lipoxygenase in phosphatidylcholine vesicles. In *European journal of biochemistry* 235 (1-2), pp. 416–423. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.00416.x.
- Casey, Joseph R.; Grinstein, Sergio; Orłowski, John (2010): Sensors and regulators of intracellular pH. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (1), pp. 50–61. DOI: 10.1038/nrm2820.
- Cayla, Cecile; Labuz, Dominika; Machelska, Halina; Bader, Michael; Schäfer, Michael; Stein, Christoph (2012): Impaired nociception and peripheral opioid antinociception in mice lacking both kinin B1 and B2 receptors. In *Anesthesiology* 116 (2), pp. 448–457. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318242b2ea.
- Chaitidis, Pavlos; Adel, Susan; Anton, Monika; Heydeck, Dagmar; Kuhn, Hartmut; Horn, Thomas (2013): Lipoxygenase pathways in Homo neanderthalensis: functional comparison with Homo sapiens isoforms. In *Journal of lipid research* 54 (5), pp. 1397–1409. DOI: 10.1194/jlr.M035626.
- Chakrabarti, Swarup K.; Cole, Banumathi K.; Wen, Yeshao; Keller, Susanna R.; Nadler, Jerry L. (2009): 12/15-lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. In *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (9), pp. 1657–1663. DOI: 10.1038/oby.2009.192.
- Chakrabarti, Swarup K.; Wen, Yeshao; Dobrian, Anca D.; Cole, Banumathi K.; Ma, Qian; Pei, Hong et al. (2011): Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats. In *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 300 (1), E175-87. DOI: 10.1152/ajpendo.00203.2010.
- Chang, Min S.; Schneider, Claus; Roberts, Richard L.; Shappell, Scott B.; Haselton, Fredrick R.; Boeglin, William E.; Brash, Alan R. (2005): Detection and subcellular localization of two 15S-lipoxygenases in human cornea. In *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (3), pp. 849–856. DOI: 10.1167/iovs.04-1166.
- Chaplan, S. R.; Bach, F. W.; Pogrel, J. W.; Chung, J. M.; Yaksh, T. L. (1994): Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. In *Journal of neuroscience methods* 53 (1), pp. 55–63. DOI: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

- Cheah, Menghon; Fawcett, James W.; Andrews, Melissa R. (2017): Assessment of Thermal Pain Sensation in Rats and Mice Using the Hargreaves Test. In *Bio-protocol* 7 (16). DOI: 10.21769/BioProtoc.2506.
- Chedea; VICAS; SOCACIU (2008): Kinetics of soybeans lipoxygenases are related to pH, substrate availability and extraction procedures. In *J Food Biochemistry* 32 (2), pp. 153–172. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2008.00169.x.
- Chedea, S. V.; Jisaka, M. (2011): Inhibition of Soybean Lipoxygenases – Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family. In Dora Krezhova (Ed.): *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*: InTech.
- Chen, M.; Yang, Z. D.; Smith, K. M.; Carter, J. D.; Nadler, J. L. (2005): Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity. In *Diabetologia* 48 (3), pp. 486–495. DOI: 10.1007/s00125-005-1673-y.
- Chen, X. S.; Funk, C. D. (1993): Structure-function properties of human platelet 12-lipoxygenase: chimeric enzyme and in vitro mutagenesis studies. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (8), pp. 694–701. DOI: 10.1096/fasebj.7.8.8500694.
- Chen, X. S.; Funk, C. D. (2001): The N-terminal “beta-barrel” domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. In *The Journal of biological chemistry* 276 (1), pp. 811–818. DOI: 10.1074/jbc.M008203200.
- Chen, X. S.; Kurre, U.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Funk, C. D. (1994a): cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases. In *Journal of Biological Chemistry* 269 (19), pp. 13979–13987.
- Chen, X. S.; Sheller, J. R.; Johnson, E. N.; Funk, C. D. (1994b): Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. In *Nature* 372 (6502), pp. 179–182. DOI: 10.1038/372179a0.
- Chen, Zhu; Chen, Xue; Yan, Hanwei; Li, Weiwei; Li, Yuan; Cai, Ronghao; Xiang, Yan (2015): The Lipoxygenase Gene Family in Poplar: Identification, Classification, and Expression in Response to MeJA Treatment. In *PloS one* 10 (4), e0125526. DOI: 10.1371/journal.pone.0125526.
- Choi, Jongkeun; Chon, Jae Kyung; Kim, Sangsoo; Shin, Whanchul (2008): Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. In *Proteins* 70 (3), pp. 1023–1032. DOI: 10.1002/prot.21590.
- Chrisnasari, Ruth; Hennebelle, Marie; Vincken, Jean-Paul; van Berkel, Willem J. H.; Ewing, Tom A. (2022): Bacterial lipoxygenases: Biochemical characteristics, molecular structure and potential applications. In *Biotechnology advances* 61, p. 108046. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108046.
- Christie, William W.; Harwood, John L. (2020): Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. In *Essays in biochemistry* 64 (3), pp. 401–421. DOI: 10.1042/EBC20190082.
- Clausen, Björn E.; Kel, Junda M. (2010): Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? In *Immunology and cell biology* 88 (4), pp. 351–360. DOI: 10.1038/icb.2010.40.

- Clemente, A.; Olías, R.; Olías, J. M. (2000): Purification and characterization of broad bean lipoxygenase isoenzymes. In *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (4), pp. 1070–1075. DOI: 10.1021/jf990463s.
- Cohen, Barry H. (2013): Explaining psychological statistics. 4th ed. New York: Wiley (Coursesmart).
- Cohen, J. (1992): A power primer. In *Psychological bulletin* 112 (1), pp. 155–159. DOI: 10.1037//0033-2909.112.1.155.
- Colamorea, T.; Di Paola, R.; Macchia, F.; Guerrese, M. C.; Tursi, A.; Butterfield, J. H. et al. (1999): 5-Lipoxygenase upregulation by dexamethasone in human mast cells. In *Biochemical and biophysical research communications* 265 (3), pp. 617–624. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1732.
- Cole, Banumathi K.; Kuhn, Norine S.; Green-Mitchell, Shamina M.; Leone, Kendall A.; Raab, Rebekah M.; Nadler, Jerry L.; Chakrabarti, Swarup K. (2012a): 12/15-Lipoxygenase signaling in the endoplasmic reticulum stress response. In *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302 (6), E654–65. DOI: 10.1152/ajpendo.00373.2011.
- Cole, Banumathi K.; Morris, Margaret A.; Grzesik, Wojciech J.; Leone, Kendall A.; Nadler, Jerry L. (2012b): Adipose tissue-specific deletion of 12/15-lipoxygenase protects mice from the consequences of a high-fat diet. In *Mediators of inflammation* 2012, p. 851798. DOI: 10.1155/2012/851798.
- Conrad, D. J. (1999): The arachidonate 12/15 lipoxygenases. A review of tissue expression and biologic function. In *Clinical reviews in allergy & immunology* 17 (1-2), pp. 71–89. DOI: 10.1007/BF02737598.
- Crooks, S.W; Stockley, R.A (1998): Leukotriene B4. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (2), pp. 173–178. DOI: 10.1016/s1357-2725(97)00123-4.
- Crowley, C.; Curtis, H. J. (1963): The development of somatic mutations in mice with age. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 49 (5), pp. 626–628. DOI: 10.1073/pnas.49.5.626.
- Cunha, T. M.; Verri, W. A.; Vivancos, G. G.; Moreira, I. F.; Reis, S.; Parada, C. A. et al. (2004): An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. In *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 37 (3), pp. 401–407. DOI: 10.1590/s0100-879x2004000300018.
- Dalli, Jesmond; Zhu, Min; Vlasenko, Nikita A.; Deng, Bin; Haeggström, Jesper Z.; Petasis, Nicos A.; Serhan, Charles N. (2013): The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (7), pp. 2573–2583. DOI: 10.1096/fj.13-227728.
- Daurkin, Irina; Eruslanov, Evgeniy; Stoffs, Taryn; Perrin, George Q.; Algood, Chester; Gilbert, Scott M. et al. (2011): Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. In *Cancer research* 71 (20), pp. 6400–6409. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1261.

- Deng, Bin; Wang, Chin-Wei; Arnardottir, Hildur H.; Li, Yongsheng; Cheng, Chien-Yee Cindy; Dalli, Jesmond; Serhan, Charles N. (2014): Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. In *PloS one* 9 (7), e102362. DOI: 10.1371/journal.pone.0102362.
- Dennis, Edward A.; Norris, Paul C. (2015): Eicosanoid storm in infection and inflammation. In *Nature reviews. Immunology* 15 (8), pp. 511–523. DOI: 10.1038/nri3859.
- Deschamps, Joshua D.; Ogunsola, Abiola F.; Jameson, J. Brian; Yasgar, Adam; Flitter, Becca A.; Freedman, Cody J. et al. (2016): Biochemical and Cellular Characterization and Inhibitor Discovery of *Pseudomonas aeruginosa* 15-Lipoxygenase. In *Biochemistry* 55 (23), pp. 3329–3340. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00338.
- Dewey, M. J.; Brown, J. L.; Nallaseth, F. S. (1982): Genetic differences in red cell osmotic fragility: analysis in allophenic mice. In *Blood* 59 (5), pp. 986–989. DOI: 10.1182/blood.V59.5.986.986.
- Dobrian, Anca D.; Huyck, Ryan W.; Glenn, Lindsey; Gottipati, Vijay; Haynes, Bronson A.; Hansson, Göran I. et al. (2018): Activation of the 12/15 lipoxygenase pathway accompanies metabolic decline in db/db pre-diabetic mice. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 136, pp. 23–32. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2018.03.003.
- Donahue, Caitlin E. T.; Siroky, Michael D.; White, Katharine A. (2021): An Optogenetic Tool to Raise Intracellular pH in Single Cells and Drive Localized Membrane Dynamics. In *Journal of the American Chemical Society* 143 (45), pp. 18877–18887. DOI: 10.1021/jacs.1c02156.
- Donowitz, M. (1985): Arachidonic acid metabolites and their role in inflammatory bowel disease. An update requiring addition of a pathway. In *Gastroenterology* 88 (2), pp. 580–587. DOI: 10.1016/0016-5085(85)90525-6.
- Doronina, Liliya; Reising, Olga; Clawson, Hiram; Churakov, Gennady; Schmitz, Jürgen (2022): Euarchontoglires Challenged by Incomplete Lineage Sorting. In *Genes* 13 (5). DOI: 10.3390/genes13050774.
- Douillard, R.; Bergeron, E. (1981): Chloroplastic localization of soluble lipoxygenase activity in young leaves. In *Plant Science Letters* 22 (3), pp. 263–268. DOI: 10.1016/0304-4211(81)90239-X.
- Droege, Kristin D.; Keithly, Mary E.; Sanders, Charles R.; Armstrong, Richard N.; Thompson, Matthew K. (2017): Structural Dynamics of 15-Lipoxygenase-2 via Hydrogen–Deuterium Exchange. In *Biochemistry* 56 (38), pp. 5065–5074. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00559.
- Duvall, Melody G.; Levy, Bruce D. (2016): DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. In *European journal of pharmacology* 785, pp. 144–155. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.11.001.
- Eek, Priit; Järving, Reet; Järving, Ivar; Gilbert, Nathaniel C.; Newcomer, Marcia E.; Samel, Nigulas (2012): Structure of a calcium-dependent 11R-lipoxygenase suggests a mechanism for Ca²⁺ regulation. In *The Journal of biological chemistry* 287 (26), pp. 22377–22386. DOI: 10.1074/jbc.M112.343285.

- Eichele, Derrick D.; Kharbanda, Kusum K. (2017): Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. In *World journal of gastroenterology* 23 (33), pp. 6016–6029. DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.
- English, Justin T.; Norris, Paul C.; Hodges, Robin R.; Dartt, Darlene A.; Serhan, Charles N. (2017): Identification and Profiling of Specialized Pro-Resolving Mediators in Human Tears by Lipid Mediator Metabolomics. In *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 117, pp. 17–27. DOI: 10.1016/j.plefa.2017.01.004.
- Epp, Nikolas; Fürstenberger, Gerhard; Müller, Karsten; Juanes, Silvia de; Leitges, Michael; Hausser, Ingrid et al. (2007): 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. In *The Journal of cell biology* 177 (1), pp. 173–182. DOI: 10.1083/jcb.200612116.
- Erben, Ulrike; Loddenkemper, Christoph; Doerfel, Katja; Spieckermann, Simone; Haller, Dirk; Heimesaat, Markus M. et al. (2014): A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. In *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (8), pp. 4557–4576.
- Erlansson, M.; Svensjö, E.; Bergqvist, D. (1989): Leukotriene B4-induced permeability increase in postcapillary venules and its inhibition by three different antiinflammatory drugs. In *Inflammation* 13 (6), pp. 693–705. DOI: 10.1007/BF00914313.
- Esser-von Bieren, Julia (2019): Eicosanoids in tissue repair. In *Immunology and cell biology* 97 (3), pp. 279–288. DOI: 10.1111/imcb.12226.
- Everds, N. E. (2007): Hematology of the Laboratory Mouse. In : *The Mouse in Biomedical Research, III*: Elsevier, pp. 133–170.
- Fan, Yu; Huang, Zhi-Yong; Cao, Chang-Chang; Chen, Ce-Shi; Chen, Yuan-Xin; Fan, Ding-Ding et al. (2013): Genome of the Chinese tree shrew. In *Nature communications* 4, p. 1426. DOI: 10.1038/ncomms2416.
- Fan, Yu; Yu, Dandan; Yao, Yong-Gang (2014): Tree shrew database (TreeshrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew. In *Scientific reports* 4, p. 7145. DOI: 10.1038/srep07145.
- Fehrenbacher, Jill C.; Vasko, Michael R.; Duarte, Djane B. (2012): Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. In *Current protocols in pharmacology* Chapter 5, Unit5.4. DOI: 10.1002/0471141755.ph0504s56.
- Feltenmark, Stina; Gautam, Narinder; Brunnström, Asa; Griffiths, William; Backman, Linda; Edenius, Charlotte et al. (2008): Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2), pp. 680–685. DOI: 10.1073/pnas.0710127105.
- Feussner, Ivo; Wasternack, Claus (2002): The lipoxygenase pathway. In *Annual review of plant biology* 53, pp. 275–297. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248.
- Field, Andy P. (2018): *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. 5th ed. London, Thousand Oaks, California: SAGE Publications.

- Fischer, A. M.; Dubbs, W. E.; Baker, R. A.; Fuller, M. A.; Stephenson, L. C.; Grimes, H. D. (1999): Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. In *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19 (5), pp. 543–554. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00550.x.
- Flamand, Nicolas; Luo, Ming; Peters-Golden, Marc; Brock, Thomas G. (2009): Phosphorylation of serine 271 on 5-lipoxygenase and its role in nuclear export. In *The Journal of biological chemistry* 284 (1), pp. 306–313. DOI: 10.1074/jbc.M805593200.
- Frank, Kayla; Paust, Silke (2020): Dynamic Natural Killer Cell and T Cell Responses to Influenza Infection. In *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10, p. 425. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00425.
- Freedman, Cody; Tran, Adrienne; Tourdot, Benjamin E.; Kalyanaraman, Chakrapani; Perry, Steve; Holinstat, Michael et al. (2020): Biosynthesis of the Maresin Intermediate, 13S,14S-Epoxy-DHA, by Human 15-Lipoxygenase and 12-Lipoxygenase and Its Regulation through Negative Allosteric Modulators. In *Biochemistry* 59 (19), pp. 1832–1844. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00233.
- Freeman, Karoline; Ryan, Ronan; Parsons, Nicholas; Taylor-Phillips, Sian; Willis, Brian H.; Clarke, Aileen (2021): The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in UK primary care: a retrospective cohort study of the IQVIA Medical Research Database. In *BMC gastroenterology* 21 (1), p. 139. DOI: 10.1186/s12876-021-01716-6.
- Freire-Moar, J.; Alavi-Nassab, A.; Ng, M.; Mulkins, M.; Sigal, E. (1995): Cloning and characterization of a murine macrophage lipoxygenase. In *Biochimica et biophysica acta* 1254 (1), pp. 112–116. DOI: 10.1016/0005-2760(94)00199-9.
- Fritz, Catherine O.; Morris, Peter E.; Richler, Jennifer J. (2012): Effect size estimates: current use, calculations, and interpretation. In *Journal of experimental psychology. General* 141 (1), pp. 2–18. DOI: 10.1037/a0024338.
- Funk, C. D.; Funk, L. B.; FitzGerald, G. A.; Samuelsson, B. (1992): Characterization of human 12-lipoxygenase genes. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (9), pp. 3962–3966. DOI: 10.1073/pnas.89.9.3962.
- Funk, Colin D.; Chen, Xin-Sheng; Johnson, Eric N.; Zhao, Lei (2002): Lipoxygenase genes and their targeted disruption. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 303–312. DOI: 10.1016/s0090-6980(02)00036-9.
- Funk, M. O.; Kim, S. H.; Alteneder, A. W. (1981): Factors affecting the initial rate of lipoxygenase catalysis. In *Biochemical and biophysical research communications* 98 (4), pp. 922–929. DOI: 10.1016/0006-291x(81)91199-2.
- Fürstenberger, G.; Hagedorn, H.; Jacobi, T.; Besemfelder, E.; Stephan, M.; Lehmann, W. D.; Marks, F. (1991): Characterization of an 8-lipoxygenase activity induced by the phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin in vivo. In *Journal of Biological Chemistry* 266 (24), pp. 15738–15745.
- Fürstenberger, Gerhard; Marks, Friedrich; Krieg, Peter (2002): Arachidonate 8(S)-lipoxygenase. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 235–243. DOI: 10.1016/s0090-6980(02)00033-3.

- Gabaldón, Toni; Koonin, Eugene V. (2013): Functional and evolutionary implications of gene orthology. In *Nature reviews. Genetics* 14 (5), pp. 360–366. DOI: 10.1038/nrg3456.
- Garcia-Verdugo, Ignacio; BenMohamed, Fatima; Tattermusch, Sonja; Leduc, Dominique; Charpigny, Gilles; Chignard, Michel et al. (2012): A role for 12R-lipoxygenase in MUC5AC expression by respiratory epithelial cells. In *The European respiratory journal* 40 (3), pp. 714–723. DOI: 10.1183/09031936.00023111.
- Gardner, Harold W. (1989): Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1001 (3), pp. 274–281. DOI: 10.1016/0005-2760(89)90111-2.
- Garner, Joseph P.; Dufour, Brett; Gregg, Laura E.; Weisker, Sandra M.; Mench, Joy A. (2004 a): Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering (‘whisker trimming’) by laboratory mice. In *Applied Animal Behaviour Science* 89 (3-4), pp. 263–282. DOI: 10.1016/j.applanim.2004.07.004.
- Garner, Joseph P.; Weisker, Sandra M.; Dufour, Brett; Mench, Joy A. (2004 b): Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. In *Comparative medicine* 54 (2), pp. 216–224.
- Gaveriaux-Ruff, Claire; Nozaki, Chihiro; Nadal, Xavier; Hever, Xavier C.; Weibel, Raphael; Matifas, Audrey et al. (2011): Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. In *Pain* 152 (6), pp. 1238–1248. DOI: 10.1016/j.pain.2010.12.031.
- Geginat, Jens; Larghi, Paola; Paroni, Moira; Nizzoli, Giulia; Penatti, Alessandra; Pagani, Massimiliano et al. (2016): The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. In *Cytokine & growth factor reviews* 30, pp. 87–93. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.003.
- Gehring, Tatjana (2019): Rekombinante Expression und proteinchemische Charakterisierung einer potentiellen viralen (Mimivirus *Acanthamoeba polyphaga*) Lipoxygenase. 1. Auflage. Berlin: Lehmanns.
- Gehring, Tatjana; Heydeck, Dagmar; Niewianda, Agathe; Janek, Katharina; Kuhn, Hartmut (2018): Do lipoxygenases occur in viruses?: Expression and characterization of a viral lipoxygenase-like protein did not provide evidence for the existence of functional viral lipoxygenases. In *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 138, pp. 14–23. DOI: 10.1016/j.plefa.2018.10.002.
- Gilbert, Nathaniel C.; Bartlett, Sue G.; Waight, Maria T.; Neau, David B.; Boeglin, William E.; Brash, Alan R.; Newcomer, Marcia E. (2011): The structure of human 5-lipoxygenase. In *Science (New York, N.Y.)* 331 (6014), pp. 217–219. DOI: 10.1126/science.1197203.
- Gillmor, S. A.; Villaseñor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E.; Browner, M. F. (1997): The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. In *Nature structural biology* 4 (12), pp. 1003–1009. DOI: 10.1038/nsb1297-1003.

- Gilroy, D. W.; Colville-Nash, P. R.; Willis, D.; Chivers, J.; Paul-Clark, M. J.; Willoughby, D. A. (1999): Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. In *Nature medicine* 5 (6), pp. 698–701. DOI: 10.1038/9550.
- Gobbetti, Thomas; Dalli, Jesmond; Colas, Romain A.; Federici Canova, Donata; Aursnes, Marius; Bonnet, Delphine et al. (2017): Protectin D1n-3 DPA and resolvin D5n-3 DPA are effectors of intestinal protection. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (15), pp. 3963–3968. DOI: 10.1073/pnas.1617290114.
- Godal, H. C.; Elde, A. T.; Nyborg, N.; Brosstad, F. (1980): The normal range of osmotic fragility of red blood cells. In *Scandinavian journal of haematology* 25 (2), pp. 107–112. DOI: 10.1111/j.1600-0609.1981.tb01374.x.
- Goloshchapova, Kateryna; Stehling, Sabine; Heydeck, Dagmar; Blum, Maximilian; Kuhn, Hartmut (2018): Functional characterization of a novel arachidonic acid 12S-lipoxygenase in the halotolerant bacterium *Myxococcus fulvus* exhibiting complex social living patterns. In *MicrobiologyOpen* 8 (7). DOI: 10.1002/mbo3.775.
- Golovanov, Alexey; Zhuravlev, Alexander; Cruz, Alejandro; Aksenov, Vladislav; Shafiullina, Rania; Kakularam, Kumar R. et al. (2022): N-Substituted 5-(1H-Indol-2-yl)-2-methoxyanilines Are Allosteric Inhibitors of the Linoleate Oxygenase Activity of Selected Mammalian ALOX15 Orthologs: Mechanism of Action. In *Journal of medicinal chemistry* 65 (3), pp. 1979–1995. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01563.
- Goulet, J. L.; Snouwaert, J. N.; Latour, A. M.; Coffman, T. M.; Koller, B. H. (1994): Altered inflammatory responses in leukotriene-deficient mice. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26), pp. 12852–12856. DOI: 10.1073/pnas.91.26.12852.
- Green, Abigail R.; Barbour, Shannon; Horn, Thomas; Carlos, Jose; Raskatov, Jevgenij A.; Holman, Theodore R. (2016): Strict Regiospecificity of Human Epithelial 15-Lipoxygenase-2 Delineates Its Transcellular Synthesis Potential. In *Biochemistry* 55 (20), pp. 2832–2840. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01339.
- Gronert, Karsten; Maheshwari, Neha; Khan, Nabeela; Hassan, Iram R.; Dunn, Michael; Laniado Schwartzman, Michal (2005): A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. In *The Journal of biological chemistry* 280 (15), pp. 15267–15278. DOI: 10.1074/jbc.M410638200.
- Grosch, W.; Laskaway, G.; Kaiser, K. P. (1977): Co-Oxidation von beta-Carotin und Canthaxanthin durch gereinigte Lipoxygenasen aus Sojabohnen. In *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 165 (2), pp. 77–81. DOI: 10.1007/BF02427785.
- Haeggström, Jesper Z.; Funk, Colin D. (2011): Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. In *Chemical reviews* 111 (10), pp. 5866–5898. DOI: 10.1021/cr200246d.
- Häfner, Ann-Kathrin; Cernescu, Mihaela; Hofmann, Bettina; Ermisch, Michael; Hörnig, Michael; Metzner, Julia et al. (2011): Dimerization of human 5-lipoxygenase. In *Biological chemistry* 392 (12), pp. 1097–1111. DOI: 10.1515/BC.2011.200.

- Häfner, Ann-Kathrin; Gerstmeier, Jana; Hörnig, Michael; George, Sven; Ball, Ann-Katrin; Schröder, Mirjam et al. (2015): Characterization of the interaction of human 5-lipoxygenase with its activating protein FLAP. In *Biochimica et biophysica acta* 1851 (11), pp. 1465–1472. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2015.08.010.
- Hagmann, W.; Kagawa, D.; Renaud, C.; Honn, K. V. (1993): Activity and protein distribution of 12-lipoxygenase in HEL cells: induction of membrane-association by phorbol ester TPA, modulation of activity by glutathione and 13-HPODE, and Ca(2+)-dependent translocation to membranes. In *Prostaglandins* 46 (6), pp. 471–477. DOI: 10.1016/0090-6980(93)90066-g.
- Hajeyah, Ali A.; Griffiths, William J.; Wang, Yuqin; Finch, Andrew J.; O'Donnell, Valerie B. (2020): The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids. In *Frontiers in endocrinology* 11. DOI: 10.3389/fendo.2020.591819.
- Halade, Ganesh V.; Kain, Vasundhara; Hossain, Shahriare; Parcha, Vibhu; Limdi, Nita A.; Arora, Pankaj (2022): Arachidonate 5-lipoxygenase is essential for biosynthesis of specialized pro-resolving mediators and cardiac repair in heart failure. In *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 323 (4), H721-H737. DOI: 10.1152/ajpheart.00115.2022.
- Hallenborg, Philip; Jørgensen, Claus; Petersen, Rasmus K.; Feddersen, Søren; Araujo, Pedro; Markt, Patrick et al. (2010): Epidermis-type lipoxygenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. In *Molecular and cellular biology* 30 (16), pp. 4077–4091. DOI: 10.1128/MCB.01806-08.
- Hamberg, M.; Su, C.; Oliw, E. (1998): Manganese lipoxygenase. Discovery of a bis-allylic hydroperoxide as product and intermediate in a lipoxygenase reaction. In *Journal of Biological Chemistry* 273 (21), pp. 13080–13088. DOI: 10.1074/jbc.273.21.13080.
- Hanaka, Hiromi; Shimizu, Takao; Izumi, Takashi (2002): Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. In *The Biochemical journal* 361 (Pt 3), pp. 505–514. DOI: 10.1042/0264-6021:3610505.
- Hansen, Alexandar L.; Kay, Lewis E. (2014): Measurement of histidine pKa values and tautomer populations in invisible protein states. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (17), E1705-12. DOI: 10.1073/pnas.1400577111.
- Hansen, Jhoanne; Garreta, Albert; Benincasa, Maria; Fusté, M. Carmen; Busquets, Montserrat; Manresa, Angeles (2013): Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. In *Applied microbiology and biotechnology* 97 (11), pp. 4737–4747. DOI: 10.1007/s00253-013-4887-9.
- Hardy, C. C.; Robinson, C.; Tattersfield, A. E.; Holgate, S. T. (1984): The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and asthmatic men. In *The New England journal of medicine* 311 (4), pp. 209–213. DOI: 10.1056/NEJM198407263110401.
- Hargreaves, K.; Dubner, R.; Brown, F.; Flores, C.; Joris, J. (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. In *Pain* 32 (1), pp. 77–88. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.

- Hashimoto, Yumi; Moki, Takeshi; Takizawa, Takenori; Shiratsuchi, Akiko; Nakanishi, Yoshinobu (2007): Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (4), pp. 2448–2457. DOI: 10.4049/jimmunol.178.4.2448.
- Hatanaka, Akikazu; Kajiwara, Tadahiko; Sekiya, Jiro (1987): Biosynthetic pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. In *Chemistry and Physics of Lipids* 44 (2-4), pp. 341–361. DOI: 10.1016/0009-3084(87)90057-0.
- Hatcher, Elizabeth; Soudackov, Alexander V.; Hammes-Schiffer, Sharon (2004): Proton-coupled electron transfer in soybean lipoxygenase. In *Journal of the American Chemical Society* 126 (18), pp. 5763–5775. DOI: 10.1021/ja039606o.
- Heydeck, Dagmar; Reisch, Florian; Schäfer, Marjann; Kakularam, Kumar R.; Roigas, Sophie A.; Stehling, Sabine et al. (2022): The Reaction Specificity of Mammalian ALOX15 Orthologs is Changed During Late Primate Evolution and These Alterations Might Offer Evolutionary Advantages for Hominidae. In *Frontiers in cell and developmental biology* 10, p. 871585. DOI: 10.3389/fcell.2022.871585.
- Ho, Chi-Chun; Lau, Susanna K. P.; Woo, Patrick C. Y. (2013): Romance of the three domains: how cladistics transformed the classification of cellular organisms. In *Protein & cell* 4 (9), pp. 664–676. DOI: 10.1007/s13238-013-3050-9.
- Hofheinz, Katharina (2014): Untersuchungen zur strukturellen Basis der Reaktionsspezifität von 5-Lipoxygenasen und deren biologische Bedeutung. Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Hohlbaum, K.; Merle, R.; Frahm, S.; Rex, A.; Palme, R.; Thöne-Reineke, C.; Ullmann, K. (2022): Effects of separated pair housing of female C57BL/6JRj mice on well-being. In *Scientific reports* 12 (1), p. 8819. DOI: 10.1038/s41598-022-12846-6.
- Horn, Thomas; Adel, Susan; Schumann, Ralf; Sur, Saubashya; Kakularam, Kumar Reddy; Polamarasetty, Aparoy et al. (2015): Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. In *Progress in lipid research* 57, pp. 13–39. DOI: 10.1016/j.plipres.2014.11.001.
- Horn, Thomas; Reddy Kakularam, Kumar; Anton, Monika; Richter, Constanze; Reddanna, Pallu; Kuhn, Hartmut (2013): Functional characterization of genetic enzyme variations in human lipoxygenases. In *Redox biology* 1, pp. 566–577. DOI: 10.1016/j.redox.2013.11.001.
- Hörnsten, Lena; Su, Chao; Osbourn, Anne E.; Hellman, Ulf; Oliw, Ernst H. (2002): Cloning of the manganese lipoxygenase gene reveals homology with the lipoxygenase gene family. In *European journal of biochemistry* 269 (11), pp. 2690–2697. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02936.x.
- Hosooka, Tetsuya; Hosokawa, Yusei; Matsugi, Kaku; Shinohara, Masakazu; Senga, Yoko; Tamori, Yoshikazu et al. (2020): The PDK1-FoxO1 signaling in adipocytes controls systemic insulin sensitivity through the 5-lipoxygenase-leukotriene B(4) axis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (21), pp. 11674–11684. DOI: 10.1073/pnas.1921015117.
- Huang, J. T.; Welch, J. S.; Ricote, M.; Binder, C. J.; Willson, T. M.; Kelly, C. et al. (1999): Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. In *Nature* 400 (6742), pp. 378–382. DOI: 10.1038/22572.

- Hwang, Sung-Min; Chung, Gehoon; Kim, Yong Ho; Park, Chul-Kyu (2019): The Role of Maresins in Inflammatory Pain: Function of Macrophages in Wound Regeneration. In *International journal of molecular sciences* 20 (23). DOI: 10.3390/ijms20235849.
- Ikediyobi, C. O.; Snyder, H. E. (1976): Cooxidation of beta-carotene by an isoenzyme of soybean lipoxygenase. In *Journal of agricultural and food chemistry* 25 (1), pp. 124–127. DOI: 10.1021/jf60209a046.
- Isobe, Yosuke; Arita, Makoto; Iwamoto, Ryo; Urabe, Daisuke; Todoroki, Hidenori; Masuda, Koji et al. (2013): Stereochemical assignment and anti-inflammatory properties of the omega-3 lipid mediator resolvin E3. In *Journal of biochemistry* 153 (4), pp. 355–360. DOI: 10.1093/jb/mvs151.
- Isobe, Yosuke; Arita, Makoto; Matsueda, Shinnosuke; Iwamoto, Ryo; Fujihara, Takuji; Nakanishi, Hiroki et al. (2012): Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3, 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. In *The Journal of biological chemistry* 287 (13), pp. 10525–10534. DOI: 10.1074/jbc.M112.340612.
- Isselbacher, K. J. (1987): The role of arachidonic acid metabolites in gastrointestinal homeostasis. Biochemical, histological and clinical gastrointestinal effects. In *Drugs* 33 Suppl 1, pp. 38–46. DOI: 10.2165/00003495-198700331-00007.
- Ivanov, Igor; Cruz, Alejandro; Zhuravlev, Alexander; Di Venere, Almerinda; Nicolai, Eleonora; Stehling, Sabine et al. (2021): Conformational Heterogeneity and Cooperative Effects of Mammalian ALOX15. In *International journal of molecular sciences* 22 (6). DOI: 10.3390/ijms22063285.
- Ivanov, Igor; Di Venere, Almerinda; Horn, Thomas; Scheerer, Patrick; Nicolai, Eleonora; Stehling, Sabine et al. (2011): Tight association of N-terminal and catalytic subunits of rabbit 12/15-lipoxygenase is important for protein stability and catalytic activity. In *Biochimica et biophysica acta* 1811 (12), pp. 1001–1010. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2011.08.008.
- Ivanov, Igor; Golovanov, Alexey B.; Ferretti, Cristián; Canyelles-Niño, Miquel; Heydeck, Dagmar; Stehling, Sabine et al. (2019): Mutations of Triad Determinants Changes the Substrate Alignment at the Catalytic Center of Human ALOX5. In *ACS chemical biology* 14 (12), pp. 2768–2782. DOI: 10.1021/acscchembio.9b00674.
- Ivanov, Igor; Heydeck, Dagmar; Hofheinz, Katharina; Roffeis, Jana; O'Donnell, Valerie B.; Kuhn, Hartmut; Walther, Matthias (2010): Molecular enzymology of lipoxygenases. In *Archives of biochemistry and biophysics* 503 (2), pp. 161–174. DOI: 10.1016/j.abb.2010.08.016.
- Ivanov, Igor; Shang, Weifeng; Toledo, Lea; Masgrau, Laura; Svergun, Dmitri I.; Stehling, Sabine et al. (2012): Ligand-induced formation of transient dimers of mammalian 12/15-lipoxygenase: a key to allosteric behavior of this class of enzymes? In *Proteins* 80 (3), pp. 703–712. DOI: 10.1002/prot.23227.
- Iwaya, Hitoshi; Maeta, Kouichi; Hara, Hiroshi; Ishizuka, Satoshi (2012): Mucosal permeability is an intrinsic factor in susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. In *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 237 (4), pp. 451–460. DOI: 10.1258/ebm.2011.011269.

- Jiang, Wen G.; Watkins, Gareth; Douglas-Jones, Anthony; Mansel, Robert E. (2006): Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. In *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 74 (4), pp. 235–245. DOI: 10.1016/j.plefa.2006.01.009.
- Jin, Jing; Boeglin, William E.; Brash, Alan R. (2021): Analysis of 12/15-lipoxygenase metabolism of EPA and DHA with special attention to authentication of docosatrienes. In *Journal of lipid research* 62, p. 100088. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100088.
- Jisaka, M.; Boeglin, W. E.; Kim, R. B.; Brash, A. R. (2001): Site-directed mutagenesis studies on a putative fifth iron ligand of mouse 8S-lipoxygenase: retention of catalytic activity on mutation of serine-558 to asparagine, histidine, or alanine. In *Archives of biochemistry and biophysics* 386 (2), pp. 136–142. DOI: 10.1006/abbi.2000.2175.
- Jisaka, M.; Kim, R. B.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R. (2000): Identification of amino acid determinants of the positional specificity of mouse 8S-lipoxygenase and human 15S-lipoxygenase-2. In *The Journal of biological chemistry* 275 (2), pp. 1287–1293. DOI: 10.1074/jbc.275.2.1287.
- Jisaka, M.; Kim, R. B.; Boeglin, W. E.; Nanney, L. B.; Brash, A. R. (1997): Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin. In *Journal of Biological Chemistry* 272 (39), pp. 24410–24416. DOI: 10.1074/jbc.272.39.24410.
- Johannesson, M.; Backman, L.; Claesson, H-E; Forsell, P. K. A. (2010): Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. In *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 82 (2-3), pp. 121–129. DOI: 10.1016/j.plefa.2009.11.006.
- Johnson, E. N.; Nanney, L. B.; Virmani, J.; Lawson, J. A.; Funk, C. D. (1999): Basal transepidermal water loss is increased in platelet-type 12-lipoxygenase deficient mice. In *The Journal of investigative dermatology* 112 (6), pp. 861–865. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00595.x.
- Juránek, I.; Suzuki, H.; Yamamoto, S. (1999): Affinities of various mammalian arachidonate lipoxygenases and cyclooxygenases for molecular oxygen as substrate. In *Biochimica et biophysica acta* 1436 (3), pp. 509–518. DOI: 10.1016/s0005-2760(98)00159-3.
- Kalms, Jacqueline; Banthiya, Swathi; Galemou Yoga, Etienne; Hamberg, Mats; Holzhutter, Hermann-Georg; Kuhn, Hartmut; Scheerer, Patrick (2017): The crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase Ala420Gly mutant explains the improved oxygen affinity and the altered reaction specificity. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1862 (5), pp. 463–473. DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.01.003.
- Kalueff, A. V.; Minasyan, A.; Keisala, T.; Shah, Z. H.; Tuohimaa, P. (2006): Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. In *Behavioural processes* 71 (1), pp. 8–15. DOI: 10.1016/j.beproc.2005.09.004.
- Kany, Shinwan; Vollrath, Jan Tilmann; Relja, Borna (2019): Cytokines in Inflammatory Disease. In *International journal of molecular sciences* 20 (23), p. 6008. DOI: 10.3390/ijms20236008.

- Kashiwagi, Kenji; Ito, Sadahiro; Maeda, Shuichiro; Kato, Goro (2017): A Ser75-to-Asp phospho-mimicking mutation in Src accelerates ageing-related loss of retinal ganglion cells in mice. In *Scientific reports* 7 (1), p. 16779. DOI: 10.1038/s41598-017-16872-7.
- Kawai, T.; Akira, S. (2006): TLR signaling. In *Cell death and differentiation* 13 (5), pp. 816–825. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401850.
- Kelton, J. G.; Blajchman, M. A. (1980): Prostaglandin I₂ (prostacyclin). In *Canadian Medical Association Journal* 122 (2), pp. 175–179.
- Kilty, I.; Logan, A.; Vickers, P. J. (1999): Differential characteristics of human 15-lipoxygenase isozymes and a novel splice variant of 15S-lipoxygenase. In *European journal of biochemistry* 266 (1), pp. 83–93. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00818.x.
- Kim, Eunjung; Rundhaug, Joyce E.; Benavides, Fernando; Yang, Peiying; Newman, Robert A.; Fischer, Susan M. (2005): An antitumorigenic role for murine 8S-lipoxygenase in skin carcinogenesis. In *Oncogene* 24 (7), pp. 1174–1187. DOI: 10.1038/sj.onc.1208269.
- Kim, Sang-Nam; Akindehin, Seun; Kwon, Hyun-Jung; Son, Yeon-Ho; Saha, Abhirup; Jung, Young-Suk et al. (2018): Anti-inflammatory role of 15-lipoxygenase contributes to the maintenance of skin integrity in mice. In *Scientific reports* 8 (1), p. 8856. DOI: 10.1038/s41598-018-27221-7.
- Kim, Soeun; Choi, Irene F.; Quante, Jessica R.; Zhang, Lei; Roop, Dennis R.; Koster, Maranke I. (2009): p63 directly induces expression of Alox12, a regulator of epidermal barrier formation. In *Experimental dermatology* 18 (12), pp. 1016–1021. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00894.x.
- Kimura, I.; Kamiya, A.; Nagahama, S.; Yoshida, J.; Tanigawa, H.; Kataoka, M. (1993): Study on the experimental ulcerative colitis model induced by dextran sulfate sodium in rats: estimation of mucosal erosions by the alcian blue-staining method. In *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 102 (5), pp. 343–350. DOI: 10.1254/fpj.102.343.
- King, M-J; Zanella, A. (2013): Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. In *International journal of laboratory hematology* 35 (3), pp. 237–243. DOI: 10.1111/ijlh.12070.
- Kitajima, S.; Takuma, S.; Morimoto, M. (1999): Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. In *Experimental animals* 48 (3), pp. 137–143. DOI: 10.1538/expanim.48.137.
- Klampfl, T.; Bogner, E.; Bednar, W.; Mager, L.; Massudom, D.; Kalny, I. et al. (2012): Up-regulation of 12(S)-lipoxygenase induces a migratory phenotype in colorectal cancer cells. In *Experimental cell research* 318 (6), pp. 768–778. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.12.017.
- Klechevsky, Eynav; Morita, Rimpei; Liu, Maochang; Cao, Yanying; Coquery, Sebastien; Thompson-Snipes, Luann et al. (2008): Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. In *Immunity* 29 (3), pp. 497–510. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.07.013.

- Knapp, Michael J.; Rickert, Keith; Klinman, Judith P. (2002): Temperature-dependent isotope effects in soybean lipoxygenase-1: correlating hydrogen tunneling with protein dynamics. In *Journal of the American Chemical Society* 124 (15), pp. 3865–3874. DOI: 10.1021/ja012205t.
- Kobe, Matthew J.; Neau, David B.; Mitchell, Caitlin E.; Bartlett, Sue G.; Newcomer, Marcia E. (2014): The structure of human 15-lipoxygenase-2 with a substrate mimic. In *The Journal of biological chemistry* 289 (12), pp. 8562–8569. DOI: 10.1074/jbc.M113.543777.
- Kobza Black, A.; Greaves, M. W.; Hensby, C. N. (1982): The effect of systemic prednisolone on arachidonic acid, and prostaglandin E2 and F2 alpha levels in human cutaneous inflammation. In *British journal of clinical pharmacology* 14 (3), pp. 391–394. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1982.tb01996.x.
- Kozlov, Nikita; Humeniuk, Lia; Ufer, Christoph; Ivanov, Igor; Golovanov, Alexey; Stehling, Sabine et al. (2019): Functional characterization of novel ALOX15 orthologs representing key steps in mammalian evolution supports the Evolutionary Hypothesis of reaction specificity. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1864 (3), pp. 372–385. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.12.016.
- Krieg, P.; Kinzig, A.; Heidt, M.; Marks, F.; Fürstenberger, G. (1998): cDNA cloning of a 8-lipoxygenase and a novel epidermis-type lipoxygenase from phorbol ester-treated mouse skin. In *Biochimica et biophysica acta* 1391 (1), pp. 7–12. DOI: 10.1016/s0005-2760(97)00214-2.
- Krieg, P.; Marks, F.; Fürstenberger, G. (2001): A gene cluster encoding human epidermis-type lipoxygenases at chromosome 17p13.1: cloning, physical mapping, and expression. In *Genomics* 73 (3), pp. 323–330. DOI: 10.1006/geno.2001.6519.
- Krieg, Peter; Fürstenberger, Gerhard (2014): The role of lipoxygenases in epidermis. In *Biochimica et biophysica acta* 1841 (3), pp. 390–400. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.08.005.
- Krieg, Peter; Rosenberger, Sabine; Juanes, Silvia de; Latzko, Susanne; Hou, Jin; Dick, Angela et al. (2013): Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. In *The Journal of investigative dermatology* 133 (1), pp. 172–180. DOI: 10.1038/jid.2012.250.
- Kriska, Tamas; Cepura, Cody; Magier, Devora; Siangjong, Lawan; Gauthier, Kathryn M.; Campbell, William B. (2012): Mice lacking macrophage 12/15-lipoxygenase are resistant to experimental hypertension. In *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302 (11), H2428-38. DOI: 10.1152/ajpheart.01120.2011.
- Kroschwald, Peter; Kroschwald, Alexandra; Ku`hn, Hartmut; Ludwig, Peter; Thiele, Bernd J.; Ho`hne, Marina et al. (1989): Occurrence of the erythroid cell specific arachidonate 15-lipoxygenase in human reticulocytes. In *Biochemical and biophysical research communications* 160 (2), pp. 954–960. DOI: 10.1016/0006-291x(89)92528-x.
- Kroschwald, Saskia; Chiu, Cheng-Ying; Heydeck, Dagmar; Rohwer, Nadine; Gehring, Tatjana; Seifert, Ulrike et al. (2018): Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1863 (8), pp. 866–880. DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.04.019.

- Kuhn, H.; Belkner, J.; Wiesner, R.; Brash, A. R. (1990): Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. In *The Journal of biological chemistry* 265 (30), pp. 18351–18361.
- Kuhn, Hartmut; Banthiya, Swathi; van Leyen, Klaus (2015): Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. In *Biochimica et biophysica acta* 1851 (4), pp. 308–330. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2014.10.002.
- Kuhn, Hartmut; Humeniuk, Lia; Kozlov, Nikita; Roigas, Sophie; Adel, Susan; Heydeck, Dagmar (2018): The evolutionary hypothesis of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs. In *Progress in lipid research* 72, pp. 55–74. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2014.10.002.
- Kuhn, Hartmut; Thiele, Bernd J. (1999): The diversity of the lipoxygenase family. In *FEBS Letters* 449 (1), pp. 7–11. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00396-8.
- Kühn, H.; Barnett, J.; Grunberger, D.; Baecker, P.; Chow, J.; Nguyen, B. et al. (1993): Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. In *Biochimica et biophysica acta* 1169 (1), pp. 80–89. DOI: 10.1016/0005-2760(93)90085-n.
- Kühn, H.; Sprecher, H.; Brash, A. R. (1990): On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme. In *The Journal of biological chemistry* 265 (27), pp. 16300–16305.
- Kühn, Hartmut; O'Donnell, Valerie B. (2006): Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. In *Progress in lipid research* 45 (4), pp. 334–356. DOI: 10.1016/j.plipres.2006.02.003.
- Kutzner, Laura; Goloshchapova, Kateryna; Heydeck, Dagmar; Stehling, Sabine; Kuhn, Hartmut; Schebb, Nils Helge (2017): Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1862 (7), pp. 666–675. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2017.04.001.
- Kutzner, Laura; Goloshchapova, Kateryna; Rund, Katharina M.; Jübermann, Martin; Blum, Maximilian; Rothe, Michael et al. (2020): Human lipoxygenase isoforms form complex patterns of double and triple oxygenated compounds from eicosapentaenoic acid. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1865 (12), p. 158806. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2020.158806.
- Lang, Imke; Feussner, Ivo (2007): Oxylipin formation in *Nostoc punctiforme* (PCC73102). In *Phytochemistry* 68 (8), pp. 1120–1127. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.028.
- Lang, Imke; Göbel, Cornelia; Porzel, Andrea; Heilmann, Ingo; Feussner, Ivo (2008): A lipoxygenase with linoleate diol synthase activity from *Nostoc* sp. PCC 7120. In *The Biochemical journal* 410 (2), pp. 347–357. DOI: 10.1042/BJ20071277.
- Lee, Seung Jin; Choi, Eun Kyoung; Seo, Kyo Won; Bae, Jin Ung; Kim, Yun Hak; Park, So Youn et al. (2013): 5-Lipoxygenase plays a pivotal role in endothelial adhesion of monocytes via an increased expression of Mac-1. In *Cardiovascular research* 99 (4), pp. 724–733. DOI: 10.1093/cvr/cvt135.

- Lehnert, Nicolai; Solomon, Edward I. (2003): Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase. In *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 8 (3), pp. 294–305. DOI: 10.1007/s00775-002-0415-6.
- Levy, B. D.; Romano, M.; Chapman, H. A.; Reilly, J. J.; Drazen, J.; Serhan, C. N. (1993): Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. In *The Journal of clinical investigation* 92 (3), pp. 1572–1579. DOI: 10.1172/JCI116738.
- Liburdi, Katia; Benucci, Ilaria; Lombardelli, Claudio; Esti, Marco (2017): Identification and characterization of lipoxygenase in fresh culinary herbs. In *International Journal of Food Properties* 20 (7), pp. 1470–1478. DOI: 10.1080/10942912.2016.1211678.
- Liem, Robert I.; Gallagher, Patrick G. (2005): Molecular mechanisms in the inherited red cell membrane disorders. In *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2 (4), pp. 539–545. DOI: 10.1016/j.ddmec.2005.11.004.
- Lindley, Alexa R.; Crapster-Pregont, Margaret; Liu, Yanjun; Kuperman, Douglas A. (2010): 12/15-lipoxygenase is an interleukin-13 and interferon- γ counterregulated-mediator of allergic airway inflammation. In *Mediators of inflammation* 2010. DOI: 10.1155/2010/727305.
- Liu, Mingen; Kalbasi, Anusha; Beatty, Gregory L. (2017): Functio Laesa: Cancer Inflammation and Therapeutic Resistance. In *Journal of oncology practice* 13 (3), pp. 173–180. DOI: 10.1200/JOP.2016.020347.
- Long, S. Y. (1972): Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. In *Animal behaviour* 20 (1), pp. 10–12. DOI: 10.1016/s0003-3472(72)80167-2.
- Ludwig, P.; Holzhütter, H. G.; Colosimo, A.; Silvestrini, M. C.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. (1987): A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. In *European journal of biochemistry* 168 (2), pp. 325–337. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13424.x.
- Lukiw, Walter J.; Cui, Jian-Guo; Marcheselli, Victor L.; Bodker, Merete; Botkjaer, Anja; Gotlinger, Katherine et al. (2005): A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. In *The Journal of clinical investigation* 115 (10), pp. 2774–2783. DOI: 10.1172/JCI25420.
- Lundberg, Ulf; Rådmark, Olof; Malmsten, Curt; Samuelsson, Bengt (1981): Transformation of 15-hydroperoxy-5,9,11,13-eicosatetraenoic acid into novel leukotrienes. In *FEBS Letters* 126 (1), pp. 127–132. DOI: 10.1016/0014-5793(81)81050-2.
- Luo, Ming; Jones, Sandra M.; Phare, Susan M.; Coffey, Michael J.; Peters-Golden, Marc; Brock, Thomas G. (2004): Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. In *Journal of Biological Chemistry* 279 (40), pp. 41512–41520. DOI: 10.1074/jbc.M312568200.
- Mabalirajan, Ulaganathan; Rehman, Rakhshinda; Ahmad, Tanveer; Kumar, Sarvesh; Leishangthem, Geeta Devi; Singh, Suchita et al. (2013): 12/15-lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma. In *Scientific reports* 3, p. 1540. DOI: 10.1038/srep01540.

- Magnusson, Lisa U.; Lundqvist, Annika; Karlsson, Merja Nurkkala; Skålén, Kristina; Levin, Max; Wiklund, Olov et al. (2012): Arachidonate 15-lipoxygenase type B knockdown leads to reduced lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis. In *PloS one* 7 (8), e43142. DOI: 10.1371/journal.pone.0043142.
- Mandal, Somnath; Dahuja, Anil; Santha, I. M. (2014): Lipoxygenase activity in soybean is modulated by enzyme-substrate ratio. In *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23 (2), pp. 217–220. DOI: 10.1007/s13562-013-0203-0.
- Mao, Peizhong; Gallagher, Patience; Nedungadi, Samira; Manczak, Maria; Shirendeb, Ulziibat P.; Kohama, Steven G. et al. (2012): Mitochondrial DNA deletions and differential mitochondrial DNA content in Rhesus monkeys: implications for aging. In *Biochimica et biophysica acta* 1822 (2), pp. 111–119. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.014.
- Marques, Raquel M.; Gonzalez-Nunez, Maria; Walker, Mary E.; Gomez, Esteban A.; Colas, Romain A.; Montero-Melendez, Trinidad et al. (2021): Loss of 15-lipoxygenase disrupts T(reg) differentiation altering their pro-resolving functions. In *Cell death and differentiation*. DOI: 10.1038/s41418-021-00807-x.
- Marshall, Jean S.; Warrington, Richard; Watson, Wade; Kim, Harold L. (2018): An introduction to immunology and immunopathology. In *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 14 (Suppl 2), p. 49. DOI: 10.1186/s13223-018-0278-1.
- Martin, Alison L.; Brown, Richard E. (2010): The lonely mouse: verification of a separation-induced model of depression in female mice. In *Behavioural brain research* 207 (1), pp. 196–207. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.10.006.
- Martin, R. D. (1968): Reproduction and ontogeny in tree-shrews (*Tupaia belangeri*), with reference to their general behavior and taxonomic relationships. In *Zeitschrift fur Tierpsychologie* 25 (5), 505-32 concl. DOI: 10.1111/j.1439-0310.1968.tb00026.x.
- Martinez, Fernando O.; Gordon, Siamon (2014): The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. In *F1000prime reports* 6, p. 13. DOI: 10.12703/P6-13.
- Martínez-Clemente, Marcos; Ferré, Natàlia; Titos, Esther; Horrillo, Raquel; González-Pérez, Ana; Morán-Salvador, Eva et al. (2010): Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene (Alox15) protects hyperlipidemic mice from nonalcoholic fatty liver disease. In *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (6), pp. 1980–1991. DOI: 10.1002/hep.23928.
- Mashima, Ryuichi; Okuyama, Torayuki (2015): The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. In *Redox biology* 6, pp. 297–310. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.006.
- Maskrey, Benjamin H.; Bermúdez-Fajardo, Alexandra; Morgan, Alwena H.; Stewart-Jones, Esther; Dioszeghy, Vincent; Taylor, Graham W. et al. (2007): Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. In *Journal of Biological Chemistry* 282 (28), pp. 20151–20163. DOI: 10.1074/jbc.M611776200.
- Massey, Karen A.; Nicolaou, Anna (2013): Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. In *Free Radical Biology & Medicine* 59 (100), pp. 45–55. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.565.

- Matsumoto, T.; Funk, C. D.; Rådmark, O.; Höög, J. O.; Jörnvall, H.; Samuelsson, B. (1988): Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (1), pp. 26–30. DOI: 10.1073/pnas.85.1.26.
- McDonnell, M.; Davis, W.; Li, H.; Funk, C. D. (2001): Characterization of the murine epidermal 12/15-lipoxygenase. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 63 (3), pp. 93–107. DOI: 10.1016/s0090-6980(00)00100-3.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C. A. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. In *Nature* 388 (6640), pp. 394–397. DOI: 10.1038/41131.
- Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (1997a): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. In *Current Opinion in Immunology* 9 (1), pp. 4–9. DOI: 10.1016/S0952-7915(97)80152-5.
- Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (1997b): Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. In *Cell* 91 (3), pp. 295–298. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- Melgar, Silvia; Karlsson, Agneta; Michaëlsson, Erik (2005): Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. In *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 288 (6), G1328-38. DOI: 10.1152/ajpgi.00467.2004.
- Mennigen, Rudolf; Nolte, Kerstin; Rijcken, Emile; Utech, Markus; Loeffler, Bettina; Senninger, Norbert; Bruewer, Matthias (2009): Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. In *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296 (5), G1140-9. DOI: 10.1152/ajpgi.90534.2008.
- Miller, Y. I.; Chang, M. K.; Funk, C. D.; Feramisco, J. R.; Witztum, J. L. (2001): 12/15-lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. In *The Journal of biological chemistry* 276 (22), pp. 19431–19439. DOI: 10.1074/jbc.M011276200.
- Moorad, Jacob A.; Promislow, Daniel E. L. (2008): A theory of age-dependent mutation and senescence. In *Genetics* 179 (4), pp. 2061–2073. DOI: 10.1534/genetics.108.088526.
- Morohashi, K.; Tsuboi-Asai, H.; Matsushita, S.; Suda, M.; Nakashima, M.; Sasano, H. et al. (1999): Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 gene-disrupted mouse. In *Blood* 93 (5), pp. 1586–1594.
- Morris, Christopher J. (2003): Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 225, pp. 115–121. DOI: 10.1385/1-59259-374-7:115.
- Morrison, S. J.; Wandycz, A. M.; Akashi, K.; Globerson, A.; Weissman, I. L. (1996): The aging of hematopoietic stem cells. In *Nature medicine* 2 (9), pp. 1011–1016. DOI: 10.1038/nm0996-1011.

- Munger, K. A.; Montero, A.; Fukunaga, M.; Uda, S.; Yura, T.; Imai, E. et al. (1999): Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), pp. 13375–13380. DOI: 10.1073/pnas.96.23.13375.
- Nadel, J. A.; Conrad, D. J.; Ueki, I. F.; Schuster, A.; Sigal, E. (1991): Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. In *The Journal of clinical investigation* 87 (4), pp. 1139–1145.
- Nagata, I.; Sunaga, H.; Furuya, K.; Makimura, N.; Kato, K. (1987): Changes in the plasma prostaglandin F2 alpha metabolite before and during spontaneous labor and labor induced by amniotomy, oxytocin and prostaglandin E2. In *Endocrinologia japonica* 34 (2), pp. 153–159. DOI: 10.1507/endocrj1954.34.153.
- Narumiya, Shuh; Salmon, John A. (1982): [6] Arachidonic acid-15-lipoxygenase from rabbit peritoneal polymorphonuclear leukocytes. In : Prostaglandins and Arachidonate Metabolites, vol. 86: Elsevier (Methods in Enzymology), pp. 45–48.
- Newie, Julia; Andreou, Alexandra; Neumann, Piotr; Einsle, Oliver; Feussner, Ivo; Ficner, Ralf (2016): Crystal structure of a lipoxygenase from *Cyanospora* sp. may reveal novel features for substrate acquisition. In *Journal of lipid research* 57 (2), pp. 276–287. DOI: 10.1194/jlr.M064980.
- Nie, D.; Che, M.; Grignon, D.; Tang, K.; Honn, K. V. (2001): Role of eicosanoids in prostate cancer progression. In *Cancer metastasis reviews* 20 (3-4), pp. 195–206. DOI: 10.1023/A:1015579209850.
- Nie, D.; Hillman, G. G.; Geddes, T.; Tang, K.; Pierson, C.; Grignon, D. J.; Honn, K. V. (1998): Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. In *Cancer research* 58 (18), pp. 4047–4051.
- Nie, Daotai; Krishnamoorthy, Sriram; Jin, Rongxian; Tang, Keqin; Chen, YuChyu; Qiao, Yan et al. (2006): Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. In *The Journal of biological chemistry* 281 (27), pp. 18601–18609. DOI: 10.1074/jbc.M601887200.
- O’Connell, Karyn E.; Mikkola, Amy M.; Stepanek, Aaron M.; Vernet, Andyna; Hall, Christopher D.; Sun, Chia C. et al. (2015): Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. In *Comparative medicine* 65 (2), pp. 96–113. DOI: Study.
- Oehler, Beatrice; Mohammadi, Milad; Perpina Viciano, Cristina; Hackel, Dagmar; Hoffmann, Carsten; Brack, Alexander; Rittner, Heike L. (2017): Peripheral Interaction of Resolvin D1 and E1 with Opioid Receptor Antagonists for Antinociception in Inflammatory Pain in Rats. In *Frontiers in molecular neuroscience* 10, p. 242. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00242.
- Oh, Sungwhan F.; Pillai, Padmini S.; Recchiuti, Antonio; Yang, Rong; Serhan, Charles N. (2011): Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. In *The Journal of clinical investigation* 121 (2), pp. 569–581. DOI: 10.1172/JCI42545.

- Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R. (1990): A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. In *Gastroenterology* 98 (3), pp. 694–702. DOI: 10.1016/0016-5085(90)90290-h.
- Oliw, Ernst H. (2002): Plant and fungal lipoxygenases. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 313–323. DOI: 10.1016/s0090-6980(02)00037-0.
- Park, Chul-Kyu; Xu, Zhen-Zhong; Liu, Tong; Lü, Ning; Serhan, Charles N.; Ji, Ru-Rong (2011): Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. In *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (50), pp. 18433–18438. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4192-11.2011.
- Parpart, Arthur K.; Lorenz, Philip B.; Parpart, Ethel R.; Gregg, John R.; Chase, Aurin M. (1947): THE OSMOTIC RESISTANCE (FRAGILITY) OF HUMAN RED CELLS 1. In *The Journal of clinical investigation* 26 (4), pp. 636–640.
- Pekárová, Mária; Kuhn, Hartmut; Bezáková, Lýdia; Ufer, Christoph; Heydeck, Dagmar (2015): Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation. In *Archives of biochemistry and biophysics* 571, pp. 50–57. DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.029.
- Perez-Hernandez, Javier; Chiurchiù, Valerio; Perruche, Sylvain; You, Sylvaine (2021): Regulation of T-Cell Immune Responses by Pro-Resolving Lipid Mediators. In *Frontiers in immunology* 12, p. 768133. DOI: 10.3389/fimmu.2021.768133.
- Perry, Steven C.; Horn, Thomas; Tourdot, Benjamin E.; Yamaguchi, Adriana; Kalyanaraman, Chakrapani; Conrad, William S. et al. (2020): Role of Human 15-Lipoxygenase-2 in the Biosynthesis of the Lipoxin Intermediate, 5S,15S-diHpETE, Implicated with the Altered Positional Specificity of Human 15-Lipoxygenase-1. In *Biochemistry* 59 (42), pp. 4118–4130. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00622.
- Perry, Steven C.; Kalyanaraman, Chakrapani; Tourdot, Benjamin E.; Conrad, William S.; Akinkugbe, Oluwayomi; Freedman, John Cody et al. (2020 b): 15-Lipoxygenase-1 biosynthesis of 7S,14S-diHDHA implicates 15-lipoxygenase-2 in biosynthesis of resolvin D5. In *Journal of lipid research* 61 (7), pp. 1087–1103. DOI: 10.1194/jlr.RA120000777.
- Perše, Martina; Cerar, Anton (2012): Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012. DOI: 10.1155/2012/718617.
- Petrich, K.; Ludwig, P.; Kühn, H.; Schewe, T. (1996): The suppression of 5-lipoxygenation of arachidonic acid in human polymorphonuclear leucocytes by the 15-lipoxygenase product (15S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid: structure-activity relationship and mechanism of action. In *The Biochemical journal* 314 (Pt 3) (Pt 3), pp. 911–916. DOI: 10.1042/bj3140911.
- Pochard, Camille; Coquenlorge, Sabrina; Jaulin, Julie; Cenac, Nicolas; Vergnolle, Nathalie; Meurette, Guillaume et al. (2016): Defects in 15-HETE Production and Control of Epithelial Permeability by Human Enteric Glial Cells From Patients With Crohn's Disease. In *Gastroenterology* 150 (1), pp. 168–180. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.09.038.

- Pogostin, Brett H.; Malmendal, Anders; Londergan, Casey H.; Åkerfeldt, Karin S. (2019): pKa Determination of a Histidine Residue in a Short Peptide Using Raman Spectroscopy. In *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (3). DOI: 10.3390/molecules24030405.
- Poritz, Lisa S.; Garver, Kristian I.; Green, Cecelia; Fitzpatrick, Leo; Ruggiero, Francesca; Koltun, Walter A. (2007): Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. In *The Journal of surgical research* 140 (1), pp. 12–19. DOI: 10.1016/j.jss.2006.07.050.
- Porta, Helena; Rocha-Sosa, Mario (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. In *Plant physiology* 130 (1), pp. 15–21. DOI: 10.1104/pp.010787.
- Porto, Marcella L.; Rodrigues, Bianca P.; Menezes, Thiago N.; Ceschim, Sara L.; Casarini, Dulce E.; Gava, Agata L. et al. (2015): Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. In *Journal of biomedical science* 22, p. 97. DOI: 10.1186/s12929-015-0201-8.
- Prame Kumar, Kathryn; Nicholls, Alyce J.; Wong, Connie H. Y. (2018): Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. In *Cell and tissue research* 371 (3), pp. 551–565. DOI: 10.1007/s00441-017-2753-2.
- Rademacher, Marlena; Kuhn, Hartmut; Borchert, Astrid (2020): Systemic deficiency of mouse arachidonate 15-lipoxygenase induces defective erythropoiesis and transgenic expression of the human enzyme rescues this phenotype. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (11), pp. 14318–14335. DOI: 10.1096/fj.202000408RR.
- Radmark, Olof (2022): Formation of eicosanoids and other oxylipins in human macrophages. In *Biochemical pharmacology* 204, p. 115210. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115210.
- Rajakariar, Ravindra; Hilliard, Mark; Lawrence, Toby; Trivedi, Seema; Colville-Nash, Paul; Bellingan, Geoff et al. (2007): Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52), pp. 20979–20984. DOI: 10.1073/pnas.0707394104.
- Rapoport, S.; Schmidt, J.; Prehn, S. (1986): Fe-dependent formation of a protein that makes mitochondria lipoxygenase-susceptible during maturation of reticulocytes. In *FEBS Letters* 198 (1), pp. 109–112. DOI: 10.1016/0014-5793(86)81194-2.
- Rather, L. J. (1971): Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. In *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 47 (3), pp. 303–322.
- Reddy, G. R.; Reddanna, P.; Reddy, C. C.; Curtis, W. R. (1992): 11-hydroperoxyeicosatetraenoic acid is the major dioxygenation product of lipoxygenase isolated from hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. In *Biochemical and biophysical research communications* 189 (3), pp. 1349–1352.
- Reisch, Florian; Kakularam, Kumar Reddy; Stehling, Sabine; Heydeck, Dagmar; Kuhn, Hartmut (2021): Eicosanoid biosynthesis in marine mammals. In *The FEBS journal* 288 (4), pp. 1387–1406. DOI: 10.1111/febs.15469.

- Ricciotti, Emanuela; FitzGerald, Garret A. (2011): Prostaglandins and inflammation. In *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (5), pp. 986–1000. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.
- Ringholz, Fiona C.; Buchanan, Paul J.; Clarke, Donna T.; Millar, Roisin G.; McDermott, Michael; Linnane, Barry et al. (2014): Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. In *The European respiratory journal* 44 (2), pp. 394–404. DOI: 10.1183/09031936.00106013.
- Roffeis, Jana; Hornung, Daniela; Kuhn, Hartmut; Walther, Matthias (2007): 15-Lipoxygenase-2 is differentially expressed in normal and neoplastic ovary. In *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 16 (6), pp. 568–575. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e32801023c4.
- Romano, M.; Chen, X. S.; Takahashi, Y.; Yamamoto, S.; Funk, C. D.; Serhan, C. N. (1993): Lipoxin synthase activity of human platelet 12-lipoxygenase. In *The Biochemical journal* 296 (Pt 1) (Pt 1), pp. 127–133. DOI: 10.1042/bj2960127.
- Roos, A.; Boron, W. F. (1981): Intracellular pH. In *Physiological reviews* 61 (2), pp. 296–434. DOI: 10.1152/physrev.1981.61.2.296.
- Rosahl, S. (1996): Lipoxygenases in plants—their role in development and stress response. In *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 51 (3-4), pp. 123–138. DOI: 10.1515/znc-1996-3-401.
- Rouzer, C. A.; Samuelsson, B. (1985): On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (18), pp. 6040–6044. DOI: 10.1073/pnas.82.18.6040.
- Rubin, G. P.; Hungin, A. P.; Kelly, P. J.; Ling, J. (2000): Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. In *Alimentary pharmacology & therapeutics* 14 (12), pp. 1553–1559. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2000.00886.x.
- Saam, Jan; Ivanov, Igor; Walther, Matthias; Holzhütter, Hermann-Georg; Kuhn, Hartmut (2007): Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33), pp. 13319–13324. DOI: 10.1073/pnas.0702401104.
- Salzmann, U.; Kühn, H.; Schewe, T.; Rapoport, S. M. (1984): Pentane formation during the anaerobic reactions of reticulocyte lipoxygenase. Comparison with lipoxygenases from soybeans and green pea seeds. In *Biochimica et biophysica acta* 795 (3), pp. 535–542. DOI: 10.1016/0005-2760(84)90183-8.
- Sapieha, Przemyslaw; Stahl, Andreas; Chen, Jing; Seaward, Molly R.; Willett, Keirnan L.; Krah, Nathan M. et al. (2011): 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids. In *Science translational medicine* 3 (69), 69ra12. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001571.
- Sarde, Sandeep J.; Kumar, Abhishek; Remme, Rahima N.; Dicke, Marcel (2018): Genome-wide identification, classification and expression of lipoxygenase gene family in pepper. In *Plant Molecular Biology* 98 (4), pp. 375–387. DOI: 10.1007/s11103-018-0785-y.

- Sarna, J. R.; Dyck, R. H.; Wishaw, I. Q. (2000): The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. In *Behavioural brain research* 108 (1), pp. 39–45. DOI: 10.1016/S0166-4328(99)00137-0.
- Saura, Patricia; Kaganer, Ilya; Heydeck, Dagmar; Lluch, José M.; Kühn, Hartmut; González-Lafont, Àngels (2018): Mutagenesis of Sequence Determinants of Truncated Porcine ALOX15 Induces Changes in the Reaction Specificity by Altering the Catalytic Mechanism of Initial Hydrogen Abstraction. In *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 24 (4), pp. 962–973. DOI: 10.1002/chem.201704672.
- Schäfer, Marjann; Fan, Yu; Gu, Tianle; Heydeck, Dagmar; Stehling, Sabine; Ivanov, Igor et al. (2020): The lipoxygenase pathway of *Tupaia belangeri* representing Scandentia. Genomic multiplicity and functional characterization of the ALOX15 orthologs in the tree shrew. In *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1865 (2), p. 158550. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2019.158550.
- Schäfer, Marjann; Kakularam, Kumar R.; Reisch, Florian; Rothe, Michael; Stehling, Sabine; Heydeck, Dagmar et al. (2022): Male Knock-in Mice Expressing an Arachidonic Acid Lipoxygenase 15B (Alox15B) with Humanized Reaction Specificity Are Prematurely Growth Arrested When Aging. In *Biomedicines* 10 (6). DOI: 10.3390/biomedicines10061379.
- Schewe, T.; Halangk, W.; Hiebsch, C.; Rapoport, S. M. (1975): A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. In *FEBS Letters* 60 (1), pp. 149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80439-X.
- Schewe, T.; Rapoport, S. M.; Kühn, H. (1986): Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. In *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 58, pp. 191–272. DOI: 10.1002/9780470123041.ch6.
- Schneider, C.; Keeney, D. S.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R. (2001): Detection and cellular localization of 12R-lipoxygenase in human tonsils. In *Archives of biochemistry and biophysics* 386 (2), pp. 268–274. DOI: 10.1006/abbi.2000.2217.
- Schneider, Claus; Brash, Alan R. (2002): Lipoxygenase-catalyzed formation of R-configuration hydroperoxides. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 291–301. DOI: 10.1016/s0090-6980(02)00041-2.
- Schneider, Claus; Pratt, Derek A.; Porter, Ned A.; Brash, Alan R. (2007): Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. In *Chemistry & biology* 14 (5), pp. 473–488. DOI: 10.1016/j.chembiol.2007.04.007.
- Schwab, Jan M.; Chiang, Nan; Arita, Makoto; Serhan, Charles N. (2007): Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. In *Nature* 447 (7146), pp. 869–874. DOI: 10.1038/nature05877.
- Schwarz, K.; Borngräber, S.; Anton, M.; Kuhn, H. (1998): Probing the substrate alignment at the active site of 15-lipoxygenases by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. Evidence for an inverse substrate orientation. In *Biochemistry* 37 (44), pp. 15327–15335. DOI: 10.1021/bi9816204.
- Schweiger, Dorothea; Fürstenberger, Gerhard; Krieg, Peter (2007): Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. In *Journal of lipid research* 48 (3), pp. 553–564. DOI: 10.1194/jlr.M600311-JLR200.

- Seneschal, Julien; Clark, Rachael A.; Gehad, Ahmed; Baecher-Allan, Clare M.; Kupper, Thomas S. (2012): Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. In *Immunity* 36 (5), pp. 873–884. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.018.
- Serhan, C. N.; Chiang, N. (2008): Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. In *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1 (Suppl 1), S200-15. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707489.
- Serhan, C. N.; Clish, C. B.; Brannon, J.; Colgan, S. P.; Chiang, N.; Gronert, K. (2000): Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. In *The Journal of experimental medicine* 192 (8), pp. 1197–1204. DOI: 10.1084/jem.192.8.1197.
- Serhan, Charles N.; Chiang, Nan; van Dyke, Thomas E. (2008): Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. In *Nature reviews. Immunology* 8 (5), pp. 349–361. DOI: 10.1038/nri2294.
- Serhan, Charles N.; Gotlinger, Katherine; Hong, Song; Lu, Yan; Siegelman, Jeffrey; Baer, Tamara et al. (2006): Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176 (3), pp. 1848–1859. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1848.
- Serhan, Charles N.; Jain, Ashish; Marleau, Sylvie; Clish, Clary; Kantarci, Alpdogan; Behbehani, Balsam et al. (2003): Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (12), pp. 6856–6865. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6856.
- Serhan, Charles N.; Yang, Rong; Martinod, Kimberly; Kasuga, Kie; Pillai, Padmini S.; Porter, Timothy F. et al. (2009): Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. In *The Journal of experimental medicine* 206 (1), pp. 15–23. DOI: 10.1084/jem.20081880.
- Shah, Shailja C.; Khalili, Hamed; Gower-Rousseau, Corinne; Olen, Ola; Benchimol, Eric I.; Lyng, Elsebeth et al. (2018): Sex-Based Differences in Incidence of Inflammatory Bowel Diseases-Pooled Analysis of Population-Based Studies From Western Countries. In *Gastroenterology* 155 (4), 1079-1089.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.06.043.
- Shang, Weifeng; Ivanov, Igor; Svergun, Dmitri I.; Borbulevych, Oleg Y.; Aleem, Ansari M.; Stehling, Sabine et al. (2011): Probing dimerization and structural flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering. In *Journal of molecular biology* 409 (4), pp. 654–668. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.035.
- Shappell, Scott B.; Boeglin, William E.; Olson, Sandy J.; Kasper, Susan; Brash, Alan R. (1999): 15-Lipoxygenase-2 (15-LOX-2) Is Expressed in Benign Prostatic Epithelium and Reduced in Prostate Adenocarcinoma. In *The American Journal of Pathology* 155 (1), pp. 235–245. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65117-6.
- Sharon, P.; Stenson, W. F. (1984): Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. In *Gastroenterology* 86 (3), pp. 453–460.

- Shejawal, N.; Menon, S.; Shailajan, S. (2014): A simple, sensitive and accurate method for rat paw volume measurement and its expediency in preclinical animal studies. In *Human & experimental toxicology* 33 (2), pp. 123–129. DOI: 10.1177/0960327113482594.
- Shen, J.; Kühn, H.; Petho-Schramm, A.; Chan, L. (1995): Transgenic rabbits with the integrated human 15-lipoxygenase gene driven by a lysozyme promoter: macrophage-specific expression and variable positional specificity of the transgenic enzyme. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (15), pp. 1623–1631. DOI: 10.1096/fasebj.9.15.8529842.
- Shibata, D.; Steczko, J.; Dixon, J. E.; Hermodson, M.; Yazdanparast, R.; Axelrod, B. (1987): Primary structure of soybean lipoxygenase-1. In *Journal of Biological Chemistry* 262 (21), pp. 10080–10085.
- Shimada, T.; Kojima, K.; Yoshiura, K.; Hiraishi, H.; Terano, A. (2002): Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. In *Gut* 50 (5), pp. 658–664. DOI: 10.1136/gut.50.5.658.
- Shimizu, K.; Keino, H.; Ogasawara, N.; Esaki, K. (1983): Hereditary erythroblastic anaemia in the laboratory mouse. In *Laboratory animals* 17 (3), pp. 198–202. DOI: 10.1258/002367783781070678.
- Siegel, Marvin I.; McConnell, Randy T.; Abrahams, Sanders L.; Porter, Ned A.; Cuatrecasas, Pedro (1979): Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase and cyclooxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. In *Biochemical and biophysical research communications* 89 (4), pp. 1273–1280. DOI: 10.1016/0006-291X(79)92146-6.
- Sigal, E.; Grunberger, D.; Craik, C. S.; Caughey, G. H.; Nadel, J. A. (1988): Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases. In *The Journal of biological chemistry* 263 (11), pp. 5328–5332.
- Sigal, E.; Grunberger, D.; Highland, E.; Gross, C.; Dixon, R. A.; Craik, C. S. (1990): Expression of cloned human reticulocyte 15-lipoxygenase and immunological evidence that 15-lipoxygenases of different cell types are related. In *Journal of Biological Chemistry* 265 (9), pp. 5113–5120.
- Silva-Santana, Giorgio; Bax, Juliet Cunha; Fernandes, Débora Cristina Silva; Bacellar, Daniela Tandler Leibel; Hooper, Cleber; Dias, Alexandre Alves Souza Oliveira et al. (2020): Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus. In *Animal models and experimental medicine* 3 (4), pp. 304–315. DOI: 10.1002/ame2.12139.
- Simard-Bisson, Carolyne; Parent, Lorraine Andrée; Moulin, Véronique J.; Fruteau de Laclos, Bernard (2018): Characterization of Epidermal Lipoxygenase Expression in Normal Human Skin and Tissue-Engineered Skin Substitutes. In *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 66 (11), pp. 813–824. DOI: 10.1369/0022155418788117.
- Simopoulos, A. P. (2002): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. In *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 56 (8), pp. 365–379. DOI: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.

- Singh, Nikhlesh K.; Rao, Gadiparthi N. (2019): Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. In *Progress in lipid research* 73, pp. 28–45. DOI: 10.1016/j.plipres.2018.11.001.
- Slappendel, S.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F.; Aasa, R.; Malmström, B. G. (1981): EPR spectroscopy of soybean lipoxygenase-1. Description and quantification of the high-spin Fe(III) signals. In *Biochimica et biophysica acta* 667 (1), pp. 77–86. DOI: 10.1016/0005-2795(81)90068-4.
- Sletvold, Olav (1987): Circadian rhythms of peripheral blood leukocytes in aging mice. In *Mechanisms of Ageing and Development* 39 (3), pp. 251–261. DOI: 10.1016/0047-6374(87)90065-0.
- Sloane, D. L.; Leung, R.; Craik, C. S.; Sigal, E. (1991): A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. In *Nature* 354 (6349), pp. 149–152. DOI: 10.1038/354149a0.
- Smith, William L.; Murphy, Robert C. (2016): The Eicosanoids. In : *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*: Elsevier, pp. 259–296.
- Smyrniotis, Christopher J.; Barbour, Shannon R.; Xia, Zexin; Hixon, Mark S.; Holman, Theodore R. (2014): ATP allosterically activates the human 5-lipoxygenase molecular mechanism of arachidonic acid and 5(S)-hydroperoxy-6(E),8(Z),11(Z),14(Z)-eicosatetraenoic acid. In *Biochemistry* 53 (27), pp. 4407–4419. DOI: 10.1021/bi401621d.
- Snodgrass, Ryan G.; Benatzy, Yvonne; Schmid, Tobias; Namgaladze, Dmitry; Mainka, Malwina; Schebb, Nils Helge et al. (2021): Efferocytosis potentiates the expression of arachidonate 15-lipoxygenase (ALOX15) in alternatively activated human macrophages through LXR activation. In *Cell death and differentiation* 28 (4), pp. 1301–1316. DOI: 10.1038/s41418-020-00652-4.
- Snodgrass, Ryan G.; Brüne, Bernhard (2019): Regulation and Functions of 15-Lipoxygenases in Human Macrophages. In *Frontiers in Pharmacology* 10. DOI: 10.3389/fphar.2019.00719.
- Song, Cai; Li, Xuwen; Leonard, Brian E.; Horrobin, David F. (2003): Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 β -induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. In *Journal of lipid research* 44 (10), pp. 1984–1991. DOI: 10.1194/jlr.M300217-JLR200.
- Spanbroek, R.; Hildner, M.; Köhler, A.; Müller, A.; Zintl, F.; Kühn, H. et al. (2001): IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1 expression. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (9), pp. 5152–5157. DOI: 10.1073/pnas.091076998.
- Spanbroek, R.; Hildner, M.; Steinhilber, D.; Fusenig, N.; Yoneda, K.; Rådmark, O. et al. (2000): 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. In *Blood* 96 (12), pp. 3857–3865.
- Spector, A. A.; Yorek, M. A. (1985): Membrane lipid composition and cellular function. In *Journal of lipid research* 26 (9), pp. 1015–1035.
- Su, C.; Oliw, E. H. (1998): Manganese lipoxygenase. Purification and characterization. In *Journal of Biological Chemistry* 273 (21), pp. 13072–13079. DOI: 10.1074/jbc.273.21.13072.

- Subbarayan, V.; Krieg, P.; Hsi, L. C.; Kim, J.; Yang, P.; Sabichi, A. L. et al. (2006): 15-Lipoxygenase-2 gene regulation by its product 15-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through a negative feedback mechanism that involves peroxisome proliferator-activated receptor gamma. In *Oncogene* 25 (44), pp. 6015–6025. DOI: 10.1038/sj.onc.1209617.
- Sumner, James B.; Sumner, Robert J. (1940): THE COUPLED OXIDATION OF CAROTENE AND FAT BY CAROTENE OXIDASE. In *Journal of Biological Chemistry* 134 (2), pp. 531–533. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)73211-0.
- Sun, D.; Funk, C. D. (1996): Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. In *The Journal of biological chemistry* 271 (39), pp. 24055–24062.
- Sun, Meng; Choi, Eugene Y.; Magee, Daniel J.; Stets, Colin W.; During, Matthew J.; Lin, En-Ju D. (2014): Metabolic Effects of Social Isolation in Adult C57BL/6 Mice. In *International scholarly research notices* 2014, p. 690950. DOI: 10.1155/2014/690950.
- Sun, Qian-Yi; Zhou, Hong-Hao; Mao, Xiao-Yuan (2019): Emerging Roles of 5-Lipoxygenase Phosphorylation in Inflammation and Cell Death. In *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019, p. 2749173. DOI: 10.1155/2019/2749173.
- Suraneni, Mahipal V.; Moore, John R.; Zhang, Dingxiao; Badeaux, Mark; Macaluso, Marc D.; DiGiovanni, John et al. (2014): Tumor-suppressive functions of 15-Lipoxygenase-2 and RB1CC1 in prostate cancer. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (11), pp. 1798–1810. DOI: 10.4161/cc.28757.
- Suzuki, H.; Kishimoto, K.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Kanai, F.; Ebina, Y. et al. (1994): Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase. In *Biochimica et biophysica acta* 1210 (3), pp. 308–316. DOI: 10.1016/0005-2760(94)90234-8.
- Szymanowska, Urszula; Jakubczyk, Anna; Baraniak, Barbara; Kur, Agnieszka (2009): Characterisation of lipoxygenase from pea seeds (*Pisum sativum* var. Telephone L.). In *Food Chemistry* 116 (4), pp. 906–910. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.045.
- Takahashi, Y.; Glasgow, W. C.; Suzuki, H.; Taketani, Y.; Yamamoto, S.; Anton, M. et al. (1993): Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. In *European journal of biochemistry* 218 (1), pp. 165–171. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18362.x.
- Tang, Daolin; Kang, Rui; Coyne, Carolyn B.; Zeh, Herbert J.; Lotze, Michael T. (2012): PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. In *Immunological reviews* 249 (1), pp. 158–175. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
- Tang, Dean G.; Bhatia, Bobby; Tang, Shaohua; Schneider-Broussard, Robin (2007): 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 82 (1-4), pp. 135–146. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2006.05.022.

- Tang, Shaohua; Bhatia, Bobby; Maldonado, Carlos J.; Yang, Peiying; Newman, Robert A.; Liu, Junwei et al. (2002): Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. In *Journal of Biological Chemistry* 277 (18), pp. 16189–16201. DOI: 10.1074/jbc.M111936200.
- Tang, Yong; Wang, Man-Tzu; Chen, Yakun; Yang, Dianer; Che, Mingxin; Honn, Kenneth V. et al. (2009): Downregulation of vascular endothelial growth factor and induction of tumor dormancy by 15-lipoxygenase-2 in prostate cancer. In *International journal of cancer* 124 (7), pp. 1545–1551. DOI: 10.1002/ijc.24118.
- Tappel, A. L.; Lundberg, W. O.; Boyer, P. D. (1953): Effect of temperature and antioxidants upon the lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate. In *Archives of biochemistry and biophysics* 42 (2), pp. 293–304. DOI: 10.1016/0003-9861(53)90359-2.
- Thomson, Scott J.; Askari, Ara; Bishop-Bailey, David (2012): Anti-inflammatory effects of epoxyeicosatrienoic acids. In *International journal of vascular medicine* 2012, p. 605101. DOI: 10.1155/2012/605101.
- Tjonahen, Eric; Oh, Sungwan F.; Siegelman, Jeffrey; Elangovan, Siva; Percarpio, Katherine B.; Hong, Song et al. (2006): Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. In *Chemistry & biology* 13 (11), pp. 1193–1202. DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.09.011.
- Tsukiyama-Kohara, Kyoko; Kohara, Michinori (2014): Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection. In *Experimental animals* 63 (4), pp. 367–374. DOI: 10.1538/expanim.63.367.
- Umate, Pavan (2011): Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in Arabidopsis and rice. In *Plant signaling & behavior* 6 (3), pp. 335–338. DOI: 10.4161/psb.6.3.13546.
- van Beek, Adriaan A.; Fransen, Floris; Meijer, Ben; Vos, Paul de; Knol, Edward F.; Savelkoul, Huub F. J. (2018): Aged mice display altered numbers and phenotype of basophils, and bone marrow-derived basophil activation, with a limited role for aging-associated microbiota. In *Immunity & ageing : I & A* 15, p. 32. DOI: 10.1186/s12979-018-0135-6.
- van Leyen, K.; Duvoisin, R. M.; Engelhardt, H.; Wiedmann, M. (1998): A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. In *Nature* 395 (6700), pp. 392–395. DOI: 10.1038/26500.
- van Leyen, Klaus; Kim, Hahn Young; Lee, Seong-Ryong; Jin, Guang; Arai, Ken; Lo, Eng H. (2006): Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. In *Stroke* 37 (12), pp. 3014–3018. DOI: 10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5.
- van Os, C. P.; Rijke-Schilder, G. P.; van Halbeek, H.; Verhagen, J.; Vliegthart, J. F. (1981): Double dioxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. Kinetics and regio-stereo specificities of the reaction steps. In *Biochimica et biophysica acta* 663 (1), pp. 177–193. DOI: 10.1016/0005-2760(81)90204-6.

- Vance, Russell E.; Hong, Song; Gronert, Karsten; Serhan, Charles N.; Mekalanos, John J. (2004): The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7), pp. 2135–2139. DOI: 10.1073/pnas.0307308101.
- Vidal-Lletjós, Sandra; Andriamihaja, Mireille; Blais, Anne; Grauso, Marta; Lepage, Patricia; Davila, Anne-Marie et al. (2019): Mucosal healing progression after acute colitis in mice. In *World journal of gastroenterology* 25 (27), pp. 3572–3589. DOI: 10.3748/wjg.v25.i27.3572.
- Vigor, Claire; Bertrand-Michel, Justine; Pinot, Edith; Oger, Camille; Vercauteren, Joseph; Le Faouder, Pauline et al. (2014): Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. In *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 964, pp. 65–78. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.04.042.
- Vogel, Robert; Jansen, Christian; Roffeis, Jana; Reddanna, Pallu; Forsell, Pontus; Claesson, Hans-Eric et al. (2010): Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. In *The Journal of biological chemistry* 285 (8), pp. 5369–5376. DOI: 10.1074/jbc.M109.057802.
- Wallace, John L. (2019): Eicosanoids in the gastrointestinal tract. In *British journal of pharmacology* 176 (8), pp. 1000–1008. DOI: 10.1111/bph.14178.
- Walther, Matthias; Anton, Monika; Wiedmann, Martin; Fletterick, Robert; Kuhn, Hartmut (2002): The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. In *The Journal of biological chemistry* 277 (30), pp. 27360–27366. DOI: 10.1074/jbc.M203234200.
- Walther, Matthias; Hofheinz, Katharina; Vogel, Robert; Roffeis, Jana; Kühn, Hartmut (2011): The N-terminal β -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions. In *Archives of biochemistry and biophysics* 516 (1), pp. 1–9. DOI: 10.1016/j.abb.2011.09.004.
- Walther, Matthias; Ivanov, Igor; Myagkova, Galina; Kuhn, Hartmut (2001): Alterations of lipoxygenase specificity by targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. In *Chemistry & biology* 8 (8), pp. 779–790. DOI: 10.1016/s1074-5521(01)00050-3.
- Wang, Jing; Xu, Xin-Li; Ding, Ze-Yang; Mao, Rong-Rong; Zhou, Qi-Xin; Lü, Long-Bao et al. (2013): Basal physiological parameters in domesticated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*). In *Dong wu xue yan jiu = Zoological research* 34 (E2), E69-74. DOI: 10.3724/SP.J.1141.2013.E02E69.
- Wang, Yuxin; Wang, Weicang; Sanidad, Katherine Z.; Shih, Pei-An; Zhao, Xinfeng; Zhang, Guodong (2018): Eicosanoid signaling in carcinogenesis of colorectal cancer. In *Cancer metastasis reviews* 37 (2-3), pp. 257–267. DOI: 10.1007/s10555-018-9739-8.
- Watanabe, T.; Medina, J. F.; Haeggström, J. Z.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. (1993): Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. In *European journal of biochemistry* 212 (2), pp. 605–612. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17699.x.

- Waterston, Robert H.; Lindblad-Toh, Kerstin; Birney, Ewan; Rogers, Jane; Abril, Josep F.; Agarwal, Pankaj et al. (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. In *Nature* 420 (6915), pp. 520–562. DOI: 10.1038/nature01262.
- Watson, A.; Doherty, F. J. (1994): Calcium promotes membrane association of reticulocyte 15-lipoxygenase. In *The Biochemical journal* 298 (Pt 2), pp. 377–383. DOI: 10.1042/bj2980377.
- Weisinger, G.; Grafi-Cohen, M.; Hirsh, M.; Knoll, E.; Sharon, O.; Many, A. et al. (2013): 12S-Lipoxygenase is necessary for human vascular smooth muscle cell survival. In *Experimental cell research* 319 (10), pp. 1586–1593. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.04.001.
- Weisinger, Gary; Limor, Rona; Marcus-Perlman, Yonit; Knoll, Esther; Kohen, Fortune; Schinder, Vera et al. (2007): 12S-lipoxygenase protein associates with alpha-actin fibers in human umbilical artery vascular smooth muscle cells. In *Biochemical and biophysical research communications* 356 (3), pp. 554–560. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.012.
- Wennman, Anneli; Oliw, Ernst H.; Karkehabadi, Saeid; Chen, Yang (2016): Crystal Structure of Manganese Lipoxygenase of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. In *The Journal of biological chemistry* 291 (15), pp. 8130–8139. DOI: 10.1074/jbc.M115.707380.
- Werz, O.; Klemm, J.; Samuelsson, B.; Rådmark, O. (2000): 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10), pp. 5261–5266. DOI: 10.1073/pnas.050588997.
- Werz, Oliver; Steinhilber, Dieter (2006): Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. In *Pharmacology & therapeutics* 112 (3), pp. 701–718. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2006.05.009.
- Werz, Oliver; Szellas, Dagmar; Steinhilber, Dieter; Rådmark, Olof (2002): Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). In *The Journal of biological chemistry* 277 (17), pp. 14793–14800. DOI: 10.1074/jbc.M111945200.
- Williams, K. I.; Higgs, G. A. (1988): Eicosanoids and inflammation. In *The Journal of pathology* 156 (2), pp. 101–110. DOI: 10.1002/path.1711560204.
- Woese, C. R.; Fox, G. E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (11), pp. 5088–5090.
- Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), pp. 4576–4579.
- Wolf, Walter J. (1975): Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. In *J. Agric. Food Chem.* 23 (2), pp. 136–141. DOI: 10.1021/jf60198a013.
- Wolfgang Lenhard; Alexandra Lenhard (2017): Computation of Effect Sizes. Available online at <https://www.psychometrica.de/effektstaerke.html>.

- Wong, A.; Hwang, S. M.; Cook, M. N.; Hogaboom, G. K.; Crooke, S. T. (1988): Interactions of 5-lipoxygenase with membranes: studies on the association of soluble enzyme with membranes and alterations in enzyme activity. In *Biochemistry* 27 (18), pp. 6763–6769. DOI: 10.1021/bi00418a018.
- Wuest, Sophia J. A.; Crucet, Margot; Gemperle, Claudio; Loretz, Christa; Hersberger, Martin (2012): Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. In *Atherosclerosis* 225 (1), pp. 121–127. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.022.
- Xiao, Ji; Liu, Rong; Chen, Ce-Shi (2017): Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model. In *Zoological research* 38 (3), pp. 127–137. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033.
- Xu, Shu; Mueser, Timothy C.; Marnett, Lawrence J.; Funk, Max O. (2012): Crystal structure of 12-lipoxygenase catalytic-domain-inhibitor complex identifies a substrate-binding channel for catalysis. In *Structure (London, England : 1993)* 20 (9), pp. 1490–1497. DOI: 10.1016/j.str.2012.06.003.
- Xu, Zhen-Zhong; Zhang, Ling; Liu, Tong; Park, Jong Yeon; Berta, Temugin; Yang, Rong et al. (2010): Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. In *Nature medicine* 16 (5), 592-7, 1p following 597. DOI: 10.1038/nm.2123.
- Yamada, Yoshiyuki; Cancelas, Jose A.; Rothenberg, Marc E. (2009): Murine model of hypereosinophilic syndromes/chronic eosinophilic leukemia. In *International archives of allergy and immunology* 149 Suppl 1, pp. 102–107. DOI: 10.1159/000211381.
- Yang, Lin; Ma, Cui; Zhang, Lixin; Zhang, Min; Li, Fei; Zhang, Chen et al. (2018): 15-Lipoxygenase-2/15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid regulates cell proliferation and metastasis via the STAT3 pathway in lung adenocarcinoma. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 138, pp. 31–40. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2018.07.003.
- Yang, Xue-Yong; Jiang, Wei-Jie; Yu, Hong-Jun (2012): The expression profiling of the lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.). In *International journal of molecular sciences* 13 (2), pp. 2481–2500. DOI: 10.3390/ijms13022481.
- Yao, Yong-Gang (2017): Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*)? In *Zoological research* 38 (3), pp. 118–126. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2017.032.
- Ye, Yumei; Lin, Yu; Perez-Polo, Jose R.; Uretsky, Barry F.; Ye, Zaiming; Tieu, Brian C.; Birnbaum, Yochai (2008): Phosphorylation of 5-lipoxygenase at ser523 by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B4 or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin a4 production. In *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (5), pp. 3515–3523. DOI: 10.4049/jimmunol.181.5.3515.
- Yokoyama, C.; Shinjo, F.; Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Oates, J. A.; Brash, A. R. (1986): Arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes by immunoaffinity chromatography and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. In *The Journal of biological chemistry* 261 (35), pp. 16714–16721.

- Yoshimoto, Tanihiro; Takahashi, Yoshitaka (2002): Arachidonate 12-lipoxygenases. In *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69, pp. 245–262. DOI: 10.1016/S0090-6980(02)00034-5.
- Yu, Zheyong; Schneider, Claus; Boeglin, William E.; Brash, Alan R. (2006): Human and mouse eLOX3 have distinct substrate specificities: implications for their linkage with lipoxygenases in skin. In *Archives of biochemistry and biophysics* 455 (2), pp. 188–196. DOI: 10.1016/j.abb.2006.09.002.
- Yu, Zheyong; Schneider, Claus; Boeglin, William E.; Marnett, Lawrence J.; Brash, Alan R. (2003): The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16), pp. 9162–9167. DOI: 10.1073/pnas.1633612100.
- Zelinkova, Zuzana; Stokkers, Pieter C.; van der Linde, Klaas; Kuipers, Ernst J.; Peppelenbosch, Maikel P.; van der Woude, Christine P. J. (2012): Maternal imprinting and female predominance in familial Crohn's disease. In *Journal of Crohn's & colitis* 6 (7), pp. 771–776. DOI: 10.1016/j.crohns.2012.01.002.
- Zhang, Wenliang; Zhong, Wei; Sun, Qian; Sun, Xinguo; Zhou, Zhanxiang (2017): Hepatic overproduction of 13-HODE due to ALOX15 upregulation contributes to alcohol-induced liver injury in mice. In *Scientific reports* 7 (1), p. 8976. DOI: 10.1038/s41598-017-02759-0.
- Zheng, Yuxiang; Brash, Alan R. (2010 a): Dioxygenase activity of epidermal lipoxygenase-3 unveiled: typical and atypical features of its catalytic activity with natural and synthetic polyunsaturated fatty acids. In *The Journal of biological chemistry* 285 (51), pp. 39866–39875. DOI: 10.1074/jbc.M110.155374.
- Zheng, Yuxiang; Brash, Alan R. (2010 b): On the role of molecular oxygen in lipoxygenase activation: comparison and contrast of epidermal lipoxygenase-3 with soybean lipoxygenase-1. In *The Journal of biological chemistry* 285 (51), pp. 39876–39887. DOI: 10.1074/jbc.M110.180794.
- Zheng, Yuxiang; Yin, Huiyong; Boeglin, William E.; Elias, Peter M.; Crumrine, Debra; Beier, David R.; Brash, Alan R. (2011): Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. In *The Journal of biological chemistry* 286 (27), pp. 24046–24056. DOI: 10.1074/jbc.M111.251496.
- Zheng, Zhonghua; Li, Yin; Jin, Gehui; Huang, Tianyi; Zou, Mengsha; Duan, Shiwei (2020): The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. In *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 129, p. 110354. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110354.
- Zijlstra, F. J.; Garrelds, I. M.; van Dijk, A. P.; Wilson, J. H. (1992): Experimental colitis in mice: effects of olsalazine on eicosanoid production in colonic tissue. In *Agents and actions* Spec No, C76-8.

7 Anhang

7.1 Statistikgutachten



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Schäfer, Marjann
Emailadresse: marjann.schaefer@charite.de
Matrikelnummer: 805900
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Hartmut Kühn
Promotionsinstitution / Klinik: Abteilung für Chemie

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin
Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

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

- Termin 1: 04.03.2021
- Termin 2: 08.09.2021

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

- Aufgrund der (sehr) kleinen Fallzahlen sollte der Fokus der Analyse auf der Deskription der Daten liegen (Angabe von Quartilen, graphische Darstellung mittels Boxplots).
- Des Weiteren sollten aufgrund der kleinen Fallzahlen nichtparametrische Testverfahren zur Anwendung kommen, welche aber auch mit Vorsicht zu interpretieren sind.
- Die Interpretation der Ergebnisse sollte auf Effektstärken beruhen, nicht auf p-Werten.
- Für multiples Testen sollte aufgrund des explorativen Charakters der Studie nicht adjustiert werden.

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

Datum: 08.09.2021

Name des Beraters/der Beraterin: Kerstin Rubarth

Kerstin
Rubarth
Digital
unterschrieben von
Kerstin Rubarth
Datum: 2021.09.08
15:05:07 +0200
Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel



7.2 Herstellerangaben zur Alox15b-KI-Maus zu Abschnitt 2.3

Mouse Alox8(Y603D&H604V) Knockin Project (CRISPR/Cas9)

1. OBJECTIVE

To create a C57BL/6 mouse model with point mutation (Y603D&H604V) at mouse Alox8 locus by CRISPR/Cas-mediated genome engineering

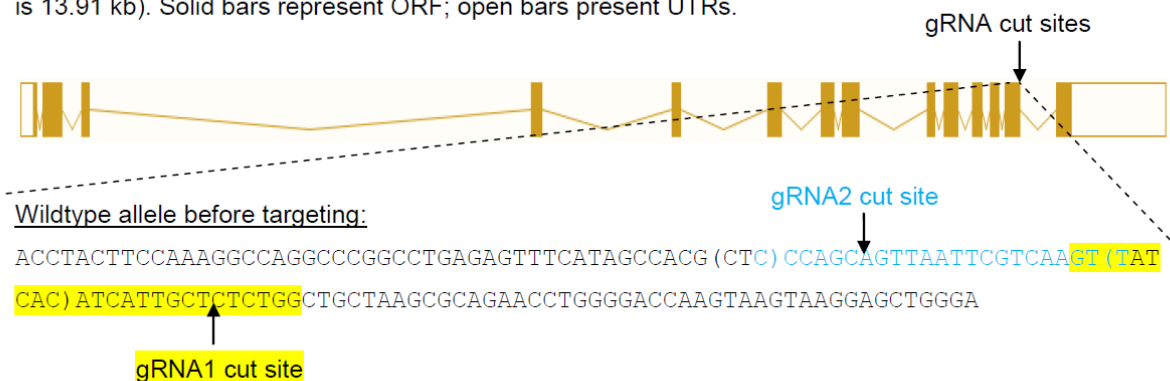
2. PROJECT SUMMARY

- The mouse Alox8 gene (GenBank accession number: NM_009661.4; Ensembl: ENSMUSG0000020891) is located on mouse chromosome 11.
- Fourteen exons have been identified, with the ATG start codon in exon 1 and TAA stop codon in exon 14. The Y603 and H604 are located on exon 13.
- Exon 13 will be selected as target sites (sequences shown on the next page).
- gRNA targeting vector and donor oligo (with targeting sequence, flanked by 130 bp homologous sequences combined on both sides) will be designed.
- The Y603D, H604V (TATCAC to GACGTC) mutation sites in donor oligo will be introduced into exon 13 by homology-directed repair. A silent mutation (CTC to CTG) will also be introduced to prevent the binding and re-cutting of the sequence by gRNA after homology-directed repair.
- Cas9 mRNA, gRNA generated by *in vitro* transcription and donor oligo will be co-injected into fertilized eggs for KI mouse production.
- The pups will be genotyped by PCR followed by sequence analysis and AatII restriction analysis.

3. TARGETING STRATEGY

3a. Schematic depiction of targeting strategy

Genomic region of mouse Alox8 locus is diagrammed below (gene is oriented from left to right; total size is 13.91 kb). Solid bars represent ORF; open bars present UTRs.



Mutant allele after targeting:

ACCTACTTCCAAAGGCCAGGCCCGGCCTGAGAGTTTCATAGCCACG (CTG) CCAGCAGTTAATTCGTCAAAGT (GAC GTC) ATCATTGCTCTCTGGCTGCTAAGCGCAGAACCTGGGGACCAAGTAAGTAAGGAGCTGGGA

Note: Sequence in parentheses in wildtype allele will be replaced by sequence in parentheses in mutation allele after successful targeting.

3b. gRNA target sequence

gRNA1 (matches forward strand of gene): GTTATCACATCATTGCTCTCTGG

gRNA2 (matches reverse strand of gene): AACTTGACGAATTAAGTCTGGG

Note: Color schemes are employed to facilitate tracking of sequences. PAM sequence is underscored.

3c. Donor oligo sequence

ACCTACTTCCAAAGGCCAGGCCCGGCCTGAGAGTTTCATAGCCACGCTGCCAGCAGTTAATTCGTCAAAGTGACGTC ATCATTGCTCTCTGGCTGCTAAGCGCAGAACCTGGGGACCAAGTAAGTAAGGAGCTGGGA

Note: mutation sequence is colored in red and silent mutation sequence is colored in violet.

3d. Links of gRNA vectors on VectorBuilder

gRNA1: <https://www.vectorbuilder.com/vector/VB171128-1087vxv.html>

gRNA2: <https://www.vectorbuilder.com/vector/VB171128-1088vvs.html>

3e. Assay of CRISPR-induced mutation

The target region of mouse Alox8 locus will be amplified by PCR with specific primers. PCR product will be sequenced to confirm targeting.

Primer sequence:

Mouse Alox8-F: CGGGAAGCCCTGGTCCAGTATATC

Mouse Alox8-R: AGCCTCACCCCTGCCTCTACTCTAAGT

Expected PCR product size:

Wildtype allele: 656 bp

Mutant allele: 656 bp

AatII restriction analysis:

Wildtype allele: 656 bp

Mutant allele: 288 bp and 368 bp

3f. Off-target analysis

Note: Each gRNA has a quality score, with higher quality scores indicating greater specificity. Each potential off-target site also has a score, which is calculated based on the number of mismatches with the gRNA and the distances of the mismatches from PAM sequence, with high scores indicating greater potential that the off-target site will be recognized by the gRNA. The quality score of the gRNA is calculated based on the total number of off-target sites and their scores.

Off-target analysis for gRNA1:

guide #10 quality score: 63

guide sequence: GTTATCACATCATTGCTCTC TGG

on-target locus: chr11:+68999231

number of offtarget sites: 226 (15 are in genes)

top 20 genome-wide off-target sites show all exonic

sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
ATTCTCAGATCATTGCTCTCAAG	2.6	3MMs [1:4:8]		chr2:-13740969
GTGACCAAATCATTGCTCTCTGG	2.4	3MMs [3:5:8]		chr2:-52467078
GTTTTCTAATCATTGCTCTCGGG	1.7	3MMs [4:7:8]		chr16:+14176454
GCTATCAAATCATTGCTCTAAGG	1.5	3MMs [2:8:20]		chr9:-25286220
GTTTTCAAATCATTGCTCTTGGG	1.4	3MMs [4:8:20]		chr15:+92068856
GAGAACATATCATTGCTCTCTGG	1.3	4MMs [2:3:5:8]		chrX:+131287461
TCTAGCACAAACATTGCTCTCAAG	1.3	4MMs [1:2:5:10]		chr1:+122961730
TTTATCAAATCACTGCTCTCAAG	1.2	3MMs [1:8:13]		chr18:+56034511
TTTACTAAATCATTGCTCTCCAG	0.8	4MMs [1:5:6:8]		chr3:-104118745
GTTAATACATCATTGCTCTTGAG	0.8	3MMs [5:6:20]		chr15:+24764108
TTTTAGACATCATTGCTCTCAGG	0.8	4MMs [1:4:5:6]		chr7:+118503635
CTTTTGACACCATTGCTCTCCAG	0.8	4MMs [1:4:6:10]		chr1:+67344153
GTGGACACATAATTGCTCTCAGG	0.8	4MMs [3:4:5:11]		chr1:-180761588
GATATCACATCCTTGCTCTGAAG	0.7	3MMs [2:12:20]		chr16:+86282336
GTAGGCACATCATTGCTCTATGG	0.7	4MMs [3:4:5:20]		chr2:+65403023
CTTACCACACCCTTGCTCTCTAG	0.7	4MMs [1:5:10:12]		chr13:-70848309
GTTACCACATCTTTGCTCTGTAG	0.7	3MMs [5:12:20]		chr10:-43416972

Off-target analysis for gRNA2:

guide #3 **quality score: 79**

guide sequence: AACTTGACGAATTAAGTCTGG **GGG**

on-target locus: chr11:-68999211

number of offtarget sites: 123 (13 are in genes)

top 20 genome-wide off-target sites show all exonic

sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
TCCTTGAAGAATTAAGTCTGG	2.6	3MMs [1:2:8]		chr18:+5024488
AACTGGACCCATTAAGTCTAAG	1.4	3MMs [5:9:10]		chr16:-25613802
TATTTGTTGAATTAAGTCTCAG	0.9	4MMs [1:3:7:8]		chr17:-59005350
AAATAGCAGAATTAAGTCTGAG	0.9	4MMs [3:5:7:8]		chr13:-79259785
AACTTGAAGGATGAAGTCTGAG	0.9	3MMs [8:10:13]	NM_001110323 NM_024470	chr6:-130178641
AACTTGAAGGATGAAGTCTGAG	0.9	3MMs [8:10:13]		chr6:-130253287
TATTTAAGAATTAAGTCTAAG	0.8	4MMs [1:3:6:8]		chr10:+55043273
ATCTGAATGAATTAAGTCTAAG	0.8	4MMs [2:5:6:8]		chr4:+45010059
AGTTTGACTCATTAAGTCTCAG	0.8	4MMs [2:3:9:10]		chr7:+109835320
AACTTCAAGAAGTAAGTCTAAG	0.8	3MMs [6:8:12]		chr4:+60512845
AACTTCAAGAAGTAAGTCTAAG	0.8	3MMs [6:8:12]		chr4:+61254915
AACTTCAAGAAGTAAGTCTAAG	0.8	3MMs [6:8:12]		chr4:+60734214
AACTGGATGGAGTAAGTCTTGG	0.6	4MMs [5:8:10:12]		chr7:-13661296
ATCCTGGCTAATTAAGTCTGAG	0.6	4MMs [2:4:7:9]		chr8:+128370779
ATTTGGACGAATGAAGTCTAGG	0.6	4MMs [2:3:5:13]		chr2:+118255260
AAATTTAAAAATTAAGTCTGGG	0.5	4MMs [3:6:8:9]		chr16:+5441294
AAAGTGACAAAGTAAGTCTTGG	0.4	4MMs [3:4:9:12]	NM_173016	chr8:-116896149

7.3 Ergänzungen zur LC-MS-/MS-Analyse durch die Lipidomix GmbH

Tabelle 38: Gradient der mobilen Phase, für die LC-Trennung der Plasma-Oxylipine (Schäfer et al. 2022). Die extrahierten Plasma-Oxylipine wurden durch RP-HPLC, unter Verwendung des folgenden Gradienten der mobilen Phase getrennt (siehe Kapitel 2). Die folgenden Stammlösungen wurden verwendet: Stammlösung A: Wasser mit 0,05 % Vol. Essigsäure (geringe Elutionsleistung), Stammlösung B: Methanol:Acetonitril (1:1 % Vol.) (hohe Elutionsleistung).

Zeit [min]	Stammlösung B [%]
0	5
0,5	56
5,5	61
18,5	87
18,6	98

Tabelle 39: Ionisierungsbedingungen der LC-MS-basierten Analyse der Blutplasma-Oxylipine (Quelle: Lipidomix GmbH, Berlin-Buch, nach Schäfer et al. 2022). Die extrahierten Plasmalipide wurden durch LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Ionisierungsbedingungen der MS-Analyse sind angegeben.

Parameter	Bedingungen
Trocknungsgastemperatur/Durchfluss	105 °C/16 l/min
Sheathgastemperatur/Flow	390 °C/12 l/min
Zerstäuberdruck	32 psi
Kapillarspannung	- 4300 V
Düsenspannung	- 1950 V

Tabelle 40: Charakteristische Massenübergänge, Stoßenergien und Retentionszeiten der verschiedenen Oxylipine (Quelle: Lipidomix GmbH, Berlin-Buch, nach Schäfer et al. 2022). Die extrahierten Plasmalipide wurden durch LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2).

Oxylipin	Precursor Ion	Product Ion	MS Res	Collision Energy [V]	Ret Time [min]
10-HDHA	343,2	181,1	Wide	11	16,725
10-HDHA	343,2	153,1	Wide	14	16,725
11-HDHA	343,2	149,1	Wide	12	17,013
11-HDHA	343,2	121,1	Wide	13	17,013
11-HETE	319,2	167,1	Wide	14	16,623
11-HETE	319,2	149,1	Wide	22	16,623
12-HEPE	317,2	179,1	Wide	13	15,01
12-HEPE	317,2	135,1	Wide	13	15,01
12-HETE	319,2	179,2	Wide	13	16,935
12-HETE	319,2	135,1	Wide	14	16,935
12-HeTrE	321,2	181	Wide	20	17,9
12-HeTrE	321,2	209	Wide	22	17,9
13-gamma-HOTrE	293,2	193	Wide	18	14,46
13-HDHA	343,2	221,2	Wide	10	16,546
13-HDHA	343,2	193,2	Wide	12	16,546
13-HODE	295,2	195,2	Wide	18	15,813
13-HODE-d4	299,2	198,1	Wide	18	15,857
13-HOTrE	293,2	195	Wide	18	14,07

Oxylinpin	Precursor Ion	Product Ion	MS Res	Collision Energy [V]	Ret Time [min]
13-HOTrE	293,2	223	Wide	20	14,07
14,15-DHET-d11	348,3	207,1	Wide	20	13,031
14,15-DHET-d11	348,3	140,1	Wide	20	13,031
14-HDHA	343,2	205,1	Wide	11	16,734
14-HDHA	343,2	161,1	Wide	13	16,734
15(R)epi-LXA4	351	135	Wide	18	7,186
15(R)epi-LXA4	351	115	Wide	15	7,186
15-HEPE	317,2	219,2	Wide	11	14,648
15-HEPE	317,2	175,1	Wide	13	14,648
15-HETE	319,2	219,2	Wide	11	16,252
15-HETE	319,2	121,1	Wide	16	16,252
15-HETE-d8	327,2	226,2	Wide	11	16,143
15-HETE-d8	327,2	214,2	Wide	14	16,143
15-HETE-d8	327,2	182,1	Wide	14	16,143
17(R)RvD1	375	215	Wide	18	7,227
17(R)RvD1	375	141	Wide	16	7,227
17(R,S)-RvD4	375,3	131	Wide	14	8,51
17(R,S)-RvD4	375,3	101	Wide	21	8,51
17-HDHA	343,2	245,2	Wide	10	16,431
17-HDHA	343,2	201,1	Wide	13	16,431
18-HEPE	317,2	259,2	Wide	9	14,22
18-HEPE	317,2	215,2	Wide	13	14,22
20-HDHA	343,2	241,2	Wide	11	16,059
20-HDHA	343,2	227,2	Wide	15	16,059
20-HETE-d6	325,2	295,2	Wide	18	15,045
20-HETE-d6	325,2	281,1	Wide	16	15,045
4-HDHA	343,2	133,1	Wide	14	17,983
4-HDHA	343,2	101	Wide	13	17,983
5(S),15(S)-DiHETE	335,3	173	Wide	14	10,88
5(S),15(S)-DiHETE	335,3	255,1	Wide	18	10,88
5(S),12(S)-DiHETE	335,2	195,1	Wide	16	11,82
5(S),12(S)-DiHETE	335,2	129	Wide	20	11,82
5-HEPE	317,2	201,1	Wide	13	15,48
5-HEPE	317,2	115,1	Wide	11	15,48
5-HETE	319,2	191,2	Wide	14	17,521
5-HETE	319,2	115,1	Wide	14	17,521
5-HeTrE	321,2	115	Wide	14	19,64
5-HeTrE	321,2	259	Wide	15	19,64
6(S)-LXA4	351	135	Wide	19	7,6
6(S)-LXA4	351	115	Wide	13	7,6
7-epi-MaR1	359	297	Wide	13	10,081
7-epi-MaR1	359	177	Wide	16	10,081
7-HDHA	343,2	141,1	Wide	11	17,144

Oxylipin	Precursor Ion	Product Ion	MS Res	Collision Energy [V]	Ret Time [min]
7-HDHA	343,2	113,1	Wide	18	17,144
8,9-EET-d11	330,3	268,2	Wide	12	18,64
8,9-EET-d11	330,3	167,1	Wide	13	18,64
8,9-EET-d11	330,3	159,1	Wide	24	18,64
8-HDHA	343,2	189,1	Wide	11	17,338
8-HDHA	343,2	109	Wide	12	17,338
8-HEPE	317,2	161,1	Wide	17	14,91
8-HEPE	317,2	155,1	Wide	13	14,91
8-HETE	319,2	155,1	Wide	12	16,915
8-HETE	319,2	127,1	Wide	22	16,915
9-HEPE	317,2	167,1	Wide	13	15,201
9-HEPE	317,2	149,1	Wide	13	15,201
9-HETE	319,2	151,1	Wide	13	17,299
9-HETE	319,2	123,1	Wide	15	17,299
9-HODE	295,1	171	Wide	21	15,94
9-HODE	295,1	277	Wide	21	15,94
9-HOTrE	293,2	171	Wide	13	13,88
9-HOTrE	293,2	121	Wide	18	13,88
LTB4	335,2	129	Wide	20	11,45
LTB4	335,2	195,1	Wide	16	11,45
LTB4-6-trans	335,2	195,1	Wide	16	10,54
LTB4-6-trans	335,2	129	Wide	20	10,54
LTB4-6-trans-epi	335,2	195,1	Wide	16	10,89
LTB4-6-trans-epi	335,2	129	Wide	20	10,89
LTB4-d4	339,2	197,1	Wide	16	11,59
LTB4-d4	339,2	59	Wide	32	11,59
LXA4	351	135	Wide	19	7,15
LXA4	351	115	Wide	13	7,15
LxA5	349	233	Wide	11	5,656
LxA5	349	115	Wide	18	5,656
LXB4	351	233	Wide	13	6,2
LXB4	351	221	Wide	15	6,2
Maresin 1	359	177	Wide	16	11,38
Maresin 1	359	113	Wide	15	11,38
Maresin 2	359,3	232,2	Wide	15	12,52
Maresin 2	359,3	221,2	Wide	12	12,52
NPD1	359,3	206,1	Wide	15	10,89
NPD1	359,3	153	Wide	15	10,89
NPDx	359,2	206	Wide	16	10,76
NPDx	359,2	153	Wide	16	10,76
PGE2-d4	355,2	275,2	Wide	18	6,185
PGE2-d4	355,2	193,2	Wide	20	6,185
RvD1	375	215	Wide	18	7,073

Oxylipin	Precursor Ion	Product Ion	MS Res	Collision Energy [V]	Ret Time [min]
RvD1	375	141	Wide	16	7,073
RvD2	375	277	Wide	13	6,299
RvD2	375	175	Wide	23	6,299
RvD3	375	147	Wide	22	6,23
RvD3	375	115	Wide	18	6,23
RvD5	359	199	Wide	14	10,98
RvD5	359	141	Wide	13	10,98
RvE1	349	195	Wide	17	4,16
RvE1	349	107	Wide	22	4,16

Tabelle 41: Auflistung der Detektionslimits zu den Metaboliten der Blutplasma-Lipidom-Analyse (Quelle: Lipidomix GmbH, Berlin-Buch). Die Metabolite und das dazugehörige Detektionslimit zu jeder Ausgangsfettsäure wurden quantifiziert.

Metabolite	Detektionslimit (ng/ml Plasma)	Metabolite	Detektionslimit (ng/ml Plasma)
<i>9,12-Octadecadiensäure</i>		<i>5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure</i>	
9-HODE	0,59	18-HEPE	0,52
13-HODE	0,30	RvE1	1,24
<i>9,12,15-Octadecatriensäure; 8,11,14-Eicosatriensäure</i>		<i>4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure</i>	
9-HOTrE	0,86	13-HDHA	1,56
13-HOTrE	0,86	14-HDHA	0,28
5-HeTrE	0,21	16-HDHA	0,29
8-HeTrE	0,92	17-HDHA	0,94
12-HeTrE	0,49	20-HDHA	0,44
15-HeTrE	0,51	22-HDHA	0,18
<i>5,8,11,14-Eicosatetraensäure</i>		Maresin 1	0,32
5-HETE	0,41	Maresin 2	0,22
8-HETE	3,12	Maresin 7-epi	0,31
12-HETE	0,67	RvD1	1,84
15-HETE	0,51	RvD1 17(R)	2,50
LTB4	0,28	RvD2	2,40
5(S),12(S)-DiHETE	0,41	RvD3	1,89
5(S),15(S)-DiHETE	0,25	RvD4 17(R,S)	2,50
8(S),15(S)-DiHETE	0,35	RvD5	1,40
<i>5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure</i>		NPD1	0,17
5-HEPE	0,41	NPD-x	0,36
8-HEPE	0,20		
12-HEPE	0,46		
15-HEPE	0,72		
4-HDHA	0,33		
7-HDHA	0,55		
8-HDHA	1,07		
10-HDHA	0,29		
11-HDHA	0,35		

7.4 Rekombinante Reaktionsspezifität des ALOX15b-KI-Enzyms

Tabelle 42: Ergebnisse der Reaktionsspezifität des rekombinanten Maus-Alox15b-Enzyms und ihrer Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante mit verschiedenen PUFAs als Substrat (Quelle: Schäfer et al. 2022). Die Enzyme der Maus-Alox15b (WT) und ihre Tyr603Asp+His604Val-Doppelmutante wurden als N-terminale his-tag-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und Aliquots der bakteriellen Lysatüberstände wurde für *In-vitro*-Aktivitätsassays (100 μ M Substrat) eingesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die primären Reaktionsprodukte mit NaBH₄ reduziert und mittels RP-HPLC analysiert (siehe Kapitel 2). Bei dem Aktivitätsassay mit Arachidonsäure (AA, 100 μ M) des Maus-Alox15b-KI-Enzyms sind *8R-HETE und 15R-HETE gleichzeitig eluiert, daher wird das S-Enantiomer höher sein als der erwähnte Wert. Bei dem Aktivitätsassay mit Docosahexaensäure (DHA, 100 μ M) des Maus-Alox15b-KI-Enzyms sind *10R-HDHA und 14S-HDHA gleichzeitig eluiert, deshalb wird das S-Enantiomer höher sein als der erwähnte Wert. Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben. (AA: Arachidonsäure, DHA: Docosahexaensäure, EPA: Eicosapentaensäure, LA: Linolsäure, n.d.: not determined).

		Alox15b-Wildtyp	Alox15b-Y603D+H604V-Mutante
Substrat	Metabolit	Anteil [%]	Anteil [%]
AA	8-HETE (S:R)	92,87 \pm 0,26 (96,66:3,34)	18,41 \pm 0,76 (79,5:20,5)*
	15-HETE (S:R)	3,85 \pm 0,19 (n.d.)	81,59 \pm 0,76 (94,26:5,74)*
	5-HETE (S:R)	3,28 \pm 0,11 (n.d.)	keine
EPA	8-HEPE (S:R)	92,1 \pm 0,64 (98,02:1,93)	13,89 \pm 0,63 (>99:0)
	15-HEPE (S:R)	7,9 \pm 0,64 (>99:0)	79,64 \pm 0,67 (93,16:6,84)
	12-HEPE (S:R)	keine	6,46 \pm 0,12 (>99:0)
LA	9-HODE (S:R)	90 (84,26:15,74)	10 (0:>99)
	13-HODE (S:R)	2,65 (0:>99)	97,35 (95,45:4,55)
DHA	10- und 14-HDHA (S:R)	64,8 \pm 1,11 (81,17:19,83)*	17,97 \pm 0,39
	17-HDHA (S:R)	19,34 \pm 2,58 (73,22:26,78)	80,24 \pm 0,41 (7,24:22,76)
	7-HDHA (S:R)	9,84 \pm 1,18 (n.d.)	keine

7.5 Morphologische Auffälligkeiten des Blutes von Alox15b-KI-Mäusen

Im Abschnitt 2.3.2.1 wurde darauf hingewiesen, dass Auffälligkeiten in der Morphologie der Blutzellen von Alox15b-KI-Mäusen existierten. Folgend sind diese Besonderheiten quantitativ dargestellt. Die Auswertung ist in Kapitel 4.4.2.2 dargelegt.

Tabelle 43: Auffälligkeiten in der Blutzusammensetzung und Morphologie der Blutzellen von Alox15b-KI-Männchen (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.– 20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (ca. 70. – ca. 80. Woche) (Quelle: eigene Darstellung). Die Anzahl der Vorkommnisse ist in der Tabelle angegeben. Pro Tier können mehrere Auffälligkeiten vorkommen. Lymphozytäre Reizformen waren zu 5 % vertreten. Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert.

Männchen	<i>Alter/Genotyp/Anzahl</i>						<i>Summe</i>
	alt HO (n = 10)	alt WT (n = 8)	mittel HO (n = 6)	mittel WT (n = 6)	jung HO (n = 10)	jung WT (n = 10)	
<i>Auffälligkeit</i>							
Anisozytose	5	-	-	-	1	1	7
Poikilozytose	5	-	-	-	-	-	5
Polychromasie	6	2	-	-	1	1	10
Plättchenaggregate	6	-	-	-	-	-	6
Howell-Jolly-Körperchen	1	-	-	-	1	1	3
Lymph. Reizformen	1	-	-	-	-	-	0
atypische Lymphozyten	-	-	-	-	2	-	2
Plasmazellen	-	-	1	1	-	-	2
Thrombozytenaggregate	-	-	4	3	-	-	7

Tabelle 44: Auffälligkeiten der Blutzusammensetzung und Morphologie der Blutzellen von Alox15b-KI-Weibchen (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.– 20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (ca. 70. – ca. 80. Woche) (Quelle: eigene Darstellung). Die Anzahl der Vorkommnisse ist in der Tabelle angegeben. Pro Tier können mehrere Auffälligkeiten vorkommen. Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert.

Weibchen	<i>Alter/Genotyp/ Anzahl</i>						<i>Summe</i>
	alt HO (n = 6)	alt WT (n = 6)	mittel HO (n = 8)	mittel WT (n = 6)	jung HO (n = 6)	jung WT (n = 6)	
<i>Auffälligkeit</i>							
Anisozytose	3	3	-	-	5	3	14
Poikilozytose	3	3	-	-	5	3	14
Polychromasie	6	4	-	5	5	3	23
Plättchenaggregate	4	3	1	2	-	-	10
Howell-Jolly-Körperchen	1	-	-	-	5	2	8
Lymph. Reizformen	2	-	1	5	-	-	8
atypische Lymphozyten	-	-	-	1	-	-	1
Plasmazellen	-	-	1	3	-	-	4
Thrombozytenaggregate	-	-	5	-	1	-	6
Mikrozytose	-	1	-	-	-	-	1

7.6 Box-Plot-Darstellung und statistische Auswertung aller Blutparameter von Alox15b-KI-Mäusen

Die Abbildungen 49 bis 55 zeigen, anders als im Abschnitt 3.4.9, Box-Plots mit Angabe zur jeweils einbezogenen Tieranzahl. Zudem sind alle Messparameter wie Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, das korpuskuläre Volumen (MCV), das korpuskuläre Hämoglobin (MCH) und die korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Thrombozyten, Stabkernige Neutrophile, segmentkernige Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Basophile, Retikulozyten dargestellt und berechnet worden (siehe Abschnitt 2.3.2.1).

Um zu überprüfen, ob eine Gleichheit zwischen den Genotypen im jeweiligen Alter vorliegt (Nullhypothese, H_0), wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau liegt dabei bei $\alpha = 0,05$. Es handelt sich um eine ungerichtete Hypothese. Die Effektstärke r wurde mit folgender Formel berechnet und bewertet (Field 2018):

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right| \quad (4)$$

$0,1 \leq r < 0,3$	schwacher Effekt
$0,3 \leq r < 0,5$	mittlerer Effekt
$r > 0,5$	starker Effekt

Auswertung der weiblichen Blutwerte:

Bei den Weibchen haben sich die Blutwerte in den Altersgruppen zwischen den Genotypen dreimal signifikant unterschieden. In der Stichprobe unterschieden sich Leukozyten, segmentkernige Neutrophile und Lymphozyten im mittleren Alter signifikant. Die Werte der homozygoten Tiere waren höher.

Statistische Auswertung:

*Leukozyten_Homozygot: Wildtyp: $U (N1= 6, N2 = 8) = 7; p = 0,029; Z = -2,202; r = 0,6$
= starker Effekt*

*Segmentkernigen Neutrophile_Homozygot: Wildtyp: $U (N1= 6, N2 = 8) = 7; p = 0,029;$
 $Z = 2,222; r = 0,6$ = starker Effekt*

*Lymphozyten_Homozygot: Wildtyp: $U (N1= 6, N2 = 8) = 4; p = 0,008; Z = 2,585; r = 0,7$
= starker Effekt*

Stabkernige Neutrophile waren gar nicht vorhanden und Basophile waren als drei Einzelwerte in der mittleren und alten Altersklasse vertreten (Wert = 0,1 [1000/ μ l]). Die Nullhypothese, dass Gleichheit zwischen den Genotypen vorliegt, kann bei den weiblichen Mäusen im Alter von 30–40 Wochen für die drei Parameter abgelehnt werden. Ein Effekt bezüglich des genetisch veränderten Alox15b-Enzyms kann hierbei weder sicher bestätigt noch abgelehnt werden.

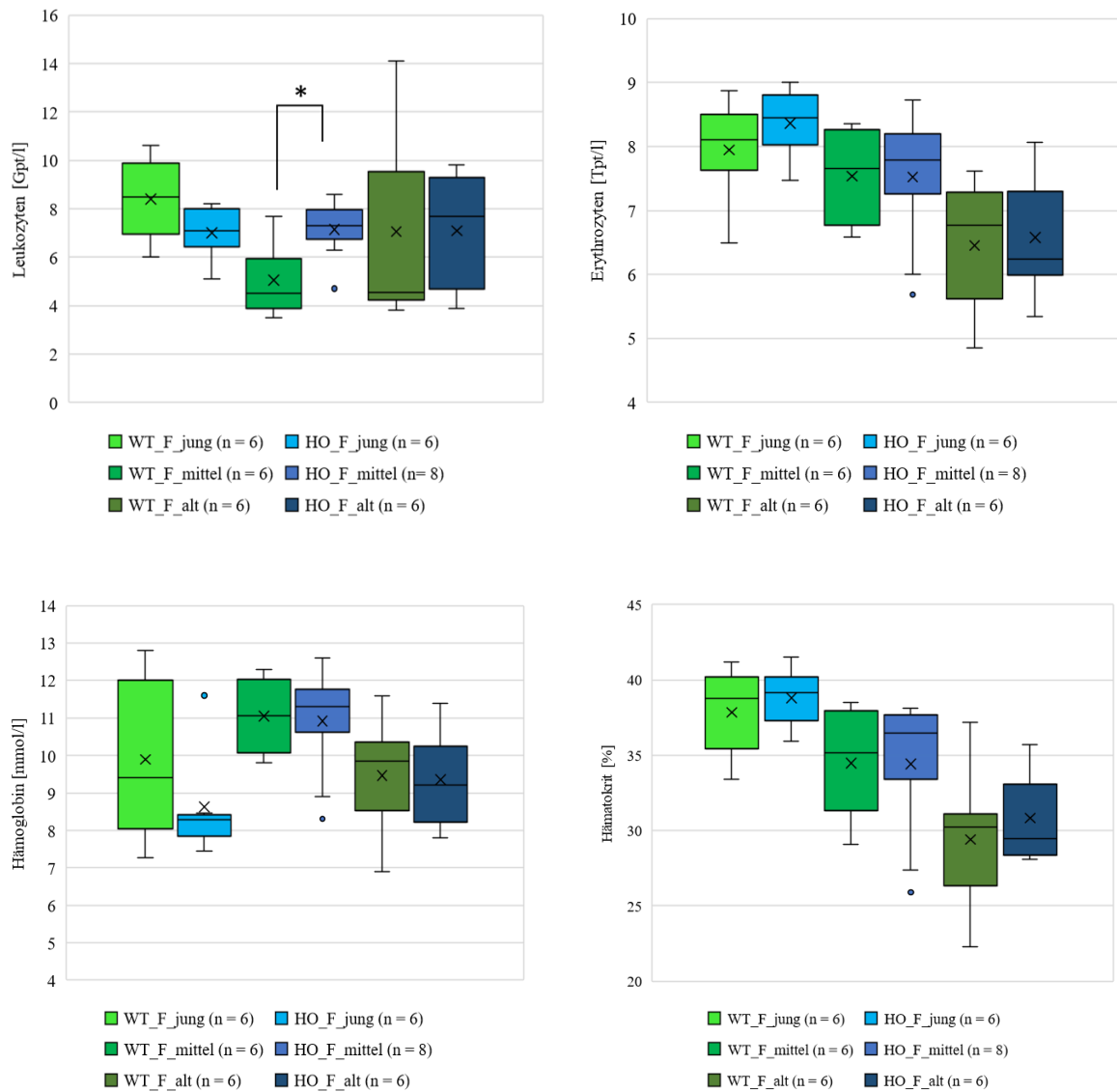


Abbildung 49: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (75.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot; mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). F = feminin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

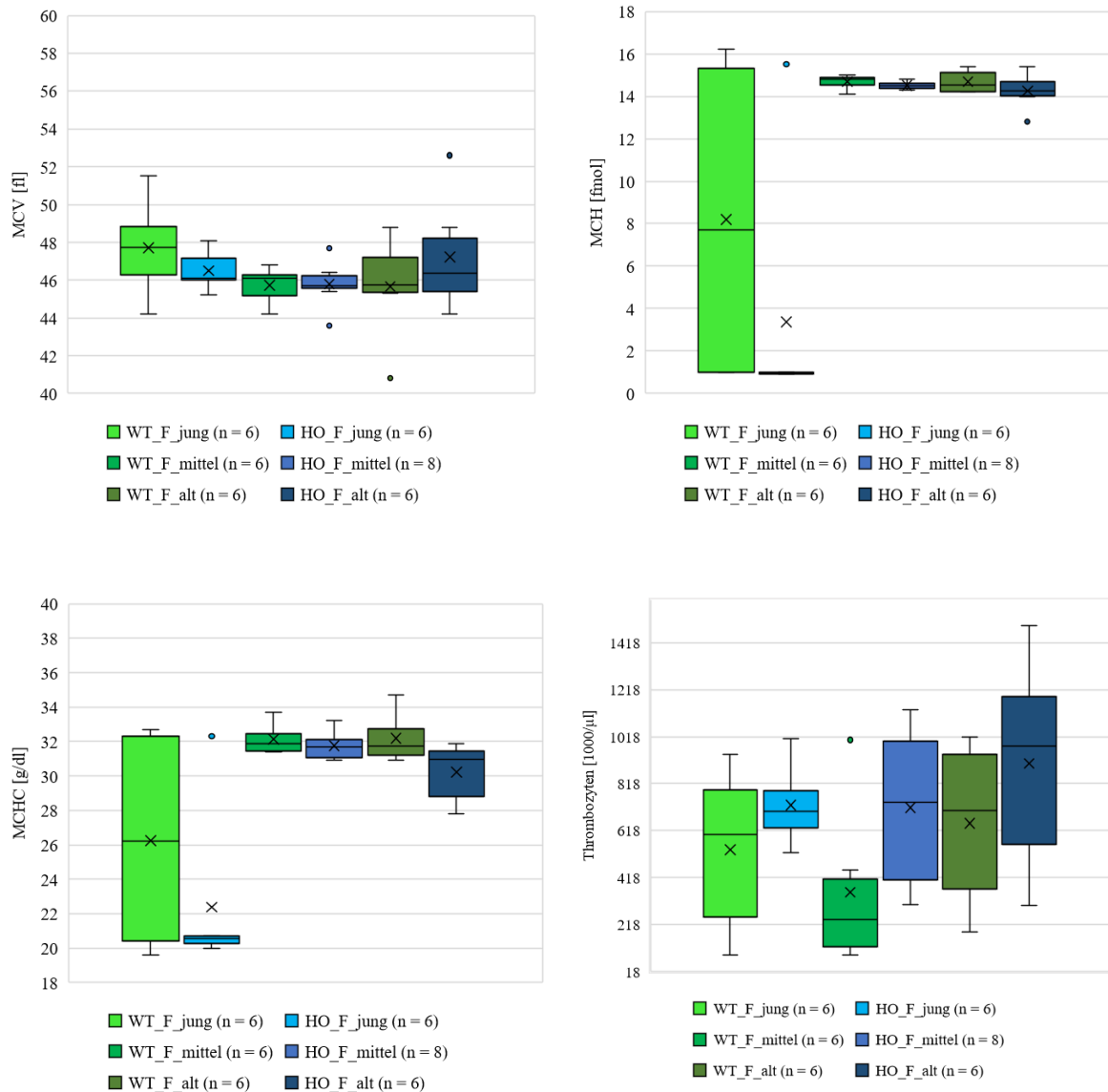


Abbildung 50: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (75.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Anästhesie wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). F = feminin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

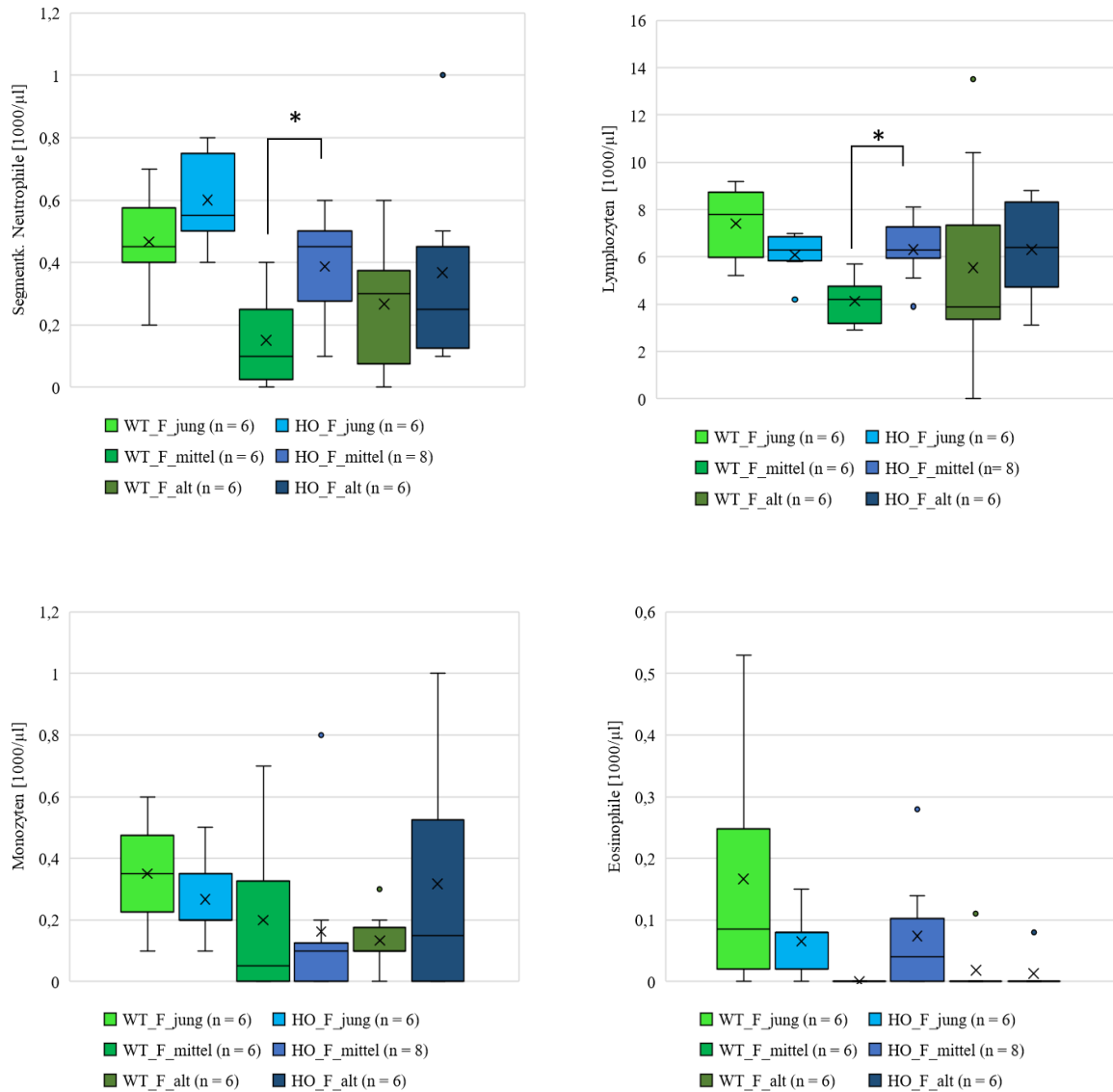


Abbildung 51: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den aufgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (75.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). F = feminin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

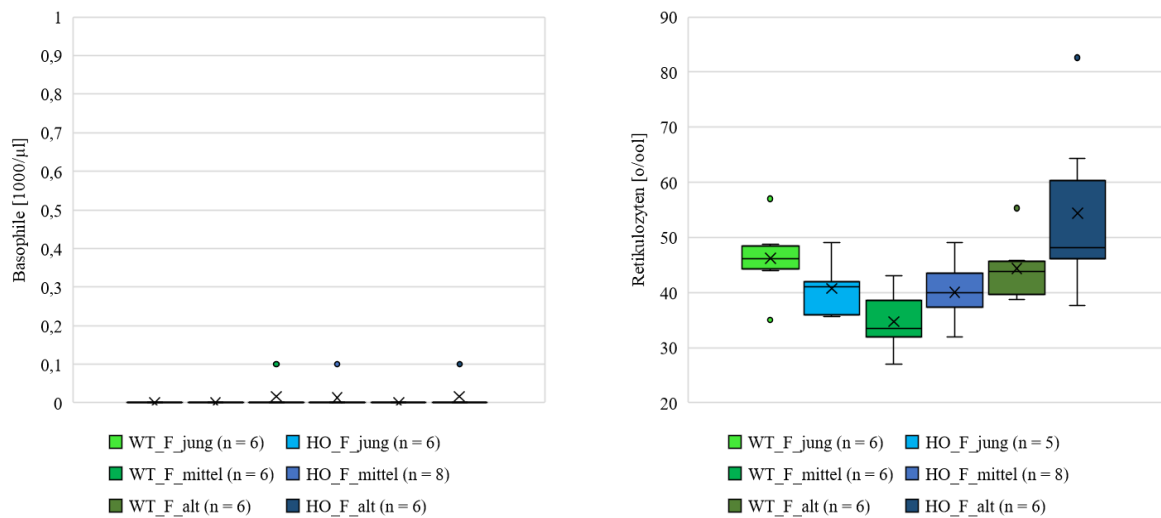


Abbildung 52: Blutwerte der weiblichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den aufgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (75.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). F = feminin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

Auswertung der männlichen Blutwerte:

Bei den männlichen Tieren unterschieden sich Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit im hohen Alter und Eosinophile im jungen Alter signifikant voneinander (siehe Abschnitt 3.4.8). Die Messwerte der aufgekreuzten Wildtyp-Stichproben waren dabei immer höher gewesen.

Statistische Auswertung:

*Erythrozyten_ alt WT: alt HO: $U(N1 = 8, N2 = 10) = 16; Z = -2,13; p = 0,03; r = 0,5$
= mittlerer Effekt*

*Hämoglobin_ alt WT: alt HO: $U(N1 = 8, N2 = 10) = 14,5; Z = -2,27; p = 0,02; r = 0,5$
= mittlerer Effekt*

*Hämatokrit_ alt WT: alt HO: $U(N1 = 8, N2 = 10) = 16; Z = -2,14; p = 0,03; r = 0,5$
= mittlerer Effekt*

*Eosinophile_ jung WT: jung HO: $U(N1 = 10, N2 = 10) = 8,5; Z = -3,17; p = 0,001; r = 0,7$
= starker Effekt*

Die Nullhypothese, dass Gleichheit zwischen den Genotypen im jeweiligen Alter vorliegt, kann bei den vier Parametern abgelehnt werden.

Stabkernige Neutrophile waren nur als Einzelwerte bei jungen homozygoten Tieren zu beobachten (Wert: 0,1 und 3,7). Basophile waren in allen Stichproben vereinzelt vertreten. Somit war ihre Anzahl höher als bei den Weibchen.

Die signifikanten Unterschiede beider Geschlechter treten bei unterschiedlichen Blutparametern, unterschiedlichem Alter und Genotyp auf. Eine klare Aussage bezüglich der humanisierten Reaktionsspezifität von Alox15b in Mäusen lassen diese Ergebnisse nicht zu. In der Diskussion (Abschnitt 4.4.2.2) wird auf mögliche Zusammenhänge mit anderen Experimenten dieser Arbeit eingegangen.

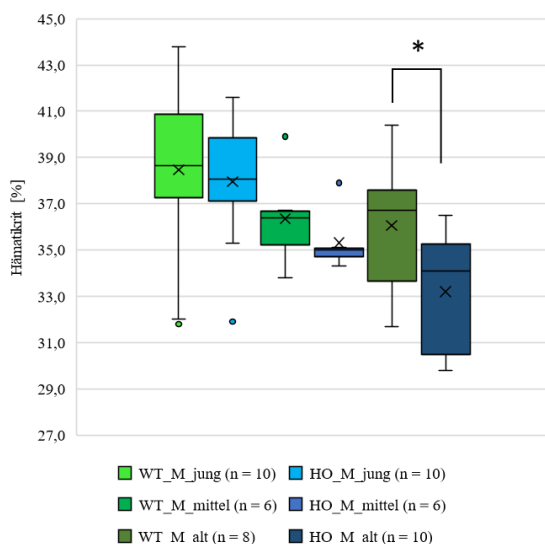
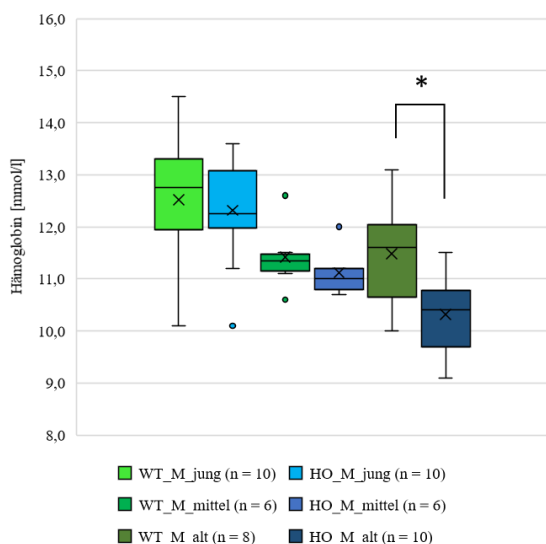
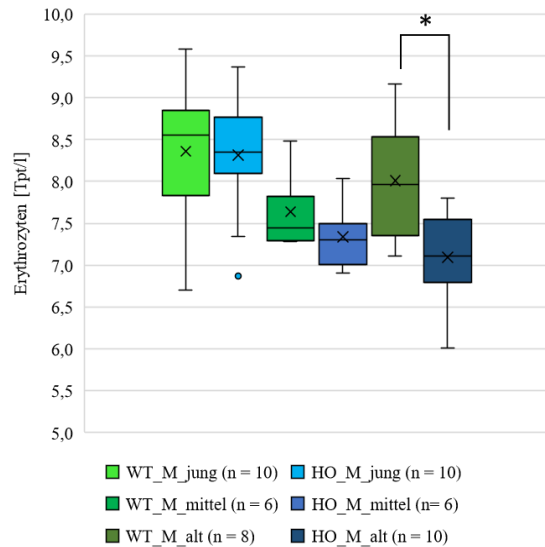
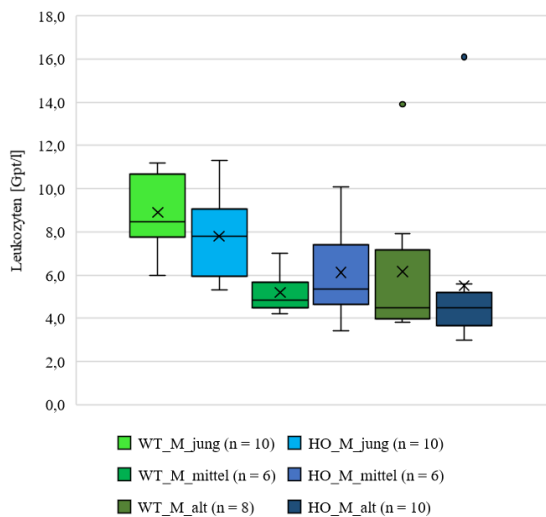


Abbildung 53: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (68.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot; mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). M = maskulin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

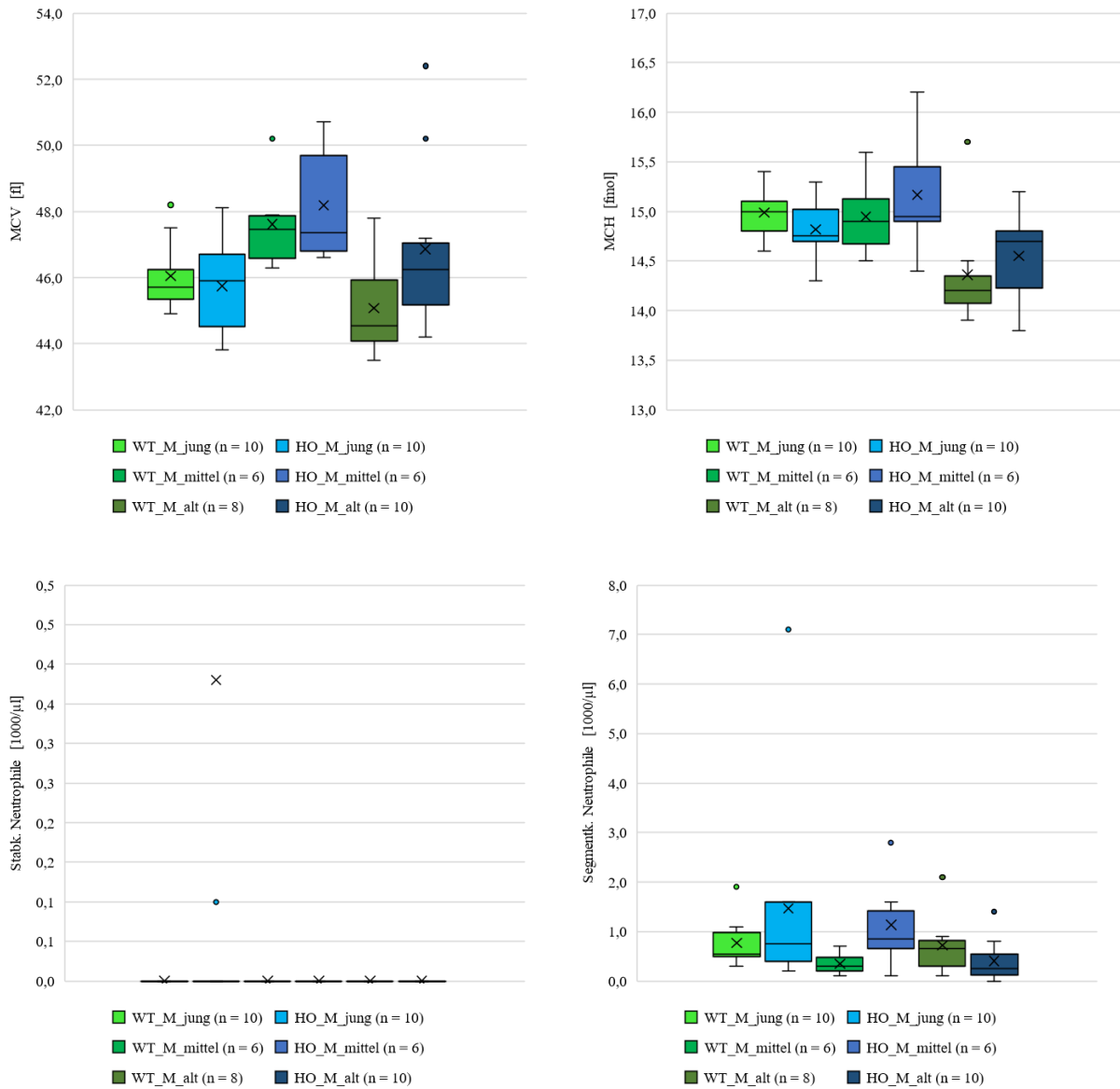


Abbildung 54: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (68.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). M = maskulin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

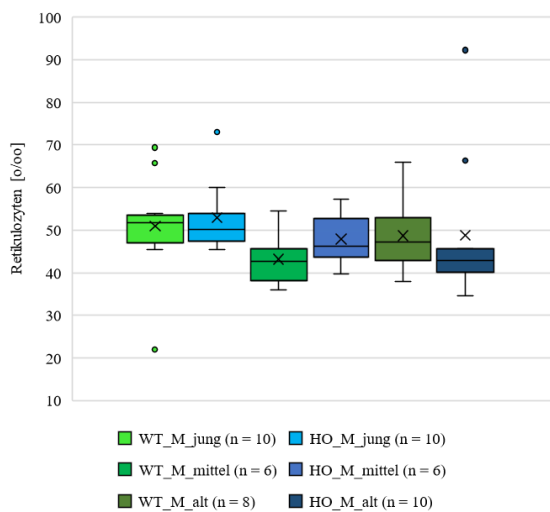
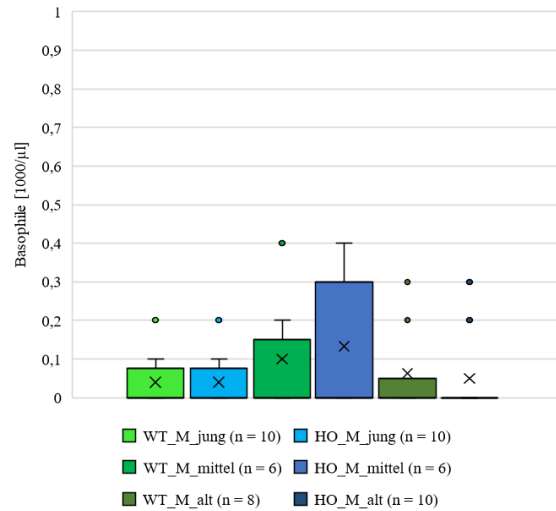
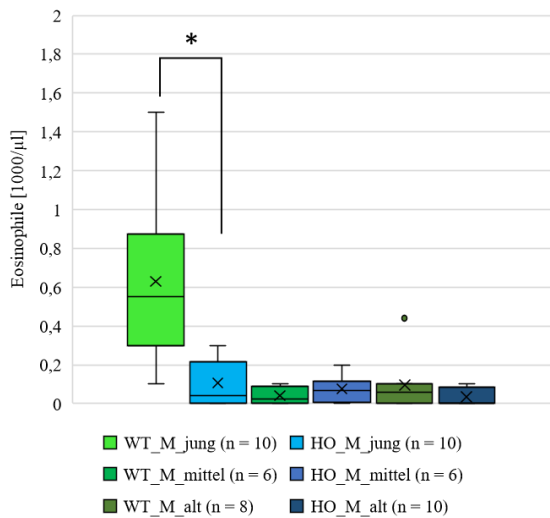
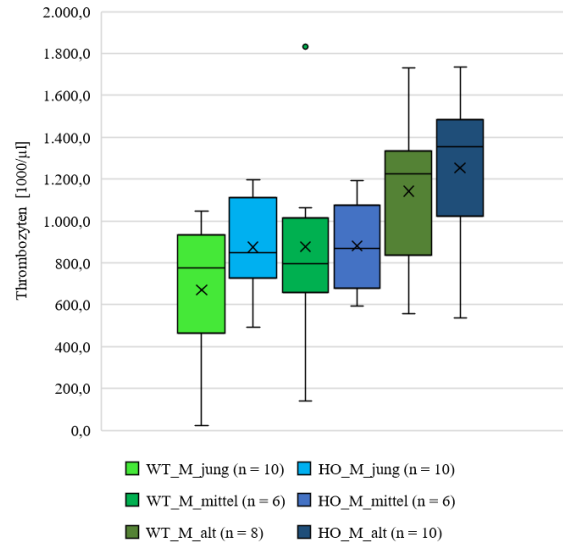
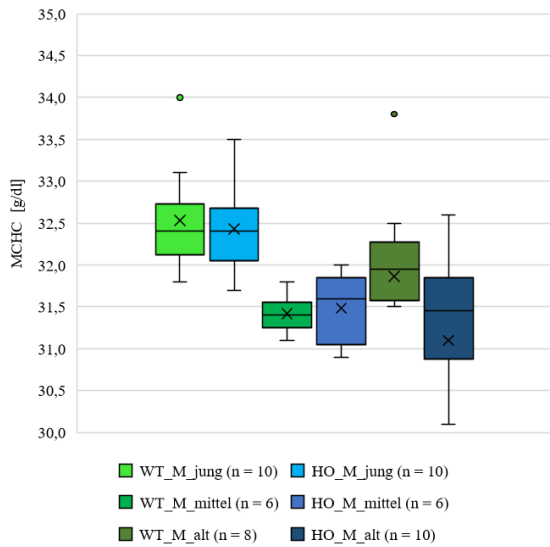


Abbildung 55: Blutwerte der männlichen Alox15b-KI-Mäuse (HO) im Vergleich zu den ausgekreuzten Wildtyp-Tieren (WT) in jungem (10.–20. Woche), mittlerem (30.–40. Woche) und hohem Alter (68.–77. Woche) dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median und einzelnen Ausreißern als Datenpunkte (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurden 0,5 ml EDTA-Blut mit Hohlvenen-/Herzpunktion entnommen und im Labor (IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR) analysiert. Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). M = maskulin, n = Tieranzahl, * = signifikanter Unterschied in der Altersgruppe.

7.7 Histologischer Schnitt von der Haut einer Alox15b-KI-Maus

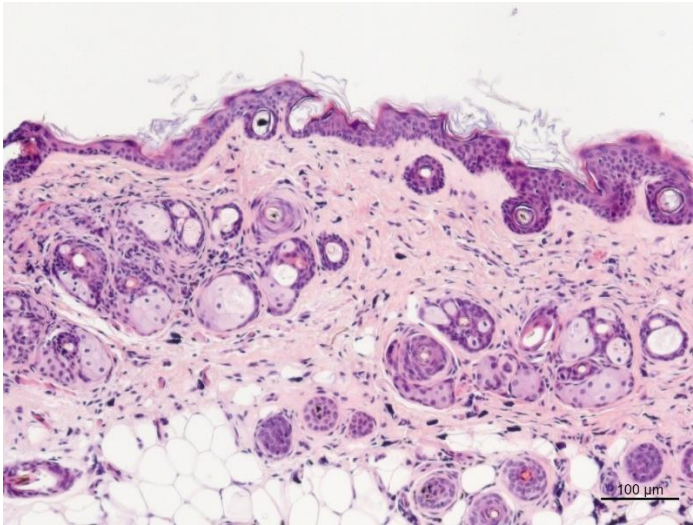


Abbildung 56: Histologischer Schnitt mit HE-Färbung von der Rückenhaut einer Alox15b-KI-Maus (Quelle: iPATH Charité, Berlin). Die Haut stammte von einer kahlen Stelle der Rückenhaut, die durch Barbering-Verhalten oder als Alterserscheinung aufgetreten ist. Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose wurde die Haut entnommen, in 4 % Paraformaldehyd fixiert und in der Core-Unit iPATH der Charité, Berlin histologisch aufgearbeitet und gefärbt. Die einfache Begutachtung des Schnitts zeigte keine Besonderheiten. Auflösung: 100-fach, Maßstab: unten rechts, 100 µm.

7.8 Ergänzende Daten zur osmolaren Stabilität der Erythrozyten

Die hier gezeigte Tabelle 45, mit Angabe zur jeweils einbezogenen Tieranzahl, dient als Ergänzung zu der in Abbildung 34 (Abschnitt 3.4.9) dargestellten Kurvenverläufe zur osmotischen Resistenz von Alox15b-KI-Erythrozyten.

Tabelle 45: Anzahl der einbezogenen Tiere in die Berechnung zur osmotischen Resistenz von Alox15b-KI-Erythrozyten und der ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollen verschiedener Alterskategorien (Quelle: eigene Daten und Darstellung).

	Weibchen-Anzahl		
Alter	Jung (10.–20. Woche)	Mittel (30.–40. Woche)	Alt (ca. 70.– ca. 80. Woche)
Wildtyp	8	6	5
Alox15b-KI	8	7	6
	Männchen-Anzahl		
Alter	Jung (10.–20. Woche)	Mittel (30.–40. Woche)	Alt (ca. 70.– ca. 80. Woche)
Wildtyp	9	6	8
Alox15b-KI	11	6	10

7.9 Alleinfuttermittelzusammensetzung der humanisierten Alox15b-KI-Mäuse

Die Futtermittelzusammensetzung kann auch einen Beitrag zur Körpergewichtsentwicklung (Abschnitte 3.4.7 und 3.5.1.1.1) haben und wird deshalb angeführt.

Futtermittelzusammensetzung:

- Zuchtfuttermittel: Ssniff V1124-300 (10 mm Pelets), 10 kg Sack (Ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest)
- Alleinfuttermittel: Ssniff V1534-300 (10 mm Pelets), 10 kg Sack (Ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest)

Tabelle 46: Futtermittelzusammensetzung der verwendeten Alleinfuttermittel für die humanisierten Alox15b-KI-Mäuse. Beide Futtersorten beinhalten noch weitere Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe [mg/kg Futter]. Diese sind aber für die Auswertung der Tierversuche nicht weiter von Relevanz gewesen.

	Zuchtfuttermittel	Alleinfuttermittel
<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Anteil [%]</i>	<i>Anteil [%]</i>
Rohprotein	22,0	19,0
Rohfett	4,5	3,3
Rohfaser	3,9	4,9
Rohasche	6,7	6,4
Calcium	1,0	1,0
Phosphor	0,7	0,7

7.10 Ergänzende Daten zu den Vorversuchen des DSS-Kolitismodells

Die Ergebnisse der Vorversuche bilden die Ausgangslage für die DSS-Kolitis im Hauptversuch in Abschnitt 3.5.1 ff. Der 1. Vorversuch mit 1,5 % DSS zeigte nur eine leichte Gewichtsreduktion von 6 % und keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Genotypen. Deshalb wurde die Konzentration auf 2 % DSS im 2. Vorversuch erhöht. Dabei hat sich das Gewicht um 10–14 % reduziert und war trotzdem konform den Tierschutzregeln (Abbildungen 57 und 58). Große Unterschiede zwischen den Genotypen waren auch hier nicht zu erkennen. Eine extra Kontrollgruppe (n = 4) entstand, da die einbezogenen Tiere Überschuss waren und hierbei sinnvoll genutzt werden konnten. Während des Versuches ließ sich auch eine Reduktion der Kolonlänge um 10–14 mm beobachten.

Tabelle 47: Datentabelle vom 1,5 % DSS-Vorversuch der Alox15b-KI-Mäuse (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Vom 1.–6. Tag des experimentellen Protokolls wurde 1,5%iges DSS im Trinkwasser *ad libitum* verabreicht. Nach zwei weiteren Tagen ohne DSS-Wasser wurden die Tiere (n = 3) durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet und die Kolonlänge und das Kolongewicht bestimmt (siehe Kapitel 2). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

1,5 % DSS-Vorversuch (n = 3)	<i>Alox15b-KI</i> Tag 0	<i>Alox15b-KI</i> Tag 8	<i>Wildtyp</i> Tag 0	<i>Wildtyp</i> Tag 8
Relatives Körpergewicht [%]	100,0 ± 0	94,0 ± 5,9	100,0 ± 0	93,5 ± 3,2
Absolutes Körpergewicht [g]	20,4 ± 1,5	19,2 ± 2,9	22,0 ± 1,5	20,5 ± 1,2
Alter [Wochen]		13,0 ± 0		13,1 ± 0,2
Kolonlänge [cm]		5,43 ± 1,58		5,83 ± 0,31
Kolongewicht [g]		0,26 ± 0,05		0,22 ± 0,04

Tabelle 48: Datentabelle vom 2 % DSS-Vorversuch der Alox15b-KI-Mäuse (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Vom 1.–6. Tag des experimentellen Protokolls wurde 2%iges DSS im Trinkwasser (Alox15b-KI n = 3) oder DSS-freies Trinkwasser (Kontrolle n = 4) *ad libitum* verabreicht. Nach zwei weiteren Tagen ohne DSS-Wasser wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet und die Kolonlänge und das Kolongewicht bestimmt (siehe Kapitel 2). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

2 % DSS-Vorversuch (n = 3)	<i>Alox15b-KI</i> Tag 0	<i>Alox15b-KI</i> Tag 8	<i>Wildtyp</i> Tag 0	<i>Wildtyp</i> Tag 8
Relatives Körpergewicht [%]	100,0 ± 0	89,8 ± 3,8	100,0 ± 0	86,5 ± 2,5
Absolutes Körpergewicht [g]	22,4 ± 1,5	20,1 ± 1,8	22,1 ± 1,2	19,1 ± 1,7
Alter [Wochen]		15,4 ± 0,2		15,4 ± 0
Kolonlänge [cm]		5,57 ± 0,12		5,63 ± 0,65
Kolongewicht [g]		0,25 ± 0,03		0,21 ± 0,04
Kontrollen, ohne DSS (n = 4)	<i>Alox15b-KI</i> Tag 0	<i>Alox15b-KI</i> Tag 8	<i>Wildtyp</i> Tag 0	<i>Wildtyp</i> Tag 8
Relatives Körpergewicht [%]	100,0 ± 0	102,8 ± 3,3	100,0 ± 0	100,8 ± 0,9
Absolutes Körpergewicht [g]	22,7 ± 0,6	22,9 ± 0,4	21,9 ± 1,2	22,5 ± 0,9
Alter [Wochen]		14,9 ± 0,4		14,0 ± 1,5
Kolonlänge [cm]		6,97 ± 0,25		6,67 ± 0,29
Kolongewicht [g]		0,21 ± 0,03		0,19 ± 0,03

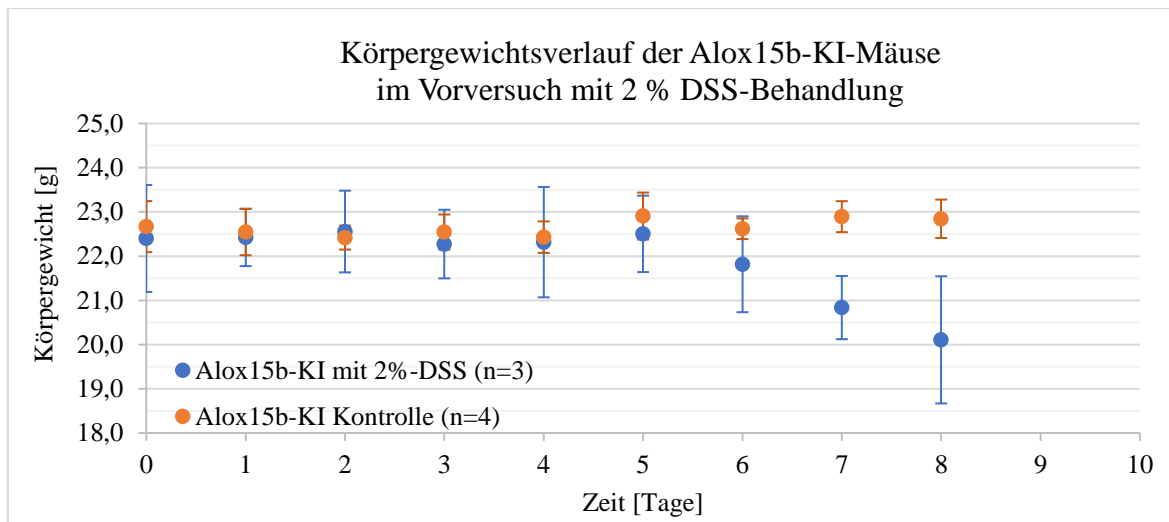


Abbildung 57: Absolute Körpergewichtskinetiken von Alox15b-KI-Mäusen im Vorversuch unter 2 % DSS-Behandlung (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Es wurde versucht eine Kolitis mit 2 % DSS im Trinkwasser in Alox15b-KI-Mäusen zu induzieren. Täglich wurde das Körpergewicht gemessen. Vom 1.–6. Tag des experimentellen Protokolls wurde 2%iges DSS im Trinkwasser (Alox15b-KI n = 3) *ad libitum* verabreicht. Die Kontroll-Gruppe mit n = 4 Tieren wurde nur mit normalem Wasser *ad libitum* getränkt. Nach zwei weiteren Tagen nur mit normalem Wasser *ad libitum* wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet. Das Kolon wurde entnommen und aufgearbeitet (siehe Kapitel 2). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

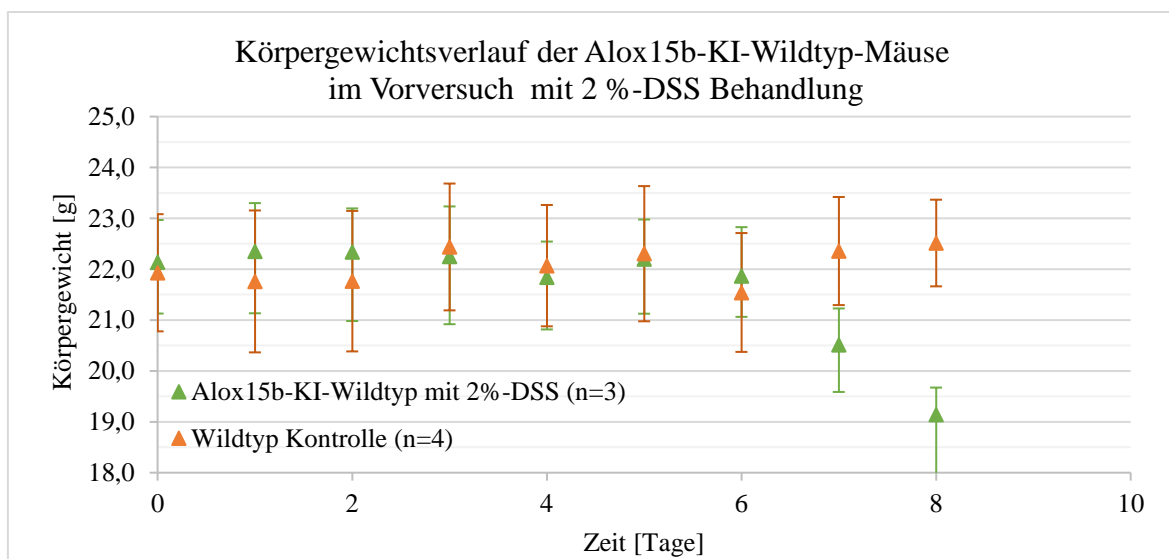


Abbildung 58: Absolute Körpergewichtskinetiken der ausgekreuzten Alox15b-KI-Wildtyp-Mäuse im Vorversuch unter 2 % DSS-Behandlung (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Es wurde versucht eine Kolitis mit 2 % DSS im Trinkwasser in Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen zu induzieren. Täglich wurde das Körpergewicht gemessen. Vom 1.–6. Tag des experimentellen Protokolls wurde 2%iges DSS im Trinkwasser (Alox15b-KI-WT n = 3) *ad libitum* verabreicht. Die Kontroll-Gruppe mit n = 4 Tieren wurde nur mit normalem Wasser *ad libitum* getränkt. Nach zwei weiteren Tagen nur mit normalem Wasser *ad libitum* wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet. Das Kolon wurde entnommen und aufgearbeitet (siehe Kapitel 2). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. .

7.11 Ergänzende Auswertung des DSS-Kolitismodells

Zur Ergänzung und Vollständigkeit sind die absoluten und relativen Messwerte sowie eine statistische Auswertung zum Hauptversuch der DSS-Kolitis aufgelistet. Die Gruppengröße der Kontrollen variiert von $n = 6$, bei den eigentlichen Kontrollen je Versuchsgruppe, $n = 18$ bei der Summation von allen Kontrollgruppen im Hauptversuch und $n = 21$ bei der Summation von allen Kontrollgruppen im Hauptversuch und dem Vorversuch ($n = 3$).

Zum Vergleich des Körpergewichts wurde die dazugehörige Kontrollgruppe je Untersuchungszeitraum gewählt, damit eine gleiche Tieranzahl vorlag.

Beim Vergleich der Kolonlängen/-gewichte wurde $n = 18$ als Kontrollgruppengröße gewählt, um einen soliden Basiswert zu erhalten. Die Messfehler lagen bei $\pm 0,5$ mm vom Lineal und $\pm 0,01$ mg von der Waage. Der Einfluss der Variabilität der Tiergruppen sollte dadurch verkleinert und die Auswirkungen der induzierten Entzündung nachweisbarer werden.

Die Größe der Kontrollgruppe $n = 21$ (Summe aus $n = 18$ Hauptversuch + $n = 3$ Vorversuch) und der Akutphase der Alox15b-KI-Tiere $n = 12$ ($n = 9$ Hauptversuch + $n = 3$ Vorversuch) sowie der Akutphase der Alox15b-KI-WT-Tiere mit $n = 9$ ($n = 6$ Hauptversuch + $n = 3$ Vorversuch) wurde gewählt, weil andere Methoden und Maßeinheiten für die Analyse der Metabolite verwendet wurden. Durch das Zusammenlegen der Gruppen werden die Aussagen genauer, da sie weniger durch Ausreißer oder Intraspeziesvariabilität beeinflusst werden. Zu beachten gilt, dass die Tiere der Vorversuche an anderen Versuchstagen (Tag 8) getötet wurden als die Tiere des Hauptversuches (Tag 7) und dies bei den anderen Zielgrößen einen Einfluss hätte ausüben können. Bei den Metaboliten war es entscheidender herauszuarbeiten, ob sich die Metabolitenzusammensetzung ändert und ob Unterschiede zwischen den Genotypen auftreten. Die unterschiedliche Gruppengröße hat auch einen Effekt auf die Statistik und sollte deshalb bei der Dateninterpretation immer berücksichtigt werden.

7.11.1 Körpergewichtskinetiken getrennt in 7-Tage- und 15-Tage-Gruppen

In Abbildung 59–62 sind die absoluten Körpergewichtsdaten zu den Versuchsgruppen 7-Tage und 15-Tage im DSS-Versuch im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen dargestellt. Es handelt sich dabei, wie im Methodenteil beschrieben, um unterschiedliche Gruppen. Bei allen Kontrollgruppen zeigt das Körpergewicht einen normalen, relativ konstanten Verlauf. Die Messwerte überschneiden sich zwischen den 15-Tage-Gruppen mehr als bei den 7-Tage-Gruppen. Das ist aber eine normale Variabilität.

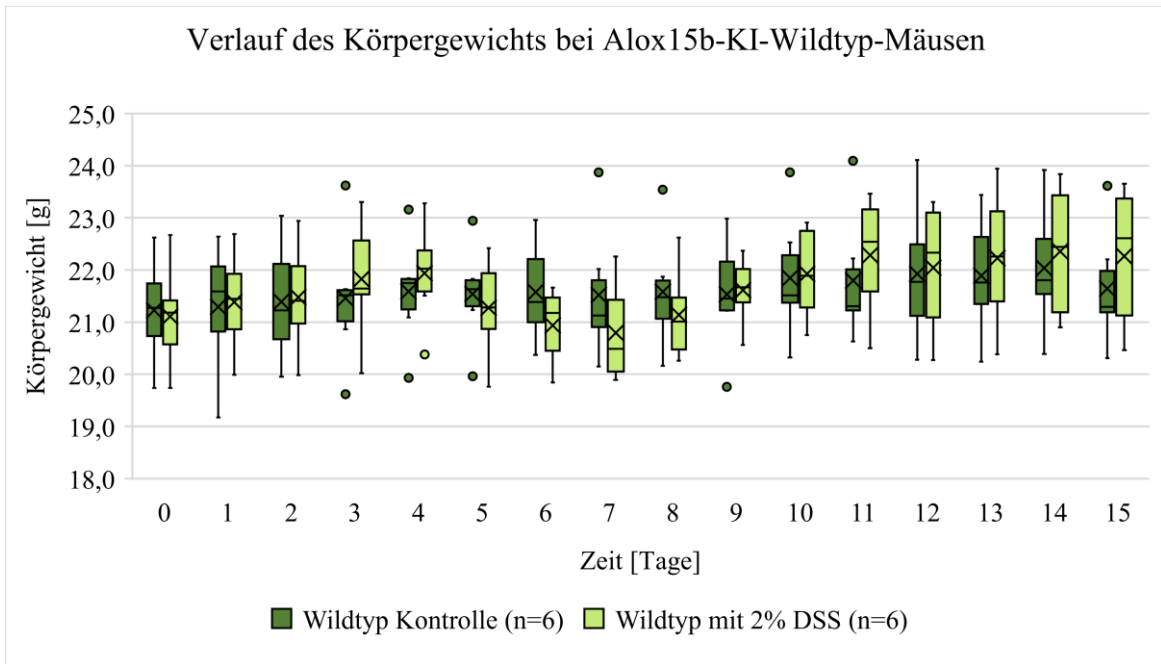


Abbildung 59: Vergleich Körpergewichtsveränderung von ausgekreuzten Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 15 Tagen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median (= Linie) und einzelnen Ausreißern (°). Von Tag 0–5 wurde *ad libitum* im Trinkwasser 2%iges DSS verabreicht und danach aus Tierschutzgründen abgesetzt. Die Tiere wurden von Tag 0–15 täglich gewogen und danach durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet (siehe Kapitel 2).

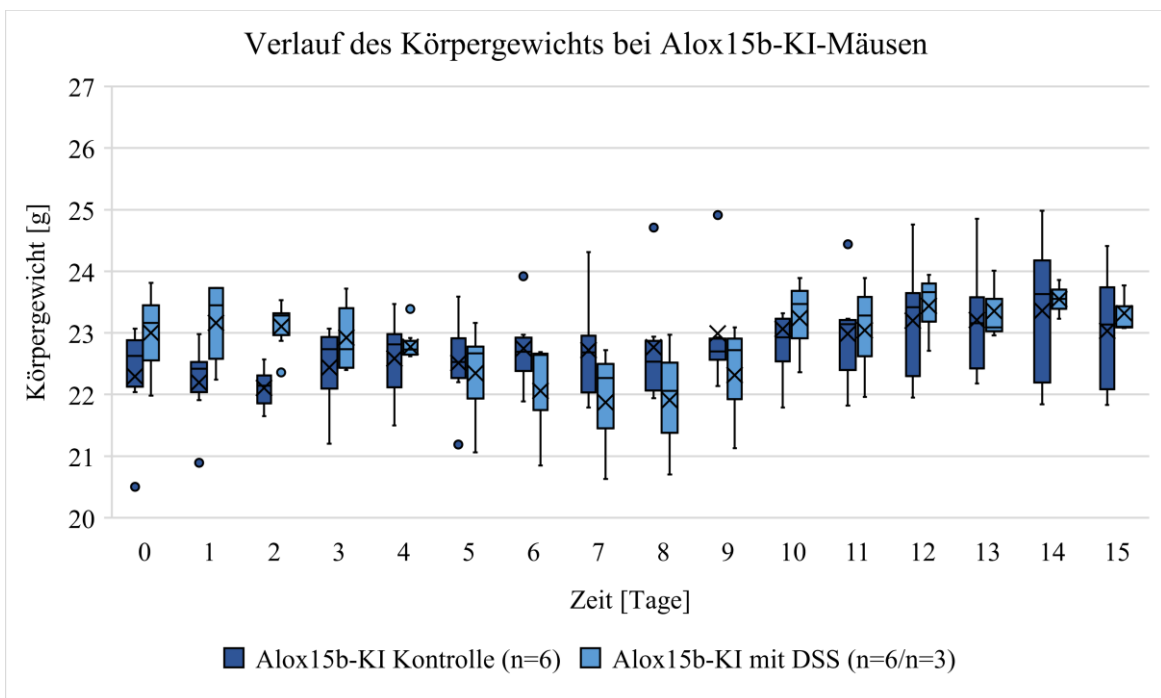


Abbildung 60: Vergleich der Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 15 Tagen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median (= Linie) und einzelnen Ausreißern (°). Von Tag 0–5 wurde *ad libitum* im Trinkwasser 2%iges DSS verabreicht und danach aus Tierschutzgründen abgesetzt. Aufgrund des Tierschutzes wurden 3 von 6 homozygote Tiere am Tag 5 aus dem Versuch genommen und daraufhin das DSS abgesetzt. Die Tiere wurden von Tag 0–15 täglich gewogen und danach durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet (siehe Kapitel 2).

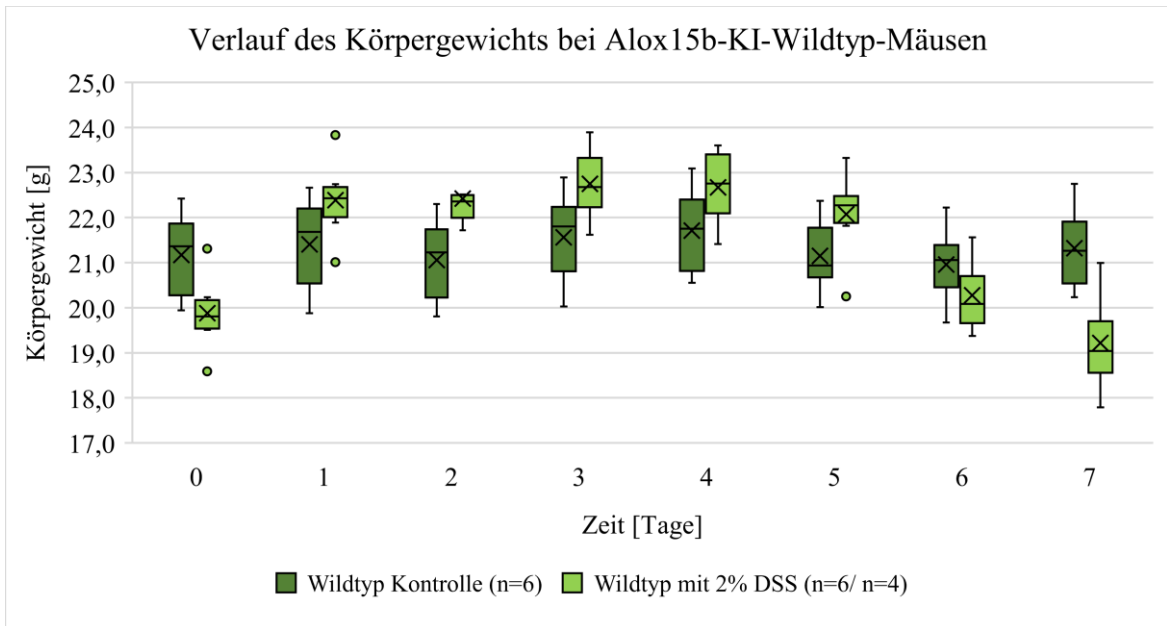


Abbildung 61: Vergleich der Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 7 Tagen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median (= Linie) und einzelnen Ausreißern (°). Von Tag 0–5 wurde *ad libitum* im Trinkwasser 2%iges DSS verabreicht und danach aus Tierschutzgründen abgesetzt. Aufgrund des Tierschutzes wurden 2 von 6 Wildtyp-Tiere am Tag 5 aus dem Versuch genommen und daraufhin das DSS abgesetzt. Die Tiere wurden von Tag 0–7 täglich gewogen und danach durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet (siehe Kapitel 2).

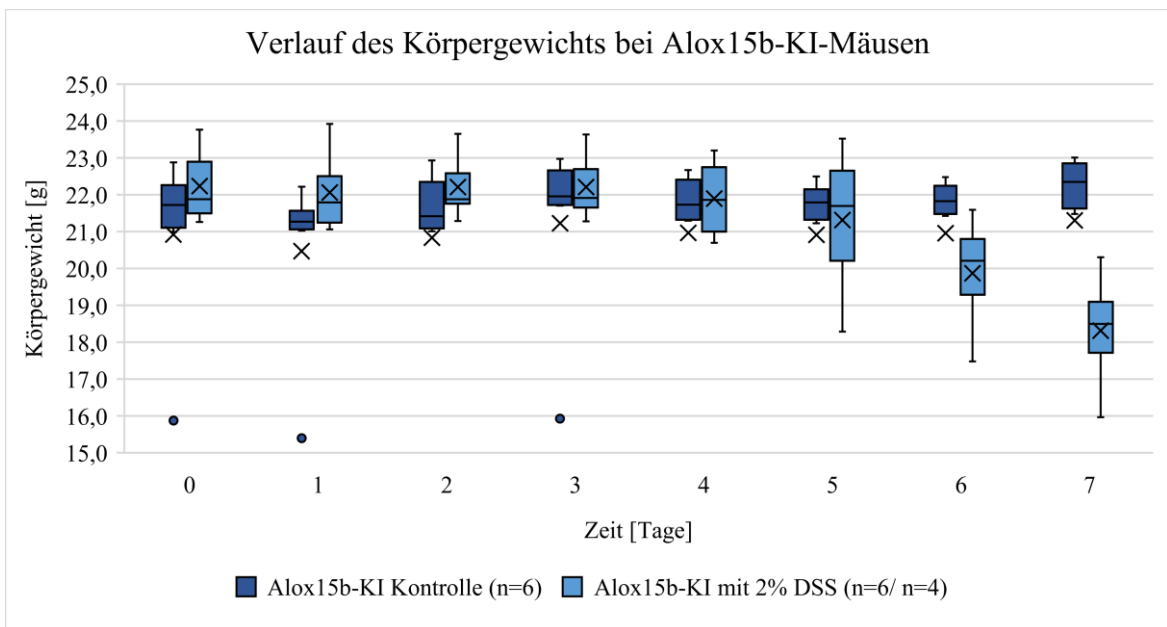


Abbildung 62: Vergleich der Körpergewichtsveränderung von Alox15b-KI-Mäusen im DSS-Kolitismodell im Verlauf von 7 Tagen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Dargestellt als Box-Plot mit Mittelwertmarkierung (x), inklusive Median (= Linie) und einzelnen Ausreißern (°). Von Tag 0–5 wurde *ad libitum* im Trinkwasser 2%iges DSS verabreicht und danach aus Tierschutzgründen abgesetzt. Aufgrund des Tierschutzes wurden 2 von 6 Tiere am Tag 5 aus dem Versuch genommen und daraufhin das DSS abgesetzt. Die Tiere wurden von Tag 0–7 täglich gewogen und danach durch zervikale Dislokation unter Isoflurannarkose getötet (siehe Kapitel 2).

7.11.2 Daten zu Kolonlänge und Kolongewicht

Tabelle 49 stellt die absolute und relative Veränderung von Gewicht und Länge des Kolons im DSS-Kolitismodell dar.

Tabelle 49: Gegenüberstellung von Kolonlänge und Kolongewicht in den verschiedenen Versuchsgruppen (zusammengefasste, unbehandelte Kontrollen, Akutphase, Heilungsphase) von homozygoten Alox15b-KI-Mäusen und dem ausgekreuzten Wildtyp im DSS-Kolitismodell, (MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Tiere) (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung).

Alox15b-KI homozygot			Kontrolle	Akutphase	Heilungsphase
			(n = 18)	(n = 9)	(n = 3)
Alox15b-KI Wildtyp	Kolonlänge	MW ± SD [cm]	6,48 ± 0,44	4,78 ± 0,42	6,40 ± 0,46
		Relative Veränderung [%]	100,00	73,76	98,80
	Kolongewicht	MW ± SD [g]	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,03
		Relative Veränderung [%]	100,00	93,27	104,01

Tabelle 50 listet die Effektstärke und die p-Werte der statistischen Auswertung des Kolonlängen- und Kolongewicht-Vergleichs. Um zu überprüfen, ob eine Gleichheit zwischen den Genotypen und den Versuchsgruppen in der Stichprobe vorliegt (H_0), wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben in SPSS (IBM SPSS Statistics 26) angewandt. Das Signifikanzniveau liegt dabei bei $\alpha = 0,05$. Es handelt sich um eine ungerichtete Hypothese. Zur Berechnung der Power wurde zuerst der Z-Wert in die Effektstärke nach Cohens d, mit dem Online-Tool (<https://www.psychometrica.de/effektstaerke.html> (Stand: 12.2021), Wolfgang Lenhard and Alexandra Lenhard 2017) umgerechnet und dann mit dem G-Power-Programm (GPower 3.1) berechnet. Die Prüfgrößen des Mann-Whitney-U-Test lassen sich in die Effektstärke umrechnen (Fritz et al. 2012; Cohen 2013). Die Effektstärke „r“ (Pearson Korrelationskoeffizient) wurde mit folgender Formel berechnet und bewertet (Field 2018, siehe Kapitel 7.6):

$$r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right| \quad (5)$$

Es wurden die jeweiligen Behandlungsgruppen und Genotypen untereinander getestet. Die Kontrollen wurden gegeneinander verglichen, um zu überprüfen, ob die Mutation der murinen Alox15b bereits ohne Entzündungsinduktion Effekte zeigt.

Tabelle 50: Statistische Auswertung von Kolonlänge und Kolongewicht in den verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrolle: ohne DSS; 7 Tage: mit DSS; 15 Tage: mit DSS) von homozygoten Alox15b-KI-Mäusen (HO) und dem ausgekreuzten Wildtyp (WT) im DSS-Kolitismodell (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test unter der Annahme von zwei unabhängigen Stichproben, berechnet in SPSS: Signifikanz: $\alpha < 0,05$ (Cohen 1992). (HO: Homozygot, WT: Wildtyp, n: Anzahl, Post-Hoc Power: $(1 - \beta)$, zweiseitig, mit Berechnung in G Power).

Mann-Whitney-U-Test-Vergleich der Kolonlängen						
	U-Wert	p-Wert	Z-Wert	r-Wert		Power (1-β) post hoc
WT Kontrolle (n = 18): HO Kontrolle (n = 18)	118,5	0,171	-1,382	0,23	schwacher Effekt	0,27
HO Kontrolle (n = 18): HO 7 Tage mit DSS (n = 9)	0,0	< 0,001	-4,182	0,80	starker Effekt	0,99
HO Kontrolle (n = 18): HO 15 Tage mit DSS (n = 3)	24,0	0,814	-0,306	0,07	schwacher Effekt	0,05
WT Kontrolle (n = 18): WT 7 Tage mit DSS (n = 6)	0,0	< 0,001	-3,604	0,74	starker Effekt	0,99
WT Kontrolle (n = 18): WT 15 Tage mit DSS (n = 6)	38,0	0,310	-1,069	0,22	schwacher Effekt	0,14
WT 7 Tage mit DSS (n = 6): HO 7 Tage mit DSS (n = 9)	21,5	0,529	-0,652	0,12	schwacher Effekt	0,09
HO 7 Tage mit DSS (n = 9): HO 15 Tage mit DSS (n = 3)	0,0	0,009	-2,501	0,83	starker Effekt	0,78
WT 7 Tage mit DSS (n = 6): WT 15 Tage mit DSS (n = 6)	0,0	0,002	-2,887	0,83	starker Effekt	0,99
Mann-Whitney-U-Test-Vergleich des Kolongewichts						
	U-Wert	p-Wert	Z-Wert	r-Wert		Power (1-β) post hoc
WT Kontrolle (n = 18): HO Kontrolle (n = 18)	125,0	0,252	-1,171	0,20	schwacher Effekt	0,2
HO Kontrolle (n = 18): HO 7 Tage mit DSS (n = 9)	52,5	0,145	-1,493	0,29	mittlerer Effekt	0,28
HO Kontrolle (n = 18): HO 15 Tage mit DSS (n = 3)	24,0	0,814	-0,302	0,07	schwacher Effekt	0,05
WT Kontrolle (n = 18): WT 7 Tage mit DSS (n = 6)	22,0	0,033	-2,136	0,44	mittlerer Effekt	0,48
WT Kontrolle (n = 18): WT 15 Tage mit DSS (n = 6)	53,0	0,974	-0,067	0,01	schwacher Effekt	0,05
WT 7 Tage mit DSS (n = 6): HO 7 Tage mit DSS (n = 9)	26,0	0,955	-0,118	0,03	schwacher Effekt	0,05
HO 7 Tage mit DSS (n = 9): HO 15 Tage mit DSS (n = 3)	8,0	0,373	-1,017	0,29	schwacher Effekt	0,15
WT 7 Tage mit DSS (n = 6): WT 15 Tage mit DSS (n = 6)	5,0	0,041	-2,085	0,60	starker Effekt	0,63

Bei den Tests zur Kolonlänge wurden viermal signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) zwischen den Gruppen festgestellt. Somit kann bei diesen die Nullhypothese abgelehnt werden. Die Effektstärke bestätigt einen starken Effekt zwischen den Gruppen. Diese Signifikanzen sagen nichts zu den Unterschieden der Genotypen aus, sondern nur, dass die

zu erwartende Längenänderung durch die Induktion der Entzündung und das Abklingen der Entzündung auch stattgefunden hat. Siehe dazu auch Abschnitt 4.5.1.

Beim Kolongewicht konnten signifikante Unterschiede bei den Wildtyp-Gruppen festgestellt werden (Tabelle 50). Es kann die Nullhypothese bei beiden Tests abgelehnt werden. Jedoch sollten die unterschiedlichen Effektstärken und Power beachtet werden. Die Ergebnisse bestätigen einen Effekt auf die Kolonlänge und dem damit verbundenen Gewicht durch die Induktion der DSS-Kolitis in der Alox15b-KI-Mauslinie. Eine Effektstärke von 2,5, wie bei der Versuchsplanung angenommen wurde, ist in diesem Vergleich nicht aufgetreten.

7.11.3 Auswertung der Oxylinprofile im DSS-Kolitismodell

Zur besseren Nachvollziehbarkeit sind hier die Tabellen zu den Oxygenierungsmetaboliten im DSS-Kolitismodell aufgelistet und nach Behandlungsgruppen sortiert. Im Kapitel 3.5.1.2 sind die Diagramme mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Tabelle 51: Analyse der Oxylinmetabolite während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Kontroll-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde nicht induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus mehreren Kontrollgruppen zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Kontrolle Alox15b-KI-Wildtyp (n = 21)							
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	130	186	207	237	382	314	108
11-HDHA	133	169	184	215	395	285	99
11-HEPE	33	44	48	53	85	65	31
11-HETE	5019	7265	7993	9900	13375	13852	3313
12-HEPE	202	335	595	765	1075	1411	-310
12-HETE	4320	7452	10115	15334	39776	27157	-4372
13-gamma- HOTrE	63	77	87	121	181	186	12
13-HDHA	533	692	812	1020	1318	1511	201
13-HODE	4163	7109	8028	9017	14140	11878	4247
14-HDHA	374	599	784	1143	2489	1960	-217
15-HEPE	53	76	86	107	171	152	31
15-HETE	6644	8704	9915	11985	14310	16906	3783
16-HDHA	314	395	449	517	687	701	211
17-HDHA	511	716	867	1070	2182	1602	184
18-HEPE	25	31	34	39	55	50	19
20-HDHA	1102	1188	1403	1535	2050	2056	668
4-HDHA	494	656	786	1056	1620	1656	55
5-HEPE	77	89	100	129	158	190	28
5-HETE	1452	1589	1899	2355	3021	3505	439
7-HDHA	150	183	211	239	317	322	100
8-HDHA	176	242	290	318	468	432	128
8-HDHA (109)	20	27	31	38	335	55	10
8-HEPE	6	7	8	8	11	11	4
8-HETE	507	705	748	855	1270	1080	479
9-HEPE	40	62	70	73	108	90	44
9-HETE	771	846	953	1041	1255	1334	553
9-HODE	4505	6936	7942	8976	13718	12035	3877
9-HOTrE	29	96	150	170	372	282	-16

Tabelle 52: Analyse der Oxylinmetabolite während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Kontroll-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde nicht induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus mehreren Kontrollgruppen zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Kontrolle Alox15b-KI (n = 21)							
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	115	156	165	186	327	231	110
11-HDHA	113	144	161	178	233	227	95
11-HEPE	32	42	44	49	95	60	31
11-HETE	4678	6528	7592	8029	12113	10281	4276
12-HEPE	153	340	456	572	822	920	-8
12-HETE	3860	6934	9794	14743	25176	26456	-4779
13-gamma- HOTrE	56	89	97	111	208	143	57
13-HDHA	498	669	697	901	1378	1250	320
13-HODE	4373	5364	6904	9534	17542	15790	-892
14-HDHA	436	499	656	815	1807	1290	24
15-HEPE	52	66	73	90	151	127	29
15-HETE	6447	8002	8934	9306	12929	11261	6046
16-HDHA	256	346	374	435	675	567	214
17-HDHA	534	628	759	909	2214	1331	205
18-HEPE	22	27	32	35	48	46	16
20-HDHA	958	1101	1225	1342	1594	1704	740
4-HDHA	454	568	635	704	1494	908	363
5-HEPE	68	85	108	128	190	193	19
5-HETE	1299	1373	1525	1633	3548	2023	984
7-HDHA	133	146	175	187	299	248	84
8-HDHA	167	224	239	269	438	337	157
8-HDHA (109)	20	29	34	52	263	88	-7
8-HEPE	6	6	7	7	11	10	4
8-HETE	456	611	644	697	1139	825	483
9-HEPE	39	49	57	69	133	99	19
9-HETE	624	701	750	795	1381	934	561
9-HODE	4840	5669	6478	8369	14553	12419	1618
9-HOTrE	48	87	117	163	386	276	-26

Tabelle 53: Analyse der Oxylinmetabolite während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus den Tieren des Vorversuchs und Hauptversuchs zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage 5,3–8) wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Akutphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI (n = 12)							
Produkt in ng/g Protein	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	123	196	293	338	508	550	-17
11-HDHA	118	183	266	293	430	457	18
11-HEPE	24	32	51	74	106	137	-32
11-HETE	5753	7108	8435	10396	17478	15329	2175
12-HEPE	141	386	483	1021	1691	1973	-567
12-HETE	7026	12217	18014	29139	33622	54522	-13166
13-gamma- HOTrE	60	99	151	189	360	323	-35
13-HDHA	677	949	1134	1564	2832	2486	27
13-HODE	5407	7503	9707	12001	13806	18749	755
14-HDHA	685	1036	3015	4006	6338	8460	-3418
15-HEPE	43	103	212	272	376	527	-152
15-HETE	7215	9626	12487	14730	16919	22387	1970
16-HDHA	373	444	622	787	1072	1300	-69
17-HDHA	694	1215	3177	4026	6041	8242	-3002
18-HEPE	12	20	33	42	64	75	-13
20-HDHA	1176	1531	1901	2630	3414	4277	-116
4-HDHA	557	862	1190	1428	1987	2277	12
5-HEPE	45	55	80	106	449	182	-21
5-HETE	1293	2061	2826	3187	13175	4875	373
7-HDHA	197	287	367	436	1192	661	62
8-HDHA	192	282	350	393	577	558	117
8-HDHA (109)	20	24	31	50	414	89	-16
8-HEPE	4	5	6	8	12	12	1
8-HETE	430	614	811	954	1087	1464	104
9-HEPE	26	38	48	60	93	93	6
9-HETE	607	909	1281	1550	2787	2512	-52
9-HODE	5459	8124	9794	12510	16266	19090	1545
9-HOTrE	47	65	115	133	182	235	-38

Tabelle 54: Analyse der Oxylinmetabolite während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus den Tieren des Vorversuchs und Hauptversuchs zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage 5,3–8) wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Akutphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI-Wildtyp (n = 9)							
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	165	299	347	369	396	472	196
11-HDHA	147	228	278	328	358	478	77
11-HEPE	33	40	48	63	87	96	7
11-HETE	5479	8034	8726	10703	13401	14706	4031
12-HEPE	335	528	586	786	4054	1174	140
12-HETE	12250	22926	24344	25382	33791	29066	19243
13-gamma- HOTrE	62	94	148	159	367	257	-4
13-HDHA	913	1122	1212	1755	2033	2706	172
13-HODE	7762	8778	12120	12375	13700	17771	3382
14-HDHA	1345	3347	3793	4462	5043	6135	1673
15-HEPE	109	147	249	312	376	560	-100
15-HETE	9510	11708	13270	14019	17744	17485	8241
16-HDHA	481	590	713	843	885	1222	211
17-HDHA	1718	3109	4144	4590	5876	6811	888
18-HEPE	13	26	38	42	63	64	4
20-HDHA	1467	2058	2214	2500	2967	3162	1396
4-HDHA	613	901	1239	1558	1664	2543	-84
5-HEPE	47	91	100	118	134	158	51
5-HETE	1703	3255	3486	3706	4075	4383	2579
7-HDHA	214	409	464	480	595	587	303
8-HDHA	205	271	350	414	454	628	57
8-HDHA (109)	25	35	43	46	130	61	20
8-HEPE	3	6	7	8	13	11	2
8-HETE	478	661	982	1072	1159	1687	46
9-HEPE	35	42	51	61	70	89	15
9-HETE	686	1156	1606	1871	2014	2944	84
9-HODE	7947	9466	12865	14035	14913	20890	2611
9-HOTrE	29	102	150	174	246	281	-5

Tabelle 55: Analyse der Oxylipinmetabolite während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser innerhalb von 5 Tagen induziert und dieses danach abgesetzt. Nach 15 Tagen im Versuch wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Heilungsphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI (n = 3)							
Produkt in ng/g Protein	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	186	203	221	234	248	281	157
11-HDHA	140	165	190	202	215	259	109
11-HEPE	42	49	56	71	85	104	17
11-HETE	6683	7900	9116	11460	13804	16801	2559
12-HEPE	264	316	368	413	459	560	169
12-HETE	5853	7481	9109	9542	9975	12633	4390
13-gamma- HOTrE	86	89	92	93	93	98	84
13-HDHA	699	804	910	953	997	1177	581
13-HODE	7909	8632	9356	9647	9938	11169	7111
14-HDHA	591	717	843	877	911	1117	477
15-HEPE	77	82	87	95	102	114	63
15-HETE	8831	10044	11258	12174	13091	15369	6849
16-HDHA	414	494	573	581	589	712	363
17-HDHA	727	826	925	970	1015	1186	610
18-HEPE	32	35	39	43	46	53	24
20-HDHA	1153	1330	1506	1607	1707	2022	915
4-HDHA	698	761	825	995	1166	1346	410
5-HEPE	107	108	109	125	141	150	83
5-HETE	1758	1885	2013	2187	2362	2640	1433
7-HDHA	210	221	233	248	263	287	182
8-HDHA	274	285	296	333	370	405	213
8-HDHA (109)	28	32	36	37	39	45	24
8-HEPE	8	8	8	8	9	9	8
8-HETE	665	712	759	786	813	897	601
9-HEPE	58	59	60	81	101	113	27
9-HETE	948	958	968	989	1010	1035	912
9-HODE	7060	7434	7809	8180	8552	9299	6316
9-HOTrE	157	167	178	189	200	222	134

Tabelle 56: Analyse der Oxylipinmetabolite während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser innerhalb von 5 Tagen induziert und dieses danach abgesetzt. Nach 15 Tagen im Versuch wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Heilungsphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI-Wildtyp (n = 6)							
Produkt in ng/g Protein	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
10-HDHA	154	200	226	244	271	310	134
11-HDHA	154	155	167	187	217	235	108
11-HEPE	30	33	35	41	46	52	21
11-HETE	5783	7374	7631	8693	10467	10672	5396
12-HEPE	187	214	253	363	453	587	-9
12-HETE	5346	7478	8825	10734	14072	15617	2595
13-gamma- HOTrE	56	62	65	76	107	96	42
13-HDHA	569	781	858	901	1109	1081	601
13-HODE	6138	7348	8133	8915	13463	11266	4998
14-HDHA	436	771	966	1194	1700	1829	137
15-HEPE	54	78	86	112	139	164	26
15-HETE	7601	8927	9706	10768	12931	13530	6165
16-HDHA	297	465	517	553	608	685	332
17-HDHA	548	958	1178	1217	1952	1605	570
18-HEPE	28	29	30	35	37	44	20
20-HDHA	1095	1244	1454	1601	1642	2137	708
4-HDHA	658	750	837	922	1221	1181	491
5-HEPE	77	92	107	131	144	188	35
5-HETE	1512	1684	1881	2035	2339	2561	1157
7-HDHA	162	196	212	237	290	299	135
8-HDHA	208	273	334	344	391	451	166
8-HDHA (109)	17	33	37	42	51	55	20
8-HEPE	6	6	7	8	8	9	5
8-HETE	572	702	779	808	979	966	544
9-HEPE	43	50	54	57	80	67	39
9-HETE	674	847	922	1008	1202	1250	606
9-HODE	5728	6900	7220	8255	10423	10286	4869
9-HOTrE	118	136	193	197	259	289	45

7.11.4 Auswertung komplexerer Oxylipine im DSS-Kolitismodell

Zur besseren Nachvollziehbarkeit sind hier die Tabellen zu den komplexeren Oxygenierungsmetaboliten im DSS-Kolitismodell aufgelistet (siehe Abschnitt 3.5.1.2.6) und nach Behandlungsgruppen geordnet. In der akuten Entzündungsphase sollte ein erhöhter Anteil an Lipidmediatoren zu erkennen sein, der in der Heilungsphase wieder absinkt. Aufgrund der veränderten Reaktionsspezifität könnte eine Abhängigkeit der Metabolite und dem Genotyp vorliegen.

Es wurden alle mit 2 % DSS behandelten Tiere entsprechend ihres Genotyps aus dem Vorversuch und dem Hauptversuch zusammengefasst, um eine größere Aussagekraft zu erhalten. Die gemessenen Änderungen im Vorversuch hatten eine entzündliche Reaktion gezeigt (siehe Abschnitt 7.10).

Tabelle 57: Analyse der komplexeren Oxylipine während der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Kontroll-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde nicht induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus mehreren Kontrollgruppen zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Kontrolle Alox15b-KI-Wildtyp (n = 21)								
Produkt in ng/g Protein	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	11	5	7	9	14	21	25	-4
Maresin 2	3	0	3	4	5	5	7	2
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	1	0	1	1	1	2	1	0
8-HeTrE	725	451	659	701	799	1191	1010	448
12-HeTrE	1591	599	970	1283	2051	3557	3674	-653
15-HeTrE	1957	944	1457	1856	2205	3540	3327	335
PGB3	30	17	23	26	36	66	55	3
PGB2	8684	3592	7279	8341	9872	14120	13761	3390
LTB4 12-oxo	6	3	4	5	7	9	11	1
LTB4	12	7	9	10	13	23	19	3
LTB4 18- COOH-dinor	26	16	22	24	30	36	42	11
LTB3	11	7	10	11	12	20	16	6

Tabelle 58: Analyse der komplexeren Oxylipine während der DSS-Kolitis von AloX15b-KI-Kontroll-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde nicht induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus mehreren Kontrollgruppen zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Kontrolle AloX15b-KI (n = 21)								
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	8	4	7	7	10	69	15	2
Maresin 2	3	0	3	3	4	10	6	1
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	1	0	1	1	1	3	2	0
8-HeTrE	560	423	466	538	609	920	823	251
12-HeTrE	1223	657	883	1212	1527	2764	2492	-82
15-HeTrE	1672	1031	1454	1653	1899	2967	2566	787
PGB3	33	11	25	29	41	76	66	0
PGB2	8155	4111	7560	8219	9206	12006	11677	5089
LTB4 12- oxo	5	4	4	5	6	21	9	2
LTB4	11	7	10	12	12	147	16	6
LTB4 18- COOH- dinor	18	6	12	17	24	42	41	-5
LTB3	8	3	5	7	10	25	17	-2

Tabelle 59: Analyse der komplexeren Oxylipine während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus den Tieren des Vorversuchs und Hauptversuchs zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tage 5,3–8) wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Akutphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI (n = 12)								
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	40	10	15	38	60	74	127	-52
Maresin 2	6	0	4	6	7	11	12	0
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	2	1	1	2	2	3	4	0
8-HeTrE	387	215	255	312	500	762	867	-113
12-HeTrE	1402	758	1088	1447	1612	2201	2399	301
15-HeTrE	1516	985	1182	1317	1832	2645	2807	207
PGB3	27	7	15	21	31	64	56	-10
PGB2	11082	4132	8124	9854	12273	20614	18497	1900
LTB4 12- oxo	11	3	6	10	13	32	25	-6
LTB4	227	13	18	44	119	1847	271	-134
LTB4 18- COOH- dinor	30	18	23	28	32	50	45	10
LTB3	18	9	11	16	21	34	37	-4

Tabelle 60: Analyse der komplexeren Oxylipine während der Akutphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser induziert. Die dargestellte Gruppe ist aus den Tieren des Vorversuchs und Hauptversuchs zusammengestellt worden. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 5,3–8) wurden die Tiere unter Isolfurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Akutphase mit 2 % DSS, WT Alox15b-KI (n = 9)								
Produkt in <i>ng/g Protein</i>	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	58	20	44	56	69	104	107	6
Maresin 2	7	5	6	6	8	10	10	3
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	2	1	2	2	3	3	4	0
8-HeTrE	427	148	227	394	503	801	915	-185
12-HeTrE	1543	837	1117	1597	1726	2764	2640	203
15-HeTrE	1631	1177	1325	1365	1715	2967	2301	739
PGB3	26	11	19	22	23	71	30	13
PGB2	10656	6015	9018	10030	12006	18285	16487	4536
LTB4 12- oxo	12	4	7	13	15	21	26	-5
LTB4	83	27	37	70	132	153	275	-106
LTB4 18- COOH- dinor	31	17	21	36	37	42	61	-4
LTB3	16	8	10	18	19	25	32	-4

Tabelle 61: Analyse der komplexeren Oxylipine während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser innerhalb von 5 Tagen induziert und dieses danach abgesetzt. Nach 15 Tagen im Versuch wurden die Tiere unter einer Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Heilungsphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI (n = 3)								
Produkt in ng/g Protein	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	9	7	9	10	10	10	12	6
Maresin 2	1	0	0	0	2	3	4	-3
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	1	0	1	1	1	1	1	0
8-HeTrE	577	465	536	608	633	658	779	391
12-HeTrE	1009	773	941	1110	1127	1145	1406	663
15-HeTrE	1571	1194	1417	1640	1760	1879	2273	903
PGB3	51	25	31	38	64	89	112	-17
PGB2	11012	7484	7568	7651	12776	17900	20588	-245
LTB4 12-oxo	6	6	6	6	6	7	7	5
LTB4	9	7	8	8	10	13	14	4
LTB4 18- COOH-dinor	21	19	19	19	22	24	26	15
LTB3	7	7	7	7	8	9	10	5

Tabelle 62: Analyse der komplexeren Oxylipine während der Heilungsphase der DSS-Kolitis von Alox15b-KI-Wildtyp-Mäusen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung). Eine DSS-Kolitis wurde mit 2 % DSS im Trinkwasser innerhalb von 5 Tagen induziert und dieses danach abgesetzt. Nach 15 Tagen im Versuch wurden die Tiere unter Isoflurannarkose-Überdosis mit zervikaler Dislokation getötet, das Kolon entnommen, die Lipide extrahiert und nach alkalischer Hydrolyse auf den Gewebegehalt von Oxylipinen mittel LC-MS/MS analysiert (siehe Kapitel 2). Die Berechnung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS Statistics 26.0).

Heilungsphase mit 2 % DSS, Alox15b-KI-Wildtyp (n = 6)								
Produkt in ng/g Protein	Mittelwert	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Obere Quartils- grenze	Untere Quartils- grenze
NPD-1	10	0	6	10	15	18	28	-7
Maresin 2	1	0	0	0	2	3	6	-4
PGJ2 15- deoxy-delta 12,14	1	0	1	1	1	1	1	1
8-HeTrE	532	421	520	562	566	576	636	450
12-HeTrE	1055	679	1007	1087	1176	1291	1429	754
15-HeTrE	1287	989	1183	1292	1405	1560	1739	849
PGB3	22	15	18	21	22	36	29	11
PGB2	7566	4689	7153	7750	8373	9669	10202	5324
LTB4 12-oxo	6	4	5	6	7	8	10	2
LTB4	10	8	9	10	11	12	13	6
LTB4 18- COOH-dinor	20	14	16	17	20	34	28	8
LTB3	7	5	6	7	8	11	11	3

7.12 Ergänzende Auswertung zum Pfotenödemmodell

In Ergänzung zu den Abschnitten 2.5, 3.5.2 und 4.5.2 sind hier detailliertere statistische Ergebnisse aufgezeigt.

7.12.1 Phänotypisches Pfotenödem der Alox15b-KI-Maus

Abbildung 63 zeigt beispielhaft das Pfotenödem beim ausgekreuzten Wildtyp und einer homozygoten Alox15b-KI-Maus. Eine angeschwollene Pfote nach 2 Tagen nach der CFA-Injektion war oft zu erkennen. Es ließen sich zwischen den Genotypen keine phänotypischen Unterschiede wahrnehmen, da bei manchen Tieren die Schwellung größer war und bei anderen nicht.



Abbildung 63: Pfotenödem 2 Tage nach der CFA-Behandlung bei einer ausgekreuzten Wildtyp-Maus (linkes Bild) und bei einer homozygoten Alox15b-KI-Maus (rechtes Bild) (Quelle: eigene Aufnahmen). Eine Adjuvans-induzierte Hautentzündung wurde durch die CFA-Injektion in die rechte Hinterpfote von Mäusen ausgelöst (siehe Kapitel 2). Zu Kontrollzwecken wurde das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, 20 μ l) in die linke Hinterpfote injiziert. Das Volumen beider Hinterpfoten wurde am lebenden Tier mit dem Plethysmometer bestimmt und als klinischer Readout-Parameter für den Schweregrad der Entzündung gewertet.

7.12.2 Statistische Auswertung zum Pfotenvolumen

Durch die Auswertung der Messwerte zeigte sich, dass die rechte, CFA-behandelte Pfote bei allen Tieren ein signifikant erhöhtes Pfotenvolumen gegenüber der linken NaCl-Kontrollpfote und der unbehandelten rechten Pfote besitzt (Abb. 47, Tabelle 63). Eine Entzündung konnte somit bei beiden Genotypen erfolgreich induziert werden. Die Kontrollen des basalen Pfotenvolumens und das Pfotenvolumen mit NaCl-Behandlung wurden verglichen, falls unerwarteterweise die NaCl-Injektion doch einen Effekt in den mutierten Mäusen aufweist.

Tabelle 63: Statistischer Vergleich des Pfortenvolumens zwischen den Genotypen (eigene Berechnung und Darstellung, Datenerhebung in Zusammenarbeit mit Dr. D. Labuz). Die Entzündung der Pfote sollte durch die subkutane CFA-Injektion (20 µl) induziert werden. Als Kontrolle diente die Injektion von Natriumchlorid (0,9 % NaCl: 20 µl) und das basale Pfortenvolumen, der unbehandelten Pfote. Nach zwei Tagen wurde das Pfortenvolumen als Parameter für die Intensität der Entzündungsreaktion doppelt gemessen und daraus der Mittelwert berechnet (siehe Kapitel 2). Fett gedruckt sind die signifikanten Ergebnisse. FCA: complete Freund-Adjuvans; HO: Homozygot; n: Anzahl (Gesamttieranzahl je Vergleich n = 10); NaCl: Natriumchlorid; 2d: 2 Tage nach Behandlung; WT: Wildtyp; Wilcoxon-Test von zwei verbundenen Stichproben in SPSS, Signifikanz: $\alpha < 0,05$; kritischer Wert = 1,96; Post-hoc power (1- β) Berechnung, zweiseitig, unter Annahme der Normalverteilung (N = 10) in G-Power.

Wilcoxon-Testergebnisse der Versuchsgruppen	p-Wert	Z-Wert	r-Wert	Cohens d	Power (1- β) post hoc
Alox15b-KI HO basal (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d NaCl (n = 10)	0,959	-0,052			0,148
Alox15b-KI HO basal FCA (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d FCA (n = 10)	0,005	-2,805	0,89	-3,84	1,00
Alox15b-KI HO 2 d FCA (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d NaCl (n = 10)	0,005	-2,807	0,89	-3,86	1,00
Alox15b-KI WT basal (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d NaCl (n = 10)	0,765	-0,298			0,082
Alox15b-KI WT basal FCA (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d FCA (n = 10)	0,005	-2,812	0,89	-3,89	1,00
Alox15b-KI WT 2 d FCA (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d NaCl (n = 10)	0,005	-2,803	0,89	-3,84	1,00

Im Vergleich der Genotypen zeigten sich signifikante Unterschied in der Änderung des Pfortenvolumens mit CFA von Alox15b-KI-Tieren zum Wildtyp. Das Pfortenvolumen nimmt bei beiden Genotypen um mehr als 50 % nach der CFA-Behandlung zu. Die Zunahme des Volumens war in der Stichprobe bei dem Alox15b-KI-Wildtyp (Mdn.: 0,29 ml) höher als bei den Alox15b-KI-Homozygoten (Mdn.: 0,23 ml). Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test in SPSS verwendet. Dabei ließ sich auch ein signifikanter Unterschied (*2d CFA_Alox15b-KI HO: Alox15b-KI WT: U (N1 = 10), (N2 = 10) = 12; p = 0,003; Z = -2,88; r = 0,6 = starker Effekt*) zwischen den CFA-behandelten Pfoten bei den Alox15b-KI-Genotypen feststellen. Die veränderte Reaktionsspezifität könnte tatsächlich eine geringere Entzündungsreaktion aufweisen.

Mit der G-Power Software konnte für diesen Vergleich bei $d_{\text{Cohen}} = 1,68$ die Post-hoc-Power von 0,93 ermittelt werden. In 7 % der Fälle würde der Test keine Signifikanz anzeigen, auch wenn es eigentlich signifikant wäre. Es entsteht der Anschein, dass wie erwartet, die Alox15b-KI-Tiere eine geringe Entzündungsreaktion aufzeigen, da das Pfortenvolumen geringer ist als der beim ausgekreuzten Wildtyp. Veränderung auf das Pfortenvolumen ließen sich 2 Tage nach der NaCl-Injektion nicht mehr erkennen (*2d NaCl_Alox15b-KI HO: Alox15b-KI WT: U (N1 = 10), (N2 = 10) = 26; p = 0,075; Z = -1,85; r = 0,41 =mittlerer Effekt*).

7.12.3 Statistische Auswertung des Von-Frey-Tests

In diesem Versuch sollte sich die Rückzugsschwelle der Pfoten durch die CFA-induzierte Entzündung verringern. Dabei ist unklar, wie stark sich die Rückzugsschwelle nach den Behandlungen und bei den beiden Alox15b-KI-Genotypen veränderte. Im Von-Frey-Test zeigte sich eine signifikant reduzierte Rückzugsschwelle der rechten, CFA-behandelten Pfote im Vergleich zur Kontrollpfote bei beiden Genotypen (Abbildung 63, Abbildung 48, Tabelle 64); (*Wilcoxon-Test: je N = 10; p = 0,005; Z = -2,803; r = 0,89 = starker Effekt*). Die Reduktion lag im Bereich von $89,9 \pm 4,3$ % (Alox15b-KI HO) und $85,0 \pm 10,0$ % (Alox15b-KI WT) zur unbehandelten Pfote.

Tabelle 64: Statistischer Vergleich zum Von-Frey-Test zwischen den Behandlungen der Alox15b-KI-Genotypen (Quelle: eigene Berechnung und Darstellung, Datenerhebung in Zusammenarbeit mit Dr. D. Labuz). Die Entzündung der Pfote sollte durch die subkutane CFA-Injektion (20 μ l) induziert werden. Als Kontrolle diente die Injektion von Natriumchlorid (0,9 % NaCl: 20 μ l) und die basale Reaktion, der unbehandelten Pfote. Nach zwei Tagen wurde die mechanische Schwelle bis zum Pfotenrückzug als Parameter für den Entzündungsschmerz doppelt gemessen und daraus der Mittelwert berechnet (siehe Kapitel 2). Fett gedruckt sind die signifikanten Ergebnisse. FCA: complete Freund-Adjuvans; HO: Homozygot; n: Anzahl (Gesamtanzahl je Vergleich n = 10); NaCl: Natriumchlorid; 2d: 2 Tage nach Behandlung; WT: Wildtyp; Berechnung mit Wilcoxon-Test von zwei verbundenen Stichproben in SPSS, Signifikanz: $\alpha < 0,05$; kritischer Wert = 1,96; Post-hoc power (1- β) Berechnung, zweiseitig, unter Annahme der Normalverteilung (N = 10) in G-Power.

Wilcoxon-Testergebnisse der Versuchsgruppen	p-Wert	Z-Wert	r-Wert	Power (1- β) post hoc
Alox15b-KI HO basal (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d NaCl (n = 10)	0,678	-0,415		0,11
Alox15b-KI HO basal FCA (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d FCA (n = 10)	0,005	-2,803	0,89	1,00
Alox15b-KI HO 2 d FCA (n = 10) – Alox15b-KI HO 2 d NaCl (n = 10)	0,005	-2,803	0,89	1,00
Alox15b-KI WT basal (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d NaCl (n = 10)	0,611	-0,508		0,15
Alox15b-KI WT basal FCA (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d FCA (n = 10)	0,005	-2,805	0,89	1,00
Alox15b-KI WT 2 d FCA (n = 10) – Alox15b-KI WT 2 d NaCl (n = 10)	0,005	-2,803	0,89	1,00

7.12.4 Statistische Auswertung des Hargreaves-Test

Der Rückzug der Pfote im Hargreaves-Test wurde mit der Latenzzeit bis zum Rückzug evaluiert (siehe Abschnitt 2.5.4). Hier zeigte sich für beide Genotypen eine zu erwartende, signifikant verkürzte Latenzzeit für die CFA-behandelte rechte Pfote im Vergleich zur Kontrollpfote:

(*Wilcoxon-Test: 2d CFA_Alox15b-KI HO: 2d NaCl_Alox15b-KI HO: N = 10; p = 0,005; Z = -2,803; r = 0,89, post hoc- Power: 1,0*),

(Wilcoxon-Test: 2d CFA_Alox15b-KI WT: 2d NaCl_Alox15b-KI WT: $N = 10$; $p = 0,005$; $Z = -2,803$; $r = 0,89$; post hoc-Power: 1,0).

Mit der Entzündung konnte eine mehr als halbierte Zeitspanne beobachtet werden. Es wurde auch auf Gleichheit zwischen den Genotypen mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben in SPSS untersucht. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Alox15b-KI-Genotypen.

(2d CFA_Alox15b-KI HO: Alox15b-KI WT: $U (N1 = 10), (N2 = 10) = 48,0$; $p = 0,912$; $Z = -0,151$; $r = 0,03 = \text{schwacher Effekt}$)

Die Post-hoc-Power ($d_{\text{Cohen}} = 0,068$) war für diesen Test 0,05 und damit sehr gering. Für das Erkennen eines Effektes wären 3599 Tiere je Genotyp erforderlich gewesen (*G-Power: a priori Berechnung, Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test, zweiseitig: $d = 0,068$: $a = 0,05$; Power = 0,8; ratio $N1/N2 = 1$*).

Die Kontrolle zeigte erwartungsgemäß keinen Unterschied (2d NaCl_Alox15b-KI HO: Alox15b-KI WT: $U (N1 = 10), (N2 = 10) = 43,0$; $p = 0,631$; $Z = 0,530$, post-hoc-Power: 0,09).

Die Alox15b-KI-Mäuse unterschieden sich anhand ihrer Entzündungsreaktion nicht von den anderen Genotypen. Insgesamt ließ sich durch die mit CFA behandelten Pfoten ein Ödem erzeugen. Ein Unterschied zwischen der Reaktionsspezifität der Alox15b-KI-Mäuse ließ sich nicht erkennen. Weiter wird dieser Versuch im Abschnitt 4.5.2 diskutiert.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn und Frau Dr. Dagmar Heydeck für die Möglichkeit, an diesem Forschungsthema zu arbeiten, und ihrer Betreuung bedanken. Herrn Prof. Dr. Gerhard Püschel möchte ich für die Betreuung seitens der Universität Potsdam Dank aussprechen. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Abramjuk, ohne die diese tierexperimentelle Arbeit nicht hätte entstehen können. Frau Dr. Domenica Labuz hat mit ihrem außerordentlichen Einsatz im experimentellen Pfortenödem auch einen unschätzbar wichtigen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet. Ebenfalls möchte ich mich beim Kollegium am Institut für Biochemie der Charité -Universitätsmedizin Berlin bedanken, die mir mit Besonnenheit und Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben. Gleiches gilt für Kooperationspartner in Hyderabad, Kunming und Moskau, mit denen ich persönlich und an verschiedenen Publikationen zusammenarbeiten konnte. Ich honoriere auch ehemalige Studenten und Kollegen der „Arbeitsgruppe -Kühn“, die in der Vergangenheit einen großen Teil an Vorarbeit leisteten, indem sie Sachverhalte untersucht haben, auf die meine Arbeit aufbaut.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und diese ausschließlich mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin, 09.05.2023

Ort und Datum

Unterschrift