

Hartmut Kühn, Tankred Schewe

Lipoxygenasen als lipidperoxidierende Enzyme. Die Rolle von S.M. Rapoport als Nestor der deutschen Lipoxy- genaseforschung

1. Einleitung

Die Entwicklung bestimmter Wissenschaftszweige ist ein diskontinuierlicher Prozess, der wesentlich vom Fortschritt der Methodenentwicklung und der Verfügbarkeit entsprechender Werkzeuge abhängt. Aber auch das Schaffen herausragender Persönlichkeiten, die mit ihren visionären Ideen und ihrem experimentellen Geschick zur Weiterentwicklung bestimmter Wissensgebiete beitragen, ist für den Fortschritt der Wissenschaften von herausragender Bedeutung. Es ist immer eine subjektive und sehr persönliche Angelegenheit, die Bedeutung eines Forschers für die Entwicklung eines Wissenschaftszweiges einzuschätzen. Jeglicher Wissenschaftsfortschritt beruht letztlich auf der kollektiven Leistung einer großen Anzahl von Wissenschaftlern, die ein gemeinsames Ziel verfolgen und sich auf verschiedenen Wegen diesem Ziel nähern. Früher waren diese Kollektive eher kleine Gruppen gleichgesinnter Individuen, die nicht selten in Konkurrenz zueinander versucht haben, ihre Forschungen voranzutreiben. Heute werden wissenschaftliche Großprojekte in aller Regel durch internationale Zusammenarbeit vorangetrieben, in denen jede Gruppe ihr spezifisches Gebiet bearbeitet. Das humane Genomprojekt, das Anfang der 90iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts initiiert wurde und 2004 seinen offiziellen Abschluss fand, ist ein Paradebeispiel für eine solche internationale Kooperation. Diese subjektive Einschätzung negiert jedoch in keiner Weise die Bedeutung von Einzelpersonen im Prozess der Wissenschaftsentwicklung und auch das humane Genomprojekt wurde in vieler Hinsicht von starken Persönlichkeiten vorangetrieben.

Für uns war S.M. Rapoport mit seinen wissenschaftlichen Ideen eine solche treibende Persönlichkeit, die die Entwicklung der internationalen Lipoxygenaseforschung über mehr als 30 Jahre vorangetrieben hat. Unter den

besonderen Umständen des politischen Systems der DDR war es dabei extrem schwierig, die Bedeutung der internationalen Zusammenarbeit, von der S.M. Rapoport zutiefst überzeugt war, in die Tat umzusetzen. Unserer Ansicht nach war es einer seiner größten Verdienste, dass er sich stets darum bemühte, wissenschaftliche Kooperation über politische und ideologische Grenzen hinweg zu organisieren. So ermöglichte er vielen seiner unmittelbaren Mitarbeiter Arbeitsaufenthalte im „Nichtsozialistischen Ausland“, um Ihnen die Möglichkeit zu geben, aktiv an der internationalen Wissenschaftskooperation teilzunehmen. Dabei konnten sicher nicht immer alle Vorstellungen durchgesetzt werden und so manche Bemühung scheiterte an finanziellen bzw. politischen Barrieren.

Große Teile seiner wissenschaftlichen Laufbahn widmete S.M. Rapoport der Erforschung von Reifungs- und Differenzierungsprozessen, wobei er der erythroiden Differenzierung besondere Aufmerksamkeit widmete. Im Rahmen dieser Arbeiten konnten er und seine Mitarbeiter Mitte der 70iger Jahre zeigen, dass am reifungsbedingten Mitochondrienabbau eine Lipoxygenase beteiligt war, deren biologische Funktion darin bestand, die Lipide der Mitochondrienmembran zu oxygenieren und damit die Membran zu destabilisieren. Mit der Entdeckung dieses Enzyms eröffnete sich für ihn ein neues Tätigkeitsfeld, die Eikosanoidforschung, auf dem er bis zu seinem Lebensende arbeitete und zu dessen Entwicklung er mit viel beachteten Beiträgen vorantrieb. Die Autoren dieses Beitrags hatten das Glück an diesen Forschungen teilhaben zu dürfen und die Arbeiten auch nach dem Tod von S.M. Rapoport weiterführen zu können.

Der vorliegende Artikel verfolgt im Wesentlichen zwei Ziele. Erstens soll der Fortschritt der Erforschung tierischer Lipoxygenasen unter besonderer Berücksichtigung des Beitrags von S.M. Rapoport bis zu seinem Tod kurz zusammengefasst werden. Zweitens sollen aber auch aktuelle Ergebnisse zur Struktur- und Funktionsbeziehung von Lipoxygenasen und zu evolutionsbiologischen Besonderheiten dieser Enzyme diskutiert werden.

2. Der duale Charakter der Lipidperoxidation

2.1 Lipide und deren biologische Funktionen

Neben Proteinen, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren bilden Lipide eine der vier großen Naturstoffklassen. Sie kommen in allen irdischen Lebensformen vor und haben drei wesentliche biologische Funktionen:

1. Lipide (vor allem Neutrallipide wie Triacylglycerole) stellen aufgrund ihres hohen spezifischen Energiegehaltes und ihrer schnellen Mobilisierbarkeit ideale Langzeitenergiespeicher dar. Dabei fungieren vor allem die langkettigen Fettsäuren als die dominierenden Energieträger. Modellrechnungen zum biologischen Energiegehalt von Kohlenhydraten und Triacylglycerolen haben gezeigt, dass aus einem Mol Capronsäure ($C_6H_{12}O_2$) über die mitochondriale β -Oxidation, den Zitratzyklus, die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung ca. 37 Mol ATP gebildet werden können. Wird Glukose ($C_6H_{12}O_6$) über die aerobe Glykolyse, den Citratzyklus, die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung metabolisiert, ergibt sich eine Netto-ATP-Ausbeute von 30 bzw. 32 Mol. Rechnet man diese Zahlen auf g Trockengewicht des energieliefernden Substrates um (1), so sind die Unterschiede im Energiegehalt noch deutlich größer (318 mMol ATP pro g Capronsäure vs. 178 mMol ATP pro g Glukose). Der Unterschied im spezifischen Energiegehalt der beiden Substanzklassen ist vor allem darauf zurückzuführen, dass bei allen hoch entwickelten Lebewesen auf der Erde der oxidative Energiestoffwechsel dominiert und dass die langen Alkylketten der Fettsäuren einen deutlich geringeren Oxidationsgrad aufweisen als die Kohlenhydrate. Dies kann leicht aus dem Sauerstoffgehalt der beiden Naturstoffklassen (siehe Summenformeln) abgeleitet werden. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass nicht alle Lipide energieliefernde Substrate für den menschlichen Organismus darstellen. So ist der Mensch z.B. nicht in der Lage, das Sterangerüst des Cholesterols abzubauen, so dass Cholesterol und dessen Derivate keine energieliefernden Substrate darstellen. Ähnlich verhält es sich mit den Polyketiden.

2. Wegen ihres amphipathischen Charakters sind andere Lipide (vor allem Phospholipide und Cholesterol) ideale Strukturbildner. Im wässrigen Milieu bilden diese Lipide durch nicht-kovalente Assoziation polymere Superstrukturen (z. B. Doppelschichten), die zelluläre und subzelluläre Kompartimente voneinander abgrenzen. Da innere und äußere Kompartimentierung zu den Grundvoraussetzungen des Lebens gehört, ist die Entwicklung jeglicher Lebensformen an die Existenz und die Funktionalität von Lipiden gebunden.

3. Lipide stellen Substrate für die Biosynthese von intra- und extrazellulären Botenstoffen dar. Hier wären in erster Linie die schon seit langer Zeit bekannten Steroidhormone zu nennen, die als Derivate des Cholesterols endogen synthetisiert werden und als Glukokortikoide (z.B. Cortisol), Mineralokortikoide (z.B. Aldosteron), Androgene (z.B. Testosteron), Östrogene (z.B. Östradiol) und Gestagene (z.B. Progesteron) vielfältige Funktionen im

menschlichen Organismus erfüllen. In jüngerer Zeit wurden neben den Steroiden noch andere Lipidmediatoren identifiziert, die als systemisch wirkende Botenstoffe oder als lokal aktive Gewebshormone fungieren. Dabei bilden die Eikosanoide (Prostaglandine, Leukotriene) eine Gruppe extrazellulärer Signalmoleküle, die aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure synthetisiert werden und pleiotrope Wirkungen in fast allen menschlichen Organsystemen entfalten (2). Eine andere Klasse von extrazellulären Lipidhormonen stellen die Endokannaboide (3) dar. Ähnlich wie die Peptidhormone Endorphine und Enkephaline wirken Endokannaboide analgetisch, entfalten diese Wirkung jedoch nicht über die Bindung an Opioidrezeptoren, sondern binden an spezifische G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren (CB1, CB2), die in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden induzieren. Bis heute hat man zwei wesentliche Endokannaboide (Arachidonylethanolamin, 2-Arachidonylglycerol) identifiziert, die sich ähnlich wie die Eikosanoide von der Arachidonsäure ableiten.

Neben ihrer Funktion als extrazelluläre Botenstoffe wirken Lipide auch als intrazelluläre Signalmoleküle. So fungiert z.B. 1,2-Diacylglycerol als intrazellulärer 2. Botenstoff. Nach Bindung agonistischer Liganden an spezifische Zelloberflächenrezeptoren kommt es intrazellulär zur Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol (DAG) und Inositolphosphat (z.B. IP3) spaltet. Aufgrund seines hydrophilen Charakters diffundiert IP3 ins Zytosol und bindet an den IP3-Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dadurch wird ein Calciumkanal geöffnet, was eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration bewirkt. DAG verbleibt jedoch wegen seines hydrophoben Charakters in der Zellmembran und rekrutiert die zytosolische Proteinkinase C (PKC) an die Zellmembran. Dieses Enzym verfügt über zwei regulatorische Bindungsdomänen (C1A, C1B) für DAG, so dass die Membrantranslokation mit einer Aktivierung des Enzyms einhergeht. Nach ihrer Aktivierung phosphoryliert die PKC eine Reihe zytosolischer Enzyme, so dass die Information der Ligandenbindung am Zelloberflächenrezeptor ins Zytosol weitergeleitet wird.

2.2 Biologische Effekte der Lipidperoxidation

Lipidperoxidation kann als chemische Reaktion von ungesättigten Lipiden mit molekularem Sauerstoff beschrieben werden. Dadurch wird eine hydrophile Peroxygruppe in ein ehemals hydrophobes Lipid eingeführt, was zu einer deutlichen Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften der Lipide führt. Aus der Diskussion der verschiedenen biologischen Funktionen

von Lipiden lässt sich demnach leicht ableiten, dass eine solche Veränderung der Lipideigenschaften gravierende funktionelle Konsequenzen haben sollte. Dies trifft vor allem auf die Strukturfunktion der Lipide zu. Es ist leicht nachvollziehbar, dass die Einführung hydrophiler Peroxidgruppen in die hydrophobe Lipiddoppelschicht von Biomembranen zu einer Störung der hydrophoben Wechselwirkung der Fettsäurereste und damit zu einer Destabilisierung der Biomembranen führt. Aber auch für die Rolle von Lipiden als Energieträger und für deren Signaltransduktionsfunktion sollte sich die Lipidperoxidation nachteilig auswirken, da die Peroxidgruppierung sowohl den Abbau von Fettsäuren (mitochondriale β -Oxidation) als auch die Synthese spezifischer Signalmoleküle (z.B. Eikosanoidsynthese) behindern sollte. Diese Überlegungen lagen der früheren Hypothese zugrunde, dass die Lipidperoxidation vor allem eine destruktive Reaktion darstellt, die besonders die strukturelle Integrität biologischer Systeme (Zellen und subzelluläre Organellen) beeinträchtigt. Deshalb war man früher der Meinung, dass Lipidperoxidation unter allen Umständen minimiert werden müsse.

Heute weiß man jedoch, dass eine regulierte Lipidperoxidation für viele biologische Prozesse essentiell ist und dass eine ausgewogene zelluläre Redoxhomöostase ein wichtiges Element bei der Regulation des zellulären Phänotyps ist. Diese Behauptung soll hier anhand von zwei Beispielen verdeutlicht werden:

i) Lokal begrenzte destruktive Prozesse, wie z.B. die Peroxidation von Membranlipiden, können für das Gesamtsystem der Zelle bzw. des gesamten Organismus durchaus von Vorteil sein, wenn es sich dabei um einen programmierten Abbau intrazellulärer Organellen handelt. Ein Beispiel für eine solch lokal begrenzte Destruktion im Rahmen eines übergeordneten endogenen Umbauprogramms stellt der Mitochondrienabbau im Rahmen der Erythrozytenreifung dar, den S.M. Rapoport in späteren Jahren seiner wissenschaftlichen Laufbahn intensiv untersucht hat. Dabei konnte er bereits 1975 feststellen, dass eine regulierte Peroxidation der Lipide der Mitochondrien-Innenmembran zum Funktionsverlust der Mitochondrien im Rahmen der späten Erythropoese (4, 5) führt. Diese Reaktion stellte im Rahmen der damaligen Arbeitshypothese die Initialzündung für den Mitochondrienabbau in Kaninchenretikulozyten dar. Mit diesen Resultaten konnte bereits Mitte der 70iger Jahre gezeigt werden, dass Lipidperoxidation, obwohl lokal destruktiv, global konstruktiven Charakter haben kann, solange sie reguliert nach einem biologischen Programm abläuft. Heute wissen wir, dass nicht nur Reifungs- und Differenzierungsvorgänge sondern auch der programmierte

Zelltod (Apoptose) lokal destruktive Prozesse enthalten (6), die einem „höheren Ziel“ dienen und damit konstruktiven Charakter haben. Dabei ist heute noch weitgehend unklar, welche Rolle die Lipidperoxidation bei Reifungs- und Differenzierungsprozessen im Allgemeinen und bei der Apoptose im Speziellen spielt.

ii) Ein normaler zellulärer Redoxstatus ist eine Voraussetzung für die ausgewogene Genexpression und jede Veränderung des Redoxgleichgewichtes zieht eine Reihe von Veränderungen der Expressionsregulation nach sich (7, 8). Anhand von genomdeckenden Expressionsprofilen konnte man feststellen, dass sowohl oxidative als auch reduktive Belastungen von Zellen *in vitro* und *in vivo* zu gravierenden Veränderungen des Genexpressionsmusters dieser Zellen führen. Solche Veränderungen beschränken sich nicht nur darauf, die unmittelbaren Auslenkungen der Redoxhomöostase rückgängig zu machen (z.B. Hochregulation der anti-oxidativen Schutzmechanismen bei oxidativer Belastung), sondern betreffen auch weite Bereiche des Bau- und Energiestoffwechsels, der intrazellulären Signalübertragung und der Ansprechbarkeit auf externe Stimulatoren. Als wesentliche Ursachen für die Veränderungen im Expressionsmuster redox-stimulierter Zellen sind Aktivierung bzw. Inaktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren und die Beeinflussung epigenetischer Mechanismen der Transkriptionsregulation zu nennen. Aber auch post-transkriptionelle Prozesse der Genexpressionskaskade (z.B. Regulation der mRNA Stabilität) können durch Veränderungen der zellulären Redoxhomöostase gezielt beeinflusst werden. Die derzeit verfügbaren experimentellen Befunde belegen, dass jede Auslenkung der Redoxhomöostase zu einer adaptiven Veränderung des zellulären Phänotyps führt, egal ob es sich dabei um oxidative oder reduktive Belastungen handelt. Zusammenfassend kann damit geschlossen werden, dass die Lipidperoxidation nicht einseitig als destruktiver Prozess verteufelt werden sollte, sondern dass diese Reaktion auch konstruktive Aspekte aufweist.

2.3 Regulation der Lipidperoxidation

Die nicht-enzymatische Lipidperoxidation ist biologisch kaum regulierbar. Es existieren enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Schutzsysteme, welche das Ausmaß der Lipidperoxidation begrenzen und damit die Sekundärfolgen minimieren können. Weiterhin kann die Freisetzung von Katalysatoren der Lipidperoxidation (z.B. Übergangsmetalle wie $\text{Fe}^{2+(3+)}$, $\text{Cu}^{+1(2+)}$) kontrolliert werden. Es ist jedoch nahezu unmöglich, die nicht-enzymatische Lipidperoxidation bei Bedarf akut hoch zu regulieren. Damit fehlt

eine effektive Zuflusskontrolle, so dass das nicht-enzymatische Lipidperoxidationsgleichgewicht vor allem abflusskontrolliert zu sein scheint. Einseitige Abflusskontrolle hat jedoch immer ein instabiles Gleichgewicht zur Folge.

Im Gegensatz dazu kann die enzymatische Lipidperoxidation sowohl über den Zufluss als auch über den Abfluss reguliert werden. Ähnlich wie bei der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation kann die „Entgiftung“ von Produkten der enzymatischen Lipidperoxidation und damit deren Sekundärfolgen durch die Funktion der antioxidativen Schutzsysteme hoch- und herunterreguliert werden. Zusätzlich besteht bei der enzymatischen Lipidperoxidation noch die Möglichkeit, die Oxidationsprozesse nach Bedarf gezielt hoch- bzw. herunter zu regulieren. So wird z.B. während der *in vitro* Reifung von Kaninchenretikulozyten die Expression der ALOX15 genau in jenem Zeitfenster hochreguliert, in dem der Abbau der Mitochondrien erfolgt. In jungen Retikulozyten, die ihren Energiebedarf noch weitgehend über die oxidative Phosphorylierung decken, also funktionsfähige Mitochondrien besitzen, wird das lipidperoxidierende Enzym nicht exprimiert. Nachdem die Mitochondrien abgebaut sind und der reife Retikulozyt seinen Energiestoffwechsel vollständig auf die glykolytische ATP-Produktion umgestellt hat, wird auch die Synthese der ALOX15 eingestellt. Dabei könnte es von biologischer Bedeutung sein, dass das einmal synthetisierte Enzym nicht längere Zeit als katalytisch aktives Protein im Retikulozytenzytosol verbleibt, sondern dass es während der Katalyse einer Selbstinaktivierung unterliegt. Modellrechnungen ließen darauf schließen, dass die Halbwertszeit der ALOX15 *in vitro* bei ca. 200 katalytischen Zyklen liegt. Anders ausgedrückt bedeutet das, dass nach der Oxidation von 200 Fettsäuremolekülen die spezifische Aktivität der ALOX15 um 50% abgefallen ist. Dabei muss betont werden, dass die Eigenschaft der Selbstinaktivierung keine Besonderheit der ALOX15 ist, sondern dass auch andere LOX-Isoformen in unterschiedlichem Maße einer Selbstinaktivierung unterliegen. Der molekulare Mechanismus der suizidalen Inaktivierung von Lipoxygenasen ist noch weitgehend unklar. CD-Spektren und andere Messdaten deuten darauf hin, dass es sich dabei nicht um größere sondern eher um subtile Konformationsänderungen handeln sollte, die experimentell jedoch schwer zu fassen sind. Wie immer man die biologische Bedeutung der suizidalen Inaktivierung von Lipoxygenasen auch interpretieren möchte, für die Funktion der ALOX15 beim Mitochondrienabbau während der Retikulozytenreifung ist diese Eigenschaft biologisch sinnvoll. Das Enzym inaktiviert sich während der Oxygenierung der Mitochondrienmembranlipide selbst, so dass einer exzessiven Lipidperoxidation, die in späteren Entwicklungsstadien auch die Plasmamembran betreffen könnte, vorgebeugt wird.

3. Historische Aspekte der Lipoxygenaseforschung

3.1 Lipidperoxidation in tierischen Geweben

Lipoxygenasen sind lipidperoxidierende Enzyme, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Hydroperoxyfettsäuren oxygenieren. Pflanzliche Lipoxygenasen sind schon seit Anfang der 30iger Jahre des vorigen Jahrhunderts bekannt. In tierischen Geweben konnten jedoch bis Mitte der 70iger Jahre keine Lipoxygenasen nachgewiesen werden. Zwar war bekannt, dass Lipidperoxidation auch in tierischen Geweben ablief und dass man für eine solche Reaktion aus thermodynamischen Gründen (relative Reaktionsträgheit von Fettsäuren und Sauerstoff) geeignete Katalysatoren benötigt. Da Lipidperoxidation zu jener Zeit aber als ausschließlich destruktiver Prozess angesehen wurde, wäre es nicht plausibel gewesen zu vermuten, dass die Evolution bei hochentwickelten Organismen Enzyme eingeführt hat, deren katalytische Aktivität eine gezielte Zerstörung zellulärer Strukturen zur Folge hat. Deshalb ging man bis weit in die 1970iger Jahre davon aus, dass die Lipidperoxidation in tierischen Geweben auf nicht-enzymatische Prozesse zurückzuführen sei (9, 10), wobei als Katalysatoren vor allem Hämoproteine bzw. Übergangsmetalle fungieren sollten.

3.2 Die Entdeckung der ersten tierischen Lipoxygenasen

Die Situation änderte sich jedoch grundlegend, als unabhängig voneinander in den Jahren 1974 und 1975 von verschiedenen Arbeitsgruppen die erste tierische Lipoxygenase in humanen Blutplättchen entdeckt wurde (11, 12). Bereits damals waren Thrombozyten als Zellen bekannt, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu zyklischen Oxygenierungsprodukten, den sogenannten Thromboxanen, umwandeln können. Bei Verwendung der Arachidonsäure als Oxygenierungssubstrat entsteht dabei das Produkt Thromboxan A₂ (TxA₂), das wegen seiner prothrombotischen Wirkung große medizinische Bedeutung hat. Nach heutigem Verständnis wird diese Umwandlung durch die konsekutive Katalyse zweier Schlüsselenzyme des Eikosanoidstoffwechsels, der Zyklooxygenase-1 (COX1) und der Thromboxansynthase (TxA₂-Synthase) katalysiert. Als bis dahin nicht näher identifiziertes Reaktionsprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels von Thrombozyten wurde bei diesen Experimenten 12-Hydroxy-5,8,10,14-Eicosatetraensäure nachgewiesen. Dieses Produkt entsprang nicht der Zyklooxygenasereaktion, da Azetylsalicylsäure, ein anerkannter Hemmstoff der Zyklooxygenase, dessen Bildung nicht beeinflusste. Deshalb schlossen die Autoren auf das Vorkom-

men eines eigenständigen lipidoxidierenden Enzyms, das sie in Anlehnung an das entsprechende Pflanzenprotein Lipoxygenase (LOX) nannten.

Als zweite tierische Lipoxygenase wurde im Jahr 1975 ein Enzym im Ly-
sate von Kaninchenretikulozyten identifiziert (13). Die Entdeckungsgeschichte dieses Enzyms unterscheidet sich jedoch grundlegend von den Ereignissen, die zur Entdeckung der Thrombozytenlipoxygenase geführt hatten. Seit Mitte der 1950er Jahre hatte S.M. Rapoport bei seinen Untersuchungen zur Reifung von Kaninchenretikulozyten die Beobachtung gemacht, dass die Atmung dieser Zellen in einem Zeitraum von 1 bis 3 Tagen bis auf fast Null absinkt, obwohl die Zellen nicht abstarben. Daraus schloss er auf die Existenz spezifischer Faktoren, die für die Abschaltung der Atmung verantwortlich sein müssten. Bereits 1955 isolierte er eine heterogene Proteinfraction, welche *in vitro* die Atmung einer Mitochondrienpräparation aus Rinderherzmuskeln hemmte (14). Mehr als 20 Jahre später, nachdem dieser Hemmstoff bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt und umfassend als LOX charakterisiert wurde (15), konnte die beobachtete Atmungshemmung auf die Wirkung der LOX zurückgeführt werden. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Wirkung einer tierischen LOX bereits 1955 beschrieben wurde, ohne dass die Identität des entsprechenden Enzyms damals aufgeklärt werden konnte. In späteren Experimenten untersuchten Rapoport und Schewe die Wirkung von Fraktionen des Retikulozytenhämolylysates auf intakte Rattenlebermitochondrien und fanden mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen heraus, dass es zu drastischen Strukturveränderungen der Mitochondrien kam, die von einer Freisetzung von Mitochondrienmatrixenzymen begleitet wurden (16). Die naheliegende Vermutung, dass es sich bei dem im Retikulozytenzytosol befindlichen Mitochondrienlysefaktor um ein phospholipid- oder proteinspaltendes Enzym handeln sollte, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen fiel jedoch auf, dass die beobachteten morphologischen Veränderungen der Mitochondrien vergleichbar mit denen waren, die nach einer induzierten nicht-enzymatischen Lipidperoxidation erzielt werden konnten. Deshalb wurde in den folgenden Monaten versucht, die Bildung von sekundären Lipidperoxidationsprodukten während der Inkubation von Rattenlebermitochondrien mit Retikulozytenlysat nachzuweisen. Da dies gelang und da die entsprechende Hitzekontrolle negativ ausfiel, konnte 1975 geschlussfolgert werden, dass Kaninchenretikulozyten eine echte Lipoxygenase exprimieren, die in der Lage war, neben freien Fettsäuren, auch isolierte Phospholipide und sogar Biomembranen zu oxygenieren (13). Diese Fähigkeit war zunächst überra-

schend, da weder für die 12-LOX aus Thrombozyten noch für das pflanzliche Enzym aus Sojabohnen eine Membranoxygenaseaktivität beschrieben worden war. In der Folgezeit wurde die LOX aus dem Lysat von Kaninchenretikulozyten aufgereinigt und hinsichtlich ihrer protein-chemischen und enzymatischen Eigenschaften charakterisiert (15). Diese Arbeit, die 1979 im Eur. J. Biochem. veröffentlicht wurde (15), stellt einen Meilenstein in der tierischen LOX-Forschung dar. Obwohl nach 1975 noch andere LOXen in verschiedenen tierischen Zellen und Geweben nachgewiesen wurden (17, 18), blieb das Enzym aus Kaninchenretikulozyten über einen langen Zeitraum das einzige tierische Enzym, das im mg Maßstab als elektrophoretisch homogenes Protein aus natürlichen Quellen isoliert werden konnte. Heute können zwar die meisten LOX-Isoformen als rekombinante Proteine in heterologen Systemen rekombinant exprimiert werden (19, 20), als natürliche LOX Quelle sind jedoch Kaninchenretikulozyten nach wie vor am besten geeignet. Die Entdeckung der LOX in Kaninchenretikulozyten sowie die Reinigung und Charakterisierung des Enzyms war der Beginn einer bis heute andauernden Lipoxygenaseforschung am Institut für Biochemie der Charité, die ohne die Vorarbeiten von S.M. Rapoport nicht möglich gewesen wäre.

3.3 Meilensteine der Erforschung tierischer Lipoxygenasen

3.3.1 Die Reaktionsspezifität von LOX

Alte Bezeichnung	Mensch	Maus
12/15-LOX (Retikulozytenenzym)	ALOX15	Alox15
12-LOX (Blutplättchenenzym)	ALOX12	Alox12
5-LOX (Leukozytenenzym)	ALOX5	Alox5
15-LOX-2 (epidermales Enzym)	ALOX15B	Alox15b
12R-LOX (epidermales Enzym)	ALOX12B	Alox12b
epidermale LOX3 (epidermales Enzym)	ALOXE3	Aloxe3
epidermale 12S-LOX (epidermales Enzym)	Pseudogen	Aloxe12

Tabelle 1: LOX Gene von Mensch und Maus

Als lipidperoxidierende Enzyme zeigen LOX eine hohe Reaktionsspezifität. Wird Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure) als Oxygenierungssubstrat angeboten, entsteht aus der Vielfalt der möglichen Oxygenierungsprodukte (12 isomere Reaktionsprodukte mit konjugierter Dienstruktur können

theoretisch aus dieser Substratfettsäure gebildet werden) nur ein einziges Hydroperoxidisomer. So wurde als Primärprodukt der Arachidonsäureoxygenierung durch die LOX aus Blutplättchen die 12S-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure (12S-HpETE) nachgewiesen (11, 12). Das entsprechende Enantiomer (12R-HpETE) und die anderen theoretisch möglichen Positionsisomeren der Hydroperoxyeicosatetraensäure [5(R/S)-HpETE, 8(R/S)-HpETE, 9(R/S)-HpETE, 11(R/S)-HpETE, 12(R/S)-HpETE und 15(R/S)-HpETE] wurden nur in geringen Mengen gefunden. Die unterschiedliche Reaktionsspezifität, die kennzeichnend für die bis dahin untersuchten LOXen war, wurde zur Klassifizierung dieser Enzyme verwendet. Danach wurde die LOX aus Thrombozyten, die Arachidonsäure zu 12S-HpETE oxygeniert, als 12-LOX bezeichnet. Das Enzym aus Leukozyten, dessen primäres Arachidonsäureoxygenierungsprodukt als 5S-HpETE identifiziert werden konnte, wurde als 5-LOX kategorisiert. Bei der geringen Anzahl der damals bekannten LOX war diese Enzymklassifizierung biologisch sinnvoll, zumal bis dahin angenommen wurde, dass LOX ihre biologische Wirkung vornehmlich über die Bildung bioaktiver Metaboliten vermitteln. Durch die Zunahme der charakterisierten LOX-Isoformen in den 1980 und 1990iger Jahren stieß dieses Klassifizierungssystem und die daraus abgeleitete LOX-Nomenklatur aus verschiedenen Gründen an seine Grenzen (21) und wird heute nur noch vereinzelt verwendet: i) Orthologe Enzyme (z.B. die Alox15 und die Alox15B von Mensch und Maus) unterscheiden sich in ihrer Reaktionsspezifität, würden also trotz ihrer evolutionären Verwandtschaft im spezifitätsbasierten Klassifizierungssystem in verschiedene LOX-Klassen eingegliedert werden. ii) LOX-Isoformen, die evolutionär weiter entfernt voneinander sind (z.B. die ALOX15 und die ALOX15B des Menschen), besitzen die gleiche Reaktionsspezifität mit Arachidonsäure und würden damit im spezifitätsbasierten Klassifizierungssystem in die gleiche LOX-Klasse eingruppiert werden. iii) Einige LOX-Isoformen (z.B. die ALOX15 des Menschen und die Alox5 der Maus) besitzen eine duale Positionsspezifität, so dass deren Eingruppierung in das spezifitätsbasierte Klassifizierungssystem Schwierigkeiten bereitet. iv) Die Reaktionsspezifität von LOXen hängt von der Struktur der verwendeten Substratfettsäure und von den Reaktionsbedingungen ab (22, 23). Um diese Probleme zu umgehen, ist man heute dazu übergegangen, LOX entsprechend ihrer evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen zu klassifizieren und neu entdeckte Enzyme den 6 funktionellen humanen bzw. den 7 funktionellen murinen Isoformen (Tabelle 1) zu zuordnen. Dieser Nomenklaturvorschlag funktioniert für die meisten Säugetier-LOX, stößt aber bei evolutionär weiter entfernten Spezies auf Probleme. So konnten z.B.

im Zebrafischgenom eine Reihe von LOX-Genen nachgewiesen werden, die sich hinsichtlich ihrer Sequenzhomologie und ihrer enzymatischen Eigenschaften (24, 25) nicht eindeutig einem der sieben funktionellen Mausgene zuordnen lassen.

Die Reaktionsspezifität der LOX aus Kaninchenretikulozyten wurde in Zusammenarbeit von S.M. Rapoport und amerikanischen Wissenschaftlern 1981 aufgeklärt (26). Dabei zeigte sich, dass dieses Enzym Arachidonsäure zu zwei unterschiedlichen HpETE-Isomeren, nämlich zu 15S-HpETE und 12S-HpETE in Verhältnis von etwa 10:1 umsetzen konnte. Dieses Ergebnis stieß in der Fachwelt zunächst auf Skepsis, was sich u.a. in den Kommentaren der Gutachter des entsprechenden Publikationsmanuskripts widerspiegelte. Die geäußerte Skepsis war allerdings nicht unbegründet, da trotz der elektrophoretischen Homogenität der LOX-Präparation eine Verunreinigung mit der Blutplättchen-LOX nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Um zusätzliche Argumente für die prinzipielle Möglichkeit einer dualen Reaktionsspezifität von LOX-Isoformen zu erhalten, wurde die Spezifität der Arachidonsäureoxygenierung durch die Retikulozyten-LOX auf verschiedenen Stufen des Reinigungsprotokolls gemessen (27). Da sich die Anreicherungsstrategien von Plättchen- (12) und Retikulozyten-LOX (15) voneinander unterschieden und damit eine Ko-Reinigung der beiden Isoformen als unwahrscheinlich eingeschätzt werden konnte, sollten im Falle der Verunreinigungshypothese die Reaktionsspezifitäten der verschiedenen Enzympräparate (Retikulozytenlysat, Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustauschchromatographie, isoelektrische Fokussierung) differieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Auf allen Reinigungsstufen konnte die duale Reaktionsspezifität nachgewiesen werden, wobei sich das Verhältnis von 15S-HpETE zu 12S-HpETE wie etwa 10:1 verhielt. 1986 wurde in Abwesenheit direkter Strukturdaten von LOX ein Konzept für die Ursachen der dualen Reaktionsspezifität der Retikulozyten-LOX erarbeitet (21), dass in der Folgezeit durch gezielte Modifizierung von LOX-Substraten (27) und durch ortsgerichtete Mutagenese (28, 29) bestätigt wurde. Heute weiß man, dass dieses Triadenkonzept (30) auf alle bisher untersuchten ALOX15-Isoformen verschiedener Spezies anwendbar ist und in eingeschränkter Form auch die Reaktionsspezifitäten von ALOX12 und ALOX5 beschreibt. Die Reaktionsspezifität der anderen bisher verfügbaren LOX-Isoformen scheint jedoch anderen Gesetzmäßigkeiten zu folgen. Obwohl in den vergangenen Jahren auf der Grundlage der nun verfügbaren direkten LOX-Strukturdaten mehrfach versucht wurde, eine umfassende Theorie zur Reaktionsspezifität von LOX zu erarbeiten (31) und mehrere Sequenzdeterminanten der Reaktionsspezifität identifiziert wurden (32, 33), ist die

Erstellung eines solchen vereinheitlichenden Konzeptes bislang leider noch nicht gelungen. Damit ergibt sich die Frage, ob ein solches Konzept überhaupt existiert.

3.3.2 Sequenzierung von LOX cDNAs und LOX Genen

Jahr	Meilenstein
1974	Erstbeschreibung der ersten tierischen LOX in Blutplättchen (ALOX5)
1975	Erstbeschreibung der zweiten tierischen LOX in Kaninchenretikulozyten (ALOX15)
1979	Erste Reinigung einer tierischen LOX (ALOX15) im mg-Maßstab und Charakterisierung
1982	Duale Positionsspezifität der ALOX15
1987	Identifizierung der ALOX15 cDNA
1989	Identifizierung des ALOX15 Gens
1996	ALOX15 knockout Mäuse
1997	Kristallstruktur der ALOX15
1999	Triadenkonzept der ALOX15 (Erklärung der dualen Positionsspezifität der ALOX15)
1999, 2001	Rolle der ALOX15 bei der Atherogenese
2004	Rolle der ALOX15 bei Osteoporose
2004	Lösungsstruktur der ALOX15
2011	Kristallstruktur der ALOX5 (stabile Mutante)
2012	Kristallstruktur des ALOX5-Arachidonsäure-Komplexes

Tabelle 2: Meilensteine der tierischen LOX-Forschung mit besonderer Berücksichtigung der ALOX15

Nach dem Durchbruch, der mit der Identifizierung und Charakterisierung der ersten tierischen LOXen erzielt worden war, traten in den kommenden Jahren andere Aspekte der LOX-Forschung in den Vordergrund. Eine mehr oder weniger willkürliche Auswahl der dabei erzielten Resultate ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Von der rasanten Entwicklung der molekular-biologischen Arbeitstechniken in den 1980iger Jahren profitierte auch die LOX-Forschung. So wurden in den frühen 1980iger Jahren die Nukleotidsequenzen der cDNAs

verschiedener LOX Isoformen (34, 35) und schließlich die Sequenzen der dazu gehörigen Gene (36, 37) aufgeklärt. Durch das humane Genomprojekt, das im Jahre 2001 erstmals einen „mehr oder weniger kompletten“ Satz der humanen Genomsequenz veröffentlichte (38, 39), konnten die kompletten Sequenzen von sechs funktionellen humanen LOX Genen identifiziert werden (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu lieferte die Sequenzierung des Mausgenoms sieben funktionelle LOX Gene. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Spezies besteht im Wesentlichen darin, dass das Gen, welches bei der Maus für die Alox12e kodiert, beim Menschen ein funktionsloses Pseudogen ist. Durch die komplette Sequenzierung der Genome anderer Organismen werden derzeit beinahe täglich neue LOX Gene identifiziert, was die weite Verbreitung der Enzyme in der belebten Natur unterstreicht.

3.3.3 Expressionsregulation von LOX

Mit der Identifizierung von genomischen LOX Sequenzen wurde die strukturelle Grundlage für Untersuchungen geschaffen, welche die Mechanismen der Expressionsregulation von Lipoxygenasen zum Inhalt hatten. Während sich international viele Forscher der Transkriptionsregulation von LOX Genen zuwandten, stand an der Charité die Translationskontrolle der LOX mRNA im Mittelpunkt der Arbeiten. Diese forschungsstrategische Entscheidung, an der S.M. Rapoport wesentlichen Anteil hatte, war vor allem darauf zurückzuführen, dass Retikulozyten keinen Zellkern mehr besitzen, so dass in diesen Zellen keine Transkription mehr stattfinden kann. Trotzdem kommt es im Verlaufe der Retikulozytenreifung in frühen Reifungsstadien der Zellen zum Anschalten und in späteren Entwicklungsperioden zum Abschalten der LOX Expression (15). Diese biologische Dynamik war u.a. dadurch erklärbar, dass in frühen Stadien der Erythropoese, in denen die erythroiden Vorläuferzellen noch über einen funktionsfähigen Zellkern verfügen, das LOX Gen transkribiert wird und die dazugehörige mRNA in Form von translationsinaktiven Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) gespeichert wird. Entsprechend dem internen Reifungsprogramm der Retikulozyten sollte es zum geeigneten Zeitpunkt zur Aktivierung der RNPs kommen, so dass die Translation der LOX mRNA angeschaltet wird. Die dieser Hypothese zugrunde liegenden molekularen Vorgänge konnten durch den Nachweis einer regulatorisch wirkenden repetitiven Sequenz im 3'-untranslatierten Bereich der LOX mRNA (40), durch die Identifizierung der entsprechenden Bindungsproteine (41) und die Beschreibung der beteiligten Aktivierungsmechanismen (42) weitgehend aufgeklärt werden.

Trotz der Fokussierung der Arbeiten zur Expressionsregulation der Retikulozyten-LOX auf die translationalen Mechanismen wurden auch verschiedene Aspekte der Transkriptionsregulation untersucht (43, 44). So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die Interleukine 4 und 13 die Expression der Retikulozyten-LOX in humanen peripheren Monozyten anschalten (45). Differentielle Expressionsarrays und qRT-PCR Daten haben gezeigt, dass dieses Enzym unter allen menschlichen Proteinen den stärksten Anstieg der mRNA Konzentration nach IL-4 Stimulation aufwies (46). Die molekularen Mechanismen der IL-4/13 induzierten LOX-Expression sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Der IL-4/13-Rezeptor, verschiedene Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie und die Azetylierung nukleärer Histone scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen (47, 48, 49).

3.3.4 Herstellung von LOX knockout Mäusen

Die Sequenzierung der murinen LOX Gene und die Entwicklung der knock-out Technologie waren die Voraussetzung für die Züchtung von Mäusen, bei denen selektiv einzelne LOX-Gene funktionell inaktiviert wurden. Derzeit gibt es für die 7 funktionellen LOX Gene, die im Mausgenom vorkommen (Tabelle 1), fünf verschiedene knockout Linien (Alox15, Alox5, Alox12, Alox12B, Alox3). Diese Ganztiermodelle haben große Bedeutung bei der Beantwortung der Fragen zur biologischen Bedeutung verschiedener LOX Isoformen. Einschränkend muss dabei allerdings angemerkt werden, dass konventionelle Stammzellknockouts das Ergebnis eines Selektionsprozesses darstellen, bei dem nur solche Stammzellen selektioniert werden, die in der Lage sind, mit dem defekten Gen zu überleben. Die experimentellen Daten, die bei der bisherigen Charakterisierung von LOX-Knockout Mäusen erhalten wurden, sind in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel (50) zusammengefasst und sollen deshalb an dieser Stelle nur kurz skizziert werden.

1996 wurde die Herstellung Alox15 defizienter Mäuse publiziert (51). Diese Tiere sind lebensfähig und vermehren sich problemlos. Alle basalen Blutparameter sind normal, so dass keine Anhaltspunkte für eine defekte Erythropoese erhalten werden konnten. Detaillierte Untersuchungen zur Auslenkung der Erythropoese, z.B. durch die Induktion einer experimentellen Anämie, wurden aber bislang noch nicht durchgeführt. Allerdings zeigten die Knockoutmäuse in verschiedenen murinen Krankheitsmodellen [Osteoporose (52), Atherosklerose (53), Arthritis (54)] signifikante Unterschiede zu entsprechenden Kontrolltieren. Diese Ergebnisse deuten auf modulierenden Funktionen der Alox15 bei den genannten Erkrankungen hin.

Die funktionelle Inaktivierung des Alox5 Gens wird von Mäusen ebenfalls problemlos toleriert (55). Allerdings zeigen die Tiere in verschiedenen Entzündungsmodellen bzw. Atherosklerosemodellen (56) eine signifikant verminderte Ausbildung von Entzündungssymptomen, wenn sie mit Kontrolltieren identischen genetischen Backgrounds verglichen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die früher aufgestellte Hypothese, dass die Alox5 eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Entzündungsreaktion spielt und auch für vaskuläre Erkrankungen bedeutsam ist. Die Beteiligung des Enzyms an der Biosynthese pro-inflammatorischer Leukotriene (50) liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die erhaltenen experimentellen Ergebnisse, schließt aber andere, bisher nicht diskutierte Pathomechanismen, nicht aus.

Mäuse mit defizienter Expression der Alox12 (57) zeigen ebenfalls keinen gravierenden Phänotyp. Untersuchungen der Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen von Alox12 defizienten Mäusen deuten darauf hin, dass Alox12 defiziente Thrombozyten eine signifikant verringerte Aggregabilität aufweisen. Weiterhin wurden geringgradige Veränderungen bei der epidermalen Differenzierung beobachtet. Inwieweit diese Unterschiede jedoch von medizinischer Bedeutung sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Unter den derzeit verfügbaren LOX-Knockout Mäusen zeigen nur die Alox12B und Alox3e defizienten Tiere einen deutlichen Phänotyp (58, 59). Diese Mäuse durchlaufen eine normale intrauterine Entwicklung, sterben aber wenige Stunden nach der Geburt aufgrund eines erhöhten Wasserverlustes (Dehydratation). Mechanistische Untersuchungen haben ergeben, dass der Wasserverlust auf eine gestörte epidermale Differenzierung zurückzuführen ist. Die Mäuse sind offensichtlich nicht in der Lage, eine effektive Verhornungszone aufzubauen, die den Wasserverlust minimiert. Dabei wird vermutet, dass die Alox3e in Zusammenarbeit mit anderen epidermalen LOX-Isoformen zur Oxygenierung spezifischer Hautlipide beiträgt (58, 59), was für die Bildung des Schutzmantels der Haut bedeutsam zu sein scheint. Ähnliche Symptome entwickeln sich auch bei Menschen, bei denen die Expression der funktionellen ALOX3e aufgrund genetischer Störungen reduziert ist (60). Diese Patienten entwickeln die typische Ichthyose Symptomatik (61).

4. Strukturelle Aspekte der LOX Forschung

4.1 Die Kristallstrukturen verschiedener LOX-Isoformen

LOXen sind monomere Enzyme, die aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehen. Obwohl sowohl die Sojabohnen-LOX als auch die ALOX15 des Ka-

ninchens in großen Mengen aus natürlichen Quellen präpariert werden konnte, dauerte es bis zum Jahr 1993, bevor die Kristallstruktur für das Sojabohnenenzyme aufgeklärt wurde (62. 63). Die Ursachen für die lange Zeit erfolglosen Versuche zur Kristallisation von LOX sind wohl vor allem im hydrophoben Charakter dieser Enzyme zu suchen. Dadurch kommt es während der Kristallisationsexperimente immer wieder zur unspezifischen Proteinaggregation, die die reguläre Kristallisation beeinträchtigt. Trotzdem gelang es 1997, die ALOX15 als erste tierische LOX zu kristallisieren und deren Raumstruktur aufzuklären (64). Kürzlich wurde auch die Raumstruktur der humanen ALOX5 publiziert (65). Mittlerweile sind in der PDB Datenbank (www.rcsb.org/pdb/home/home.do) die Röntgenkoordinaten von drei Säugetier-LOXen (ALOX15, ALOX12, ALOX5) und mehreren anderen LOX-Isoformen hinterlegt. Obwohl sich die Aminosäuresequenzen der bisher kristallisierten LOXen teilweise deutlich voneinander unterscheiden, scheint die Globalstruktur aller LOXen sehr ähnlich zu sein (Abb. 1). Alle LOXen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die in eine Zweidomänenstruktur gefaltet wird. Die kleinere N-terminale Domäne besteht aus mehreren β -Faltblättern, die überwiegend parallel bzw. anti-parallel angeordnet sind. Die Funktionalität der N-terminalen Domäne ist noch nicht vollständig geklärt. Trunkationsexperimente und Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation verschiedener LOX Isoformen deuten darauf hin, dass dieses Strukturelement für die Regulation der katalytischen Aktivität und für die Membranbindung von LOXen bedeutsam zu sein scheint. Die große C-terminale Domäne wird aus mehreren α -Helices aufgebaut und enthält die Substratbindungstasche sowie das katalytische Nichthämeisen. Sowohl gentechnische Trunkationsexperimente, die an verschiedenen tierischen LOXen durchgeführt wurden, als auch limitiert proteolytische Spaltungen der Sojabohnen-LOX haben übereinstimmend gezeigt, dass die isolierte C-terminale Domäne katalytisch aktiv ist. Die Substratbindungstasche der bisher kristallisierten LOX Isoformen wird überwiegend von hydrophoben Aminosäuren gebildet. Lediglich in der unmittelbaren Umgebung des Nichthämeisens sind polarere (Asn) bzw. ionisierbare (His) Reste lokalisiert.

Die Detailstruktur der Substratbindungstasche unterscheidet sich zwischen den einzelnen LOX-Isoformen. Für die Kaninchen ALOX15 wurde aus den Röntgenkoordinaten die Existenz einer U-förmigen Substratbindungstasche abgeleitet, deren Öffnung auf der Proteinoberfläche erkennbar ist. Den Boden der Substratbindungstasche bilden die Aminosäuren Phe353, Ile418 und Ile593 (30). Nach den derzeitigen Vorstellungen zur Substratbindung

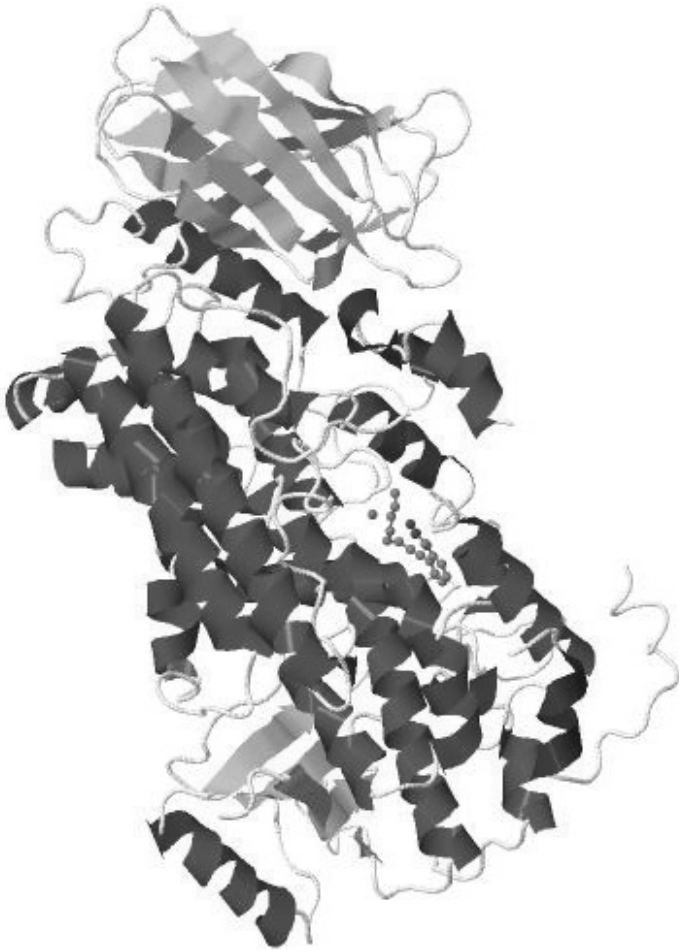


Abb. 1: Röntgenstruktur der Kaninchen ALOX15. Helices sind dunkelgrau, β -Faltblätter hellgrau dargestellt. Arachidonsäure (ball-and-stick Modell) wurde als Substratmolekül in die Substratbindungstasche hinein moduliert. Der isolierte Punkt repräsentiert das katalytische Nichthämeisen.

dringt die Fettsäure mit ihrem Methylende voran in das Lumen der Substratbindungstasche ein und wird so am aktiven Zentrum des Enzyms arretiert, dass die doppelallylständige Methylengruppe des C13 der Arachidonsäure in räumlicher Nachbarschaft zum Nichthämeisen zu liegen kommt. Dadurch

wird die initiale Wasserstoffabstraktion von diesem Kohlenstoffatom ermöglicht. Werden an den oben genannten Positionen Aminosäuren mit kleinen Seitenketten eingeführt, könnte die Substratfettsäure tiefer in die Bindungstasche eintauchen, so dass das C10 der Substratfettsäure in räumlicher Nachbarschaft des katalytischen Nichthämeisens lokalisiert wäre, was eine Oxidation des C12 ermöglicht. Entsprechende Mutationen der oben genannten Aminosäure konnten diese Arbeitshypothese bestätigen (30). Die Substratbindungstasche der ALOX5 hat eine ähnliche Struktur nur scheint sie an beiden Enden verschlossen zu sein (65). Für eine effektive Substratbindung ist damit eine Umorientierung einzelner Aminosäureseitenketten erforderlich. Wie genau diese Umorientierung jedoch induziert wird und welche Konfiguration(en) die Substratfettsäure am aktiven Zentrum des Enzyms einnimmt, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt.

4.2 Strukturelle Flexibilität von LOXen und deren Lösungsstruktur

In Proteinkristallen ist die relative Beweglichkeit einzelner Strukturelemente zueinander eingeschränkt, so dass man auf der Basis der Röntgenkoordinaten von kristallisierten Proteinen keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der strukturellen Flexibilität der Proteine ziehen kann. Für die Kaninchen ALOX15, die ursprünglich als Enzym-Inhibitor Komplex kristallisiert worden war (64), ließen sich aus den Röntgenkoordinaten sehr wohl Schlussfolgerungen zur Strukturodynamik ableiten. Bei einer Neuauswertung der Kristalldaten fiel nämlich auf, dass in den Kristallen nur ca. 50% der Proteinmoleküle den Hemmstoff am aktiven Zentrum gebunden hatten. Die restlichen Moleküle waren nicht ligandiert. Mit Hilfe eines komplizierten Auswertalgorithmus war es nun möglich, die Strukturen des ligandierten und nicht-ligandierten Enzyms zu bestimmen und beide Strukturen miteinander zu vergleichen. Dabei stellte sich heraus, dass es als Folge der Bindung des Hemmstoffs am aktiven Zentrum zu einer deutlichen Konformationsänderung kommt, die nicht nur die unmittelbare Umgebung des aktiven Zentrums betrifft (66). Derzeit ist noch unklar, ob solche Konformationsänderungen auch durch die Bindung flexiblerer Liganden (z.B. Substratfettsäuren) am aktiven Zentrum ausgelöst werden und ob sie für den Katalysemechanismus bedeutsam sind. Eines zeigen diese Strukturveränderungen aber zweifellos. Die Kaninchen ALOX15 ist ein flexibles Enzym und kann durch Bindung bestimmter Liganden am aktiven Zentrum seine Struktur verändern.

Auf der Basis der Röntgenstruktur der Kaninchen ALOX15 wurde die Möglichkeit diskutiert, dass sich in wässrigen Lösungen die beiden Protein-

domänen relativ zu einander bewegen können. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde die Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlen (SAXS) in ALOX15 Lösungen gemessen. Die Auswertung der Streumuster ergab erhebliche Abweichungen der berechneten Lösungsstruktur von der Kristallstruktur, die vor allem den Bereich der N-terminalen Domäne betrafen. Als Kontrollexperimente wurden SAXS Messungen an der N-terminalen Trunktionsmutante der ALOX15 durchgeführt, die eine gute Übereinstimmung von Lösungs- und Kristallstruktur ergaben. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass für die ALOX15 des Kaninchens in wässrigen Lösungen die Möglichkeit einer Interdomänenbewegung in Betracht gezogen werden muss (67). Für andere LOXen (z.B. die Sojabohnen-LOX1) ist das offensichtlich nicht der Fall (68).

Um die Flexibilitätsunterschiede zwischen diesen beiden LOX-Isoformen näher zu charakterisieren, wurden Untersuchungen zur Thermostabilität der beiden Proteine in Verbindung mit Messungen der CD-Spektren und von dynamischen Fluoreszenzveränderungen durchgeführt (69). Dabei konnten deutliche Unterschiede der strukturellen Flexibilität zwischen den beiden LOX-Isoformen ermittelt werden, was im Einklang mit den erhaltenen SAXS Daten steht.

Zusammenfassend scheinen die hier beschriebenen Untersuchungen zu belegen, dass die Globalstruktur aller LOX-Isoformen ähnlich ist, das aber isoformspezifische Unterschiede in der Feinstruktur des aktiven Zentrums und hinsichtlich der strukturellen Flexibilität der Proteine bestehen. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welche biologische Bedeutung sich hinter der großen strukturellen Flexibilität des Kaninchenenzym verbirgt.

4.3 Dimerisierung

Aufgrund ihres hydrophoben Charakters wurde in der jüngeren Vergangenheit eine mögliche Oligomerisierung der Enzyme diskutiert. Als Auslöser dieser Debatte müssen die kürzlich publizierten Ergebnisse angesehen werden, die nachweisen, dass die Zyklooxygenase nur als Homodimer katalytisch aktiv ist (70). Dabei fungiert jeweils ein Monomer als katalytisch aktive Unter-einheit, während das andere Monomer regulatorische Bedeutung besitzt.

Für die Kaninchen ALOX15 und die humane ALOX12 wurde versucht, eine mögliche Dimerisierung des Enzyms mittels Gelfiltration und Kleinwinkelstreuung zu belegen (71). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass für die ALOX15 in wässrigen Lösungen ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht existiert, das in Abhängigkeit von den äußeren Bedingun-

gen, wie Ionenstärke, pH und Enzymkonzentration verschoben werden kann. Aufgrund der Streudaten ließ sich ein Modell der LOX-Homodimere konstruieren, wobei angenommen wurde, dass jedes Monomer innerhalb des Homodimers die Röntgenstruktur einnimmt. Diese Ergebnisse lassen jedoch keine gesicherten Schlussfolgerungen darüber zu, ob Monomere oder Homodimere die katalytisch aktive Enzymspezies darstellen und ob überhaupt wesentliche Unterschiede in der katalytischen Aktivität der beiden Enzymzustände existieren. Für die humane ALOX5 konnte kürzlich ebenfalls eine Dimerisierung nachgewiesen werden (72). Im Gegensatz zur ALOX15 scheinen die ALOX5 Dimere deutlich stabiler zu sein. Unter nativen Bedingungen lassen sich die Homodimere mittels Gelfiltration isolieren und zerfallen nicht sofort wieder in die entsprechenden Monomere. Unklar bleibt für beide LOX-Isomere, ob die Homodimerbildung auch intrazellulär abläuft und ob die biologische Funktion der LOXen durch die Dimerisierung beeinflusst wird.

5. Evolutionäre Aspekte der LOX Forschung

5.1 Vorkommen von LOX in den Domänen des irdischen Lebens

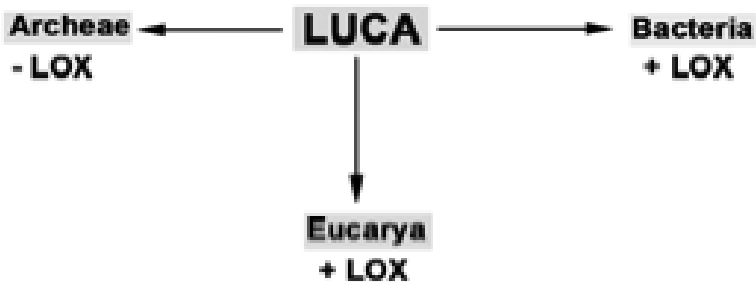


Abb. 2: Vorkommen von Lipoxygenasen in den drei Domänen des irdischen Lebens.

LOXen sind im Tier- und Pflanzenreich (50, 73) weit verbreitet und werden auch in niederen Meeresorganismen (74, 75) gefunden. Durchsucht man die öffentlich zugänglichen Datenbanken nach typische LOX-Sequenzen, kann man feststellen, dass solche Sequenzen sowohl in Eukaryonten als auch in Bakterien vorkommen (Abb. 2). In Archaeen wurden hingegen bislang jedoch keine LOX-Sequenzen gefunden (30). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich Archaeen als extremophile Organismen häufig unter anaeroben Bedingungen entwickeln und Sauerstoff bei ihnen teilweise toxische Effekte hat. Untersucht man das Vorkommen von LOX Sequenzen in

niederen irdischen Lebensformen kann man feststellen, dass diese Enzyme in einigen Prokaryonten (Cyano- und Proteobakterien), in einzelligen Protista (Rot- und Grünalgen) und verschiedenen Pilzen vorkommen. Auch wurden LOX Sequenzen in Moosen und vielen Blütenpflanzen gefunden. Für die Enzyme einiger Bakterienarten wurde postuliert, dass sie durch zufälligen horizontalen Gentransfer (76) und nicht durch systematische Evolution in diese Organismen eingeführt wurden. Bislang ist jedoch noch völlig unklar, welche biologischen Funktionen LOXen bei niederen Lebensformen ausüben.

Im Tierreich wurden LOXen in Korallen, Würmern, Fröschen, Fischen, Vögeln, Nagern, Delphinen, Elefanten und in verschiedenen Affenarten gefunden (30). Sucht man nach LOX-Sequenzen in verschiedenen Modellorganismen der irdischen Lebensentwicklung kann man feststellen, dass keine klassischen LOX-Sequenzen im Genom von *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* vorhanden sind. LOX enthaltende Modellorganismen sind aber z.B. *Dictyostelium discoideum*, *Ciona intestinalis*, *Branchiostoma floridae* und *Tetraodon nigroviridis*. Der Zebrafisch (*Dario rerio*), der häufig für Untersuchungen der Wirbeltierentwicklung verwendet wird, besitzt eine Reihe von LOX-Genen, von denen sich einige nicht eindeutig bestimmten humanen Genen zuordnen lassen (24, 25). Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Zebrafisch im Unterschied zu den meisten Säugetieren über mehrere Gene verfügt, die für eine ALOX5 kodieren. Diese Gene sind durch eine hohe Sequenzhomologie gekennzeichnet, liegen aber auf verschiedenen Chromosomen und unterscheiden sich teilweise in ihren proteinkodierenden und regulatorischen Sequenzen.

5.2 Lipoxygenase bei der Primatenentwicklung

Vergleicht man die LOX-Sequenzen verschiedener Säugetiere, fällt auf, dass in den meisten Spezies funktionelle Gene für fünf bis sieben verschiedene LOX-Isoformen gefunden werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass sich während der Säugetierentwicklung LOXen nur wenig verändert haben. Schaut man sich jedoch die Sequenzen der Primaten ALOX15 genauer an, wird deutlich, dass bei niederen Primaten, z.B. bei Makkaken und Gibbons die Primärdeterminanten der Positionsspezifität teilweise durch Aminosäuren mit kleinen Seitenketten besetzt sind. Entsprechend der Triadenhypothese (30), welche die Reaktionsspezifität dieser Enzymklasse determiniert, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Tierspezies um 12-lipoxygenierenden ALOX15-Spezies handelt. Für die ALOX15 vom *M. mulatta* wurde diese Vorhersage kürzlich experimentell bestätigt (77). Bei

Orang-Utans (77), Gorillas, Schimpansen Bonobos und beim Menschen sind die Triadendeterminanten mit großen Aminosäuren besetzt, so dass auf 15-lipoxygenierende Enzymspezies geschlossen werden kann. Damit kann festgestellt werden, dass niedrigere Primaten ähnlich wie etliche Nicht-Primatesäugetiere (Maus, Ratte, Schwein etc.) 12-lipoxygenierende ALOX15 exprimieren. Im Gegensatz dazu scheinen hochentwickelte Primaten inklusive des Menschen 15-lipoxygenierende Enzyme zu exprimieren. Diese Hypothese wird noch dadurch untermauert, dass die kürzlich publizierten Genomsequenzen ausgestorbener Vorfahren des heutigen Menschen [*H. neandertalensis* (78), *H. denisovan* (79)] darauf hindeuten, dass auch diese Primaten ALOX15 Gene besaßen, die für 15-lipoxygenierende Enzyme kodieren. Versucht man diese Befunde in das Evolutionsschema der Primatenentwicklung einzupassen, kann geschlussfolgert werden, dass während der Primatenentwicklung die Umschaltung von 12-lipoxygenierenden zu 15-lipoxygenierenden ALOX15 Spezies zwischen Gibbon und Orang-Utan erfolgte (Abb. 3). Warum die Umschaltung vorgenommen wurde und welchen evolutionären Vorteil dieser switch für die höher entwickelten Primaten mit sich brachte, ist völlig unklar.

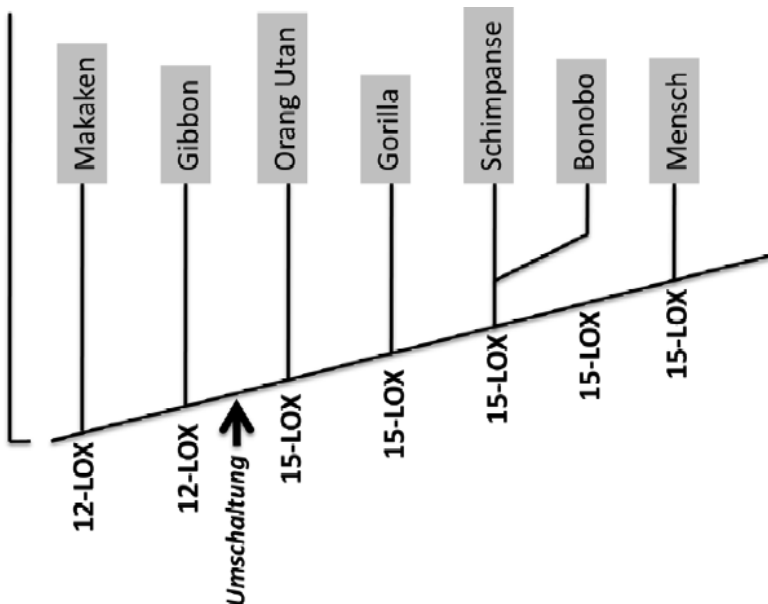


Abb. 3: Umschalten der Positionsspezifität der ALOX15 während der Primatenentwicklung

6. Perspektiven der LOX-Forschung

Die weitere Entwicklung der Lipoxygenasenforschung in den nächsten 10-20 Jahren ist schwer vorherzusagen. Es ist jedoch zu erwarten, dass die medizinische Bedeutung verschiedener LOX-Isoformen genauer untersucht werden wird. Hier steht aller Voraussicht nach die Rolle der ALOX5 bei kardio-vaskulären bzw. entzündlichen Erkrankungen im Vordergrund. Leider existieren derzeit noch keine wirklich isoform-spezifischen LOX-Hemmstoffe, die für in vivo Untersuchungen in tierischen Krankheitsmodellen und am Menschen genutzt werden können. Die Entwicklung solcher Substanzen wäre für die translationale LOX-Forschung von überragendem Interesse. Für die Klärung der biologischen Rolle der ALOX15, die von S.M. Rapoport vor über 35 Jahren erstmals beschrieben wurde, stehen die entsprechenden knockout Mäuse zur Verfügung (51). Obwohl bisherige Untersuchungen an diesen Tieren keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung des Enzyms an der Entwicklung roter Blutzellen geliefert haben, bedeutet das nicht, dass das Enzym an der murinen Erythropoese nicht beteiligt ist. Um diese Frage zu klären, sind Auslenkungsexperimente (z.B. Induktion einer experimentellen Anämie) nötig, die in den nächsten Monaten in unserem Labor durchgeführt werden.

Auf dem Gebiet der molekularen Enzymologie ist in den nächsten Jahren zu erwarten, dass die produktiven Enzym-Substrat-Komplexe verschiedener LOX-Isoformen strukturell aufgeklärt werden. Bereits jetzt gibt es für die ALOX5 einen Satz von Röntgenkoordinaten, die den ALOX5-Arachidonsäure-Komplex strukturell charakterisieren (80). Leider ist die Qualität der Daten derzeit noch nicht gut genug, um die genaue Orientierung der Fettsäure am aktiven Zentrum, besonders die exakte Lokalisation der Carboxylgruppe, ableiten zu können. Dieses technische Problem sollte aber in nächster Zukunft gelöst werden können. Schwieriger gestaltet sich jedoch die Beantwortung der Frage, ob es sich bei der gelösten Struktur um eine katalytisch produktive Konformation handelt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein flexibles Fettsäuremolekül verschiedene energetisch gleichwertige Konformationen an aktiven Zentrum einnehmen kann. Dabei muss die thermodynamisch stabilste Konformation nicht unbedingt jene sein, die für die Oxygenierungsreaktion benötigt wird. Dieses Problem ist mit reinen Strukturuntersuchungen nicht sicher zu lösen. Hierzu bedarf es einer Kombination von direkten Strukturdaten und computergestützten Modulierungsexperimenten.

Der Nachweis von LOX-Sequenzen in verschiedenen Bakterien wirft natürlich die Frage nach der biologischen Funktion der Enzyme bei niederen Lebensformen auf. Dazu existieren momentan noch keine detaillierten Unter-

suchungen. Deshalb ist in den nächsten Jahren zu erwarten, dass diese Fragen in den Mittelpunkt intensiver Untersuchungen rücken werden. Möglicherweise erlauben die bei diesen Untersuchungen zu erwartenden Daten eine vollständig andere Sichtweise auf die biologische Rolle von LOXen in höheren Organismen, so dass einzelne Kapitel der biologischen Bedeutung von LOXen neu geschrieben werden müssen.

Wie immer die Entwicklung der LOX-Forschung auch aussehen wird, alle zukünftigen Ergebnisse ruhen auf den Fundamenten, die von den Pionieren der Erforschung tierischer Lipoxygenasen, zu denen S.M. Rapoport gehört, gelegt worden sind. In diesem Sinn wird auch die Arbeit kommender Generationen von LOX-Forschern durch die bahnbrechenden Arbeiten von S.M. Rapoport bewusst oder unbewusst geprägt sein.

Literaturverzeichnis

1. Püschel, G, Kühn, H., Kietzmann, T., Höhne, W., Christ, B., Doenecke, D. and Koolman, J. (2011) *Taschenlehrbuch der Biochemie*, Thieme, 1. Auflage, 253-254.
2. Aoki, T, Narumiya, S. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 304-311.
3. Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E., Hashimoto-dani, Y. (2012) *Neuron* 76, 70-81.
4. Chung, J., Chen, C., Paw, B.H. (2012) *Curr. Opin. Hematol.* 19, 156-162.
5. Baron, M.H., Isern, J., Fraser, S.T. (2012) *Blood* 119, 4828-4837.
6. Liu, Z., Li, D., Zheng, X., Wang, E., Wang, J. (2012) *Curr. Pharm. Des.* (ahead of print).
7. Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y. (2012) *Cell Signal* 24, 981-990.
8. Antelmann, H., Helmann, J.D. (2011) *Antioxid Redox Signal* 14, 1049-1063.
9. Tappel, A.L. (1970) *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 1137-1139.
10. Mellors A, Tappel AL. (1966) *Lipids* 1, 282-184.
11. Hamberg, M., Samuelsson, B. (1974) *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 71, 3400-3404.
12. Nugteren, D.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 380, 299-307.
13. Schewe, T., Halangk, W., C. Hiebsch, Rapoport, S.M. (1974) *FEBS Lett* 60, 149-152.
14. Rapoport, S., (1955) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 302: 167-173.
15. Rapoport, S.M., Schewe, T., Wiesner, R., Halangk, W., Ludwig, P., Janicke-Höhne, M., Tannert, C., Hiebsch, C., Klatt, D. (1979) *Eur. J. Biochem.* 96, 545-561.
16. Schewe, T., Krause, W., Halangk, W., Rapoport, S.M (1975) VII. Internationales Symposium über Struktur und Funktion der Erythrozyten, Berlin, 1973, *Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften der DDR*, Akademie-Verlag Berlin, pp. 609-615.

17. Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E.J., Austen, K.F., Lewis, R.A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 7626-7630.
18. Goldyne, M.E., Burrish, G.F., Poubelle, P., Borgeat, P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8815-8819.
19. Denis, D., Falguyret, J.P., Riendeau, D., Abramovit,z M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 5072-5079.
20. Andreou, A.Z., Vanko, M., Bezakova, L., Feussner, I. (2008) *Phytochemistry* 69, 1832-1837.
21. Kühn, H., Schewe, T., Rapoport, S.M. (1986) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 58:273-311.
22. Gardner, H.W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 274-281.
23. Walther, M., Roffeis, J., Jansen, C., Anton, M., Ivanov, I., Kuhn, H. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 827-835.
24. Haas, U., Raschperge, E., Hamberg, M., Samuelsson, B., Tryggvason, K., Haeggström, J.Z. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20479-20484.
25. Jansen, C., Hofheinz, K., Vogel, R., Roffeis, J., Anton, M., Reddanna, P., Kuhn, H., Walther, M. (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 37804-37812.
26. Bryant, R.W., Bailey, J.M., Schewe, T., Rapoport, S.M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6050-6055.
27. Kuhn, H., Sprecher, H., Brash, A.R. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 16300-16305.
28. Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C.S., Sigal, E. (1991) *Nature* 354, 149-152.
29. Borngraber, S., Browner, M., Gillmor, S., Gerth, C., Anton, M., Fletterick, R., Kuhn, H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 37345-37350.
30. Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V.B., Kuhn, H., Walther, M. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.* 503, 161-174.
31. Coffa, G., Schneider, C., Brash, AR. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 87-92.
32. Jisaka, M., Kim, R.B., Boeglin, W.E., Brash, A.R. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 1287-1293.
33. Coffa, G., Brash, A.R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15579-15584.
34. Thiele, B.J., Fleming, J., Kasturi, K., O'Prey, J., Black, E., Chester, J., Rapoport, S.M., Harrison, P.R. (1987) *Gene* 57, 111-119.
35. Matsumoto, T., Funk, C.D., Rådmark, O., Höög, J.O., Jörnvall, H., Samuelsson, B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 26-30.
36. O'Prey, J., Chester J., Thielem B,J., Janetzki, S, Prehn, S., Fleming, J., Harrison, P.R. (1989) *Gene* 84, 493-499.
37. Funk, C.D., Matsumoto, T., Hoshiko, S., Rådmark, O., Samuelsson, B. (1989) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 19, 470-473.
38. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) *Nature* 409, 860-921.
39. Venter, JC et al. (2001) *Science* 291, 1304-1351.

40. Thiele, B.J., Andree, H., Höhne, M., Rapoport, S.M. (1982) *Eur. J. Biochem.* 129, 133-141.
41. Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N., Thiele, B.J. (1994) *EMBO J.* 13, 1476-1481.
42. Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., Hentze, M.W. (2001) *Cell* 104, 281-290.
43. Zuo, X., Shen, L., Issa, J.P., Moy, O., Morris, J.S., Lippman, S.M., Shureiqi, I. (2008) *FASEB J.* 22, 1981-1992.
44. Liu, C., Xu, D., Sjöberg, J., Forsell, P., Björkholm, M., Claesson, H.E. (2004) *Exp. Cell Res.* 297, 61-67.
45. Conrad, D.J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., Sigal, E. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 217-221.
46. Chaitidis, P., Billett, E.E., O'Donnell, V.B., Fajardo, A.B., Fitzgerald, J., Kuban, R.J., Ungethuem, U., Kühn, H. (2004) *J. Immunol.* 173, 4821-4827.
47. Shankaranarayanan, P., Chaitidis, P., Kühn, H., Nigam S. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42753-42760.
48. Bhattacharjee, A., Mulya, A., Pal, S., Roy, B., Feldman, G.M., Cathcart, M.K. (2010) *J. Immunol.* 185, 5211-5224.
49. Xu, B., Bhattacharjee, A., Roy, B., Xu, H.M., Anthony, D., Frank, D.A., Feldman, G.M., Cathcart, M.K. (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, 3918-3928.
50. Haeggström, J.Z., Funk, C.D. (2011) *Chem. Rev.* 111, 5866-5898.
51. Klein, R.F., Allard, J., Avnur, Z., Nikolcheva, T., Rotstein, D., Carlos, A.S., Shea, M., Waters, R.V., Belknap, J.K., Peltz, G., Orwoll, E.S. (2004) *Science* 303, 229-232.
52. George, J., Afek, A., Shaish, A., Levkovitz, H., Bloom, N., Cyrus, T., Zhao, L., Funk, C.D., Sigal, E., Harats, D. (2001) *Circulation* 104(14) 1646-50.
53. Krönke, G., Katzenbeisser, J., Uderhardt, S., et al. (2009) *J. Immunol.* 183, 3383-3389.
54. Chen, X.S., Sheller, J.R., Johnson, E.N., Funk, C.D. (1994) *Nature* 372, 179-182.
56. Zhao, L., Moos, M.P., Gräbner, R., et al. (2004) *Nat. Med.* 10, 966-973.
57. Johnson, E.N., Brass, L.F., Funk, C.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3100-3105.
58. Epp, N., Fürstenberger, G., Müller, K., de Juanes, S., Leitges, M., Hausser, I., Thieme, F., Liebisch, G., Schmitz, G., Krieg, P. (2007) *J. Cell. Biol.* 177, 173-182.
59. Krieg, P., Rosenberger, S., de Juanes, S., et al. (2012) *J. Invest. Dermatol.* (ahead of print).
60. Lesueur, F., Bouadjar, B., Lefèvre, C., et al. (2007) *J. Invest. Dermatol.* 127, 829-834.
61. Eckl, K.M., de Juanes, S., Kurtenbach, J., et al. (2009) *J. Invest. Dermatol.* 129, 1421-1428.
62. Boyington, J.C., Gaffney, B.J., Amzel, L.M. (1993) *Science* 260, 1482-1486.

63. Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J.T., Walter, R., Axelrod, B. (1996) *Biochemistry* 35, 10687-10701.
64. Gillmor, S.A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., Browner, M.F. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003-1009.
65. Gilbert, N.C., Bartlett, S.G., Waight, M.T., Neau, D.B., Boeglin, W.E., Brash, A.R., Newcomer M, E. (2011) *Science* 331, 217-219.
66. Neau, D.B., Gilbert, N.C., Bartlett, S.G., Boeglin, W., Brash, A.R., Newcomer, M.E. (2009) *Biochemistry* 48, 7906-7915.
67. Hammel, M., Walther, M., Prassl, R., Kuhn, H. (2004) *J. Mol. Biol.* 343, 917-929.
68. Dainese, E., Sabatucci, A., van Zadelhoff, G., Angelucci, C.B., Vachette, P., Veldink, G.A., Agrò, A.F., Maccarrone, M. (2005) *J. Mol. Biol.* 349, 143-152.
69. Mei, G., Di Venere, A., Nicolai, E., Angelucci, C.B., Ivanov, I., Sabatucci, A., Dainese, E., Kuhn, H., Maccarrone, M. (2008) *Biochemistry* 47, 9234-9242.
70. Ivanov, I., Di Venere, A., Horn, T., Scheerer, P., Nicolai, E., Stehling, S., Richter, C., Skrzypczak-Jankun, E., Mei, G., Maccarrone, M., Kühn, H. (2011) *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 1001-1010.
71. Ivanov, I., Shang, W., Toledo, L., Masgrau, L., Svergun, D.I., Stehling, S., Gómez, H., Di Venere, A., Mei, G., Lluch, J.M., Skrzypczak-Jankun, E., González-Lafont, A., Kühn, H. (2012) *Proteins* 80, 703-712.
72. Häfner, A.K., Cernescu, M., Hofmann, B., Ermisch, M., Hörnig, M., Metzner, J., Schneider, G., Brutschy, B., Steinhilber, D. (2011) *Biol. Chem.* 392, 1097-1111.
73. Andreou, A., Feussner, I. (2009) *Phytochemistry* 70, 1504-1510.
74. Brash, A.R., Boeglin, W.E., Chang, M.S., Shieh, B.H. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 20949-20957.
75. Hawkins, D.J., Brash, A.R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 7629-7634.
76. Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2001) *Microbiology* 147, 3199-3200.
77. Vogel, R., Jansen, C., Roffeis, J., Reddanna, P., Forsell, P., Claesson, H.E., Kuhn, H., Walther, M. (2010) *J. Biol. Chem.* 285, 5369-5376.
78. Green, R.E., Krause, J., Briggs et al. (2010) *Science* 328, 710-722.
79. Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.T., et al. (2012) *Science* 338, 222-226.
80. Gilbert, N.C., Rui, Z., Neau, D.B., Waight, M.T., Bartlett, S.G., Boeglin, W.E., Brash, A.R., Newcomer, M.E. (2012) *FASEB J.* (ahead of print)