

**Biochemische Charakterisierung der
5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase
und biologische Funktion der
5-Hydroxy- und 5-oxo-Eikosatetraensäure**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Shing Kit Lee

Kiel

2003

Referent/in: Prof. Dr. K. Krupinska
Korreferent/in: Prof. Dr. J.-M. Schröder
Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2004
Zum Druck genehmigt: Kiel, 12.02.2004

Der Dekan

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	4
3	Material und Methoden	11
3.1	Reagenzien und Laborgeräte.....	11
3.1.1	Chemikalien.....	11
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	11
3.1.3	Zellkulturmedien.....	14
3.1.4	Laborgeräte.....	14
3.2	Isolierung von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten.....	17
3.3	Präparation von Mikrosomen durch fraktionierte Zentrifugation.....	17
3.4	Solubilisierung der 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) aus Mikrosomen.....	18
3.5	Nachweis der 5-HEDH-Aktivität.....	19
3.5.1	Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität im Enzymstandardtest.....	19
3.5.2	Flüssigkeitschromatographische Auftrennung und Quantifizierung von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE.....	20
3.5.3	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes.....	21
3.6	Untersuchungen zur 5-HEDH-Stabilität.....	21
3.7	Untersuchungen zur 5-HEDH-Aktivität.....	22
3.8	Untersuchung der Substratumsatzgeschwindigkeit der 5-HEDH.....	23
3.9	Ammoniumsulfatfällung von 5-HEDH.....	24
3.10	Aufreinigung der 5-HEDH mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (HPLC).....	24
3.10.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	24
3.10.2	Anionenaustauschchromatographie.....	25
3.10.3	Aufreinigung der 5-HEDH mittels HPLC- μ -Separation.....	26
3.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
3.12	Bestimmung der Aminosäuresequenz.....	31
3.13	Enzymatischer Abbau durch Lys-C-Endoprotease.....	32
3.14	Depletierung von β -Aktin und Laktotransferrin aus PMN-Lysaten mit Hilfe von Antikörpern an Affinitätssäulen.....	32
3.15	Einfluß zweiwertiger Metallkationen auf die 5-HEDH-Aktivität.....	33
3.16	Einfluß von Chelatoren auf die 5-HEDH-Aktivität.....	34
3.17	Einfluß von Calmidazoliumchlorid auf die 5-HEDH-Aktivität.....	35
3.18	Massenspektrometrie.....	35
3.19	Zellkultur.....	36
3.19.1	Isolierung und Kultur von humanen Keratinozyten.....	36
3.19.2	Isolierung und Kultur von humanen Fibroblasten.....	36
3.20	Subkultur von Keratinozyten und Fibroblasten.....	37
3.21	Kryokonservierung.....	37
3.22	Stimulation primärer Keratinozyten und Fibroblasten mit..... 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE.....	38
3.23	RNA-Isolierung.....	38
3.24	Reverse Transkription (RT).....	39
3.25	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	39

3.26	Semiquantitative, densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte	42
3.27	Amplifikation eines unbekanntes Genabschnittes mit Hilfe der RACE-PCR-Technik	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Chromatographischer Nachweis von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE ...	44
4.2	Nachweis der 5-HEDH-Aktivität nach fraktionierter Zentrifugation ...	46
4.3	Untersuchung der 5-HEDH-Stabilität	47
4.3.1	Grad der Degradierung der 5-HEDH bei Raumtemperatur.....	47
4.3.2	5-HEDH-Stabilität nach Kryokonservierung	48
4.3.3	5-HEDH-Stabilität als Funktion der Temperatur	49
4.3.4	Einfluß organischer Lösungsmittel auf die 5-HEDH-Stabilität	49
4.4	Untersuchung der 5-HEDH-Aktivität	50
4.4.1	Einfluß der Reaktionstemperatur auf die 5-HEDH-Aktivität.....	50
4.4.2	Einfluß von NaCl auf die 5-HEDH-Aktivität.....	51
4.4.3	Einfluß des pH-Wertes auf die 5-HEDH-Aktivität	52
4.5	Untersuchungen zur Substratumsatzgeschwindigkeit von 5-HEDH.....	54
4.5.1	5-HEDH-Aktivität als Funktion der Substratlimitierung	54
4.5.2	Bildungsrate von 5-oxo-EETE nach der Substratlimitierung	54
4.5.3	Einfluß der Reaktionszeit auf die 5-HEDH-Aktivität	55
4.5.4	Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit (V_{max})	56
4.6	Ammoniumsulfatfällung	58
4.7	Partielle 5-HEDH-Aufreinigung mit Hilfe der Hochleistungsflüssig- keitschromatographie (HPLC)	60
4.7.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	60
4.7.2	Schwache Anionenaustauschchromatographie (DEAE-P-Säule)	60
4.7.3	HPLC- μ -Separation an einer starken Anionenaustauschersäule..... (Mini-Q-Säule)	64
4.7.4	HPLC- μ -Separation an einer C ₂ /C ₁₈ -Umkehrphasensäule.....	69
4.8	Nachweis der 5-HEDH-Aktivität nach Depletierung von β -Aktin	
	und Laktotransferrin aus PMN-Lysaten mit Hilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern.....	79
4.9	Einfluß von Kalziumchlorid (CaCl ₂) auf die 5-HEDH-Aktivität.....	83
4.10	Einfluß von Magnesiumchlorid (MgCl ₂) auf die 5-HEDH-Aktivität ...	84
4.11	Einfluß von Eisen-(II)-sulfat (FeSO ₄) auf die 5-HEDH-Aktivität	84
4.12	Einfluß von Zinksulfat (ZnSO ₄) auf die 5-HEDH-Aktivität	85
4.13	Einfluß von EDTA auf die 5-HEDH-Aktivität	86
4.14	Einfluß von EGTA auf die 5-HEDH-Aktivität	86
4.15	Einfluß von Calmidazoliumchlorid auf die 5-HEDH-Aktivität.....	87
4.16	Massenspektrometrische Untersuchung einer partiell aufgereinigten, 5-HEDH-aktiven HPLC-Fraktion	88
4.17	Amplifizierung eines Genabschnittes der <i>NADH-Dehydrogenase</i>	
	bzw. der <i>eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase</i>	92
4.18	Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE auf die mRNA-Expression..... in menschlichen Hautzellen.....	92
4.18.1	Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE auf die mRNA-Expression..... von primären Keratinozyten.....	92
4.18.2	Einfluß von 5-(S)-HETE auf die IL-1 β -mRNA-Expression von	
	primären Fibroblasten.....	93

4.18.3	Einfluß von 5-oxo-ETE auf die Gro- α -mRNA-Expression..... von primären Fibroblasten.....	94
4.18.4	Einfluß von 5-oxo-ETE auf die IL-1 α - und IL-1 β -mRNA-Expression primärer Fibroblastenkulturen.....	95
5	Diskussion	98
5.1	Diskussion der Methoden.....	98
5.1.1	Chromatographischer Nachweis der 5-HEDH-Aktivität im	98
5.1.2	Präparation und Stabilisierung der 5-HEDH.....	99
5.1.3	Versuche zur chromatographischen Aufreinigung der 5-HEDH.....	102
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	106
5.2.1	5-HEDH-Kinetik	106
5.2.2	Nachweis von α -Aktinin-1, Aktin und α -Aktin in..... 5-HEDH-Präparationen	108
5.2.3	Nachweis von Protein Kinase C-Inhibitor Protein-1..... (KCIP-1 bzw. 14-3-3) in 5-HEDH-Fraktionen	109
5.2.4	Nachweis von Calgranulin A und Calgranulin B in..... 5-HEDH-Fraktionen.....	110
5.2.5	Hemmung der 5-HEDH-Aktivität durch Calmidazoliumchlorid.....	112
5.2.6	Nachweis von Laktoferrin in 5-HEDH-Fraktionen.....	113
5.2.7	Massenspektrometrischer Nachweis einer putativen	114
5.2.8	NADH-Dehydrogenase in 5-HEDH-Fraktionen.....	114
5.2.8	5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE induzieren die mRNA-Expression	117
5.2.8	von IL-1 α , IL-1 β und Gro- α in humanen Fibroblasten	117
6	Zusammenfassung	122
7	Abstract	125
8	Abkürzungen und Synonyme	128
9	Literaturverzeichnis	131
10	Anhang	143
10.1	Berechnung der relativen Zentrifugalkraft.....	143
10.2	Abkürzungen und Buchstabensymbole der Aminosäuren	143
10.3	Kodierungssequenz der Aminosäuren.....	144
11	Danksagung	145
12	Erklärung	146
13	Lebenslauf	147

2 Einleitung

Arachidonsäure, die erstmals aus der Erdnußpflanze *Arachis hypogaea* isoliert worden war, ist ein Bestandteil von Membranphospholipiden und wird intrazellulär durch die Phospholipase A₂ bzw. durch die gemeinsame Wirkung der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C und Diazylglyzerol-Lipase gespalten (Irvine, 1982; Daniel, 1985: Kapitel 10). Die vierfach ungesättigte Fettsäure ist vorwiegend in der Sn2-Position von Phospholipiden verestert und liegt intrazellulär nur in sehr geringer Konzentration gelöst vor (Irvine, 1982). Als Vorläufermolekül von bioaktiven Eikosanoiden kann sie durch einen Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Enzymkomplex oxidiert (Capdevila *et al.*, 1992) oder über die Cyclooxygenase wie auch über die Lipoxygenase metabolisiert werden (siehe Abb. 1; Pace-Asciak *et al.*, 1983: Kapitel 16; Holtzman, 1991; Vane *et al.*, 1998). Cytochrom P₄₅₀, das ubiquitär vorkommt und Oxygenierungsreaktionen katalysiert, besitzt weder Substrat- noch Stereospezifität (Capdevila *et al.*, 1982, 1986). Die in zwei Isoformen vorkommende Cyclooxygenase (COX-I und -II) setzt dagegen die Arachidonsäure unter Bildung der beiden instabilen Prostaglandinverbindungen PGG₂ und PGH₂ in die stabileren PGD₂, PGE₂ und PGF_{2α} bzw. in Thromboxane oder Prostazykline um (Pace-Asciak *et al.*, 1983: Kapitel 16; Kulmacz, 1985: Kapitel 1; Holtzman, 1991). Weitere Eikosanoide lassen sich durch die „nicht-häm eisenhaltigen“ Enzyme, die sogenannten 5-, 12- oder 15-Lipoxygenasen (5-, 12-, 15-LOX), metabolisieren. Diese Enzyme weisen strenge Position- und Stereoselektivität auf (Papatheofanis *et al.*, 1985: Kapitel 2; Kühn *et al.*, 1986). 15-Lipoxygenase, die in humanen Eosinophilen konstitutiv exprimiert wird (Morita *et al.*, 1990), läßt sich auch in Epithelzellen (Ford-Hutchinson, 1991) und in dermalen Fibroblasten nachweisen (Kragballe *et al.*, 1986). Keratinozyten zeigen hingegen erst nach Zerstörung ihrer Zellmembran die spezifische 15-LOX-Aktivität (Green, 1990). Die biologische Funktion der 15-LOX ist weitgehend unbekannt. Wahrscheinlich unterstützt 15-LOX anti-inflammatorische Prozesse, indem die Bildung von 15-Hydroxyeikosatetraensäure (15-HETE) und Lipoxine gefördert und die Expression von inflammatorischen Zytokinen unterbunden werden (Ferrante *et al.*, 1997; Serhan *et al.*, 1997). Die 15-Lipoxygenase läßt sich durch 12-Hydroxyeikosatetraensäure (12-HETE) hemmen (Kragballe *et al.*, 1986; Grimminger *et al.*, 1995). Zudem wirkt das Stereoisomer 12-(R)-HETE chemo-

taktisch gegenüber neutrophilen Granulozyten (Powell *et al.*, 1995a) und läßt sich in psoriatisch erkrankter Haut in signifikant hohen Mengen nachweisen (Boeglin *et al.*, 1998).

Im Vergleich zu 12- und 15-HETE sind 5-(*S*)-Hydroxy-(6 *trans*, 8, 11, 14 *cis*)-Eikosatetraensäure (5-Hydroxy-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-Eikosatetraensäure, **5-(*S*)-HETE**) und 5-oxo-(6 *trans*, 8, 11, 14 *cis*)-Eikosatetraensäure (5-oxo-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-Eikosatetraensäure, **5-oxo-ETE**) Intermediate des 5-LOX-Abbauweges. Bei der Bildung des 5-Hydroxy- und 5-oxo-Eikosanoids wird Arachidonsäure als Ausgangssubstrat in die instabile 5-Hydroperoxyeikosatetraensäure (5-HPETE) oxidiert (Samuelsson, 1991, 2000) und weiter über eine Glutathion-abhängige Peroxidase zu 5-(*S*)-HETE reduziert (Skoog *et al.*, 1988; Jakobsson *et al.*, 1997). Alternativ dazu läßt sich 5-HPETE auch durch eine Leukotrien A-Synthase in diverse Leukotriene umwandeln (Samuelsson, 1982; Mancini *et al.*, 1998; Rådmark, 2000). Die Bildung von 5-oxo-ETE erfolgt über eine mikrosomale 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) unter Beteiligung des Kosubstrates NADP⁺ (siehe Abb. 1).

5-HEDH weist eine hohe Substratspezifität gegenüber Eikosanoiden auf, die eine 5-(*S*)-Hydroxylgruppe, gefolgt von einer 6-*trans* Doppelbindung im Molekül, besitzt (Powell *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). Diese stereospezifische 5-oxo-ETE-Bildung läßt sich z.B. mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) oder Ca²⁺-Ionophor A23187 bis zu achtfach in Eosinophilen und bis zu 9,6-fach in Neutrophilen steigern (Powell *et al.*, 1995b). Neben der enzymatischen Bildung ist auch eine „nicht-enzymatische“ Oxidation bekannt (Gravel *et al.*, 1993). Falgueyret *et al.* (2000) wiesen nach, daß die „nicht-enzymatische“ 5-oxo-ETE-Bildung vom pH-Wert abhängig ist und im alkalischen Milieu begünstigt wird. Darüber hinaus entdeckten Zarini *et al.* (2003) einen neuen 5-oxo-ETE-Syntheseweg, bei dem 5-HPETE als Ausgangssubstrat dient und nicht 5-(*S*)-HETE. Der Mechanismus der zellulären Aktivierung ist nicht vollständig bekannt. Desensibilitätsstudien mit Pertussis Toxin wiesen darauf hin, daß die ausgelöste Zellantwort über einen LTB₄-unabhängigen (Powell *et al.*, 1993; O’Flaherty *et al.*, 1994), G-Protein-gekoppelten Rezeptor wirkt (Czech *et al.*, 1997; O’Flaherty *et al.*, 1988, 2000).

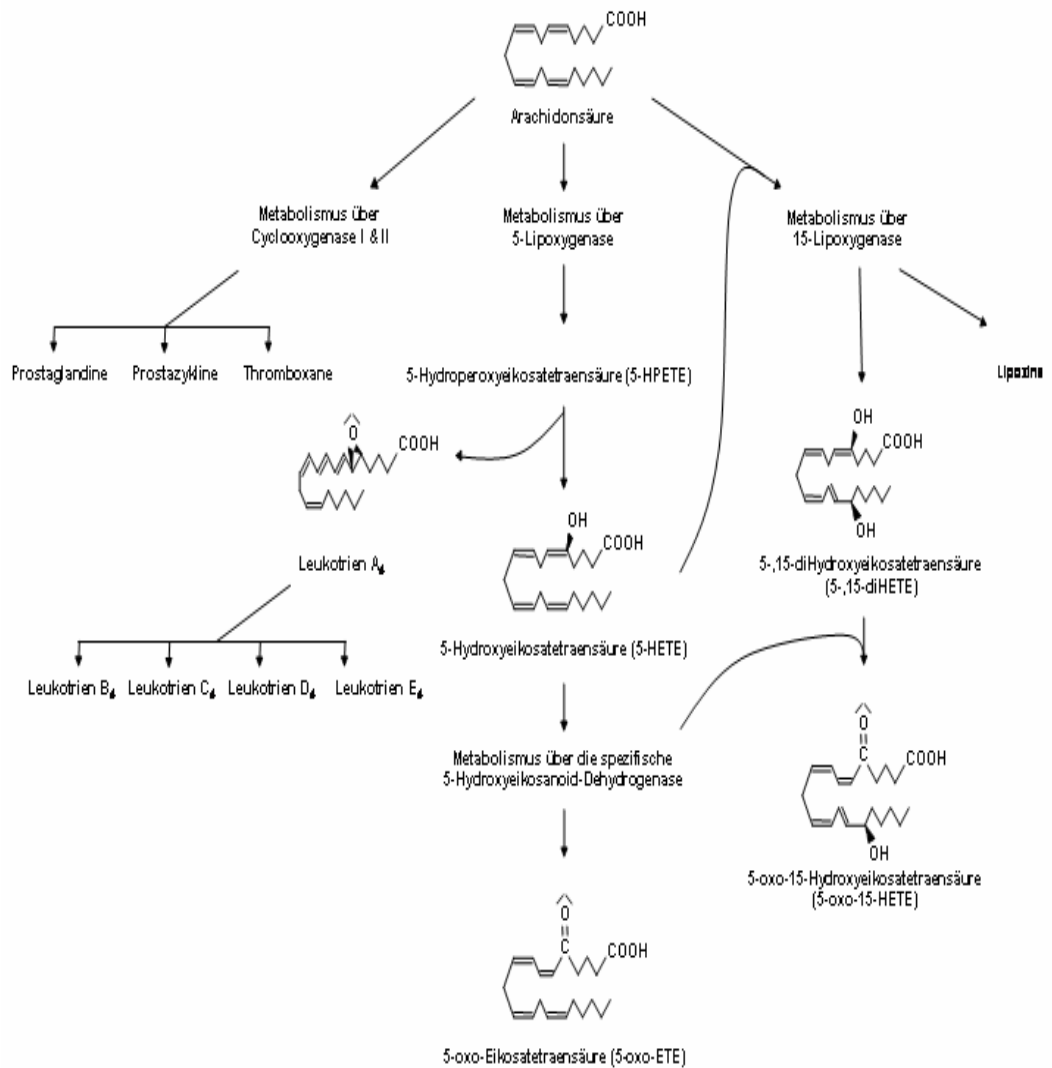


Abb. 1: Arachidonsäure-Metabolismus. Die Arachidonsäure kann über die Cyclooxygenase-I und -II zu Prostaglandinen, Prostazyklinen oder Thromboxanen metabolisiert werden. Ebenso läßt sie sich enzymatisch durch 5-, 12- bzw. 5-Lipoxygenase abbauen (*12-LOX-Weg hier nicht dargestellt*). Lipoxine entstehen über dem 15-LOX-Abbauweg, wohingegen Leukotriene, Mono- und Dihydroxyeikanoide (z.B. *5,15-diHETE*) über die Bildung eines instabilen Hydroperoxids 5-HPETE umgewandelt werden. 5-(S)-Hydroxyeikosatetraensäure, die durch Reduktion von 5-HPETE entsteht, wird weiter durch eine spezifische 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) in 5-oxo-Eikosatetraensäure (5-oxo-EETE) umgewandelt.

5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE repräsentieren eine Gruppe von chemotaktischen Lipiden, die selektiv eosinophile Granulozyten (Powell *et al.*, 1995b; O'Flaherty *et al.*, 1996; Czech *et al.*, 1997) und auch neutrophile Granulozyten aktivieren können (Norgauer *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1997). Weitere biologische Wirkungen von 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE ist nur z.T. bekannt (Zimpfer *et al.*, 1998). Gordon *et al.* (1991) wiesen beispielsweise nach, daß 5-(S)-HETE die

Prostaglandinbildung in Endothelzellen hemmt. Zudem wurde nachgewiesen, daß 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilität, die Aktinpolymerisation, die Degranulation von Speichergranula sowie die Produktion von toxischen Sauerstoffradikalen und die Oberflächenexpression von β_2 -Integrin CD11b in Eosinophilen und in Neutrophilen induzieren (Powell *et al.*, 1997, 1999). Obwohl beide Eikosanoide äquivalente Eigenschaften besitzen, ist 5-oxo-EETE bis zu 100-mal aktiver als sein Vorläufermolekül 5-(S)-HETE (O'Flaherty *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1993). Zwar ist 5-(S)-HETE ein schwächerer Zellaktivator als 5-oxo-EETE. Gemeinsam mit Leukotrien B_4 (LTB_4), PMA oder „platelet-activating factor“ (PAF) übt es aber einen synergistischen Effekt auf die Zielzelle aus (O'Flaherty *et al.*, 1985, 1987).

5-HEDH-Aktivität wurde in Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen (Powell *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). Zudem wurde die 5-HEDH-Aktivität mit der Bildung des „Eosinophilen-chemotaktischen Lipids“ (Morita *et al.*, 1990a), das später als 5-oxo-15-Hydroxyeikosatetraensäure (5-oxo-15-HETE) identifiziert worden war (Morita *et al.*, 1990b), und gemeinsam mit der Enzymaktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase 1 beobachtet (Schwenk *et al.*, 1992, 1995). Pareigis (1997) wies zudem nach, daß 5-HEDH in den Keratinozyten-Zelllinien HaCaT, KB, A 431, in immortalisierten Zellen mit hämatopoetischer Herkunft (z.B. EoL-3) und in der promyeloischen HL-60-Zelllinie exprimiert wird. In der menschlichen Haut stellen Langerhans-Zellen und Keratinozyten die physiologischen „Produktionsstätten“ der 5-(S)-HETE dar (Rosenbach *et al.*, 1990). Dendritische Zellen monozytären Ursprungs sind dagegen in der Lage, die biologisch aktivere 5-oxo-EETE zu generieren (Zimpfer *et al.*, 2000).

Die chemotaktische Eigenschaft von 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE löst in der Haut die Gewebe-Infiltration von Eosinophilen aus (siehe Abb. 2). Diese selektive Zellakkumulation ist insbesondere bei Eosinophilen-assoziierten Erkrankungen zu beobachten. Als proinflammatorische Effektorzelle tragen Eosinophile zur Abwehr von Helminthen bei (Butterworth, 1984; Kroegel *et al.*, 1988; Behm *et al.*, 2000). Ebenso sind Eosinophile an chronischen Erkrankungen wie Asthma (Kumar *et al.*, 1994; Krug *et al.*, 1998), allergischer Rhinitis (Sedgwick *et al.*, 1991) oder atopischer Dermatitis beteiligt (Leiferman *et al.*, 1986; 1991; Kapp, 1993).

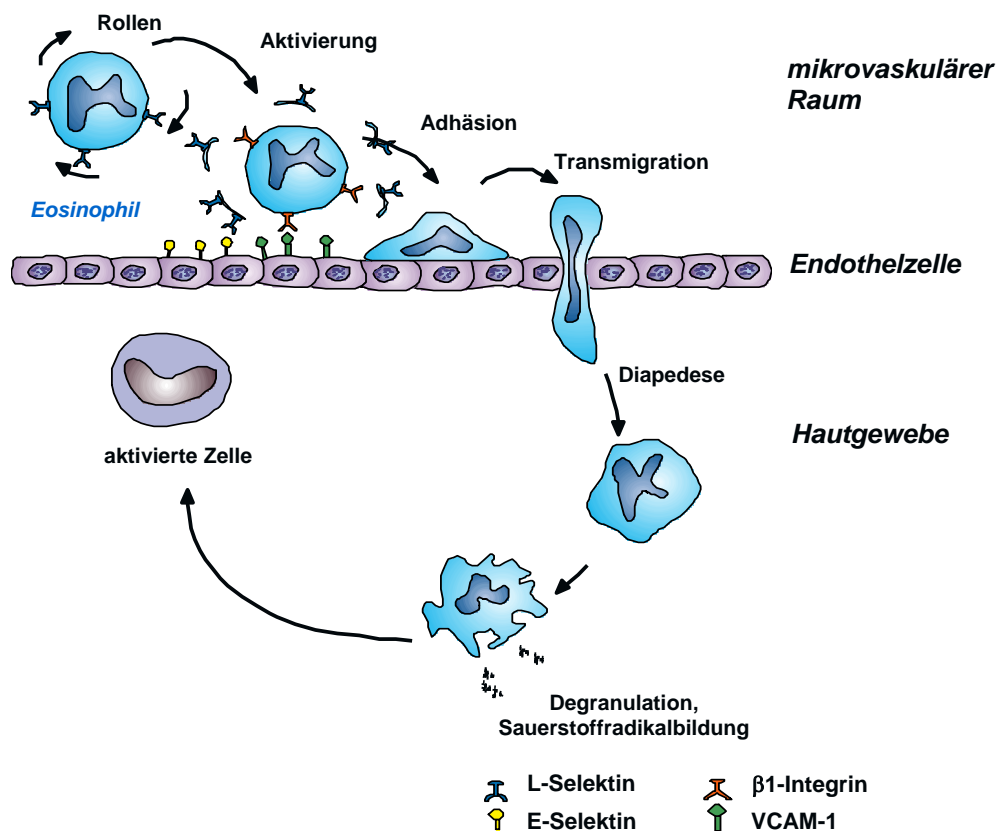


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Eosinophilen-Infiltrationsprozesses in der entzündeten Haut. Die Infiltration von Eosinophilen aus dem mikrovaskulären Raum in die entzündete Haut erfolgt in vier Phasen; Rollen, Zellaktivierung, Adhäsion und Transmigration durch die endotheliale Zellschicht. In diesem dynamischen Prozeß sind Zelladhäsionsmoleküle wie L- und E-Selektin, das β 1-Integrin VLA-4 (very late antigen-4) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) beteiligt. In der Haut bilden infiltrierte Eosinophile Sauerstoffradikale und setzen durch Degranulation Substanzen frei, die weitere Zellen in der Haut aktivieren können.

Der proinflammatorische Effekt der eosinophilen Granulozyten beruht u.a. auf der Sekretion von präformierten und granulär gespeicherten Proteinen, auf der Wirkung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen und auf der Freisetzung von bioaktiven Lipidmediatoren. Zu den granulären Proteinen gehören lysosomale Enzyme wie die Eosinophil-Peroxidase, die Arylsulfatase und die saure Phosphatase. Ein hoher Anteil des Granula-Inhaltes setzt sich jedoch aus den basischen Proteinen „major basic rotein“ (MBP), „eosinophil cationic protein“ (ECP) und „eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN) zusammen (Giembycz *et al.*, 1999). Möglicherweise werden durch die Sekretion von MBP die Lungen von Asthmatikern geschädigt, welches in großen Mengen im Sputum und auch in den

erkrankten Lungengeweben nachzuweisen ist (Abu-Ghazaleh *et al.*, 1992; Makino *et al.*, 1995).

Ein weiteres Charakteristikum von Eosinophilen-assoziierten Erkrankungen ist die Beteiligung von TH₂-Lymphozyten (Finkelman *et al.*, 1991; Okano *et al.*, 2000). TH₂-/CD4⁺-Zellen exprimieren Interleukin-(IL)-4 und IL-5 (Del Prete, 1992), die u.a. die Blut-Eosinophilie fördern (Coffman *et al.*, 1989, Shahabuddin *et al.*, 2000), die IgE-Synthese induzieren (Del Prete *et al.*, 1988) und die Oberflächenexpression von „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) in Endothelzellen (Thornhill *et al.*, 1991) und von „very late antigen-4“ (VLA-4) in Eosinophilen bewirken (Wardlaw, 1994, 2001). Trotz der Beteiligung von TH₂-Lymphozyten und der damit verbundenen Auswirkung von IL-4 und IL-5, ist zu vermuten, daß 5-oxo-ETE, und weniger 5-(S)-HETE, der akute Auslöser der Eosinophilen-Infiltration ist (O’Flaherty *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1993). Inwiefern sich 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE auf die Produktion von weiteren chemotaktisch aktiven Mediatoren auswirken und deren Funktionen in der entzündeten Haut beeinflussen können, ist nicht bekannt. Sozzani *et al.* (1996) wiesen nach, daß die Chemokinwirkung von „monocyte chemotactic protein-1 und -3“ (MCP-1 und -3) durch 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE verstärkt wird. Powell *et al.* (2001) stellten hingegen fest, daß die 5-oxo-ETE-induzierte Eosinophilen-Chemotaxis 4-fach durch Eotaxin bzw. durch „regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted“ (RANTES) gesteigert wird. Analog zu 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE, scheinen diese eosinophil-spezifischen β -Chemokine (CC-Chemokine) ebenso für die Zellakkumulation bei Eosinophilen-assoziierten Erkrankungen verantwortlich zu sein (Garcia-Zepeda *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1999). Welches dieser eosinophil-spezifischen Chemoattraktantien (z.B. 5-(S)-HETE, 5-oxo-ETE und Eotaxin) die Eosinophilen-Infiltration in die entzündete Haut in erster Linie initiiert, ist nicht bekannt.

Eotaxin wird z.B. in Fibroblasten erst nach Aktivierung durch TH₂-Zytokine gebildet (Mochizuki *et al.*, 1999). Die Expression von RANTES erfolgt hingegen konstitutiv und läßt sich mit Tumor Nekrose Faktor- α , IL-1 β oder Interferon- γ (IFN- γ) steigern (Meyer *et al.*, 1998). Im Vergleich dazu ist die 5-(S)-HETE-Produktion von der transkriptionalen Regulation der 5-Lipoxygenase-Synthese abhängig (Janssen-Timmen *et al.*, 1995; Spanbroek *et al.*, 1998). Zudem wird die Bildung von 5-oxo-ETE durch die mikrosomale 5-HEDH katalysiert. Es ist

nachgewiesen worden, daß Eikosanoide mit einer 5-(S)-Hydroxylgruppe und 6-*trans* Doppelbindungen im Molekül durch die spezifische 5-HEDH oxidiert werden (Powell *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). Die molekulare Natur und die zelluläre Regulation von 5-HEDH sind aber noch weitgehend unbekannt.

Um den Reaktionsmechanismus und die Regulation der 5-oxo-ETE-Bildung zu verstehen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die membrangebundene 5-HEDH zu isolieren und soweit wie möglich zu charakterisieren. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE Zytokine induzieren können, und ob das 5-(S)-Hydroxy- und das 5-oxo-Eikosanoid die Eosinophil-assoziierte Entzündung verstärken oder verlängern können. Der Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE auf zelluläre Funktionen wurde mehrfach nachgewiesen (Norgauer *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1997, 1999). Im Gegensatz dazu ist über 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE als Induktor nur wenig bekannt (Zeng *et al.*, 2002). Aus diesem Grunde sollten Untersuchungen durchgeführt werden, die den Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE auf die Zytokinen-Expression zum Ziele hatten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen Zusammenhänge der Zytokinbildung in der Haut zu erkennen und mögliche Synergien zwischen 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE mit proinflammatorischen Zytokine besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Laborgeräte

3.1.1 Chemikalien

Die Arachidonsäurederivate, 5-(*S/R*)-Hydroxy-(*6E, 8Z, 11Z, 14Z*)-Eikosatetraensäure (5-(*S/R*)-HETE) und 5-oxo-(*6E, 8Z, 11Z, 14Z*)-Eikosatetraensäure (5-oxo-ETE), zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) sowie für die Durchführung der Zellstimulationsversuche, wurden von Diagnostic International, Karlsdorf, und Cascade Biochem Ltd., Reading, England, bezogen. Weitere Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei Merck KGaA, Darmstadt, bzw. Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen, erworben.

3.1.2 Puffer und Lösungen

1.) Mikrosomen-Präparationspuffer:

0,1 mM	DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)
1 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
20 % (v/v)	Glyzerin (ca. 87 % Reinheit)
10 mM	Tris/HCl; pH 8,0

2.) Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline: PBS):

pH 7,2 - 7,4:

2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
137 mM	NaCl
6,4 mM	Na ₂ HPO ₄

3.) Reaktionspuffer zur Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität:

1 mM	β -NADP ⁺ (β -Triphosphopyridinnukleotid)
200 mM	NaCl
10 mM	Tris/HCl; pH 8,0

4.) Solubilisierungspuffer:

Mikrosomen-Präparationspuffer (siehe Lösung Nr. 1) mit Zusatz von 2,5 % (w/v) Octyl- β -D-Glukopyranosid.

5.) Proteinauftragspuffer für Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

2,6 mM	DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)
12 % (v/v)	Glyzerin (87 % Reinheit)
6 M	Harnstoff
139 mM	Natriumdodecylsulfat
50 mM	Tris/HCl; pH 6,8

6.) Elektrodenpuffer für Tricine-SDS-Gelelektrophorese:

100 mM	Tris/HCl; pH 8,25
100 mM	Tricine
0,1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat

7.) Fixierlösung:

30 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Eisessig

8.) "Farmer's Reducer"-Fixierlösung:

30 % (v/v)	Ethanol
2 % (v/v)	Glutaraldehyd
0,4 M	Natriumacetat; pH 6,0
0,1 % (v/v)	Natriumthiosulfat
Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit Eisessig.	

9.) Silbernitrat-Färbelösung:

0,1 % (w/v)	AgNO ₃
0,02 % (v/v)	Formaldehyd

10.) Entwicklerlösung:

0,04 % (v/v)	Formaldehyd
1,25 % (w/v)	Na ₂ CO ₃

11.) Puffer für den enzymatischen Verdau mit Lys-C-Endoprotease:

1 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
2 ng/μl	Lys-C-Endoprotease; Endkonzentration
25 mM	Tris/HCl; pH 8,5

12.) Tricine-Puffer (10-fach konzentriert):

50 mM	β-Mercaptoethanol
0,1 % (w/v)	Gelatine
20 mM	MgCl ₂
1 % (w/v)	Thesit [®] (Polyoxyethylene-9-laurylether)
300 mM	Tricine; pH 8,4

Der 10-fach konzentrierte Tricine-Puffer wurde autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar), in jeweils 1 ml Volumen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

13.) Bromphenolblau-Lösung als DNA-Auftragspuffer:

1 % (w/v)	Bromphenolblau
100 mM	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
50 % (v/v)	Glyzerin (ca. 87 % Reinheit)
0,1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat
1 % (v/v)	Xylencyanol

14.) TAE-Puffer:

10 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

0,11 % (v/v) Eisessig

40 mM Tris/HCl; pH 8,0

Der TAE-Puffer wurde 50-fach konzentriert hergestellt und autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

15.) Desoxynukleotidtriphosphat-(dNTP)-Lösung:

20 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP)

20 mM Desoxycytidintriphosphat (dCTP)

20 mM Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)

20 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)

Die Nukleotide wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, bezogen.

16.) TRIzol[®]-Reagenz:

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus stimulierten Zellen erfolgte mit einem phenolhaltigen TRIzol[®]-Reagenz der Firma Life Technologies, Karlsruhe (Vertrieb durch Invitrogen AG).

17.) Flüssigwachs:

Chill-out 14TM-Flüssigwachs der Firma MJ Research Inc. (Watertown, MA, USA) wurde über Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, bezogen.

18.) Ethidiumbromid-Lösung:

Der Bezug von Ethidiumbromid erfolgte über Hoffmann La Roche, Mannheim, und wurde mit Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser in einer Endkonzentration von 10 mg/ml angesetzt.

19.) 100 Bp DNA-Größenmarker:

Der „READY-LOADTM 100 Bp DNA-Leiter“ wurde von der Firma Life Technologies, Karlsruhe, bezogen.

20.) Transkriptase und Polymerase:

Die Durchführung der reversen Transkription und der RT-PCR erfolgten mit *SuperscriptTM II* und *Taq DNA-Polymerase* der Firma Life Technologies, Karlsruhe.

3.1.3 Zellkulturmedien

Wachstumsmedium für primäre Keratinozyten:

Zusammengesetzt aus Keratinozyten-Basalmedium (KBM) und folgenden Inhaltsstoffen:

- 0,1 ng/ml humaner Epidermiswachstumsfaktor (human epidermal growth factor: hEGF)
- 0,5 µg/ml Hydrocortison
- 5 µg/ml Insulin
- 100 U/ml Penicillin
- 30 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (bovine pituitary extract: BPE)
- 100 µg/ml Streptomycin

Das Basalmedium und die verwendeten Supplemente wurden von der Firma Clonetics Corporation/Bio Whittaker Inc. bezogen.

Wachstumsmedium für primäre Fibroblasten:

Zusammengesetzt aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und folgenden Inhaltsstoffen:

- 10 % (v/v) fätales Rinderserumalbumin (fetal calf serum: FCS);
zuvor bei 56 °C für 45 min hitzeinaktiviert.
- 2 mM L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin

DMEM stammte von der Firma Cell Concepts GmbH, Umkirch. Die Supplemente wurden dagegen von Life Technologies, Karlsruhe, bezogen.

3.1.4 Laborgeräte

Sonikator:

Der Sonikator besteht aus einem HF-Generator Sonoplus GM70 (70 Watt) und einem Ultraschallumwandler UW70 mit Titanmikrospitze MS73/HD70 (Firma Bandelin Electronic, Berlin).

Tischzentrifugen:

- 1.) Heræus Megafuge 10.R, Tragringrotor Kat.-Nr.: 3360 (max. 6.200 x g bzw. 6.000 Upm) für 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße, Kendro Laboratory Products GmbH, Hamburg.
- 2.) Biofuge 17RS, Sepatech Festwinkelrotor, Kat.-Nr.: 1379 (max. 25.848 x g bzw. 17.000 Upm) für 1 ml Reaktionsgefäße, Heræus Sepatech.

Ultrazentrifugen:

- 1.) Ultrazentrifuge L5-75; Schwingrotor Modell: 70.1/SW28
- 2.) Ultrazentrifuge L7-55; Festwinkelrotor Modell: 50-Ti

Die Ultrazentrifugen stammten von der Firma Beckmann, München.

Gefriertrocknungsanlage (Lyophilisator):

Der Lyophilisator besteht aus einem Kühlaggregat LOC-1 Alpha 2-4 (Firma Christ) und aus einer Vakuumpumpe BZ43 Typ DUO 004B (Firma Pfeiffer Balzers).

Ultrafiltrationskammer:

Ultrafiltrationskammer bestehend aus einer Rührzelle (Amicon[®]-Kammer) mit 200 ml (Kat.-Nr.: 5123) bzw. 400 ml (Kat.-Nr.: 5124) Volumen Fassungsvermögen.

Ultrafiltrationsmembran mit Ausschlußvolumen von 1 kDa (YM1-Membran):

Ø 63,5 mm, Kat.-Nr.: 13332

Ø 76,0 mm, Kat.-Nr.: 13342

Die Rührzellen und Filtrationsmembrane stammten von der Firma Millipore GmbH, Eschborn.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(HPLC)-Systeme:

- 1.) Pumpsystem: Gradientenpumpe: P4000, Thermo Separation Products GmbH (Spectra Physics Analytical), Darmstadt
 Detektor: Spectroflow 773, Kratos Analytical Instruments
 Integrator: Computing Integrator: SP4290, Thermo Separation Products GmbH.
- 2.) Pumpsystem: SP8800 tenary HPLC Pump, Thermo Separation Products GmbH.
 Detektor: Spectra Focus, Thermo Separation Products GmbH.
 Heizsystem: SP8792 Controller und SP8792 Column Heater, Thermo Separation Products GmbH.
 Computer: IBM (OS/2-Betriebssystem mit Auswertungssoftware, Thermo Separation Products GmbH)
 Drucker: Hewlett Packard Star Laser Printer 8
- 3.) SMART[®]-System: HPLC- μ -Separationsanlage, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg.
 Integrator: Hewlett Packard 747A Plotter

Tab. 1: HPLC-Säulen für die präparative Auftrennung der 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (HIC- und Anionenaustauschersäule) und für die Analyse von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE (C₁₈-Umkehrphasensäule).

Säulenbezeichnung	Säulentyp	Hersteller
Waters Spherisorb ODS2 250 x 4,6 mm, 5,0 μ m Art.-Nr.: 2546 D181WS050	Aqua C ₁₈ -Umkehrphasensäule	Bischoff Chromatography Analystechnik u. -geräte GmbH, Leonberg
Lichroprep RP-18, 15-25 μ m Guardcartridge K2 Art.-Nr.: 6302 1841	C ₁₈ -Vorsäule	Bischoff Chromatography Analystechnik u. -geräte GmbH, Leonberg
HIC-Ultropac Column TSK-Phenyl-5PW 7,5 x 7,5 mm	hydrophobe Interaktionssäule	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
BIOSEP DEAE-P 75 x 7,8 mm micron Art.-Nr.: CHO-1680	schwacher Anionenaustauscher	Phenomenex GmbH, Aschaffenburg

Tab. 2: μ -Separationssäulen zur Aufreinigung der 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase mit Hilfe der HPLC- μ -Separationsanlage „SMART[®]-System“.

Säulenbezeichnung	Säulentyp	Hersteller
Mini Q PC 3.2/3	starker Anionenaustauscher	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
μ RPC C2/C18 SC 2.1/10	C ₂ /C ₁₈ -Umkehrphasensäule	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Gelelektrophorese-Systeme:

- 1.) Phast System Separation and Control Unit (horizontale Elektrophoresekammer), Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg.
- 2.) Mini Protean II[™] Cell (vertikale Elektrophoresekammer), Kat.-Nr.: 165-2940, Biorad GmbH, München.
- 3.) HORIZON[®] 11·14 (horizontale Elektrophoresekammer) für PCR-Produkte, Life Technologies, Karlsruhe.

Ampère- bzw. Voltmeter:

- 1.) 200/20 Power Supply
 - 2.) Power Pac 300 Power Supply
- Bezogen von Biorad GmbH, München.

Thermocycler:

- 1.) Trio-Block-Thermocycler Modell TB-1 und T3, Biometra, Göttingen.
- 2.) Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA.

UV-Gel-Belichtungsanlage:

Chroma 42, Vetter GmbH, Wiesloch.

3.2 Isolierung von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten

Die Isolierung polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyten (PMN) aus venösem Vollblut erfolgte nach einer Methode von Morita *et al.* (1990). Frisches Menschenblut wurde zunächst mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt und bei 500 x g, 20 min ohne Bremseinwirkung zentrifugiert. Das Zellsediment wurde, nachdem die wäßrige und lymphozytenhaltige Interphase entfernt worden war, mit einer 2,5 %igen (w/v) Gelatinelösung (in 0,9 % NaCl-Lösung) resuspendiert und für 30 min im 37 °C warmen Wasserbad (Köttermann Systemlabor GmbH & Co., Uetze-Hänigsen) inkubiert. Die obere, PMN-reiche Gelatinephase wurde dann entnommen und bei 500 x g, 10 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde in 40 ml 0,85 %ige Ammoniumchloridlösung (NH₄Cl; pH 7,0) resuspendiert, um verunreinigende Erythrozyten zu lysieren. Nach dieser Lyse wurden die intakten, neutrophilen Granulozyten durch Zentrifugation angereichert und mit PBS gewaschen (jeweils 500 x g, 10 min, 4 °C). Das Granulozyten enthaltende Pellet wurde schließlich in einer definierten Menge PBS (siehe 3.1.2; Nr. 2) aufgenommen, so daß eine Zellkonzentration von ca. 1×10^8 vitale PMN/ml ergab. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wobei gleichzeitig die Zellvitalität mittels Trypanblaufärbung bestimmt wurde (Lindl und Bauer, 1994: Kapite 12).

3.3 Präparation von Mikrosomen durch fraktionierte Zentrifugation

Die Präparation von Mikrosomen erfolgte nach einer modifizierten Technik von Ozols (1990) und Wintergalen *et al.* (1995), wobei frisch isolierte neutrophile Granulozyten (1×10^8 PMN/ml) mit Präparationspuffer (siehe 3.1.2; Nr.1) versetzt und im Eisbad für 2 – 3 min intervall ultrabeschallt (60 Zyklen/s) wurden. Grobe Membranfragmente und granuläre Bestandteile konnten dann über eine fraktionierte Zentrifugation (Differentialzentrifugation) abgetrennt werden. Hierzu wurde das PMN-Extrakt ohne Bremseinwirkung 20 min mit 900 x g, dann 20 min mit 16.000 x g und schließlich zur Anreicherung der Mikrosomen 1 h bei 105.000 x g zentrifugiert (siehe Abb. 3). Während der Präparation wurden frei-

gesetzte Proteasen durch zwei- bis dreimalige Zugabe von 100 µl gesättigter PMSF-Inhibitorlösung (Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol gelöst) inaktiviert.

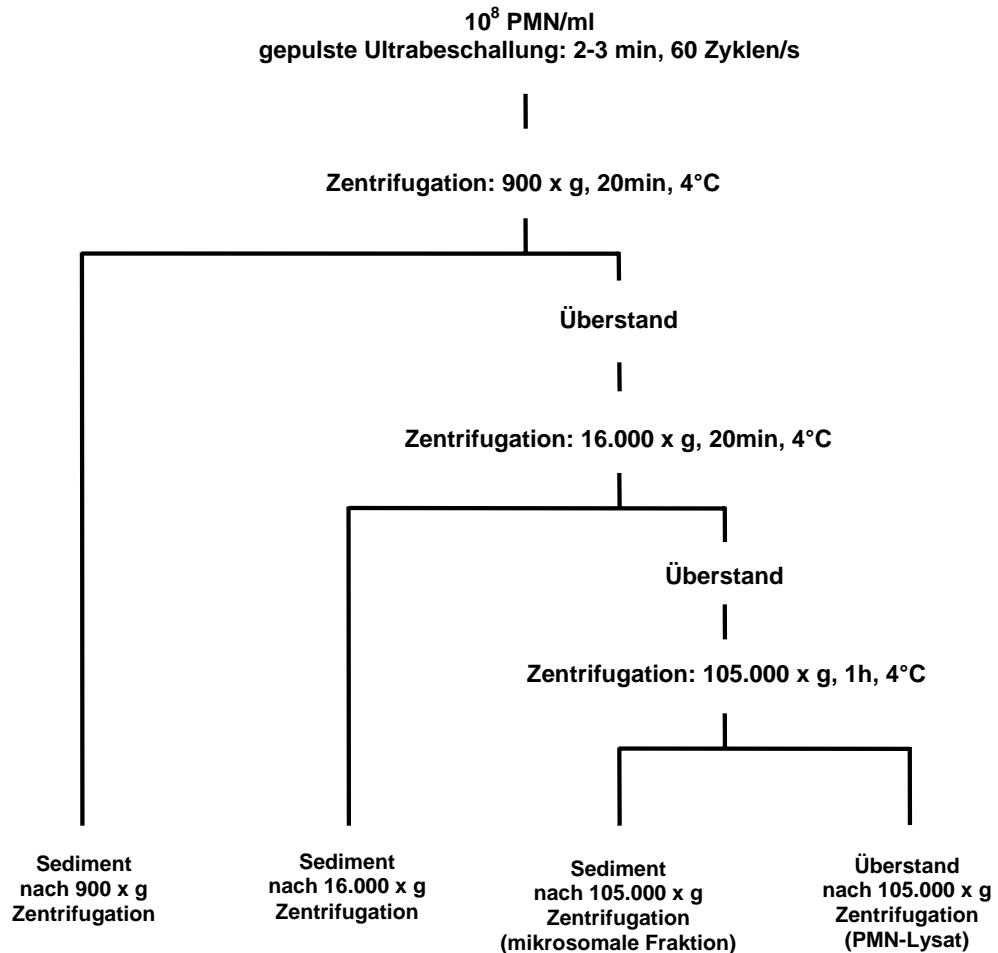


Abb. 3: Schematische Darstellung einer fraktionierten Zentrifugation zur Gewinnung von Mikrosomen. Frisch isolierte, neutrophile Granulozyten (PMN) wurden nach einer gepulsten Ultraschallbehandlung im Eisbad mit 900 x g (20 min), 16.000 x g (20 min) und 105.000 x g (1 h) zentrifugiert. Die aufgereinigten Mikrosomen befanden sich in 105.000 x g-Sediment.

3.4 Solubilisierung der 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) aus Mikrosomen

Das Herauslösen der membranständigen 5-HEDH aus dem gallertartigen Mikrosomensediment in 10 ml Pufferlösung erfolgte unter Rühren bei 4 °C und einer Inkubationsdauer von 6 - 14 h. Das nicht-ionische Octyl-β-D-Gluko-

pyranosid (Fluka GmbH, Freiburg) diente als Detergens und wurde in einer Konzentration von 2,5 % (w/v) unter Vermeidung von Schaumbildung in Präparationspuffer angesetzt (siehe 3.1.2; Nr. 4). Nach erfolgter Solubilisierung wurden die groben Zellpartikel durch Zentrifugation (6.200 x g, 10 min, 4 °C) entfernt. Der gelb opaleszierende Überstand mit solubilisiertem 5-HEDH war für spätere Untersuchungen bei -20 °C lagerfähig.

3.5 Nachweis der 5-HEDH-Aktivität

3.5.1 Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität im Enzymstandardtest

Die Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität erfolgte indirekt über die Umsetzung von 5-(*S*)-HETE zu 5-oxo-EETE und wurde nach einer Modifikation des Testsystems von Pareigis (1997) durchgeführt. Es wurden 30 – 50 µl PMN-Lysat (105.000 x g-Überstand), das 3 – 5 x10⁶ PMN entsprach, mit Reaktionspuffer (siehe 3.1.2; Nr. 3) vermischt und hinsichtlich 5-HEDH-Aktivität in einem Gesamtreaktionsvolumen von 300 µl untersucht. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 4 µM 5-(*S/R*)-HETE im 40 °C warmen Wasserbad gestartet und nach 20 min mit eiskaltem Methanol (40 % des Endvolumens) gestoppt. Die 5-oxo-EETE-Bildung galt als Maß für die enzymatische Umsetzung von 5-(*S*)-HETE. Der Gehalt an 5-oxo-EETE wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im UV-Bereich bei 280 nm Wellenlänge nachgewiesen.

Zum Vergleich der spezifischen 5-HEDH-Aktivität wurden 30 µl Zellüberstand und 30µl Zellsediment der fraktionierten Zentrifugation (siehe Abb. 3) untersucht. Partiiell aufgereinigte HPLC-Fraktionen, die aus PMN-Lysaten (105.000 x g-Überstand) und Mikrosomenüberständen stammten, wurden wegen der zuvor nachgewiesenen Aktivitätsabnahme mit einer fünf- bis siebenfachen Menge (150 – 200 µl) untersucht.

Definition der spezifischen 5-HEDH-Aktivität

Die spezifische 5-HEDH-Aktivität wurde, abweichend vom internationalen Standard, in Enzymeinheiten (Units; U) pro Milligramm Protein angegeben. Eine Enzymeinheit beschreibt in der vorliegenden Arbeit die Bildung von einem pmol 5-oxo-ETE/min. Da eine absolute Reinheit der 5-HEDH nicht erzielt werden konnte, wurde die spezifische 5-HEDH-Aktivität auf die gesamte, gemessene Proteinmenge pro Reaktionsansatz bezogen.

3.5.2 Flüssigkeitschromatographische Auftrennung und Quantifizierung von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE

Zur Quantifizierung der gebildeten 5-oxo-ETE-Menge wurden die untersuchten Reaktionsansätze zentrifugiert (25.458 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand mußte zunächst an einer C₁₈-Vorsäule (Lichroprep RP-18, 15-25 µm Guardcartridge K2, Bischoff Chromatography GmbH, Leonberg) appliziert und mit 3 – 4 ml 0,01 % Essigsäure von Salzen und gelösten Proteinbestandteilen befreit werden. Das im Überstand enthaltene 5-oxo-ETE wurde dann durch eine auf 50 °C erhitzte C₁₈-Umkehrphasensäule (Reversed Phase-18-Säule: RP₁₈-Säule; Waters Spherisorb ODS2, ID 250 x 4,6 mm; Bischoff Chromatography GmbH) eluiert. Hierzu wurden die an der Säulenmatrix gebundenen, lipophilen Komponenten mit einem isokratischen Laufpuffergradienten aus Methanol und 0,01 % Essigsäure (80 %:20 %; 1 ml/min) eluiert, UV-spektrometrisch detektiert und durch Flächenintegration der Peaks quantifiziert.

Eichung der Eikosanoide

Der Gehalt an Eikosanoiden in den untersuchten Proben wurde anhand einer Eichkurve mit authentischen, kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen quantifiziert. Hierfür wurden 0 – 3120 pmol (0 – 1000 ng) 5-(S/R)-HETE und 0 – 2826 pmol (0 – 900 ng) 5-oxo-ETE mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch verdünnt und nach dem etablierten Verfahren (siehe 3.5.2) an der RP₁₈-Säule aufgetrennt. Nach Integration der ermittelten Peakfläche wurde die eingesetzte Menge der beiden Eikosanoide entsprechend ihrer Flächengröße berechnet.

3.5.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung der Proteinkonzentration, die auf einer Färbemethode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) beruht, wurde mit einem „DC Protein Assay“ der Firma Biorad GmbH, München, nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 5 µl Probe wurden mit 25 µl Kupfertartratlösung (Reagenz A) und 200 µl Folinlösung (Reagenz B) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die proteinhaltige Reagenzlösung färbt sich in Anwesenheit von Peptidverbindungen blau-violett und ist bei 690 nm Wellenlänge photometrisch detektierbar.

Eichung mit bovinem Serumalbumin

Als Referenz für die Proteinquantifizierung diente bovines Serumalbumin (BSA; 0 – 1 mg/ml) gelöst in Präparationspuffer (siehe 3.1.2; Nr.1). Aus der Extinktion des BSA-Standards mit bekanntem Proteingehalt konnte so auf die Proteinmenge der jeweilig untersuchten Probe rückgeschlossen werden.

3.6 Untersuchungen zur 5-HEDH-Stabilität

a.) Einfluß der Standzeit bei 25 °C

PMN-Lysate (Aliquots von 5×10^6 PMN) wurden in einem einstündigen und solubilisierte Mikrosomenüberstände (siehe 3.4) in einem zweistündigen Rhythmus bis zu einer maximalen Inkubationszeit von 6 h und 8 h auf ihr 5-oxo-ETE-Bildungsvermögen hin untersucht. Die Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität und die Quantifizierung des 5-oxo-ETE-Gehaltes erfolgten nach dem etablierten Standardverfahren (siehe 3.5).

b.) Einfluß der Kryokonservierung

Weiterhin wurde die 5-HEDH-Aktivität der PMN-Lysate nach Resuspension im Reaktionspuffer (siehe 3.1.2; Nr. 3) mit und ohne Zusatz von 20 % Glycerin untersucht. Die Reaktionsansätze wurden über sieben Tage bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen der Zellsuspensionen wurden Aliquots von 3×10^5 und $2,6 \times 10^6$ PMN-Lysat hinsichtlich ihrer 5-HEDH-Aktivität in 300 µl Reaktionsvolumen nach dem Standardverfahren untersucht (siehe 3.5).

c.) Einfluß der Temperatur

Zur Ermittlung der Temperaturstabilität wurden PMN-Lysate von 5×10^6 PMN in einem Temperaturbereich 4 – 90 °C für 30 min erhitzt. Anschließend wurde die spezifische 5-HEDH-Aktivität im Lysat anhand der 5-oxo-ETE-Produktion untersucht. Die 5-HEDH-Aktivität wurde nach dem Standardverfahren ermittelt (siehe 3.5).

d.) Einfluß von organischen Lösungsmitteln

Der Nachweis der 5-HEDH-Stabilität in verschiedenen, organischen Lösungsmitteln erfolgte in Aliquots von 5×10^6 PMN (105.000 x g-Überstand). Dabei wurden Reaktionsansätze mit jeweils 10 % und 80 % Acetonitril, Ethanol bzw. Isopropanol vermischt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollansätze enthielten 10 mM Tris/HCl (pH 8,0). Eine weitere Kontrollreihe wurde zusätzlich mit 10 % Glycerin versetzt. Die Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität erfolgte nach dem Verfahren des Enzymstandardtests (siehe 3.5).

3.7 Untersuchungen zur 5-HEDH-Aktivität**a.) Einfluß der Temperatur**

Die Temperaturabhängigkeit der 5-HEDH-Aktivität wurde im Enzymstandardtest (siehe 3.5.1) untersucht, wobei die Reaktionstemperatur zwischen 4 °C und 90 °C variierte. Die gebildete 5-oxo-ETE wurde chromatographisch quantifiziert und die 5-HEDH-Aktivität nach Integration der Peakfläche bestimmt (siehe 3.5.2). Für die Untersuchung wurden 50 µl Zellysate mit 5×10^6 PMN verwendet.

b.) Einfluß von NaCl

Desweiteren wurde das Lysat von 5×10^6 PMN/50 µl zur Untersuchung der NaCl-Abhängigkeit eingesetzt. Hierzu wurden die untersuchten Reaktionsansätze nach dem Standardverfahren mit 0 – 2 M NaCl versetzt und für 20 min bei 40 °C inkubiert (siehe 3.5.1). Anschließend wurden die Enzymprodukte mit der etablierten Nachweismethode bestimmt (siehe 3.5.2).

c.) Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes (pH 2,0 – 13,0) auf die 5-HEDH-Aktivität wurde nach dem Grundschemata des Standardtests (siehe 3.5) untersucht. Die Reaktion erfolgte im destillierten Wasser, und für die Substratumsetzung wurden Zellysate mit 5×10^6 PMN verwendet. Vor der Untersuchung mußte zunächst die Stabilität des Substrats 5-(S/R)-HETE ($4 \mu\text{M}$) im Bereich zwischen pH 1,0 und pH 14,0 (20 min, 40°C) überprüft werden, indem das Elutionsprofil der Hydroxyfettsäure 5-(S/R)-HETE bei 235 nm chromatographisch untersucht wurde.

3.8 Untersuchung der Substratumsatzgeschwindigkeit der 5-HEDH

Die Untersuchung des Substratumsatzes durch 5-HEDH erfolgte mit variablen Zellysatmengen. Aliquots von $1 - 100 \times 10^6$ PMN wurden im Hinblick auf die Substratlimitierung in 1 – 2 ml Reaktionsvolumen untersucht. Ebenso wurde die „Bildungsrate“ von 5-oxo-ETE (5-(S/R)-HETE-Umsatz) bestimmt.

Definition der 5-oxo-ETE-Bildungsrate

Die Bildungsrate eines untersuchten Reaktionsansatzes wurde als die 5-HEDH-Aktivität pro Zeiteinheit (Unit; U) definiert, die aus einer Aliquotmenge von 1×10^6 PMN resultierte.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die 5-oxo-ETE-Produktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit nach dem Standardverfahren (siehe 3.5) ermittelt. Der Untersuchungszeitraum wurde auf maximal eine Stunde festgelegt, wobei die enzymatische Reaktion der Einzelansätze durch Zugabe von eiskaltem Methanol versetzt in 10 min-Intervallen beendet wurde.

Weiterhin wurden die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) ermittelt. Die Untersuchung erfolgte ebenfalls nach dem Grundschemata des Standardtests (siehe 3.5) und wurde an einer einheitlichen Zellzahl von 5×10^6 PMN/50 μl Reaktionsansatz sowie in Anwesenheit von 0 – $10 \mu\text{M}$ 5-(S/R)-HETE durchgeführt. Die Ermittlung von K_M und V_{\max} erfolgte anhand der erstellten Diagramme nach **Lineweaver-Burk** und **Eadie-Hofstee**.

3.9 Ammoniumsulfatfällung von 5-HEDH

Eine Fällung von 5-HEDH aus 10 ml PMN-Lysat (100 Mio. PMN/ml, siehe Abb. 3) fand unter Rühren, durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) statt. 5-HEDH wurde vollständig gefällt, indem die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration stufenweise von 50 % auf 68,1 % erhöht wurde. Die ausgefällten Proteine wurden nach jeder Fällung durch Zentrifugation (6.000 x g, 5 min, 4 °C) entfernt und in 5 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, resuspendiert. Zur Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität wurden 30 µl PMN-Überstand und 30 µl des resuspendierten Proteinsediments der verschiedenen Fällungsschritte (z.B. bei 0 %; 50 %; 54,2 %; 58,1 %; 61,8 %; 65,2 % und 68,1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) untersucht.

3.10 Aufreinigung der 5-HEDH mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.10.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Aufreinigung der 5-HEDH an einer hydrophoben Interaktionssäule (HIC-Ultropac Column, TSK-Phenyl-5PW, Kat.-Nr.: 2131-100, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) erfolgte mit 2 ml PMN-Lysat, die zuvor mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu 50 % gefällt worden war (50 Mio. PMN/ml). Die Probe wurde nach Äquilibrierung des HPLC-Systems auf die HIC-Säule aufgebracht und mit einem Stufengradienten aus 10 mM Tris/HCl und 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (siehe Tab. 3) innerhalb von 60 min eluiert. Die Durchflußrate betrug während der Chromatographie 0,5 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Für die Ermittlung der enzymatischen 5-HEDH-Aktivität wurden jeweils 30 µl HIC-HPLC-Fraktion untersucht (siehe 3.5).

Tab. 3: Chromatographiebedingungen für die 5-HEDH-Aufreinigung an einer hydrophoben Interaktionssäule (HIC-Ultropac Column, TSK-Phenyl-5PW).

Chromatographiebedingung Nr.1	
Elutionsmittel	<u>Elutionsmittel A:</u> 10 mM Tris/HCl; pH 8,0 und 10 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (entgast!) <u>Elutionsmittel B:</u> 10 mM Tris/HCl; pH 8,0 (entgast!)
Elutionsgradient (t: Zeit)	t = 0 min A / B (100 % : 0 %) t = 5 min A / B (100 % : 0 %) t = 10 min A / B (70 % : 30 %) t = 15 min A / B (55 % : 45 %) t = 30 min A / B (30 % : 70 %) t = 40 min A / B (0 % : 100 %) t = 60 min A / B (0 % : 100 %); bei Raumtemperatur
Durchflußrate	0,5 ml/min

3.10.2 Anionenaustauschchromatographie

2 ml PMN-Lysat (100×10^6 PMN/ml; siehe 3.3) sowie 2 ml Mikrosomenüberstand (siehe 3.4) wurden zunächst partikelfrei zentrifugiert (6.000 x g, 10 min, 4 °C) und nach Äquilibrierung des HPLC-Systems jeweils an einer schwachen HPLC-Anionenaustauschersäule (DEAE-P, ID 75 x 7,8 micron, Art.-Nr.: CHO-1680) der Firma Phenomenex GmbH, Aschaffenburg, aufgetrennt. Die Überstände wurden nach dem Gradienten laut Tab. 4 und einer Durchflußrate von 1 ml/min chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden manuell, nach ihren relativen Absorptionsminima, in Gefäßen, die zuvor mit Stabilisatoren (ca. 20 % Glycerin, 10 – 20 mM Octyl-β-D-Glukopyranosid) befüllt worden waren, gesammelt. Zum Nachweis der 5-HEDH-Aktivität wurden 150 – 200 µl der aufgetrennten DEAE-P-HPLC-Fraktionen im Enzymstandardtest untersucht (siehe 3.5). Restliche HPLC-Fraktionen wurden für spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert.

Tab. 4: Chromatographiebedingungen für die 5-HEDH-Aufreinigung an einer schwachen Anionenaustauschersäule (BIOSEP DEAE-P-Säule).

Chromatographiebedingung Nr. 2	
Elutionsmittel	<u>Elutionsmittel A:</u> 20 mM Tris/HCl; pH 8,0 (entgast!) <u>Elutionsmittel B:</u> 20 mM Tris/HCl; pH 8,0 und 1 M NaCl (entgast!)
Elutionsgradient (t: Zeit)	t = 0 min A / B (100 % : 0 %) t = 12 min A / B (100 % : 0 %) t = 15 min A / B (80 % : 20 %) t = 30 min A / B (80 % : 20 %) t = 40 min A / B (60 % : 40 %) t = 52 min A / B (60 % : 40 %) t = 57 min A / B (0 % : 100 %) t = 70 min A / B (0 % : 100 %); bei Raumtemperatur
Durchflußrate	1 ml/min

3.10.3 Aufreinigung der 5-HEDH mittels HPLC- μ -Separation

Die weitere Aufreinigung der 5-HEDH erfolgte mit 5-HEDH-aktiven HPLC-Fraktionen aus parallelen DEAE-Auftrennungen. DEAE-P-HPLC-Fraktionen gleicher Retentionszeit (R_t) wurden gesammelt und gemeinsam durch eine Ultrafiltration (mittels Amicon[®]-Kammer) über eine Filtermembran von 1 kDa Porengröße (Millipore GmbH, Eschborn) einkonzentriert. Eine HPLC- μ -Separationsanlage (SMART[®]-System; Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) mit diversen HPLC- μ -Trennsäulen (siehe Tab. 2) diente der weiteren Proteinauftrennung. Abhängig vom nachfolgenden Auftrennungsprozeß wurden die 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Proben in 0,5 – 1 ml 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) oder 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen. Die Bedingungen für die Anionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie sind in Tab. 5 und in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 5: Chromatographiebedingungen für die 5-HEDH-Aufreinigung an einer starken Anionenaustauschersäule (Mini-Q PC 3.2/3).

Chromatographiebedingung Nr. 3	
Elutionsmittel	<u>Elutionsmittel A:</u> 20 mM Tris/HCl; pH 8,0 (entgast!) <u>Elutionsmittel B:</u> 20 mM Tris/HCl; pH 8,0 und 1 M NaCl (entgast!)
Elutionsgradient (t: Zeit)	t = 0 min A / B (100 % : 0 %) t = 1 min A / B (100 % : 0 %) t = 10 min A / B (80 % : 20 %) t = 14 min A / B (80 % : 20 %) t = 24 min A / B (50 % : 50 %) t = 32 min A / B (50 % : 50 %) t = 40 min A / B (0 % : 100 %) t = 50 min A / B (0 % : 100 %); bei Raumtemperatur
Durchflußrate	100 µl/min

Tab. 6: Chromatographiebedingungen für die 5-HEDH-Aufreinigung an einer C₂/C₁₈-Umkehrphasensäule (µRPC C₂/C₁₈, SC 2.1/10).

Chromatographiebedingung Nr. 4a	Chromatographiebedingung Nr. 4b
Elutionsmittel	<u>Elutionsmittel A:</u> 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) <u>Elutionsmittel B:</u> 80 % Acetonitril und 0,1 % TFA
Elutionsgradient (t: Zeit)	Elutionsgradient (t: Zeit)
t = 0 min A / B (100 % : 0 %) t = 1 min A / B (100 % : 0 %) t = 10 min A / B (75 % : 25 %) t = 40 min A / B (30 % : 70 %) t = 50 min A / B (0 % : 100 %) t = 58 min A / B (0 % : 100 %); bei Raumtemperatur	t = 0 min A / B (100 % : 0 %) t = 1 min A / B (100 % : 0 %) t = 10 min A / B (60 % : 40 %) t = 55 min A / B (30 % : 70 %) t = 60 min A / B (0 % : 100 %) t = 65 min A / B (0 % : 100 %); bei Raumtemperatur
Durchflußrate	100 µl/min

Chromatographie an einer Mini-Q-Säule

Aufreinigungsschema Nr. 1:

Die 5-HEDH-Auftrennung erfolgte zunächst an einer starken Anionenaustauschersäule (Mini-Q-HPLC-Säule) aus einer Mischprobe, hergestellt aus zwölf einzelnen 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen (siehe Parallelaufreinigung; Abb. 22), die in Zeitintervallen von 35,7 – 39,5 min eluiert worden waren. In Tab. 5 sind die Chromatographiebedingungen für die Auftrennung angeführt. Zum Nachweis der 5-HEDH-Aktivität wurde das gesamte Eluat der Mini-Q-HPLC-Fraktionierung untersucht. 5-HEDH-haltige Eluate wurden nach der Vorsäulenextraktion (siehe 3.5.2) lyophilisiert und in 50 µl Tris/HCl-Puffer

(pH 8,0) resuspendiert. Je 10 µl dieser Probelösungen (Nr. 22 – 29; R_t : 18 – 26,5 min) wurden für die weitere elektrophoretische Untersuchung (siehe 3.11) eingesetzt.

Aufreinigungsschema Nr. 2:

In den weiteren Untersuchungen wurde 5-HEDH anhand ihres Elutionsprofils charakterisiert. Es wurden drei Mischproben aus jeweils elf aufeinanderfolgenden DEAE-P-Einzelfraktionen erstellt. Die Mischproben bestanden aus 5-HEDH-Eluaten, die zwischen 36,5 min und 43,5 min von der Säule eluiert worden waren. Das veränderte Elutionsverhalten der 5-HEDH wurde durch die Enzymaktivität in den drei DEAE-P-HPLC-Gemischen a, b, c (30 µl, siehe 3.5) bestimmt. Danach wurden die selben Mischproben an einer Mini-Q-HPLC-Säule weiter aufgetrennt (siehe Tab. 5). Jeweils 1 µl Eluat der Mini-Q-HPLC-Fraktionen wurde in der Phast Gel-Elektrophorese (Nr. 35 – 50; R_t : 16 – 26,8 min) aufgetrennt. Als Vergleich diente eine weitere elektrophoretische Untersuchung bei der die Proben in einem Tricine-SDS-Polyacrylamid aufgetrennt worden waren (Nr. 37 – 48; R_t : 17 – 19,5 min).

Chromatographie an einer C₂/C₁₈-Umkehrphasensäule

Aufreinigungsschema Nr. 3:

Zunächst mußte die 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fraktion (R_t : 39 – 41 min; siehe Abb. 22) mit Hilfe der Ultrafiltrationskammer einkonzentriert und umgepuffert werden. Über eine Mini-Q-Säule wurde diese anschließend weiter aufgetrennt (vgl. Abb. 26 u. Abb. 28b). Die in Zeitintervallen von 20 – 25 min eluierten „Unterfraktionen“ wurden gesammelt, mit Hilfe der Ultrafiltrationskammer einkonzentriert und an einer Umkehrphasensäule nochmals aufgetrennt. Die Oberflächenmatrix der Umkehrphasensäule besteht aus Kohlenwasserstoffen mit einer Kettenlänge von zwei und 18 Kohlenstoffatomen (C₂/C₁₈-Säule). Die Bedingungen für die Chromatographie sind in Tab. 6 aufgeführt (siehe Nr. 4a). Die Auftrennung der Unterfraktionen wurde mit einem steigenden Acetonitrilgradienten (0 – 80 % (v/v)) und einer Durchflußrate von 100 µl/min vorgenommen.

Aufreinigungsschema Nr. 4:

In den weiteren Untersuchungen wurden 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fraktionen aus drei Paralleltrennungen (R_t : 39 – 41 min, siehe Abb. 22) direkt an einer C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt, nachdem sie einkonzentriert und mit 500 μ l 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure angesäuert worden waren. Nach der Umkehrphasenchromatographie wurden die C_2/C_{18} -HPLC-Fraktionen Nr. 41 – 46, die zwischen 37,5 min und 43 min eluiert worden waren, mit Hilfe des SDS-Phast Gel-Systems elektrophoretisch untersucht (3 μ l Probe, siehe 3.11). Von den C_2/C_{18} -HPLC-Fraktionen Nr. 41 und Nr. 42 (R_t : 37,5 – 39,5 min) wurden desweiteren Unterfraktionen, die möglicherweise 5-HEDH enthielten, mit Lys-C-Endoprotease verdaut. Die Protease diente dem Abbau von Proteinen, wobei Peptidbindungen mit Lysin am C-terminalen Ende gespalten werden. Die entstandenen Peptidfragmente der untersuchten Proben wurden schließlich an der C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt und einer aminoterminalen Sequenzanalyse (Edman-Abbau) unterzogen.

Aufreinigungsschema Nr. 5:

Da ein hoher enzymatischer Verlust im Zusammenhang mit der C_2/C_{18} -Chromatographie beobachtet worden war, wurden fraktionierte HPLC-Proben, die aus sechs Einzelchromatographieläufen entstammten, an der C_2/C_{18} -Säule aufgereinigt. Die Proben waren enzymatisch aktiv und wurden zuvor an einer DEAE-P-Anionenaustauschersäule aufgetrennt. Sie eluierten zwischen 39 min und 41 min (siehe Abb. 22). Die Bedingungen für die C_2/C_{18} -Chromatographie ist aus Tab. 6, Nr. 4a zu entnehmen. Die separierten C_2/C_{18} -Fraktionen, die möglicherweise 5-HEDH enthielten, wurden danach in drei Mischproben zusammengefaßt. Die als a', b', c' bezeichneten Mischproben mit Retentionszeiten von 38,5 – 42,5 min wurden mit Lys-C-Endoprotease verdaut und erneut an der C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt. Nach der letzten Chromatographie wurden einzelne C_2/C_{18} -HPLC-Fraktionen ausgewählt und aminoterminal sequenziert. Ergänzend wurden unter Verwendung eines Phast Gel-Elektrophoresesystems C_2/C_{18} -HPLC-Fraktionen (R_t : 38,5 – 43,5 min) untersucht.

Aufreinigungsschema Nr. 6:

In der weiteren Untersuchung wurde eine aktive, 5-HEDH-haltige DEAE-P-HPLC-Probe (R_t : 39 – 41 min) unbehandelt an einer C_2/C_{18} - μ -HPLC-Säule auf-

getrennt (siehe Tab. 6; Chromatographiebedingung Nr. 4b). Nach der Separation wurden C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die zwischen 14 min und 31 min eluiert worden waren (Nr. 32 – 58), im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 3 µl Probenvolumen eingesetzt. C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die im SDS-Polyacrylamidgel wenige Proteinbanden aufwiesen (Nr. 34 – 38; R_t: 14,5 – 16,5 min // Nr. 41 – 45; R_t: 18,5 – 20 min // Nr. 57; R_t: 28 – 30 min, siehe Abb. 38), wurden dem Edman-Abbau unterzogen (siehe 3.12).

3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

a.) Phast Gel Elektrophorese

Die Detektion von Proteinen in fraktionierten HPLC-Proben erfolgte u.a. mit Hilfe einer automatisierten, horizontalen Separationsanlage dem „Phast System“. Das Elektrophorese-System und die Polyacrylamidgele (*Phast Gel Homogeneous High Density*) wurden bei Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, bezogen. Ein Probenvolumen von 1 – 3 µl wurde dabei in einem Zeitraum von einer Stunde und einem steigenden Spannungsgradienten von 0 - 120 Volt elektrophoretisch aufgetrennt.

b.) Tricine-SDS-Polyacrylamidgel

Die untersuchten Proben wurden neben dem Phast System außerdem elektrophoretisch nach einer modifizierten Methode von Schägger und v. Jagow (1987) getrennt. Proteingemische mit relativ hohen Molekulargewichten zwischen 30 kDa und 200 kDa wurden in einem kontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel unter Anwendung eines Tricine-haltigen Elektrodenpuffers (siehe 3.1.2; Nr. 6) aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels und die Elektrophoresebedingungen sind in Tab. 7 wiedergegeben. Zur Polymerisation der Bis-Acrylamidlösungen wurden 30 µl Ammoniumpersulfatlösung (10 %) und 6 µl Tetramethylethyldiamin (TMED) eingesetzt. Vor dem Beladen des Gels wurden 3 – 10 µl Probevolumen mit einer doppelten Menge Proteinauftragspuffer (siehe 3.1.2; Nr. 5) gemischt und in Anwesenheit von 2,6 mM DTT für 10 min bei ca. 90 °C denaturiert. Die Denaturierung erfolgte in einem Thermocycler-Block in 500µl Reaktionsgefäßen. Dalton-Marker-6 oder SDS-6H der Firma Sigma Aldrich

GmbH, Deisenhofen, dienten als Molekulargewichtsmarker während der Elektrophorese.

Tab. 7: Elektrophoresebedingungen für die Proteinauftrennung im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987).

Zusammensetzung des Tricine-SDS-Polyacrylamidgels			Elektrischer Spannungsgradient
Sammelgel:	Bis-Acrylamid (40 %)*:	0,36 ml	t: 0 – 30 min: 100 Volt
	3 M Tris/HCl (pH 8,45):	0,92 ml	t: 30 – 90 min: 120 Volt
	Aqua dest.:	2,46 ml	
Trenngel:	Bis-Acrylamid (40 %)*:	0,91 ml	
	3 M Tris/HCl (pH 8,45):	0,99 ml	
	Aqua dest.:	1,1 ml	
	Harnstoff:	2,16 g	
Polymerisation des Acrylamidgels:	10 % Ammoniumpersulfat:	30 µl	
	Tetramethylethylendiamin:	6 µl	

* Bis-Acrylamid wurde als 40 %ige Lösung von der Firma Biorad GmbH, München, bezogen.

Silbernitratfärbung

Aufgetrennte Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurden mittels Silbernitrat sichtbar gemacht. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel für jeweils 30 min in 20 – 30 ml Fixierlösung (siehe 3.1.2; Nr. 7) und anschließend in „Farmer’s Reducer-Lösung“ (siehe 3.1.2; Nr. 8) unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Polyacrylamidgel drei- bis viermal für 10 min mit Aqua dest. gewaschen und in einer 0,1 %igen (w/v) wässrigen Silbernitratlösung mit Zusatz von 0,02 % (v/v) Formaldehyd (siehe 3.1.2; Nr. 9) für 30 min gefärbt. Danach erfolgte eine 5 – 10 minütige Entwicklung mit 1,25 % (w/v) wässriger Na₂CO₃- und 0,04 % (v/v) Formaldehyd-Lösung (siehe 3.1.2; Nr. 10). Die Reaktion wurde je nach Intensität der Proteinbanden (3 – 10 min) mit einem wässrigen Gemisch aus 5 % (v/v) Essigsäure und 5 % (v/v) Glycerin gestoppt (Heukeshoven, *et al.*, 1988).

3.12 Bestimmung der Aminosäuresequenz

Die aminoterminalen Sequenzierung, die nach dem Prinzip des Edman-Abbaus erfolgte, wurde nach Identifikation der entsprechenden Thiohydantoin-Derivate mit Hilfe eines Protein-Sequenzers Modell 476A (Perkin Elmer Corporation

Applied Biosystems, Weiterstadt) ermittelt. Für die Sequenzanalyse wurden je nach vorhandener Proteinmenge 50 – 100 % Volumen einer HPLC-Fraktion eingesetzt. Da eine weitere Derivatisierung der Probe nicht durchgeführt wurde, konnten vorhandene Cysteine nicht detektiert werden.

3.13 Enzymatischer Abbau durch Lys-C-Endoprotease

Der enzymatische Verdau von partiell aufgereinigten Proteinen wurde mit einer Lys-C-Endoprotease der Firma Hoffmann LaRoche, Mannheim, durchgeführt. Dazu wurde zunächst 80 – 100 % Volumen einer proteinhaltigen HPLC-Fraktion mit Hilfe der SpeedVac Modell VR-1 (Heto Lab Equipment) bis zum Trocknen einkonzentriert und mit 2 ng/ μ l Lys-C-Endoproteasen versetzt (siehe 3.1.2; Nr. 11). Der Proteinabbau wurde bei 37 °C und einer Inkubationsdauer von 4 h durchgeführt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Endoprotease durch eine Mindestverweildauer des Reaktionsansatzes bei -20 °C für 4 – 24 h inaktiviert wurde. Die fragmentierte Probe wurde danach an einer C₂/C₁₈-Säule aufgereinigt.

3.14 Depletierung von β -Aktin und Laktotransferrin aus PMN-Lysaten mit Hilfe von Antikörpern an Affinitätssäulen

Die Abtrennung von β -Aktin und Laktotransferrin (Laktoferrin) aus PMN-Lysaten erfolgte mit Hilfe von HiTrap™-NHS-Affinitätssäulen (Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen β -Aktin (Clone AC-15, Kat.-Nr.: A5441, Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen) und polyklonalen Antikörpern gegen humanes Laktotransferrin (Kat.-Nr.: PC062, The Binding Site Ltd., Birmingham). Hierfür wurde die auf Sepharose®-basierende Säule (1 ml Matrixvolumen) nach Anleitung des Herstellers mit 6 ml eiskaltem HCl (1 mM) aktiviert und mit einem β -Aktin-Antikörper (990 μ g) bzw. einem Laktotransferrin-Antikörper (12,6 mg) für 5 h bei 4 °C beladen. Die so aktivierten Affinitätssäulen wurden dann dreimal abwechselnd mit je 6 ml Waschpuffer (0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl; pH 8,3) und 6 ml Elutionspuffer (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M NaCl;

pH 4,0) gewaschen und mit 10 – 20 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) äquilibriert.

Zur Abtrennung von β -Aktin und Laktotransferrin aus dem PMN-Lysat wurden 5 ml Volumina eingesetzt. Die Elution erfolgte manuell, wobei die Durchflußrate nicht mehr als 0,5 ml/min betrug. Die Chromatographie jeder Probe wurde viermal wiederholt. Die an den Affinitätssäulen gebundenen Bestandteile wurden nach jedem Trennungsschritt mit 1,5 ml Puffer eluiert (Depletierung). Zur Regeneration der Oberflächenmatrix der Affinitätssäule wurde diese mit 10 ml Phosphatpuffer gewaschen und äquilibriert. Aufgereinigte Proben wurden nach jedem Chromatographieschritt auf ihre 5-HEDH-Aktivität untersucht. Hierzu wurden 50 μ l Probenvolumen, die ca. 5 Mio. PMN entsprachen, nach dem Standardverfahren (siehe 3.5) analysiert.

In einer nachfolgenden Untersuchung wurden 2 ml PMN-Lysat, die zuvor an β -Aktin- und Laktotransferrin-Affinitätssäulen aufgereinigt worden waren, weiter an einer DEAE-P-HPLC-Säule aufgereinigt. Die Chromatographie lief nach dem Trennungsschema, aufgeführt in der Tab. 4, ab.

3.15 Einfluß zweiwertiger Metallkationen auf die 5-HEDH-Aktivität

a.) Einfluß von Ca^{2+} -Kationen

Die Untersuchung der 5-HEDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit PMN-Überständen der 105.000 x g-Zentrifugation (siehe Abb. 3) und wurde nach Modifikation des Enzymstandardtests (siehe 3.5) in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) und 1 mM NADP^+ durchgeführt. Hierzu wurden 3×10^6 PMN entsprechende Aliquots (30 μ l) mit 0 – 300 mM CaCl_2 bei Raumtemperatur inkubiert und die Bildungsfähigkeit auf 5-oxo-ETE nach 5 min untersucht.

b.) Einfluß von Mg^{2+} -Kationen

Der Einfluß von MgCl_2 (0 – 300 mM) auf die 5-HEDH-Aktivität wurde unter den gleichen Testbedingungen (siehe 3.5) und mit entsprechender Aliquotmenge (30×10^6 PMN/30 μ l) untersucht.

c.) Einfluß von Zn²⁺-Kationen

Die Ermittlung der 5-oxo-ETE-Bildung in Anwesenheit von Zn²⁺-Kationen erfolgte mit Aliquots von 3 Mio. PMN. Hierzu wurden 30 µl Probe (100 x 10⁶ PMN/ml) mit ZnSO₄-haltigem (0 – 1 µM) Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) vermischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend nach dem etablierten Enzymstandardtest untersucht (siehe 3.5).

d.) Einfluß von Fe²⁺-Kationen

Darüber hinaus wurde die 5-HEDH-Aktivität in Abhängigkeit von Fe²⁺-Kationen analysiert. Es wurden 30 µl PMN-Lysat der 105.000 x g-Zentrifugation (siehe Abb. 3) mit FeSO₄-haltigem (0 – 10 mM) Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) vermischt und für 5 min bei 25°C inkubiert. Der Einfluß von Eisenkationen auf die 5-HEDH-Aktivität wurde nach den wie zuvor festgelegten Versuchsbedingungen ermittelt (siehe 3.5).

3.16 Einfluß von Chelatoren auf die 5-HEDH-Aktivität

Chelatoren sind Komplexbildner, die mit zweiwertigen Kationen interagieren. Dabei werden Kationen für andere Substanzen unzugänglich gemacht. In der vorliegenden Arbeit dienten Chelatoren wie EDTA und EGTA daher der Überprüfung einer zweiwertigen Kationenabhängigkeit hinsichtlich der Reaktivität der 5-HEDH.

a.) Einfluß von EDTA

Die Fähigkeit zur 5-oxo-ETE-Bildung der 5-HEDH wurde bei Zugabe von Chelatoren untersucht. Hierzu wurden 30 µl PMN-Lysat (100 x 10⁶ PMN/ml) mit EDTA-haltigem (0 – 20 mM) Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die 5-HEDH-Aktivität wurde anschließend im Standardtest ermittelt (siehe 3.5).

b.) Einfluß von EGTA

In einem Parallelversuch wurde die 5-HEDH-Aktivität in Anwesenheit von EGTA, das spezifisch Ca²⁺-Kationen komplexiert, bestimmt. Hierfür wurden

Aliquots von 3×10^6 PMN (30 μ l) mit 0 – 125 mM EGTA, das zuvor in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst worden war, gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 min wurde die 5-HEDH-Aktivität im Enzymstandardtest untersucht (siehe 3.5.1) und die gebildete 5-oxo-ETE-Menge chromatographisch quantifiziert (siehe 3.5.2).

3.17 Einfluß von Calmidazoliumchlorid auf die 5-HEDH-Aktivität

Calmodulin gehört zur Familie der Kalzium-bindenden Proteine und reguliert intrazellulär mit Hilfe einer Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase u.a. die Aktivitäten von Enzymen (Stull, 2001; Hudmon *et al.*, 2002). Zum Nachweis der Calmodulin-Abhängigkeit von 5-HEDH wurden 3×10^6 PMN (30 μ l) in 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit 0 – 0,2 μ M Calmidazoliumchlorid, ein speziell gegen calmodulingerichteter Inhibitor, versetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei Raumtemperatur inkubiert und nach 5 min auf ihre 5-HEDH-Aktivität untersucht (siehe 3.5).

3.18 Massenspektrometrie

Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen über eine Ultrafiltrationskartusche (Centricon[®], Millipore GmbH, Eschborn) mit Porengröße von 1 kDa entsalzt und mit Hilfe der SpeedVac bis zum Trocknen einkonzentriert. Die Proben wurden anschließend zur Spaltung und Alkylierung vorhandener Disulfidbrücken in einer gesättigten Atmosphäre (100 ml Volumen) aus 100 μ l Pyridin, 100 μ l 4-Vinylpyridin und 200 μ l Tri-n-Butylphosphin inkubiert (6 h, 37 °C) und in 50 mM Ammoniumcarbonatpuffer ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; pH 8,0) aufgenommen. Die behandelten Proben wurden mit Endoprotease Lys-C (2 ng/ml) in einzelne Peptidfragmente gespalten, erneut einkonzentriert und mit Hilfe eines Massenspektrometers der Firma Micromass UK Ltd. (Modell: Quadrupol-TOF-1™) analysiert. Die Bestimmung der Aminosäure-Zusammensetzung erfolgte über das Electrospray-Ionisationsverfahren

(ESI) in Kombination mit einer flüssigkeitschromatographischen Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS). Die ermittelten Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe der FASTA-Proteindatenbank identifiziert.

3.19 Zellkultur

3.19.1 Isolierung und Kultur von humanen Keratinozyten

Die Isolierung primärer Keratinozyten aus zirkumsierten Knabenvorhäuten erfolgte nach einer modifizierten Methode von Rheinwald *et al.* (1975) und Liu *et al.* (1978). Die nach Zirkumzision im Nährmedium (DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 10 % FCS, 200 U/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin) transportierten Vorhäute wurden mit PBS gewaschen, vorhandenes Fett- und Bindegewebe sowie die Unterhaut mit Blutgefäßen wurden entfernt und das verbleibende Hautgewebe in 1 – 2 cm lange und 3 – 5 mm breite Streifen geschnitten. Die Hautstreifen wurden dann mit 0,2 % (w/v) Trypsin-PBS-Lösung bei 4 °C inkubiert und nach ca. 24 h mit 10 % FCS-haltigem Keratinozyten-Nährmedium versetzt. Danach wurde die Epidermis vorsichtig vom Hautstreifen abgelöst und mehrmals mit Wachstumsmedium (siehe 3.1.3) gewaschen. Die vereinzelter Zellen wurden abzentrifugiert (500 x g, 10 min, 25 °C) und über Nacht (mind. 24 h) in einem 10 % FCS-haltigem Wachstumsmedium gehalten. Das Nährmedium wurde anschließend gegen ein FCS-freies ausgewechselt. Die adhärenen Keratinozyten wurden im Brutschrank (NuAIR US Autoflow CO₂ Jacketed Incubator, Zapf Instrumente, Sarstedt) bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

3.19.2 Isolierung und Kultur von humanen Fibroblasten

Primäre Fibroblasten aus menschlicher Vorhaut wurden aus Bindegewebe, die bei Gewebstücken der Keratinozytenpräparation anfielen, isoliert. Nach Entfernen der Epidermis wurden diese in Kulturflaschen ausgelegt und mit 10 % (v/v) FCS-haltigem „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM) benetzt. Die Fibro-

blastenzellen wuchsen nach einigen Tagen aus den Gewebstücken und wurden adhärent. Hierzu wurde das verbrauchte Nährmedium in einem Rhythmus von zwei Tagen gegen frisches ersetzt.

3.20 Subkultur von Keratinozyten und Fibroblasten

Die Subkultivierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten erfolgte nach der Methode von *Lindl und Bauer* (1994: Kapitel 5), wobei die adhärenen Hautzellen nach Entfernung des verbrauchten Nährmediums mit 37 °C warmem PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,1 %:0,02 %) für 2 – 3 min versetzt und schließlich durch Abklopfen von der Oberfläche (*Shake-off-Verfahren*) gelöst wurden. Die Enzymreaktion (*Trypsinierung*) wurde nach Resuspension der Zellen durch Zugabe eines serumhaltigen Nährmediums beendet. Die abgelösten Hautzellen wurden im Verhältnis 1:4 verdünnt und weiter angezüchtet (*Subkultur*) oder für die spätere Verwendung kryokonserviert (siehe 3.21).

3.21 Kryokonservierung

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten lassen sich für spätere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff lagern. Hierzu wurden Keratinozyten und Fibroblasten, die üblicherweise im zweiten Kulturstadium waren, von der Kulturflaschenoberfläche abgelöst (siehe 3.20), mit PBS gewaschen und in „Einfriermedium“ (DMEM, 10 % Dimethylsulfoxid, 20 % FCS) bei -80 °C adaptiert. Nach etwa 24 h wurden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt und so bei -196 °C gelagert. Keratinozyten und Fibroblasten wurden jeweils mit einer Zelldichte von $3 - 5 \times 10^6$ Zellen/ml kryokonserviert.

3.22 Stimulation primärer Keratinozyten und Fibroblasten mit 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE

Zellstimulationsversuche an primären Keratinozyten und Fibroblasten in der vierten Zellpassage erfolgte mit einer Konfluenz von 80 – 90 %. Hierzu wurden die adhärennten Hautzellen zunächst für ca. 24 h durch serumfreies Nährmedium (für Keratinozyten; Nährmedium ohne Rinderhypophysenextrakt; BPE) adaptiert und mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit authentischem, kommerziell erhältlichem 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE, die zuvor im FCS- bzw. BPE-freien Nährmedium aufgenommen und sterilfiltriert worden waren, stimuliert. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Eikosanoide betragen dabei 1, 5, 100 und 500 nM. Als Kontrolle dienten nährmedienhaltige Kulturansätze ohne FCS, mit BPE bzw. 10 % FCS sowie Kulturansätze mit Zusatz von 0,32 % Ethanol (Vehikelkontrolle). Die Stimulationszeiten betragen 4 h und 24 h.

3.23 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit einer phenolhaltigen TRIzol[®]-Reagenzlösung der Firma Life Technologies, Karlsruhe, und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde die TRIzol[®]-haltige Probe (1 ml/10 cm³) nach Lyse der Zellen mit 200 µl Chloroform vermischt, bei Raumtemperatur 2 – 3 min inkubiert und für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (12.000 x g). Die obere wäßrige Phase, die die gesamte RNA enthielt, wurde nach Überführung in ein zweites Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min inkubiert gelassen. Die präzipitierte RNA wurde dann abzentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C), mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und nach der Trocknung in 20 µl wäßriger Formamidlösung (20 %) aufgenommen. Der RNA-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers Gene Quant II-RNA/DNA-Calculator (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) anhand der optischen Dichte bei 260 nm quantifiziert. Nach Ermittlung der RNA-Konzentration wurde die Gesamt-RNA in die stabilere, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (*Transkription*).

3.24 Reverse Transkription (RT)

Zur Durchführung der reversen Transkription wurden 2 µg RNA mit 2,5 µl Oligo-(dT)-Anker-Primer (20 µM) versetzt und auf 12 µl Volumen mit Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-haltigem Wasser gefüllt. Die Probe wurde für 10 min bei 70 °C erhitzt, im Eisbad gekühlt und mit den folgenden Komponenten versetzt:

- 4 µl Reaktionspuffer (5-fach konzentriert)
- 2 µl 1,4-Dithio-DL-threitol (0,1 mM)
- 1 µl Desoxynukleotidtriphosphat (10 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (*SuperscriptTM II*, Life Technologies)

Die Transkription wurde durch Zugabe der Reversen Transkriptase (*SuperscriptTM II*) gestartet und fand bei 42 °C statt. Nach 1 h wurde die Enzymreaktion beendet, indem die Transkriptase auf 90 °C für 5 min inaktiviert wurde. Die umgeschriebene cDNA-Probe wurde auf 4 °C heruntergekühlt und mit 180 µl DEPC-Wasser auf einem Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Die Reaktionsansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.25 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Untersuchung der spezifischen Genexpression auf molekularer Ebene erfolgte mit Hilfe einer hochsensiblen RT-PCR-Methode. Neben den genspezifischen Oligonukleotiden wurden 5 µl cDNA, die als Matrize für die eigentliche PCR diente, eingesetzt. Als interner Standard wurde das spezifische Gen für Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird, verwendet. Die genspezifischen Oligonukleotide (Eotaxin-1, -2, -3, Gro- α , IL-1 α und -1 β) besaßen Intron-überspannende Basensequenzen (siehe Tab. 8) und wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, und MWG Biotech AG, Ebersberg, hergestellt.

Tab. 8: Synthetische, genspezifische Oligonukleotide (Primersequenzen).

Primer	Oligonukleotidsequenz: 5' → 3'	spezifisches Gen	Basenpaar
EOSQP-F	CCC AAC CAC CTG CTG CTT TAA CCT G	Eotaxin-1	208 Bp
EOSQP-B	TGG CTT TGG AGT TGG AGA TTT TTG G		
EX2SQ-F	CTA CGG GCT CTG TGG TC	Eotaxin-2	291 Bp
EX2SQ-B	GGT TTG GTT GCC AGG ATA		
ETX3SQ-F	CCT GGC CTC CCT CCT GAG TCT	Eotaxin-3	187 Bp
ETX3SQ-B	ACA GAC TTT CTT GCC TCT TTT GGT AG		
GA1	CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC	GAPDH	360 Bp
GA2	ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT		
Gro- α F	CTG CTC CTG GTA GCC GCT G	Gro- α	750 Bp
Gro- α R	GGC ATG GTG CAG GCT CCT CA		
IL-1 $^{\circ}$ -F	CTG CCC AAG ATG AAG ACC AAC CAG TGC T	IL-1 α	757 Bp
IL-1 $^{\circ}$ -B	AAA ACT GTT GCG GCA GGA AGG CTT AGG T		
IL-1B-F	CCA GCT ACG AAT CTC CGA CCA CCA CTA C	IL-1 β	586 Bp
IL-1BR	TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA CCA GTT G		

Die Intron-überspannenden Oligonukleotidsequenzen wurden von den Firmen Amershan Pharmacia Biotech, Freiburg, und MWG Biotech AG, Ebersberg, hergestellt und freundlicherweise von Dr. Bartels und Dr. Hein zur Verfügung gestellt.

Ein Reaktionsansatz für die RT-PCR bestand aus den folgenden Komponenten und wurde zum Schutz vor Verdunstung mit 30 μ l Flüssigwachs (Chill-out 14TM, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) überschichtet:

- 4,0 μ l Tricine-Puffer (10-fach konzentriert)
- 0,5 μ l Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP's; 20 μ M)
- 2,5 μ l genspezifischer Primer 1 (10 μ M)
- 2,5 μ l genspezifischer Primer 2 (10 μ M)
- 0,15 μ l Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Primer 1 (GA1; 10 μ M)
- 0,15 μ l Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Primer 2 (GA2; 10 μ M)
- 5,0 μ l cDNA (siehe 3.24)
- 25,2 μ l Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde im Thermocycler, Modell T3, der Firma Biometra GmbH, durch Zugabe eines Gemisches aus 0,2 μ l *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l) und 9,8 μ l Tricine-Puffer (8,8 μ l DEPC-Wasser, 1,0 μ l 10-fach Tricine-Puffer) gestartet. Die Temperaturprofile für die Reaktionsbedingung der entsprechenden Primerpaare sind in Tab. 9 dargestellt. Die gebildeten PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe eines

UV-Transilluminators (Chroma 42; Vetter GmbH, Wiesloch) sichtbar gemacht. Dazu wurden 9 µl PCR-Produkt mit 1 µl DNA-Auftragspuffer (siehe 3.1.2) vermischt und in 2 %igem Agarosegel aufgetrennt (50 min, 100 Volt). Die DNA-Banden wurden anhand ihrer Fluoreszenz bei 366 nm detektiert und mit Hilfe einer BioDoc-Foto-Dokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) digital verarbeitet. Zur Herstellung des Agarosegels wurden diesbezüglich 2 g Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) in 100 ml TAE-Puffer (einfachkonzentriert; siehe 3.1.2) aufgekocht und mit 9 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Als Größenmarker dienten 3 µl „Ready Load™“-100 Bp-Leiter (Life Technologies).

Tab. 9: Temperaturprofile für die RT-PCR.

Primer-Produkt	Temperaturprofil	Zyklen	[°C/s]
Eotaxin-1, -2	Heizdeckel: 105°C		
	95°C, 1 min		2
	70°C, 10 s	3	2
	67°C, 20 s		0,2
	72°C, 2 min		2
	94°C, 45 s		28
	67°C, 10 s	2	
	60°C, 20 s	0,2	
	72°C, 30 s	2	
	72°C, 15 min		2
4°C, Pause		2	
Eotaxin-3	Heizdeckel: 105°C		
	94°C, 1 min	31	2
	65°C, 30 s		2
	72°C, 30 s		2
	72°C, 15 min		2
4°C, Pause		2	
IL-1α, -1β	Heizdeckel: 105°C		
	95°C, 1 min		2
	70°C, 10 s	3	2
	67°C, 20 s		0,2
	72°C, 2 min		2
	94°C, 45 s		28
	67°C, 10 s	2	
	62°C, 20 s	0,2	
	72°C, 30 s	2	
	72°C, 15 min		2
4°C, Pause		2	
Gro-α	Heizdeckel: 94°C		
	94°C, 1 min	35	2
	60°C, 30 s		2
	72°C, 2 min		2
	72°C, 3 min		2
4°C, Pause		2	

3.26 Semiquantitative, densitometrische Auswertung der RT-PCR-Produkte

Die densitometrische Auswertung der aufgetrennten DNA-Banden erfolgte mit Hilfe der BioDoc Analyse Software „ScanPack 3“ (Biometra, Göttingen). Hierfür wurde die Bandenintensität der RT-PCR-Produkte mathematisch in Kurven transformiert und nach Integration der Kurvenfläche mit der Intensität der GAPDH-Bande (interne Kontrolle) ins Verhältnis gesetzt. Es ergab sich daraus die relative mRNA-Expression der stimulierten Zellen. Die im Ergebnisteil dargestellten Diagramme sind einzelne, repräsentative Auswertungen von semiquantitativen PCR-Reaktionen.

3.27 Amplifikation eines unbekanntes Genabschnittes mit Hilfe der RACE-PCR-Technik

Nach der massenspektrometrischen Ermittlung wurden synthetische Oligonukleotide (degenerierte und nested-Primer) hergestellt, um das Gen für das identifizierte Protein (potentielles 5-HEDH-Enzym) zu exprimieren und dieses dann als Sonde für die Suche nach genomischer DNA einzusetzen. Diese RACE-PCR-Technik (RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde bereits von Frohman *et al.* (1988) erfolgreich durchgeführt und sollte eine schnelle Amplifizierung von cDNA ermöglichen. Die Sequenzen der degenerierten Primer *Jack -1* und *Jack -2* (Namensgebung erfolgte willkürlich!), nested-Primer und *Frohman-Adapterprimer* setzten sich wie in Tab. 10 beschrieben zusammen und wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert. Zur Amplifikation wurden 5 µl cDNA aus Keratinozytenkultur bzw. aus Hautbiopsien zweier psoriatischer Patienten (psoriatische Plaques), die als Positivkontrollen dienten, mit den folgenden Komponenten versetzt und mit 30 µl Chill-out 14™-Flüssigwachs überschichtet:

- 5,0 µl Tricine-Puffer (10-fach konzentriert)
- 5,0 µl Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP's; 2 mM)
- 2,5 µl degenerierter Primer (*Jack1*, *Jack2* oder *nested-Primer*; 10 µM)
- 2,5 µl Frohman-Adapterprimer (10 µM)
- 20,0 µl Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser

Die Enzymreaktion wurde nach Zugabe von 0,4 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und 9,6 µl DEPC-Wasser mit dem Temperaturprofil aus Tab. 11 gestartet. Als Kontrollen wurden Reaktionsansätze verwendet, die neben der cDNA nur degenerierte Primer oder Frohman-Adapterprimer enthielten.

Tab. 10: Synthetische Oligonukleotidsequenzen.

Primer	Oligonukleotidsequenz: 5' → 3'	T _m
Jack-1-Primer	GC(CT) CC(CT) GC(CT) CG(GCT) GT (GT) TT(CT) CC	65,8°C
Jack-2-Primer	GCT CCT GCT CG(GT) GT(GT) TTT CC	61,4°C
nested-Primer	CC(CT) GC(CT) CG(GCT) GT(GT) TT(CT) CC(ACT) (AT)(GC)	63,4°C
Frohman-Adapterprimer	CCT GTC GAC GGT ACC AAG C	60,0°C

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, hergestellt und wurden freundlicherweise von Dr. Harder zur Verfügung gestellt.

Tab. 11: Temperaturprofil für die degenerierten und nested-Primer.

Primer-Produkt	Temperaturprofil	Zyklen	[°C/s]
Jack-1, Jack-2, nested-Primer	Heizdeckel: 104°C		
	95°C, 1 min		2
	85°C, Pause		2
	94°C, 1 min	35	2
	50°C, 30 s		2
	72°C, 3 min		2
	72°C, 5 min		2
4°C, Pause			

4 Ergebnisse

4.1 Chromatographischer Nachweis von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE

Untersuchungen von PMN-Lysaten und Überständen solubilisierter Mikrosomen ergaben, daß die Bildung von 5-oxo-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-Eikosatetraensäure (5-oxo-ETE) durch eine Oxidation der 5-Hydroxy-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-Eikosatetraensäure (5-(S)-HETE) hervorgerufen wird. Diese Reaktion erfolgt enzymatisch und wird durch die mikrosomale 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) in Anwesenheit des Kosubstrates NADP⁺ katalysiert. Nach dem Verfahren des Enzymstandardtests (siehe 3.5.1) ließ sich die Abnahme des Substrates und die Bildung des Reaktionsproduktes mit Hilfe der Umkehrphasenchromatographie nachweisen (siehe Abb. 4). Beide Eikosanoide zeigten nach der etablierten Trennungsmethode (siehe 3.5.2), neben ihren unterschiedlichen Absorptionsspektren im UV-Bereich zusätzlich divergente Elutionseigenschaften. 5-(S/R)-HETE wurde bei 235 nm detektiert und mit einer Retentionszeit (R_t) von ca. 10,2 min eluiert, wohingegen 5-oxo-ETE mit etwa einer Minute Verzögerung (R_t : 11,2 min) bei 280 nm Wellenlänge durch Ko-Elution mit kommerziell erhältlichem 5-oxo-ETE bestimmt wurde.

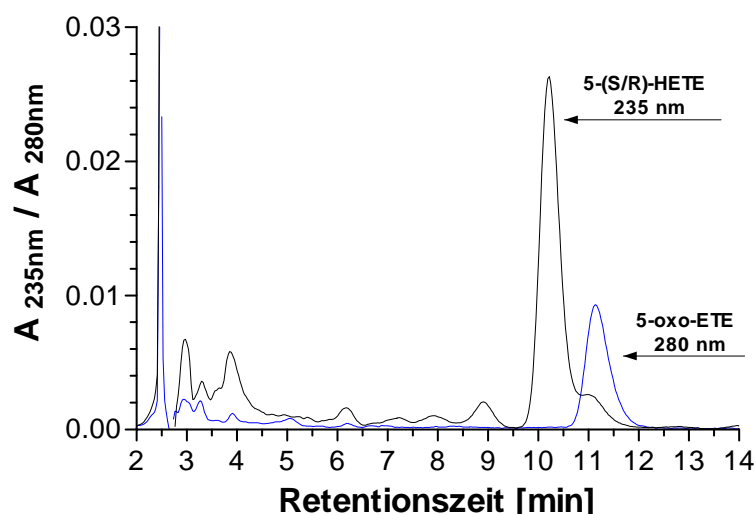


Abb. 4: Chromatographische Auftrennung von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE. Lysate von 3 Mio. PMN wurden im Enzymstandardtest (siehe 3.5) auf ihre 5-HEDH-Aktivität hin untersucht. Das Substrat 5-(S/R)-HETE und das Enzymprodukt 5-oxo-ETE wurden an einer analytischen RP₁₈-Säule chromatographisch aufgetrennt und nach Flächenintegration quantifiziert. Das Chromatogramm stellt eine repräsentative Auftrennung der beiden Eikosanoide bei einer Absorption (A) von 235 nm und 280 nm dar.

Mit der Erstellung zweier Eichkurven aus kommerziell erhältlichen, authentischen 5-(*S/R*)-HETE und 5-oxo-EETE (siehe Abb. 5) ließ sich die 5-HEDH-Aktivität einer Probe anhand der gebildeten 5-oxo-EETE-Menge nachweisen. 500 pmol 5-(*S/R*)-HETE, die nach dem Standardverfahren aufgetrennt worden waren (siehe 3.5.2), wiesen nach Integration der Peakfläche bei 235 nm ca. $1,36 \times 10^6$ Flächeneinheiten auf. Im Vergleich dazu wurde für 500 pmol 5-oxo-EETE, die eine Absorption bei 280 nm zeigte, eine Flächeneinheit von $0,83 \times 10^6$ ermittelt.

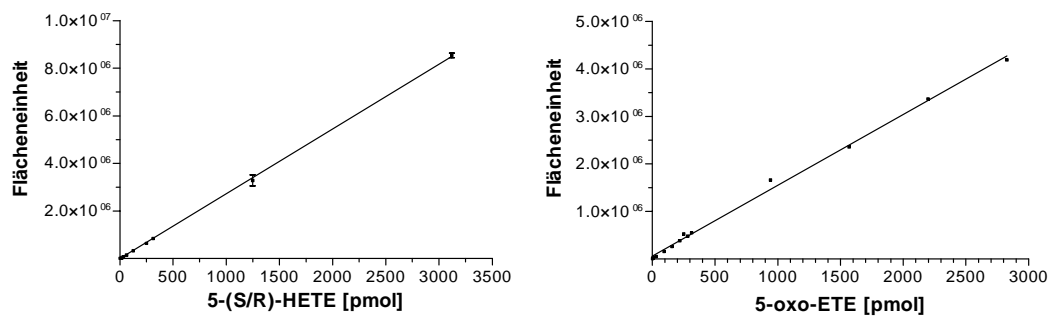


Abb. 5: Eichkurve von 5-(*S/R*)-HETE und 5-oxo-EETE. 5-(*S/R*)-HETE (0 – 3120 pmol; n = 3) und 5-oxo-EETE (0 – 2826 pmol; n = 1) wurden im Standardverfahren der Eikosanoïdchromatographie an einer analytischen RP₁₈-Säule aufgetrennt (siehe 3.5.2) und nach der Flächenintegration entsprechend ihrer Flächeneinheit gegeneinander aufgetragen.

Weiterhin wurde zur Bestimmung der 5-HEDH-Proteinkonzentration eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA; 0 – 1 mg/ml) erstellt (siehe Abb. 6). Die Messung bei 690 nm ergab z.B. für 0,2 mg BSA/ml eine Absorption ($A_{690\text{nm}}$) von ca. 0,02.

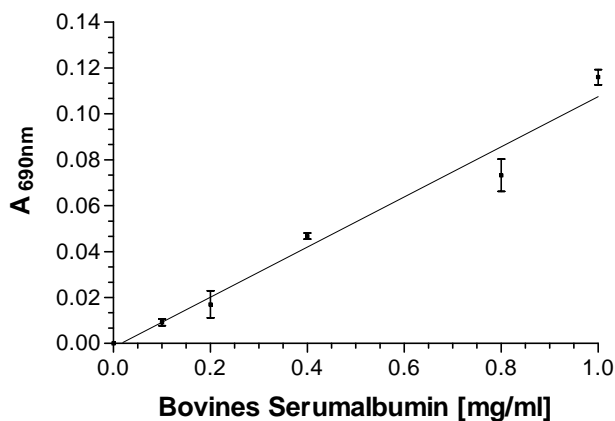


Abb. 6: Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA). Die Darstellung einer BSA-Eichkurve (0 – 1 mg/ml) erfolgte mit Hilfe eines DC Protein Assays der Firma Biorad GmbH (siehe 3.5.3). BSA wurde nach einer Messung bei 690 nm entsprechend ihrer Absorption ($A_{690\text{nm}}$) ins Verhältnis gesetzt (n = 4).

4.2 Nachweis der 5-HEDH-Aktivität nach fraktionierter Zentrifugation

Die mikrosomale 5-HEDH ließ sich durch eine fraktionierte Zentrifugation des Neutrophilenextraktes partiell anreichern. Die einzelnen Phasen waren an ihren unterschiedlichen Farben bzw. an der Trübung erkennbar. Der Zellüberstand zeigte nach Entfernung der groben Zellfragmente und Membranbestandteile ein gelb farbiges, opaleszierendes Aussehen. Das gallertartige Mikrosomensediment war hingegen gelbgrün. Bezogen auf die Gesamtproteinmenge der getesteten Fraktionen, wiesen die Mikrosomen nach Solubilisierung die höchste spezifische 5-HEDH-Aktivität auf. Diese betrug ca. 49,8 U/mg Gesamtprotein, wohingegen die des zytosolischen PMN-Lysates (105.000 x g-Überstand) eine Enzymaktivität von ca. 5,8 U/mg erreichte. Im Vergleich dazu lag die spezifische 5-HEDH-Aktivität nach der Zentrifugation mit 900 x g bzw. 16.000 x g im Überstand bei ca. 6,6 U/mg und 7,0 U/mg. Im Sediment ergab sich eine spezifische Enzymaktivität von ca. 1,8 U/mg sowie 2,0 U/mg (siehe Abb. 7).

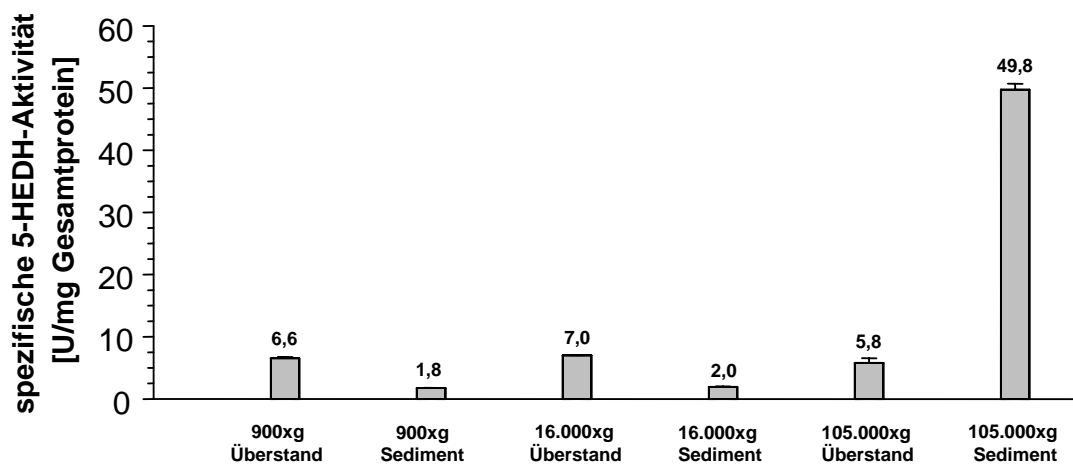


Abb. 7: Verteilung der spezifischen 5-HEDH-Aktivität nach einer fraktionierten Zentrifugation. 5-HEDH wurde nach dem Schema der fraktionierten Zentrifugation (siehe Abb. 3) aus PMN-Extrakt partiell aufgereinigt und im Standardtest (siehe 3.5) auf ihre Aktivität untersucht (n = 2). Die spezifische 5-HEDH-Aktivität war als Enzymeinheit (U: Unit) definiert und bezog sich auf die Gesamtproteinmenge der untersuchten Probe. Eine Enzymeinheit entsprach 1 pmol 5-oxo-ETE, die pro Minute gebildet wurde.

4.3 Untersuchung der 5-HEDH-Stabilität

4.3.1 Grad der Degradierung der 5-HEDH bei Raumtemperatur

Da die 5-HEDH-Präparation aus isolierten PMN mehrere Stunden erfolgte und die weitere chromatographische Auftrennung bei Raumtemperatur stattfand, war zuvor eine Untersuchung hinsichtlich der 5-HEDH-Stabilität notwendig. Hierzu wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Verweildauer bei Raumtemperatur ermittelt.

Eine sukzessive Abnahme der 5-HEDH-Aktivität konnte in Zeitintervallen von 6 h im PMN-Lysat und innerhalb von 8 h im Mikrosomenüberstand nachgewiesen werden. Bezüglich des PMN-Lysates nahm die 5-oxo-ETE-Bildung nach einer Stunde bereits um ca. 15 % ab. Die Halbwertszeit der 5-HEDH lag bei etwa 3 h. Diesbezüglich betrug die Enzymaktivität nur noch 43,8 % der Ausgangsaktivität (-56,2 %, 3,5 Units; siehe Abb. 8a). Im Vergleich dazu zeigten solubilisierete Mikrosomenüberstände eine schwächere Ausgangsaktivität. Diese nahm aber innerhalb des untersuchten Zeitraumes nur langsam ab. In den ersten zwei Stunden lag der Aktivitätsverlust bei ca. 13,8 %. Erst nach 4 h ließ sich ein deutlicher Rückgang der Enzymaktivität um ca. 76 % (1,2 Units) ermitteln. Nach 8 h wiesen die Reaktionsansätze nur noch eine Enzymaktivität von ca. 15,6 % (0,8 Units) auf (siehe Abb. 8b).

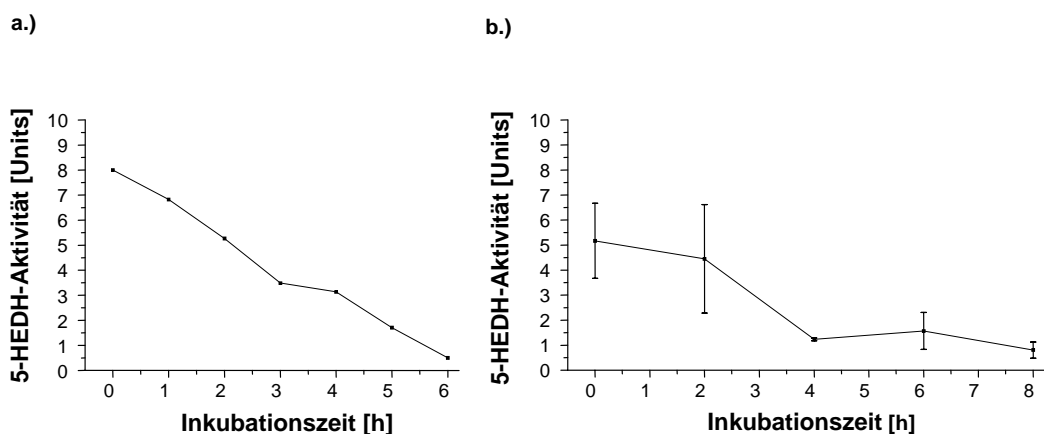


Abb. 8: 5-HEDH-Stabilität in Abhängigkeit der Verweildauer bei Raumtemperatur. PMN-Lysat (a.; n = 1) und solubilisierter Mikrosomenüberstand (b.; n = 2) nach Inkubation bei Raumtemperatur für 6 h und 8 h. Die Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität erfolgte nach dem Standardverfahren (siehe 3.5)

4.3.2 5-HEDH-Stabilität nach Kryokonservierung

5-HEDH-haltige Reaktionsansätze wurden nach der Präparation bei -20 °C gelagert. Für die Gewährleistung, daß die 5-HEDH-Struktur auch nach einer Kryokonservierung stabil blieb, wurde die 5-HEDH-Aktivität untersucht. Eine Beeinträchtigung der 5-HEDH-Stabilität im PMN-Lysat ließ sich nach sieben Tagen Kryokonservierung (-20 °C) beobachten (siehe Abb. 9). Während der Lagerung war ein erheblicher Verlust der 5-HEDH-Aktivität in glyzerinfreien Reaktionsansätzen beobachtet worden. Erst die Anwesenheit von Glycerin als Konservierungsmittel bewirkte eine Stabilisierung der 5-HEDH. Die Stabilität wurde nach Auftauen des Lysates indirekt über die 5-oxo-ETE-Produktion nachgewiesen. Am Beispiel eines PMN-Lysates von $2,6 \times 10^6$ Zellen konnte eine 16,6-fach höhere 5-HEDH-Aktivität (ca. 5,0 Units) durch 20 % Glycerinzusatz während der -20 °C -Lagerung erzielt werden. Ohne Glycerin betrug sie nur 0,3 Units. Auch die Menge an eingefrorenem Reaktionsvolumen hatte Auswirkungen auf die Enzymstabilität. Der glyzerinfreie Reaktionsansatz mit $0,3 \times 10^6$ PMN zeigte keine Enzymaktivität, wohingegen die ca. 8,5-fach konzentrierten Reaktionsansätze ($2,6 \times 10^6$ PMN) noch eine Restaktivität von 0,3 Units aufwiesen.

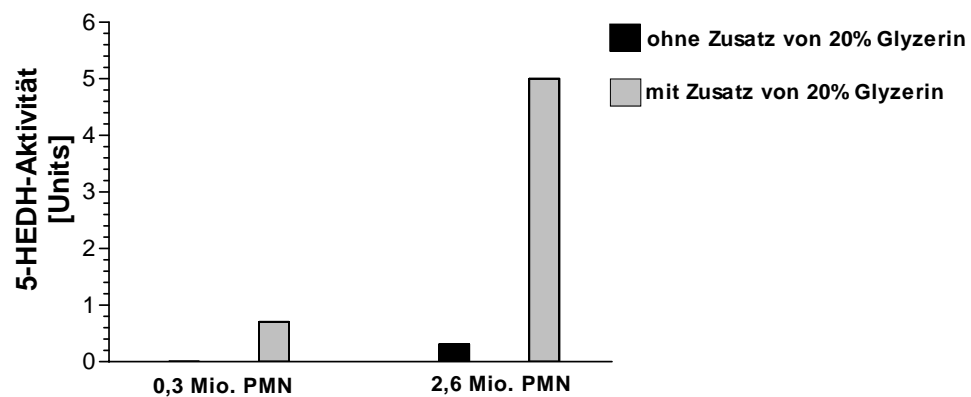


Abb. 9: 5-HEDH-Stabilität nach einer Kryokonservierung bei -20 °C . Lysate von $0,3 \times 10^6$ und $2,6 \times 10^6$ PMN wurden mit und ohne Zusatz von 20 % Glycerin bei -20 °C gelagert. Die 5-HEDH-Aktivität, die als Enzymeinheit (Unit; 1 pmol 5-oxo-ETE/min) definiert war, wurde nach sieben Tage Kryokonservierung im Standardtest untersucht ($n = 1$).

4.3.3 5-HEDH-Stabilität als Funktion der Temperatur

Um die Stabilität der 5-HEDH zu überprüfen, wurden Zellysate Temperaturen von 4 – 90 °C ausgesetzt. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität nach dem Standardtest bestimmt (siehe 3.5). Die 5-HEDH zeigte ein relativ konstantes Aktivitätsniveau in einem Temperaturbereich von 4 – 50 °C. Die 5-oxo-ETE-Bildung variierte zwischen einer maximalen Umsatzrate von 4,3 pmol/min bei 20 °C und einer minimalen Umsatzrate von 3,6 pmol/min bei 50 °C. Eine Temperatur von 60 °C bewirkte eine geringfügige Verschlechterung der Enzymaktivität. Die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE-Menge bei 60 °C-Inkubationstemperatur entsprach etwa 58 % (2,5 Units) der enzymatischen Aktivität der Reaktionsansätze bei einer 20 °C-Inkubation. Eine vollständige Denaturierung der 5-HEDH wurde durch eine Temperatur von über 70 °C induziert (siehe Abb. 10).

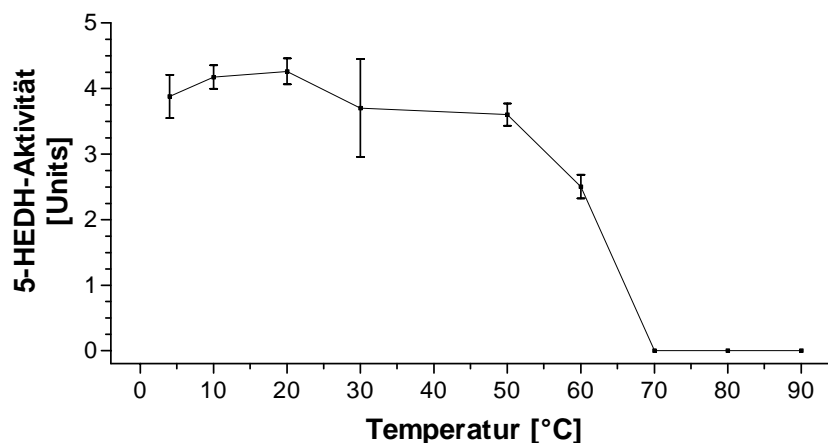


Abb. 10: Einfluß der Temperatur auf die 5-HEDH-Stabilität. Die Überprüfung der 5-HEDH-Stabilität erfolgte in einem Temperaturbereich von 4 – 90 °C. Dabei wurden Zellysate mit 5×10^6 PMN für 30 min im Wasserbad erwärmt. Die Enzymstabilität wurde über die enzymatische Aktivität bestimmt ($n = 3$). Daher war die ermittelte Enzymaktivität (Unit) ein Maß für die Enzymstabilität und entsprach 1 pmol 5-oxo-ETE, die pro Minute gebildet wurde.

4.3.4 Einfluß organischer Lösungsmittel auf die 5-HEDH-Stabilität

Im Hinblick auf die weitere chromatographische 5-HEDH-Auftrennung wurde der Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die 5-HEDH-Aktivität bzw. native Proteinstruktur der Dehydrogenase untersucht. Es zeigte sich, daß die 5-HEDH durch Acetonitril, Ethanol und Isopropanol in ihrer enzymatischen Aktivität

beeinträchtigt wurde. Die 5-oxo-ETE-Bildung ließ sich nach Inkubation mit 80 % Acetonitril, Ethanol oder Isopropanol vollständig hemmen. Mit 10 % Acetonitril, Ethanol bzw. Isopropanol wurde die 5-HEDH-Aktivität nur teilweise gestört (siehe Abb. 11). Die untersuchten Reaktionsansätze wiesen bezüglich der glyzerinfreien Kontrollen (Tris/HCl, pH 8,0) einen Aktivitätsverlust von 14 – 34 % auf. Die stärkste Inhibition bewirkte dabei 10 % Ethanol (ca. 34 %), wohingegen 10 % Acetonitril die geringste Wirkung auf die 5-oxo-ETE-Produktion hatte (ca. 14 %). Eine schwache Steigerung der 5-HEDH-Aktivität zeigten Reaktionsansätze mit Zusatz von 10 % Glycerin. Die 5-oxo-ETE-Ausbeute lag etwa 13 % höher als die der glyzerinfreien Kontrollansätze.

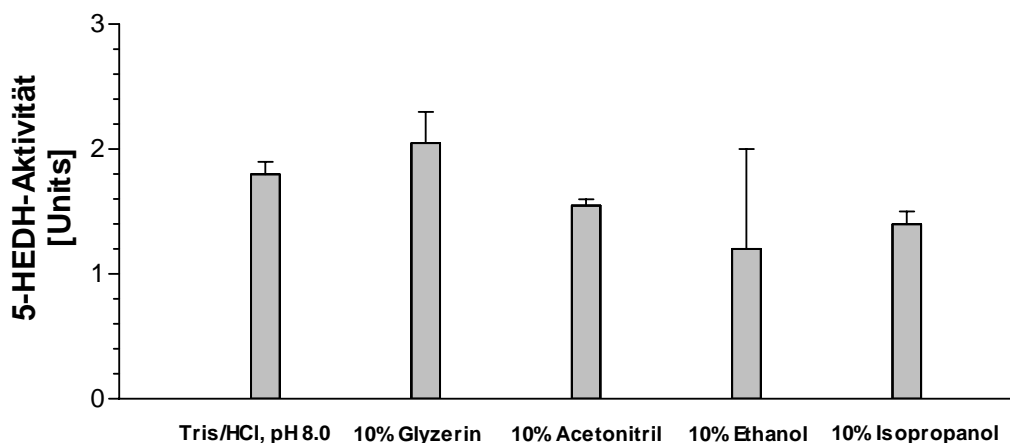


Abb. 11: Einfluß von organischen Lösungsmitteln auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 5×10^6 PMN wurden mit 10 % Acetonitril, Ethanol und Isopropanol für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und im Standardtest (siehe 3.5) auf ihre 5-HEDH-Aktivität untersucht ($n = 2$). Als Kontrollen dienten 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit bzw. ohne Zusatz von 10 % Glycerin. Die Enzymeinheit (Unit) war ein Maß für die 5-HEDH-Aktivität und entsprach 1 pmol/min gebildete 5-oxo-ETE-Menge.

4.4 Untersuchung der 5-HEDH-Aktivität

4.4.1 Einfluß der Reaktionstemperatur auf die 5-HEDH-Aktivität

Für eine Optimierung des Enzymstandardtests (siehe 3.5) wurde die Aktivität der 5-HEDH in einem Temperaturbereich von 4 – 90 °C untersucht (siehe 3.7a). Dabei wurde ein Wirkungsbereich der 5-HEDH zwischen 40 °C und 50 °C ermittelt. Die enzymatische Aktivität betrug 22,6 Units bei 40 °C und 23,4 Units bei 50 °C. Eine minimale 5-oxo-ETE-Produktion bis zur vollständigen Hemmung

der 5-HEDH wurde unterhalb von 20 °C und oberhalb von 60 °C festgestellt. Die noch detektierte 5-oxo-ETE-Menge erreichte nicht mehr als 16 % des Optimumbereichs (siehe Abb. 12).

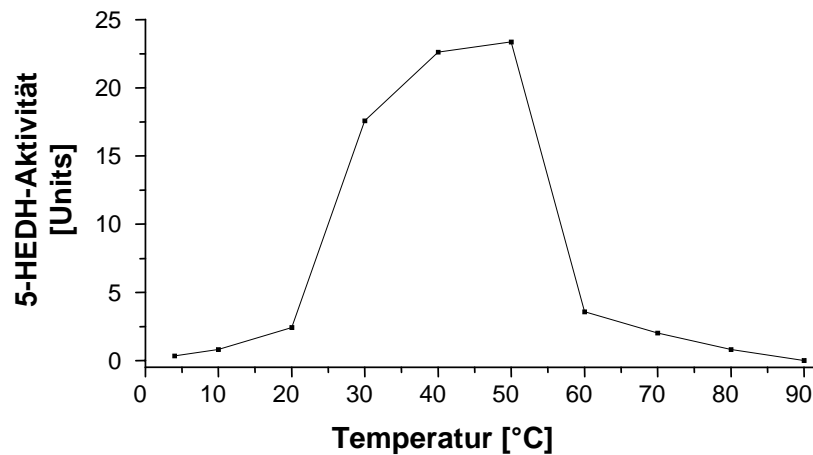


Abb. 12: Einfluß der Reaktionstemperatur auf die 5-HEDH-Aktivität. Die 5-HEDH-Aktivität im PMN-Lysat (5×10^6 PMN/50 μ l) wurde im Enzymstandardtest (siehe 3.5) zwischen 4 °C und 90 °C untersucht. Die ermittelte Enzymeinheit (Unit) war ein Maß für die Enzymaktivität und entsprach 1 pmol 5-oxo-ETE, die pro Minute gebildet wurde (n = 1).

4.4.2 Einfluß von NaCl auf die 5-HEDH-Aktivität

Die Untersuchung der 5-HEDH-Aktivität hinsichtlich der Salz-Abhängigkeit erfolgte mit Zellysaten von 5×10^6 PMN und wurde nach dem Standardverfahren in Anwesenheit von variablen NaCl-Konzentrationen (0 – 2 M) durchgeführt. Der Versuch zur Optimierung des Enzymstandardtests (siehe 3.5) zeigte, daß NaCl nur einen geringen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübte. Ein deutlicher Rückgang der 5-HEDH-Aktivität auf 2,7 Units ließ sich erst bei Anwesenheit von 2 M NaCl ermitteln. Diese entsprach etwa 39,7 % der enzymatischen Aktivität der NaCl-freien Reaktionsansätze (siehe Abb. 13).

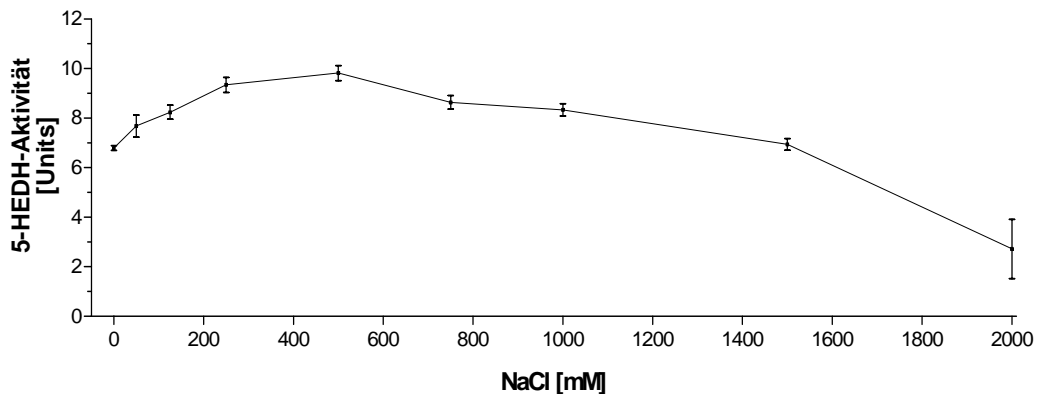


Abb. 13: Einfluß von NaCl auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 5×10^6 PMN wurden im Standardtest mit 0 – 2 M NaCl inkubiert und auf ihre 5-HEDH-Aktivität untersucht (siehe 3.5). Die ermittelte Enzymaktivität entsprach 1 pmol/min gebildete 5-oxo-ETE-Menge ($n = 3$).

4.4.3 Einfluß des pH-Wertes auf die 5-HEDH-Aktivität

Die native 5-HEDH-Konformation und die enzymatische Aktivität während der Präparation und in der chromatographischen Aufreinigung waren pH-abhängig. Untersuchungen zur pH-Stabilität zeigten, daß 5-(S/R)-HETE in einem weiten pH-Bereich stabil blieb. Zwischen pH 2,0 und pH 13,0 ließ sich keine Veränderung im Elutionsprofil feststellen. 5-(S/R)-HETE absorbierte bei 235 nm und eluierte mit einer R_t von ca. 10,2 min (vgl. Abb. 4). Eine Veränderung im Absorptionsprofil zeigte 5-(S/R)-HETE nur bei pH 1,0 zwischen einer Retentionszeit von 7 – 12 min. Ein charakteristisches Elutionsprofil von 5-(S/R)-HETE war auch bei pH 14,0 zu sehen. Eine Quantifizierung des Reaktionsproduktes war jedoch nicht möglich, da der Elutionspeak von 5-oxo-ETE von Verunreinigungen der RP₁₈-Säule verstärkt überlagert wurde (*Chromatogramm nicht dargestellt*).

Abb. 14 zeigt eine charakteristische, chromatographische Auftrennung der 5-(S/R)-HETE nach Inkubation bei pH 1,0 und pH 2,0. Im Hinblick auf die 5-HETE-Stabilität wurden PMN-Lysate (5 Mio. Zellen/50 μ l) zwischen pH 2,0 und pH 13,0 untersucht. Die höchste 5-oxo-ETE-Produktion wurde im Bereich zwischen pH 7,0 – 12,0 nachgewiesen (24,0 – 30,1 pmol/min). Oberhalb von pH 12,0 nahm die Enzymaktivität rapide ab, so daß bei pH 13,0 keine Umsetzung mehr zu beobachten war. Ebenso wurde eine Inhibition der 5-oxo-ETE-Produktion unterhalb von pH 7,0 festgestellt. Die ermittelte Enzymaktivität betrug für Reaktionsansätze bei pH 6,0 etwa 5,6 Units. Dies entsprach ca. 21 % der

maximalen Umsetzung. Eine vollständige Inhibition der 5-HEDH-Aktivität ließ sich nur im Bereich von pH 1,0 – 5,0 beobachten (siehe Abb. 15).

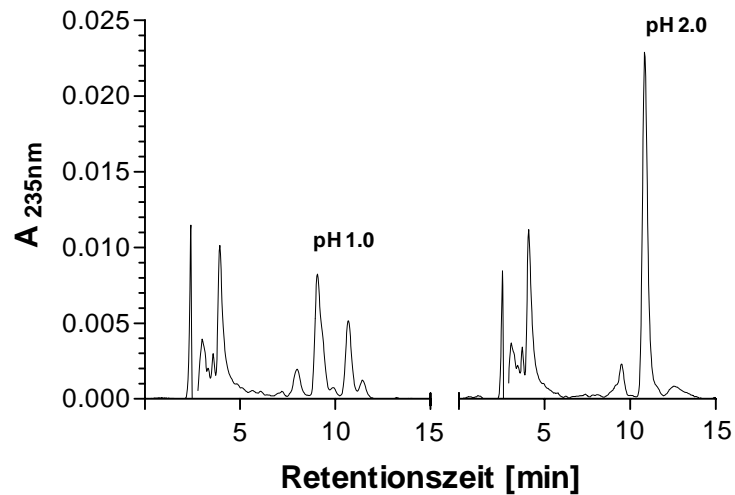


Abb. 14: 5-(S/R)-HETE-Stabilität bei pH 1,0 und pH 2,0. Zur Untersuchung der Substratstabilität wurden $4 \mu\text{M}$ 5-(S/R)-HETE unter Standardbedingung bei pH 1,0 – 14,0 inkubiert und aufgetrennt (siehe 3.5.2). 5-(S/R)-HETE, die bei 235 nm gemessen wurde, wies eine hohe Stabilität zwischen pH 2,0 und pH 14,0 auf. Eine Veränderung im Elutionsprofil ließ sich nicht nachweisen (vgl. Abb. 4). Dargestellt sind die Elutionsprofile von 5-(S/R)-HETE nach Inkubation bei pH 1,0 und pH 2,0.

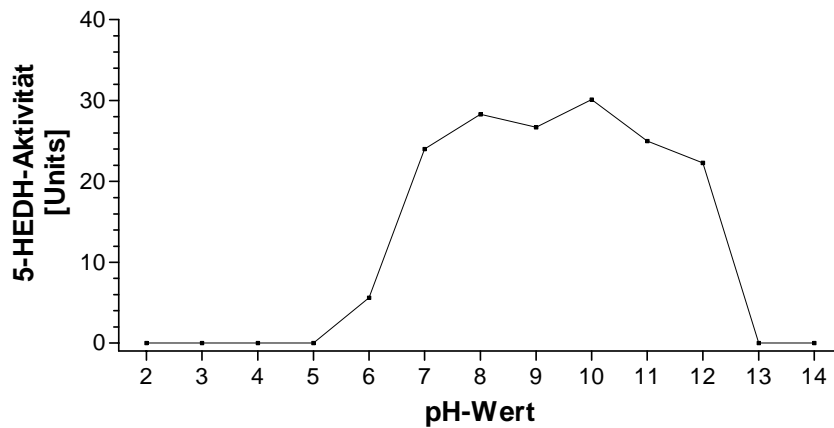


Abb. 15: Einfluß des pH auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 5×10^6 PMN wurden nach dem Grundschemata des Standardtests bei pH 2,0 – 13,0 inkubiert und auf ihre 5-HEDH-Aktivität untersucht ($n = 1$). Die ermittelte Aktivität war als Enzymeinheit (Unit) definiert und entsprach 1 pmol 5-oxo-EETE, die pro Minute gebildet wurde.

4.5 Untersuchungen zur Substratumsatzgeschwindigkeit von 5-HEDH

4.5.1 5-HEDH-Aktivität als Funktion der Substratlimitierung

Der Nachweis der 5-HEDH erfolgte über die Umsetzung von 5-(S)-HETE zu 5-oxo-EETE in Anwesenheit von NADP⁺ als Kofaktor. Dabei ließ sich die Enzymaktivität von Zellysaten zwischen 1 – 100 x 10⁶ PMN mit gleichbleibender Substratkonzentration deutlich beeinflussen. Aus Abb. 16 ist zu sehen, daß ein linearer Anstieg der 5-oxo-EETE-Produktion im Bereich von 1 – 8 Mio. PMN vorlag. Die Produktion näherte sich mit zunehmender PMN-Menge (Aliquots ab 8 x 10⁶ PMN) bei gleichbleibender 5-(S/R)-HETE-Konzentration (4 µM) einem Maximum. Obwohl Reaktionsansätze mit 90 – 100 x 10⁶ PMN die höchste Gesamtproduktion von 5-oxo-EETE (ca. 308 pmol) aufwiesen, hatten sie aber, bezogen auf 1 x 10⁶ PMN, eine niedrigere Bildungsrate (vergl. Abb. 17).

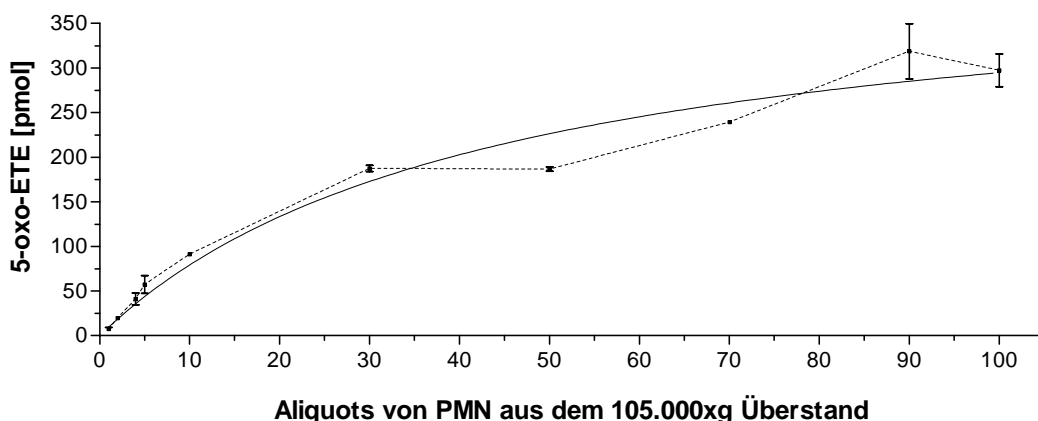


Abb. 16: 5-HEDH-Aktivität als Funktion der Substratlimitierung. Die Untersuchung der 5-(S)-HETE-Limitierung erfolgte bei gleichbleibender Substratkonzentration und mit Aliquots von 1 – 100 x 10⁶ PMN. Nach dem Grundschemata des Standardtests (siehe 3.5) wurde dann die Gesamtmenge der quantifizierten 5-oxo-EETE als Funktion des untersuchten PMN-Aliquots dargestellt (n = 2).

4.5.2 Bildungsrate von 5-oxo-EETE nach der Substratlimitierung

Zur Darstellung der Bildungsrate wurde die ermittelte Enzymaktivität der untersuchten Reaktionsansätze (Aliquots von 1 – 100 x 10⁶ PMN) auf 1 x 10⁶ PMN bezogen. Abb. 17 zeigt, daß die Stärke der 5-(S)-HETE-Umsetzung unmittelbar von der PMN-Menge abhing. Diese nahm unterhalb von 10 x 10⁶ PMN linear zu und erreicht mit 8 x 10⁶ PMN ein Maximalwert von ca. 11,5 Units/1 x 10⁶ PMN.

Nach Erreichen der Substratlimitierung ging die Bildungsrate wieder zurück, woraufhin Reaktionsansätze mit Aliquots von 90×10^6 PMN und 100×10^6 PMN nur noch durchschnittlich 3,3 Units/ 1×10^6 PMN aufwiesen.

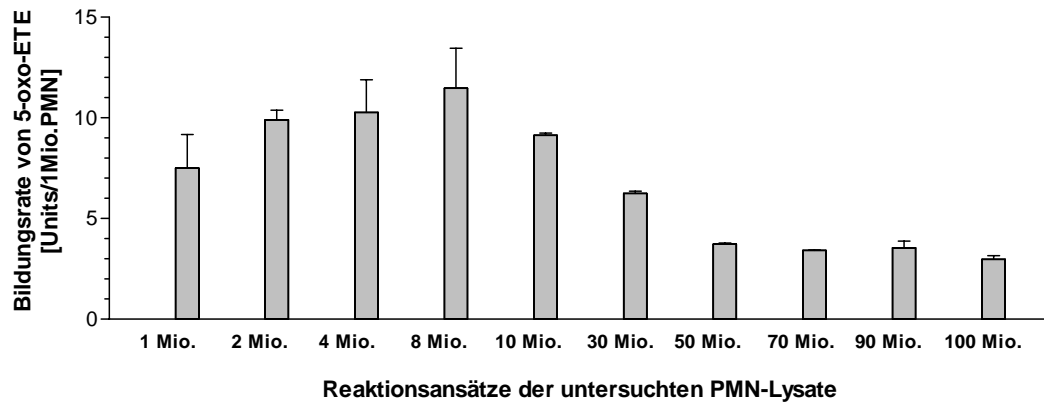


Abb. 17: Bildungsrate von 5-oxo-ETE. Aus der Bildungsrate (Substratumsatz) der untersuchten Reaktionsansätze (siehe 4.5.1; vgl. Abb. 16) ergab sich ein Quotient der 5-HEDH-Aktivität bezogen auf 1×10^6 PMN ($n = 2$).

4.5.3 Einfluß der Reaktionszeit auf die 5-HEDH-Aktivität

Die 5-oxo-ETE-Produktion, die in 10 min-Intervallen untersucht wurde, stieg in den ersten 20 min nahezu linear an und ging nach ca. 30 min langsam zurück. Dabei ließ sich eine starke Abnahme der 5-(S/R)-HETE-Konzentration in den Reaktionsansätzen beobachten. Der Verbrauch in den ersten 20 min war entsprechend hoch. Der Verbrauch ließ nach ca. 30 min aber deutlich nach (siehe Abb. 18).

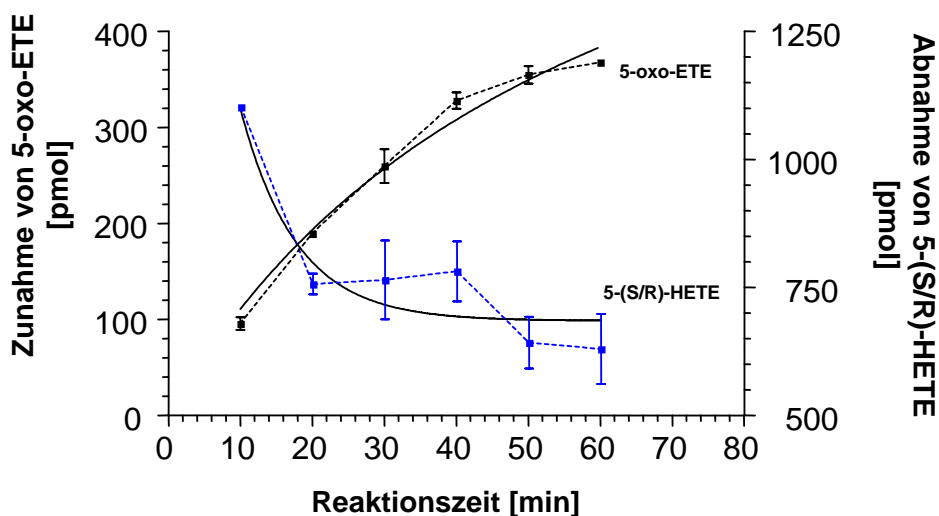


Abb. 18: Einfluß der Reaktionszeit auf die 5-(S/R)-HETE-Abnahme und 5-oxo-ETE-Produktion. Aliquots von 5×10^6 PMN wurden mit $4 \mu\text{M}$ 5-(S/R)-HETE unter Testbedingung inkubiert (siehe 3.5). Der 5-(S/R)-HETE-Verbrauch und die 5-oxo-ETE-Produktion wurden in 10 min-Intervallen ermittelt (jeweils $n = 2$).

4.5.4 Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit (V_{\max})

Die *Michaelis-Menten-Konstante* (K_M) und die *maximale Substratumsatzgeschwindigkeit* (V_{\max}) von 5-HEDH wurde mit Hilfe von PMN-Lysaten aus je 5×10^6 Zellen bei variabler Substratkonzentration ($[S]$: 0 – 10 μM) bestimmt. Die synthetisierte 5-oxo-ETE-Menge wurde dabei quantifiziert und die Substratumsatzgeschwindigkeit (V) berechnet. Die Umsatzgeschwindigkeit ist definiert als die Menge des gebildeten Produkts pro Zeiteinheit. Im vorliegenden Versuch wurde die Menge 5-oxo-ETE in pmol/Sekunde bestimmt.

Aus Abb. 19 ist zu erkennen, daß die Substratumsatzgeschwindigkeit mit steigender 5-(S/R)-HETE-Konzentration einen asymptotischen Verlauf zeigt. Daraus ergaben sich nach Erreichen der Substratlimitierung, ein V_{\max} -Wert von ca. 0,2 pmol/s. Substratkonzentrationen von 0 – 2 μM 5-(S/R)-HETE führten zu einer nahezu linearen Substratumsatzgeschwindigkeit. Der K_M -Wert, definiert als die Reaktionsgeschwindigkeit bei der die Substratumsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist, betrug nach der vorliegenden Substratsättigungskurve ca. 1,3 μM . Für eine genauere Bestimmung der V_{\max} - und K_M -Werte wurde die Umsatzgeschwindigkeit

keit im Verhältnis zur Substratkonzentration doppelt-reziprok nach *Lineweaver-Burk* dargestellt.

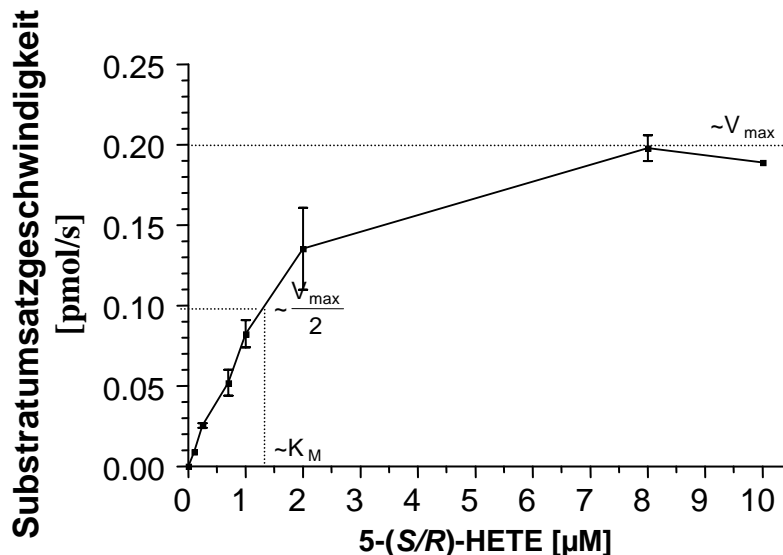


Abb. 19: Reaktionskinetik von 5-HEDH nach Michaelis-Menten. Zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von 5-HEDH wurden Zellysate (5×10^6 PMN) mit 5-(S/R)-HETE in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 10 μM) untersucht ($n = 2$). Die ermittelte Enzymaktivität wurde zur Bestimmung des K_M -Wertes und der Substratumsatzgeschwindigkeit (V), die als picomol 5-oxo-EETE pro Sekunde (s) definiert war, herangezogen.

Aus der linearen Regression ließ sich der V_{max} -Wert mit ca. 0,4 pmol/s und der K_M -Wert mit ca. 4,4 μM ermitteln (siehe Abb. 20a). Eine lineare Abweichung wird bei der Enzymkinetik der *Lineweaver-Burk-Berechnung* nicht berücksichtigt. Diese wird hingegen bei der Umsetzung nach *Eadie-Hofstee* einbezogen. Die Werte für V_{max} und K_M betragen demnach 0,25 pmol/s und 2,4 μM (siehe Abb. 20b). Zur Darstellung wurden die ermittelten V_{max} - und K_M -Werte in Tab. 12 aufgelistet.

Gleichung zur Berechnung von V_{max} und K_M nach *Lineweaver-Burk*:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Gleichung zur Berechnung von V_{\max} und K_M nach *Eadie-Hofstee*:

$$V = -K_M \times \left(\frac{V}{[S]} \right) + V_{\max}$$

V = Substratumsatzgeschwindigkeit; 5-oxo-ETE [pmol/s]
 V_{\max} = maximale Substratumsatzgeschwindigkeit; 5-oxo-ETE [pmol/s]
 K_M = Michaelis-Menten-Konstante; [μM]
 $[S]$ = Substratkonzentration; 5-(S/R)-HETE [μM]

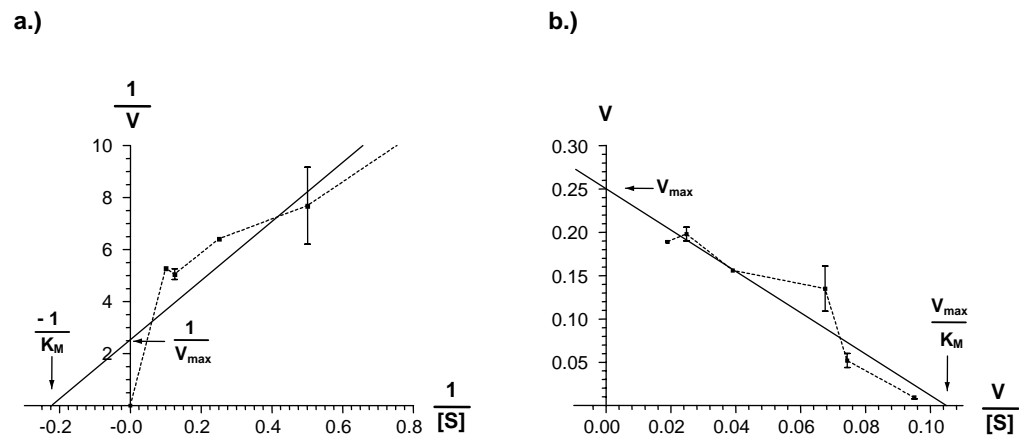


Abb. 20: Reaktionskinetik der 5-HEDH nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee. Zur Ermittlung der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) und der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) wurden Zellysate (5×10^6 PMN) mit 5-(S/R)-HETE in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 10 μM) untersucht ($n = 2$). Die V_{\max} - und K_M -Werte betragen in der doppelt-reziproken Darstellung nach *Lineweaver-Burk* (a.) ca. 0,4 pmol/s und 4,4 μM . Mit Berücksichtigung der linearen Abweichung nach *Eadie-Hofstee* (b.) wurden hingegen Werte von ca. 0,25 pmol/s und 2,4 μM bestimmt.

Tab. 12: V_{\max} - und K_M -Werte der 5-HEDH nach unterschiedlichen Ermittlungsmethoden

	Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee
V_{\max}	0,2 pmol/s	0,4 pmol/s	0,25 pmol/s
K_M	1,3 μM	4,4 μM	2,4 μM

4.6 Ammoniumsulfatfällung

Durch einen ansteigenden Ammoniumsulfat-Gehalt ließ sich die 5-HEDH aus einem Proteingemisch von 10 ml PMN-Lysat (100 x 10⁶ PMN/ml) fällen. Das Enzym wurde anschließend in Testpuffer resuspendiert. Die abnehmende Enzymaktivität vermittelte einen Einblick über die Güte der durchgeführten Fällung (siehe Abb. 21).

Die höchste Abnahme der 5-HEDH-Aktivität wurde in den PMN-Überständen mit einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung von 50 – 58,1 % festgestellt. Durch Erhöhung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration ließen sich sukzessiv Proteine, einschließlich der 5-HEDH, aus dem Zellüberstand fällen. Die Fällung wurde solange fortgesetzt, bis im PMN-Überstand keine 5-HEDH-Aktivität mehr nachzuweisen war. Bei einem Sättigungsgrad von 68 % Ammoniumsulfat fiel die Enzymaktivität schließlich unter der Nachweisgrenze. Während die 5-HEDH-Aktivität im Überstand stetig abnahm, nahm die Produktionsfähigkeit für 5-oxo-ETE in den Proteinsedimenten konstant zu. Die maximale 5-oxo-ETE-Bildung wurde bei 54,2 % Ammoniumsulfat ermittelt. Eine Übersicht der Wiederfindungsraten der 5-HEDH und der Aktivitätsabnahme hinsichtlich des PMN-Überstandes ist in Tab. 13 dargestellt.

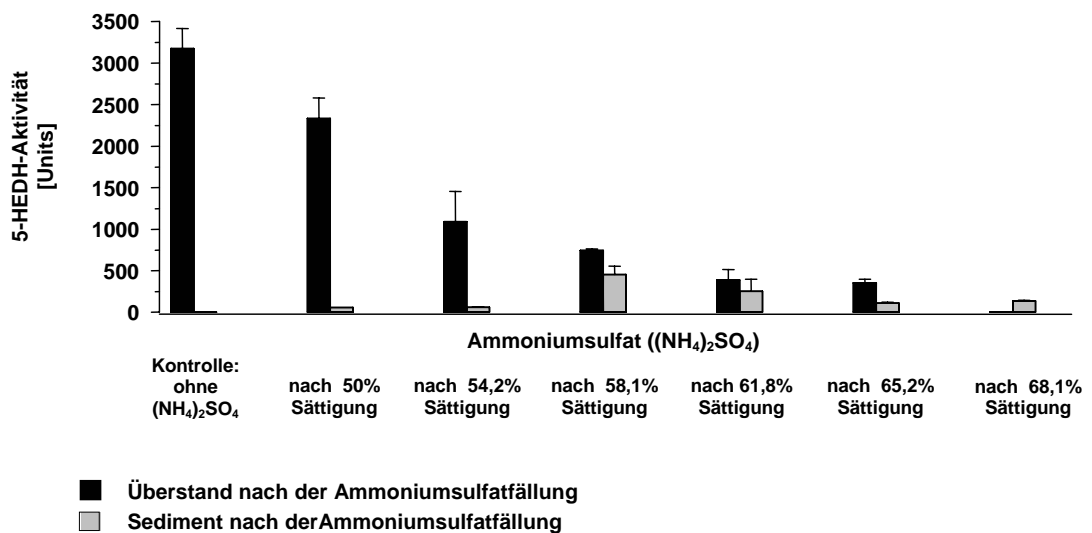


Abb. 21: Ammoniumsulfatfällung der 5-HEDH. Die Fällung der 5-HEDH aus 10 ml PMN-Lysat (100×10^6 PMN/ml) erfolgte durch tropfenweise Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (0 – 68,1 %). Anschließend wurde die Enzymaktivität in 30 μl PMN-Überstand bzw. Proteinsediment des jeweiligen Sättigungsschrittes bestimmt ($n = 2$).

Tab. 13: 5-HEDH-Aktivität von PMN-Überständen und -Sedimenten nach sukzessiver Ammoniumsulfatfällung.

Sättigungsgrad des PMN-Überstandes	5-HEDH-Aktivität im		5-HEDH-Aktivität im PMN-Überstand bezüglich der Ausgangsaktivität
	Sediment	Überstand	
50,0 %	1,8 %	73,4 %	-26,6 %
54,2 %	19,3 %	34,4 %	-65,6 %
58,1 %	14,3 %	23,5 %	-76,5 %
61,8 %	8,0 %	12,5 %	-87,5 %
65,2 %	3,5 %	11,0 %	-89,0 %
68,1 %	4,2 %	0,0 %	-100,0 %

4.7 Partielle 5-HEDH-Aufreinigung mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.7.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die 5-HEDH-Aufreinigung an einer hydrophoben Interaktionssäule (HIC-Säule) wurde durchgeführt, nachdem das Löslichkeitsverhalten der 5-HEDH bekannt war. Aus einem mit 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gesättigtem PMN-Lysat ließen sich nicht definierbare Bestandteile nach der Chromatographie-Bedingung Nr. 1 (siehe Tab. 3) isolieren. Die fraktionierten Komponenten wiesen im Enzymstandardtest (siehe 3.5) keine enzymatische Aktivität auf (*Chromatogramm nicht dargestellt*). Daher wurde die HIC-Säule für die weitere Aufreinigung der 5-HEDH nicht mehr eingesetzt.

4.7.2 Schwache Anionenaustauschchromatographie (DEAE-P-Säule)

Partielle Aufreinigung des PMN-Lysates

Die erste Aufreinigung der 5-HEDH erfolgte an einer schwachen HPLC-Anionenaustauschersäule (BIOSEP DEAE-P) und wurde unter Chromatographiebedingung Nr. 2 (siehe Tab. 4) durchgeführt. Der Erfolg der Auftrennung von 2 ml PMN-Lysat (100×10^6 PMN/ml) wurde anhand der 5-HEDH-Aktivität in zwei Elutionsbereichen bestimmt (siehe Abb. 22). Ein Großteil der Enzymaktivität (ca. 83,1 %) wurde in den DEAE-P-HPLC-Fractionen Nr. 12 – 18, zwischen 36,5 min und 44 min Retentionszeit und einem Salzgehalt des Elutionspuffers von 330 – 400 mM NaCl nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden

16,9 % nach einer Retentionszeit von 23 – 28 min (Fraktionen Nr. 7 – 9, 200 mM NaCl) eluiert. Restliche DEAE-P-HPLC-Fraktionen wiesen keine enzymatische Aktivität auf.

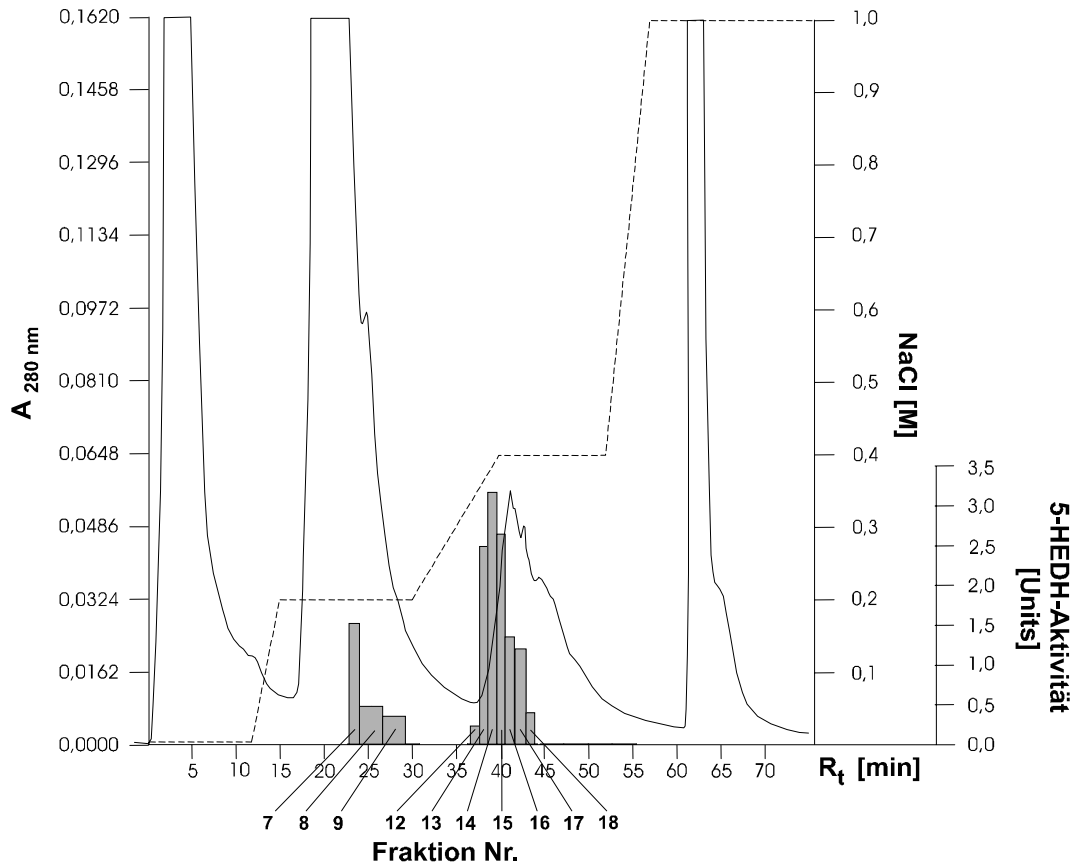


Abb. 22: Anionenaustauschchromatographie der PMN-Lysate. 2 ml PMN-Lysat (100×10^6 PMN/ml) wurden an einer Anionenaustauschersäule (DEAE-P) unter der Chromatographiebedingung Nr. 2 (siehe Tab. 4) aufgetrennt. Zur Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität wurden 200 μ l Fraktionsvolumen im Standardtest ($n = 1$) untersucht. Die 5-HEDH-Aktivität, die als Enzymeinheit (Unit: pmol 5-oxo-ETE/min) definiert worden war, wurde mit einer R_t von 23 – 28 min (Fraktion Nr. 7 – 9) und 36,5 – 44 min (Fraktion Nr. 12 – 18) nachgewiesen. $A_{280\text{nm}}$: Absorption bei 280 nm, R_t : Retentionszeit.

Der Reinheitsgrad der 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionen (Nr. 12 – 18; R_t : 36,5 – 44 min) und das Molekulargewicht der darin enthaltenen Proteine wurden nach einer modifizierten Elektrophoresemethode von Schagger und v. Jagow (1987; siehe 3.11) von jeweils 3 μ l Fraktionsvolumen bestimmt. Das Protein-Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines Proteinstandards, der SDS-6H (Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen), bestimmt.

Abb. 23 stellt die elektrophoretische Auftrennung der DEAE-P-HPLC-Fraktionen der Retentionszeiten von 35,5 – 45 min dar. Durch eine Tricine-SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einer anschließenden Silbernitratfärbung konnten geringste Proteinmengen der aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen (Nr. 12 – 18; R_t : 36,5 – 44 min) sichtbar gemacht werden. Besonders die DEAE-P-Fraktion 14 (R_t : 38,5 – 39,5 min), in der zwar die höchste 5-HEDH-Aktivität nachgewiesen worden war, zeigte eine Vielzahl an unbekanntem Proteinbanden. Proteinbanden, die einem Molekulargewicht von ca. 29, 45 sowie 97,4 kDa entsprachen, konnten auf das Vorhandensein der 5-HEDH zurückgeführt werden.

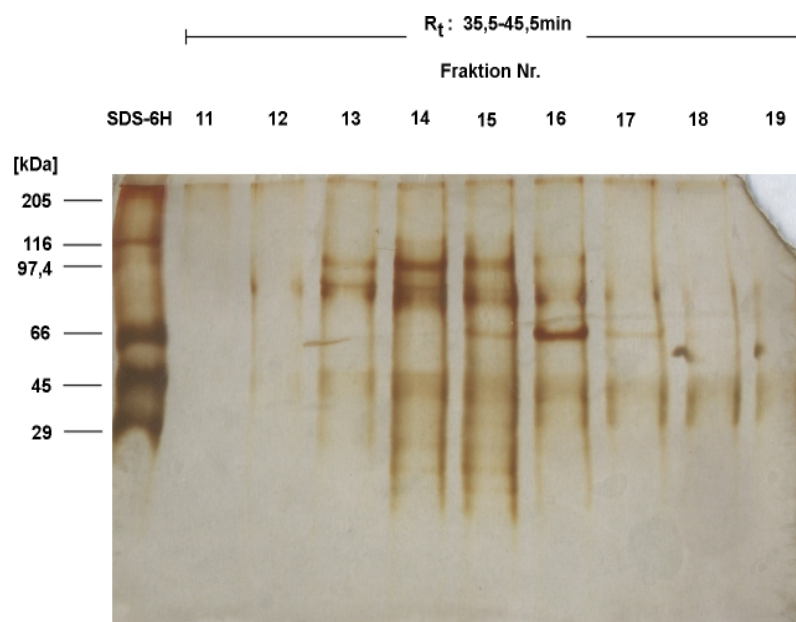


Abb. 23: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der DEAE-P-HPLC-Fractionen. 3 μ l DEAE-P-HPLC-Fractionen, die in Zeitintervallen von 35,5 – 45 min eluiert worden waren (siehe Abb. 22), ließen sich elektrophoretisch auftrennen und mit Silbernitrat anfärben (siehe 3.11). 5-HEDH-aktive Fraktionen (Nr. 12 – 18) wiesen Retentionszeiten (R_t) von 36,5 – 44 min auf. 200 ng SDS-6H (Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen) diente als Proteinstandard mit bekanntem Molekulargewicht.

Partielle Aufreinigung des solubilisierten Mikrosomenüberstandes

Entsprechend dem PMN-Lysat wurden 2 ml solubilierte Mikrosomenüberstände aufgetrennt und auf ihre Fähigkeit zur 5-oxo-ETE-Bildung untersucht. Die Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität ergab, daß die DEAE-P-HPLC-Fractionen Nr. 24 – 30 (R_t : 40 – 47 min, 400 mM NaCl) 5-HEDH enthielten (siehe Abb. 24). Die DEAE-P-Fractionen Nr. 26 und Nr. 27, in der die höchste 5-oxo-ETE-Produktion nachgewiesen wurde und in Zeitintervallen von 41,5 – 44,3 min eluiert worden waren, wiesen diesbezüglich ca. 27,3 % und 27,5 % 5-HEDH-Aktivität auf. Im Vergleich zu Chromatographieverläufen der PMN-Überstände

wurde im Elutionsbereich der 5-HEDH eine ausgeprägte UV-Absorption detektiert. Außerdem wurde ein weiterer Elutionspeak nach ca. 60 min ermittelt (vgl. Abb. 22), in dem keine 5-HEDH-Aktivität nachzuweisen war.

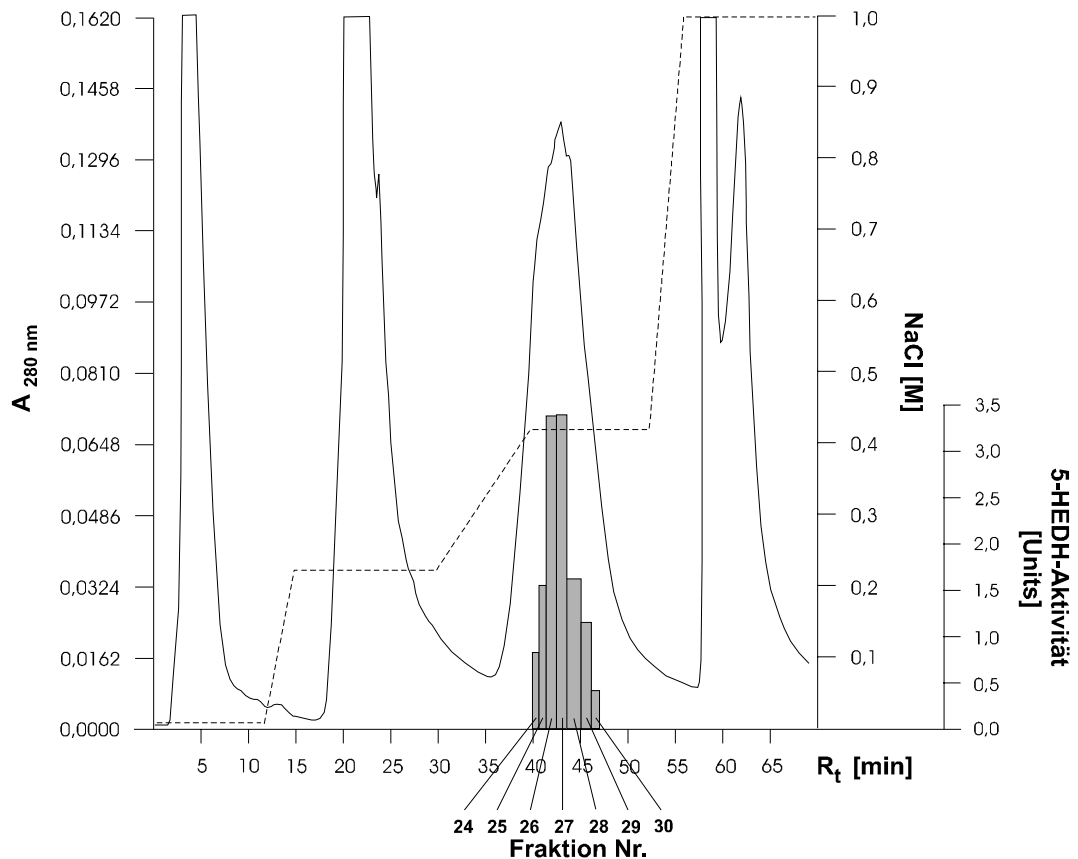


Abb. 24: Anionenaustauschchromatographie eines solubilisierten Mikrosomenüberstandes. Die Aufreinigung der 5-HEDH aus 2 ml Mikrosomenüberstand erfolgte an einer Anionenaustauschersäule (DEAE-P) unter Chromatographiebedingung Nr. 2 (siehe Tab. 4). Die Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität erfolgte dabei mit 200 μ l Fraktionsvolumen nach dem Enzymstandardtest ($n = 1$). Die Enzymaktivität wurde in den Fraktionen Nr. 24 – 30 (■ Fläche) nachgewiesen. Diese war als Enzymeinheit (Unit) definiert und entsprach der pro Minute gebildeten 5-oxo-ETE-Menge; $A_{280\text{nm}}$: Absorption bei 280 nm, R_t : Retentionszeit

Die 5-HEDH-aktiven (Nr. 24 – 30) DEAE-P-HPLC-Fraktionen (Nr. 21 – 23 und 31) wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 25). Dabei ließen sich im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel Proteinbanden von 29 kDa und 45 kDa (Fraktionen Nr. 25 – 28) sowie Banden aus einem Molekulargewicht von 97,4 kDa (Fraktionen Nr. 24 – 29) bestimmen. Die Intensität der Proteinbanden korrelierte mit der zuvor ermittelten Stärke der Enzymaktivität in den HPLC-

Fractionen. Weiterhin ließen sich zusätzliche Proteine, die kleiner als 29 kDa waren, in den DEAE-P-HPLC-Fractionen Nr. 24 – 31 nachweisen (vgl. Abb. 23).

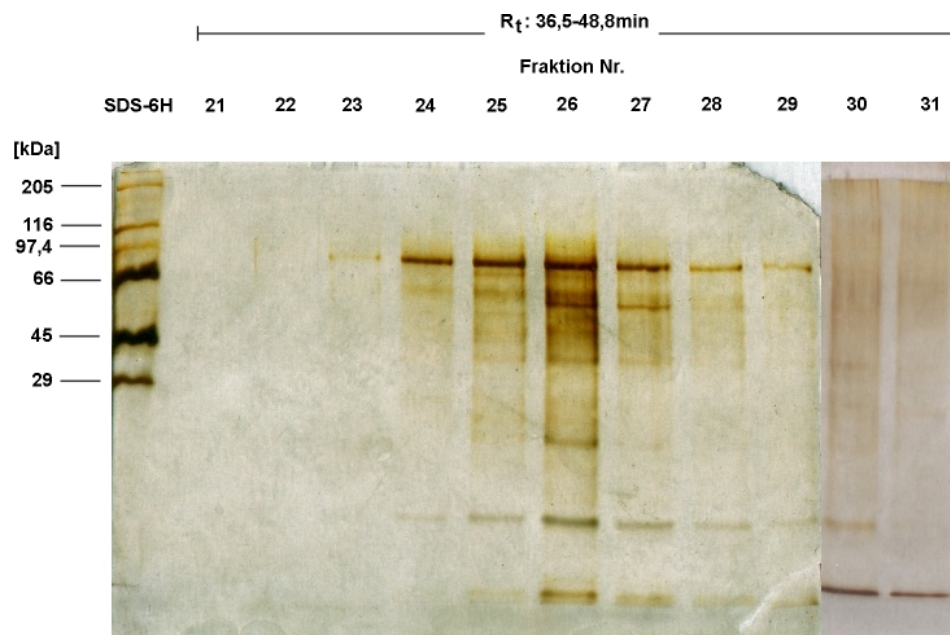


Abb. 25: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der DEAE-P-HPLC-Fractionen. DEAE-P-HPLC-Fractionen (3 μ l), die in Zeitintervallen von 36 – 48,8 min eluierten (siehe Abb. 24), wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silbernitratlösung gefärbt (siehe 3.11). Als Größenmarker wurden 200 ng SDS-6H (Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen) verwendet. 5-HEDH-haltige DEAE-P-HPLC-Fractionen (Nr. 24 – 30) wurden mit Retentionszeiten (R_t) von 40 – 47 min eluiert.

4.7.3 HPLC- μ -Separation an einer starken Anionenaustauschersäule (Mini-Q-Säule)

Aufreinigungsschema Nr. 1:

Chromatographie der 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen

5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen wurden im nachfolgenden Reinigungsprozeß an einer starken Anionenaustauschersäule (Mini-Q-Säule) aufgetrennt. Obwohl die Mischprobe aus zwölf 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Einzelfractionen bestand (vgl. Parallelauftrennung Abb. 22), ließen sich nach der Mini-Q-Chromatographie nur noch maximal 3,2 % der Ausgangsaktivität wiederfinden (R_t : 20 – 25 min). Allein 1,6 % wurden in der Mini-Q-HPLC-Fraktion Nr. 26 ermittelt. Die verbliebenen 1,6 % verteilten sich auf die Fraktion 27 und 28 (siehe Abb. 26) zu gleichen Teilen (je 0,8 %). Ob es sich dabei tatsächlich um 5-

HEDH-Proteine handelte, wurde erneut anhand einer Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Silbernitratfärbung untersucht.

Abb. 27 zeigt, daß in den 5-HEDH-aktiven Mini-Q-Fractionen (Nr. 27 und Nr. 28) keine Proteine angefärbt worden war. Lediglich in Fraktion Nr. 26, in der die höchste 5-oxo-ETE-Produktion nachgewiesen wurde, ließen sich Proteine mit 24 kDa- und 66 kDa-Größe schwach anfärben. Proteine dieser Molekulargrößen wurden ebenso in Mini-Q-HPLC-Fractionen Nr. 24 und Nr. 25 bestimmt. Diese wiesen aber im Enzymstandardtest (siehe 3.5) keine 5-HEDH-Aktivität auf.

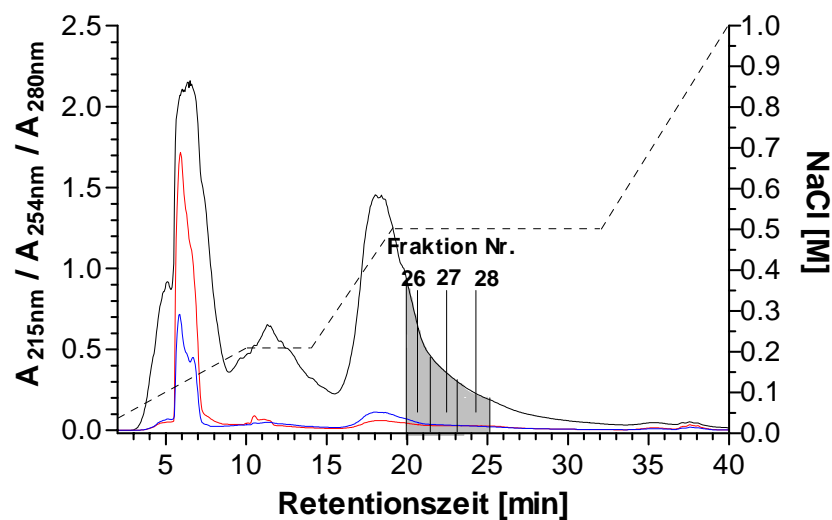


Abb. 26: Mini-Q-HPLC- μ -Separation der 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen. Ein Gemisch aus zwölf aktiven DEAE-P-Fractionen (Paralleltrennung; Abb. 22) wurde eingengt, entsalzt und an einer Mini-Q-Säule unter Chromatographiebedingung Nr. 3 (siehe Tab. 5) aufgetrennt. In den Mini-Q-HPLC-Fractionen Nr. 26 – 28 ließen sich nach Untersuchung der 5-HEDH-Aktivität nur noch maximal 3,2 % der 5-HEDH-Ausgangsaktivität (■ Fläche; n = 1) nachweisen.

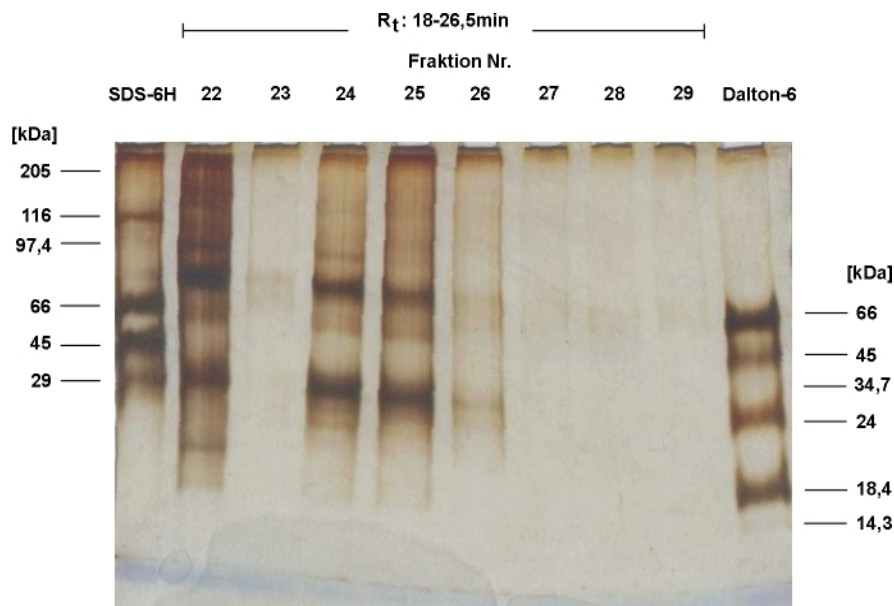


Abb. 27: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Mini-Q-HPLC-Fractionen. Mini-Q-HPLC-Fractionen, die in Zeitintervallen von 18 – 27 min eluiert worden waren, wurden nach der Vorsäulenextraktion lyophilisiert, in 50 μ l Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und mit 10 μ l Volumen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.11). Die Färbung erfolgte mit Silbernitrat und als Größenmarker dienten SDS-6H und Dalton-6. Mini-Q-HPLC-Fractionen Nr. 26 – 28 (R_t : 20 – 25 min) wiesen im Enzymstandardtest 5-HEDH-Aktivität auf.

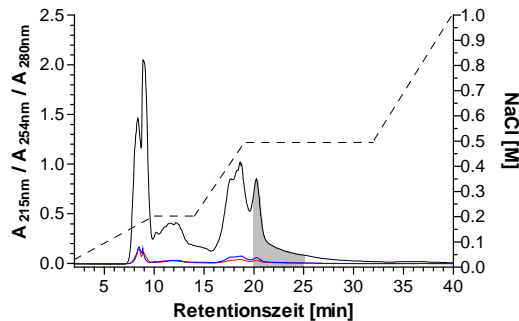
Aufreinigungsschema Nr. 2:

Chromatographieverhalten von drei nacheinander eluierten, 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemischen

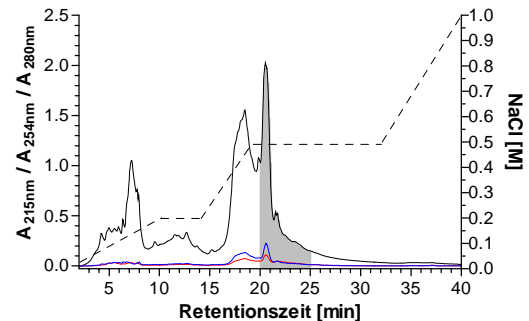
Ein unterschiedliches Chromatogrammmuster drei nacheinander eluierter, 5-HEDH-aktiver DEAE-P-HPLC-Gemische (**Gemisch a, b, c**) ließ sich an der Mini-Q-Säule nachweisen. Dabei zeigte **Gemisch b** vor der HPLC- μ -Separation die höchste und **Gemisch c** die geringste 5-HEDH-Aktivität. Im Vergleich dazu wies **Gemisch a** eine mittelstarke 5-HEDH-Aktivität auf. Das Verhältnis zwischen nachgewiesener Enzymaktivität und Elutionsprofil ist in Abb. 28a-c dargestellt.

Der Elutionsbereich von 5-HEDH, der in einer Parallelauftrennung (vgl. Abb. 26) zwischen 20 min und 25 min bestimmt worden war (siehe ■ Fläche), wies in den drei durchgeführten Chromatographieläufen unterschiedlich starke UV-Absorptionen auf. **Gemisch b**, das die höchste 5-oxo-ETE-Bildung aufwies, zeigte in dem grau unterlegten Elutionsbereich nahezu eine Verdoppelung der Absorption bei 215 nm. Die **Gemische a** und **c** wiesen bei der selben Retentionszeit verhältnismäßig geringe Absorptionen auf. Außerdem ließ sich im **Gemisch b**

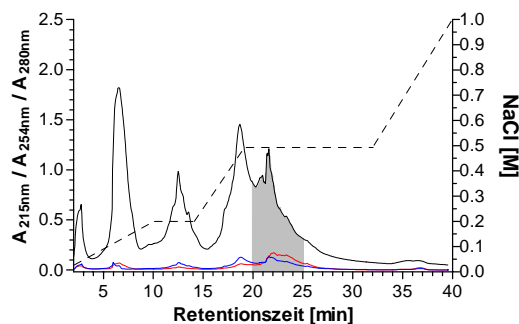
eine ausgeprägte UV-Absorption zwischen 6 – 9 min und 16 - 21 min Retentionszeit feststellen. Die Stärke der UV-Absorption korrelierte aber nicht mit der zuvor ermittelten 5-HEDH-Aktivität.



Gemisch a



Gemisch b



Gemisch c

Abb. 28: Mini-Q-HPLC- μ -Separation von drei nacheinander eluierten, 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemische. Die Untersuchung des Elutionsprofils von drei nacheinander aufgetrennten, 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Gemischen a, b, c (R_t : 36,5 – 43,5 min, siehe Abb. 22) erfolgte unter gleichbleibenden Chromatographiebedingungen (siehe Tab. 5). Gemisch b zeigte vor der Mini-Q-Trennung die höchste und Gemisch c die geringste 5-HEDH-Aktivität. Die graue Markierung (■ Fläche; R_t : 20 - 25 min) stellt den Elutionsbereich der 5-HEDH einer parallelen Chromatographie dar (vgl. Abb. 26).

Nach der Bestimmung der hohen 5-HEDH-Aktivität und nachdem eine ausgeprägte UV-Absorption während der Chromatographie ($R_t = 20 - 25$ min) festgestellt worden war, wurden Mini-Q-HPLC-Faktionen des **Gemisches b** ($R_t = 16 - 27$ min) mit Hilfe des Phast Gel-System (siehe 3.11) elektrophoretisch untersucht. Abb. 29 zeigt, daß im 5-HEDH-aktiven Elutionsbereich (R_t : 20 – 25 min; vgl. Abb. 26 und Abb. 28b) mehrere Proteinbanden nicht scharf voneinander abgegrenzt anfärbbar waren. Vor allem die Mini-Q-HPLC-Faktionen Nr. 43 – 45 (R_t : 20 – 22 min) wiesen intensiv gefärbte Proteinbanden im Bereich von 18 kDa bis 40 kDa auf. Im Vergleich dazu wiesen enzymatisch nicht-aktive Mini-Q-HPLC-Faktionen (Nr. 36 – 42 und 46 - 48) überwiegend Proteinbanden mit Molekulargewichten von etwa 66 kDa und höher auf.

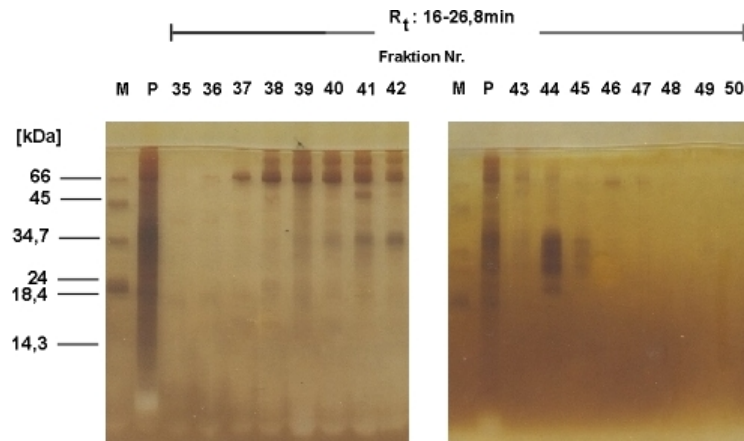


Abb. 29: Phast Gel-Elektrophorese von Mini-Q-HPLC-Fractionen nach Auftrennung eines 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemisches Nach Chromatographie eines 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Gemisches an einer Mini-Q-Säule (siehe Abb. 28b) wurden jeweils 1 μl 5-HEDH-aktive (Nr. 43 – 47) sowie 1 μl nicht-aktive Mini-Q-HPLC-Fractionen (Nr. 35 – 42, Nr. 48 – 50) im Phast Gel *Homogeneous High Density* elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.11). Als Kontrolle diente 1 μl unbehandelte Probe (P) und als Größenmarkierung wurden 100 ng Dalton-6 (M) verwendet.

Eine bessere Auftrennung der Proteinbanden ließ sich im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel erzielen (siehe Abb. 30). Proteine, die zuvor im Phast Gel mit fließenden Übergängen angefärbt worden waren (Mini-Q-Fraktion Nr. 43 – 45 mit $R_f: 20 - 22 \text{ min}$), wiesen nun drei distinktive Proteinbanden mit Molekulargrößen von kleiner als 29 kDa auf (Fraktion Nr. 44). Außerdem ließen sich Proteine, die zuvor mit 66 kDa identifiziert worden waren (vgl. Abb. 29), in den Mini-Q-Fractionen Nr. 45 – 47 ($R_f: 21,3 - 23 \text{ min}$) bei ca. 70 kDa anfärben.

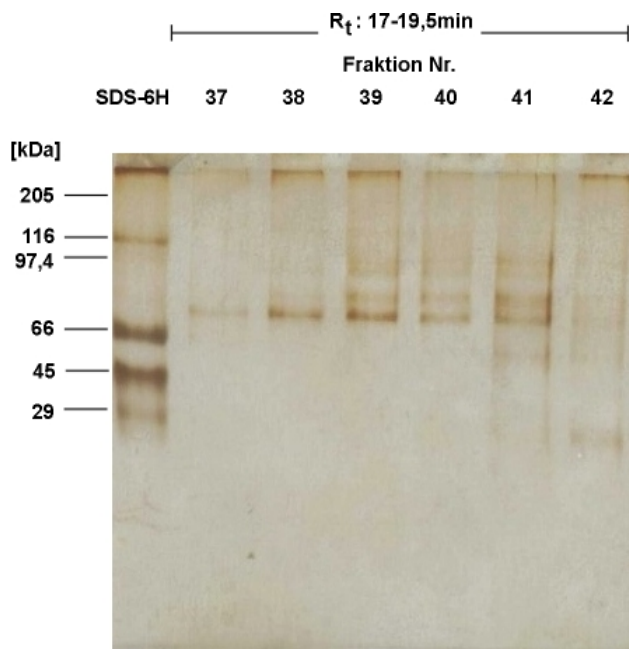
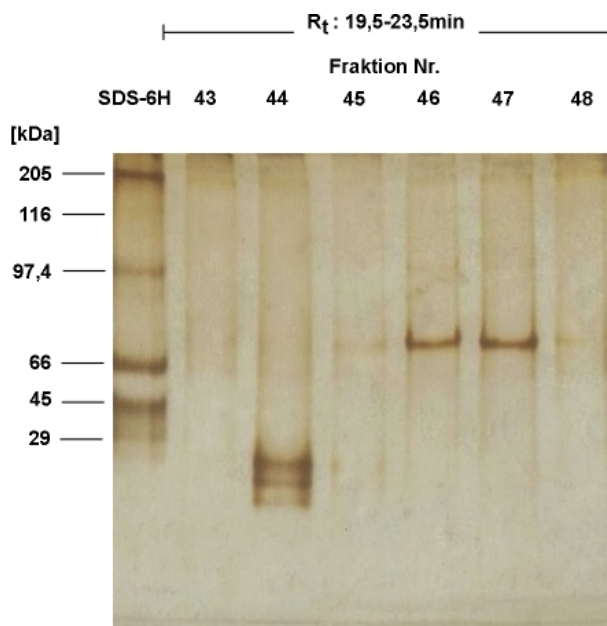


Abb. 30: Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Mini-Q-HPLC-Fractionen nach Auftrennung eines 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemisches. Parallel zu Phast Gel-Separation (siehe Abb. 29) ließen sich Mini-Q-HPLC-Fractionen (3 µl) im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel verbessert auftrennen. Die Mini-Q-HPLC-Fractionen Nr. 37 – 48 stammten aus dem aktiven Elutionsbereich der 5-HEDH (siehe Abb. 28b). Die Größenmarkierung erfolgte mit 300 ng SDS-6H.



4.7.4 HPLC-µ-Separation an einer C₂/C₁₈-Umkehrphasensäule

Aufreinigungsschema Nr. 3:

5-HEDH-aktive Mini-Q-HPLC-Proben (R_t: 20 – 25 min; siehe Abb. 28b), die von einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion stammten (R_t: 39 – 41 min; siehe Abb. 22), ließen sich an eine C₂/C₁₈-Säule weder detektieren noch fraktionieren (*Chromatogramm nicht dargestellt*).

Aufreinigungsschema Nr. 4:

Infolgedessen wurden 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen aus drei Parallelauftrennungen (R_t : 39 – 41 min, siehe Abb. 22) gesammelt und unmittelbar an der C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt.

In Abb. 31 ist zu erkennen, daß sich Komponenten des 5-HEDH-haltigen Fraktionsgemisches mit steigender Acetonitrilmenge eluieren und bei 215 nm Wellenlänge detektieren lassen. Die UV-Absorption war zwischen einer Retentionszeit von 37 – 43 min (53 – 60 % Acetonitril) besonders ausgeprägt. Weiterhin ließ sich anhand der Elutionsprofile nacheinander aufgetrennter DEAE-P-Proben zeigen, daß 5-HEDH zwischen 36 min und 43 min eluiert worden war (*Chromatogramme nicht dargestellt*). Die C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen mit einer Retentionszeit von 37,5 – 43 min wurden daraufhin im Phast Gel-System (siehe 3.11) elektrophoretisch aufgetrennt.

Abb. 32 zeigt, daß sich ein breites Spektrum an Proteinen zwischen 18,4 kDa und 66 kDa anfärben ließ. Dabei wurden in den C_2/C_{18} -Fractionen Nr. 42 – 46 (R_t : 39,5 – 43 min) überwiegend Proteine mit 34 kDa-Größe identifiziert. Ergänzend dazu wies C_2/C_{18} -Fraktion Nr. 42 noch eine gefärbte Bande um 66 kDa auf.

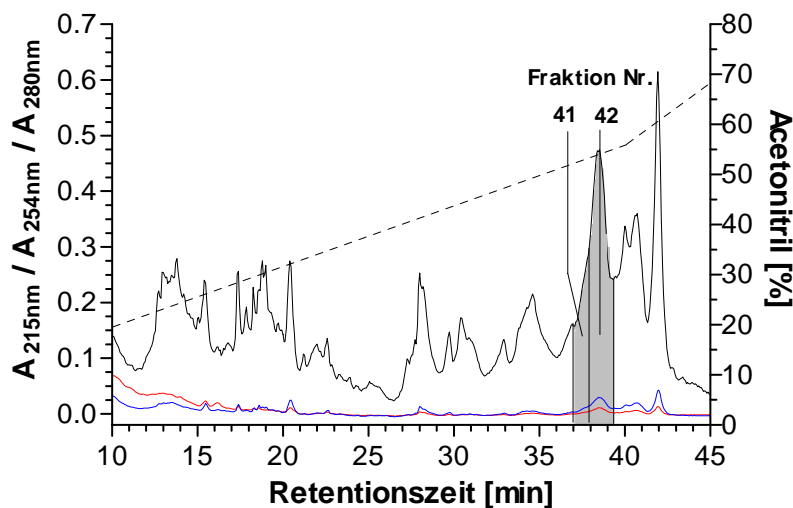


Abb. 31: C_2/C_{18} -HPLC- μ -Separation eines 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemisches. DEAE-P-HPLC-Fractionen (R_t : 39 – 41 min), die aus drei Paralleltrennungen stammten, wurden gemischt und an einer C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt (siehe Tab. 6, Nr. 4a). Separierte C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen (Nr. 41 – 46 mit R_t : 37,5 – 43 min) wurden anschließend im Phast Gel elektrophoretisch untersucht (■ Fläche, siehe Abb. 32). Die restlichen Proben aus HPLC-Fractionen Nr. 41 und Nr. 42 wurden zur weiteren Aufreinigung gesammelt, mit Lys-C-Endoprotease verdaut und an der C_2/C_{18} -Säule erneut separiert (siehe Abb. 33).

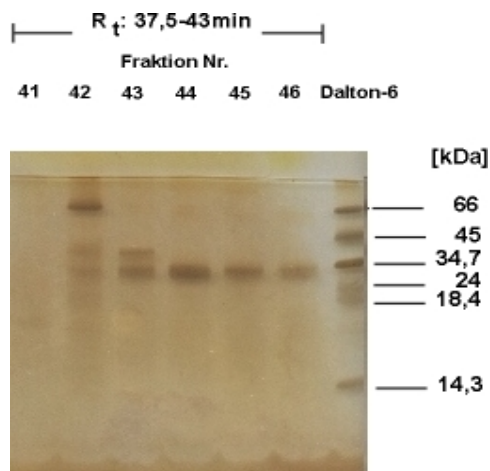


Abb. 32: Phast Gel-Elektrophorese von C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen nach Auftrennung eines 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionsgemisches. 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen (R_t: 39 – 41 min), die aus drei Paralleltrennungen stammten, wurden gemischt und an einer C₂/C₁₈-Umkehrphasensäule aufgetrennt (siehe Abb. 31). Die partiell aufgereinigten C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen (Nr. 41 – 46; R_t: 37,5 – 43 min) wurden im SDS-Polyacrylamidgel (Phast Gel) elektrophoretisch untersucht und mit Silbernitrat gefärbt (siehe 3.11). Als Größenmarker dienten 100 ng Dalton-6.

Für weitere Untersuchungen wurden die C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen Nr. 41 und Nr. 42 (R_t: 37,5-39,5 min; siehe Abb. 31) gemischt, mit Lys C Endoprotease abgebaut und erneut an einer C₂/C₁₈-Säule aufgetrennt (siehe Tab. 6, Nr. 4a). Da die eingesetzten HPLC-Fractionen nur kleine Volumina enthielten, ließen sich bei der nachfolgenden C₂/C₁₈-Chromatographie nur geringe Peptidmengen nachweisen.

Der in Abb. 33 dargestellte Peak (siehe Pfeil) wurde im weiteren Verlauf der Untersuchung einem Edman-Abbau (siehe 3.12) unterzogen. Dabei wurde die aminoternale Sequenz „QFGAQANVIGWIQT“ ermittelt. Der Abgleich mit der FASTA-Proteindatenbank ergab, daß die Aminosäuresequenz bis zu 93 % Identität mit humanem α-Aktinin-1 zeigte. Im Vergleich zum Originalprotein belegt das ermittelte Peptidfragment die Positionen 634 bis 648 des α-Aktinin-1. Zur Ermittlung der Einzelbuchstaben-Code wurde die „Aminosäuretabelle“ von Alberts herangezogen (*Molecular Biology Of The Cell, 2nd Edition, Garland Publishing, Inc. N.Y. & London; siehe Anhang*).

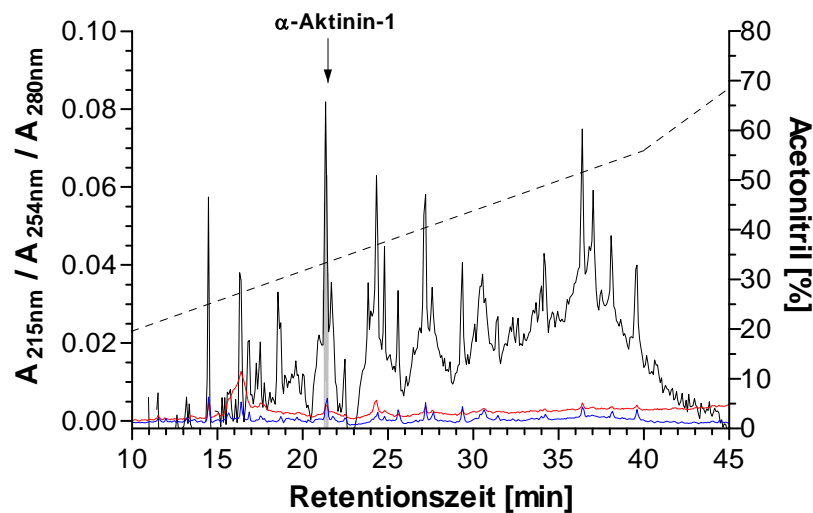


Abb. 33: C_2/C_{18} -Chromatographie einer partiell aufgereinigten C_2/C_{18} -HPLC-Fraktion nach dem Verdau mit Endoprotease Lys-C. Partiiell aufgereinigte C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen (Nr. 41 und 42, R_t : 37,5 – 39,5 min; siehe Abb. 31) wurden nach dem Lys-C-Verdau erneut an einer C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt (siehe Tab. 6, Nr. 4a). Die C_2/C_{18} -HPLC-Fraktion, die zwischen 21,5 min und 22 min eluierte, wurde dann dem Edman-Abbau unterzogen. Das nachgewiesene Peptidfragment ließ sich mit Hilfe der FASTA-Proteindatenbank als α -Aktinin-1 identifizieren (siehe Pfeil).

Aufreinigungsschema Nr. 5:

Für eine weitere 5-HEDH-Aufreinigung wurden C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen, die aus sechs partiell aufgereinigten, 5-HEDH-aktiven DEAE-P-Fractionen stammten und zuvor separat aufgetrennt worden waren, gemischt (Mischung a', b', c'), enzymatisch verdaut und erneut an einer C_2/C_{18} -Säule aufgetrennt. Danach wurden ausgewählte C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen zur weiteren Untersuchung aminoterminal sequenziert (siehe 3.12).

Abb. 34 stellt eine von sechs repräsentativen C_2/C_{18} -HPLC-Auftrennungen dar. Das Chromatogramm wies, verglichen mit dem aus Abb. 31, eine nahezu doppelte bis dreifache Verstärkung der UV-Absorption (215 nm) bei Retentionszeiten von 37 - 43 min auf. Die einzelnen C_2/C_{18} - μ -HPLC-Fractionen, als Gemische a', b', c' bezeichnet, wurden außerdem vor dem Vermischen und dem Lys-C-Verdau elektrophoretisch untersucht.

Aus Abb. 35 ist zu erkennen, daß die untersuchte C_2/C_{18} -HPLC-Fraktion aus Gemisch a' mehrere Proteine mit Molekulargrößen von 66 kDa bis kleiner als 14,3 kDa enthielt. Im Gegensatz dazu ließen sich in den untersuchten C_2/C_{18} -HPLC-Fractionen aus Gemisch b' und c' nur noch wenige dieser Proteine nachweisen. Stattdessen wurden vermehrt Proteine mit einer Größe von 24 kDa nach-

gewiesen. Nur die untersuchte Fraktion aus Gemisch b' wies eine deutliche Proteinbande größer als 66 kDa auf.

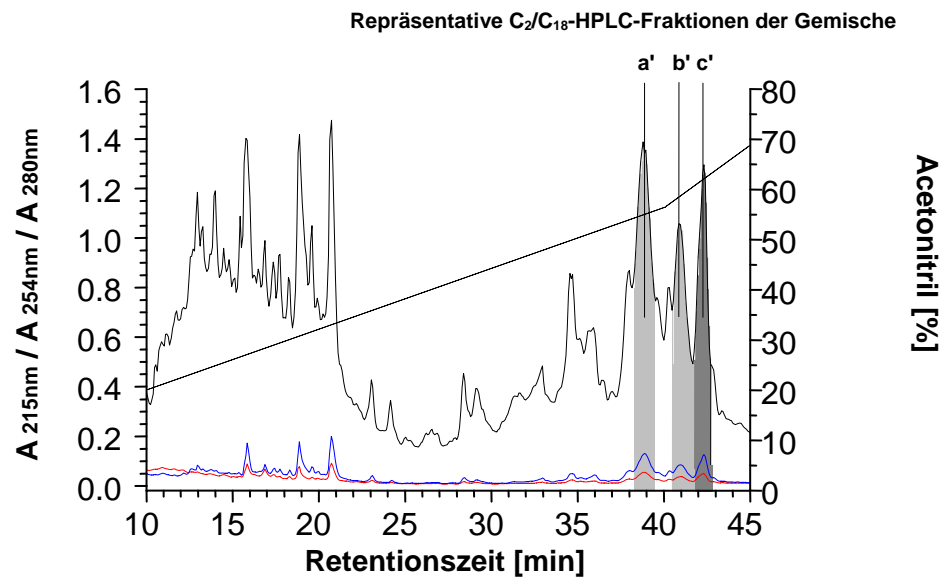


Abb. 34: C₂/C₁₈-HPLC- μ -Separation einer von sechs 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen. Sechs aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen (R_t : 39 – 40,5 min) wurden nacheinander an einer C₂/C₁₈-Säule aufgetrennt (siehe Tab. 6, Nr. 4a). C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die in Zeitintervallen von 38,5 – 42,5 min eluierten, wurden dann in drei Gemische a', b' c' geteilt. Hier ist eine von sechs repräsentativen C₂/C₁₈-Auftrennung vor dem Vermischen dargestellt.

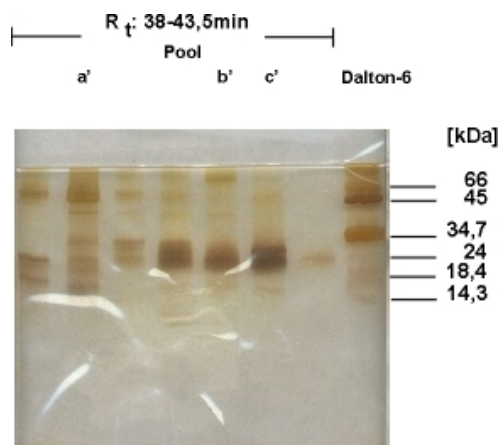


Abb. 35: Phast Gel-Elektrophorese von HPLC-Fractionen nach Auftrennung einer aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion an einer C₂/C₁₈-Säule. Eine von sechs 5-HEDH-aktiven DEAE-P-Fractionen (R_t : 39 – 40,5 min) wurden an einer C₂/C₁₈-Säule aufgetrennt (siehe Abb. 34). Jeweils resultierende C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen (R_t : 38 – 43,5 min) wurden vor dem Vermischen und Lys-C-Endoprotease-Verdau gelelektrophoretisch untersucht. Als Größenmarkierung dienten 100 ng Dalton-6.

Die Gemische a', b' und c' wurden in der weiteren Untersuchung mit Lys-C-Endoprotease enzymatisch abgebaut und erneut an der C₂/C₁₈-HPLC-Säule aufgetrennt. Nach der Auftrennung von Gemisch a' (siehe Abb. 36) wurden drei

ausgewählte C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die mit jeweils einer R_t von 28 min, 32 min und 32,5 min eluierten, dem Edman-Abbau unterzogen (*siehe Pfeile*).

Das erste, identifizierte Peptidfragment (R_t: 28 min) besaß die Aminosäuresequenz „SYELPDGQVKIT“ und konnte nach einer Recherche in der FASTA-Proteindatenbank als *zytoplasmatisches Aktin* nachgewiesen werden. Das Peptidfragment nahm im Originalprotein die Positionen 239 bis 250 ein. Das zweite Peptidfragment (R_t: 32 min) ließ sich aufgrund der geringen Proteinmenge nicht eindeutig analysieren. Es handelte sich möglicherweise um die Aminosäuresequenz „DFWRQQNIDRRE“, die bis zu 66,7 % Identität mit *Cathepsin-E-Precursor* oder *Methionyl-tRNA-Synthase* zeigte. Das dritte Peptidfragment (R_t: 32,5 min) war identisch mit derjenigen des *α-Aktins* und wurde im Originalprotein an den Positionen 331 bis 445 lokalisiert. Da bereits zuvor *α-Aktinin-1* zwischen 21 – 22 min (vergl. Abb. 33) identifiziert worden war, wurden die C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen um 22 min Retentionszeit nicht weiter analysiert.

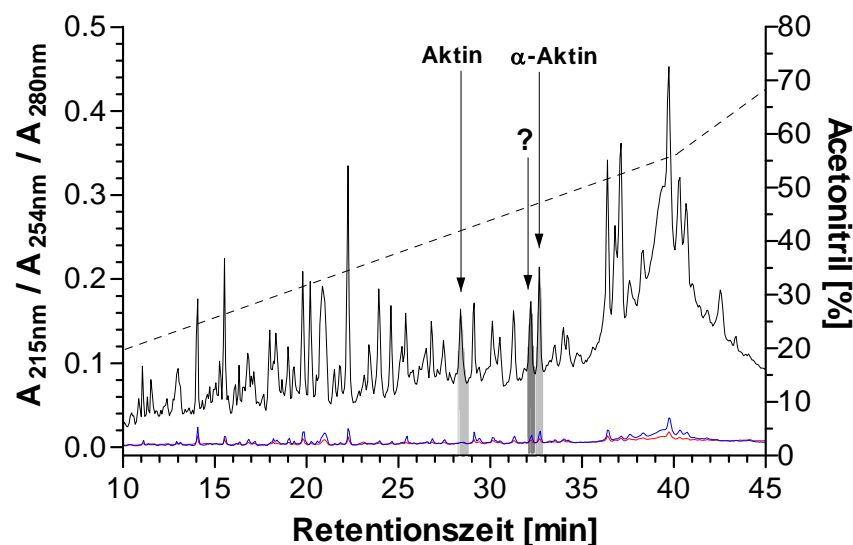


Abb. 36: C₂/C₁₈-HPLC- μ -Separation von C₂/C₁₈-HPLC-Fraktionsgemischen nach dem Lys-C-Endoprotease-Verdau. C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen (R_t: 38,5 – 42,5 min; Abb. 34), die nach Auftrennung von sechs 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen separiert worden waren, wurden vermischt (Gemisch a', b', c'), mit Lys-C-Endoprotease verdaut und erneut an einer C₂/C₁₈-Säule aufgetrennt. Dargestellt ist das Chromatogramm von Gemisch a'. Mit Hilfe des Edman-Abbaus ließen sich *zytoplasmatisches Aktin* und *α-Aktin* bei einer R_t von 28 min und 32,5 min nachweisen. Das dritte Peptidfragment (R_t: 32 min) ließ sich dagegen nicht eindeutig bestimmen. Es zeigte bis zu 66,7 % Identität mit einem *Cathepsin-E-Precursor* oder einer *Methionyl-tRNA-Synthase*.

Ebenso wurde Gemisch c' an der C₂/C₁₈-HPLC-Säule aufgetrennt (siehe Abb. 37). HPLC-Fraktion Nr. 65, die mit einer Retentionszeit von 30,5 min eluierte, wies in der Aminosäuresequenz-Analyse zwei Peptidfragmente auf. Die Hauptsequenz besaß die Aminosäure-Reihenfolge „DSTLIMQLLRDNLTLWTSDQQ“ und wurde als Protein Kinase C Inhibitor Protein-1 (KCIP-1 oder *14-3-3 Protein epsilon*) identifiziert. Es wies bis zu 95 % Identität auf und belegte die Positionen 216 bis 236 im Originalprotein. Die schwächere Nebensequenz hatte dagegen die Aminosäuresequenz „MQPTHPR LGLALNFSVFYY“. Diese wurde als *14-3-3 Protein eta* bestimmt und hatte eine Übereinstimmung mit dem Originalprotein von 87,5 %. Das Peptidfragment ist in den Positionen 165 – 184 lokalisiert.

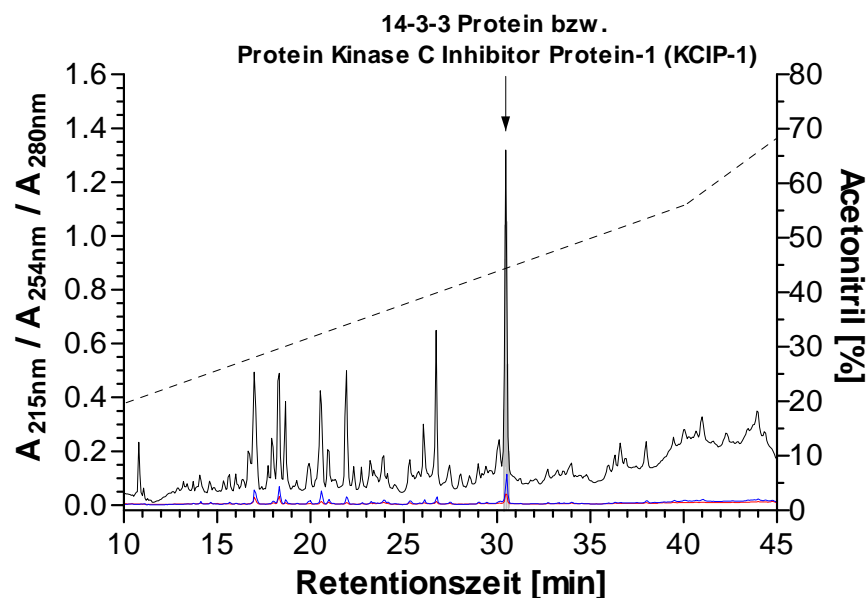


Abb. 37: C₂/C₁₈-HPLC- μ -Separation von C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen nach dem Lys-C-Verdau. Entsprechend der Durchführung aus Abb. 36 wurde Gemisch c' mit Lys-C-Endoprotease verdaut und an der C₂/C₁₈-Säule aufgetrennt. Die C₂/C₁₈-HPLC-Fraktion, die nach 30,5 min eluiert worden war, wurde dem Edman-Abbau unterzogen. Zwei Peptidfragmente ließen sich als *14-3-3 Protein epsilon* bzw. *eta* identifizieren. *14-3-3 Protein* wird auch als *Protein Kinase C Inhibitor Protein-1 (KCIP-1)* bezeichnet.

Da in der Umkehrphasenchromatographie von Gemisch b' keine repräsentativen Proteinpeaks nachzuweisen waren (*Chromatogramm nicht dargestellt*), wurden keine weiteren Aminosäuresequenz-Untersuchungen durchgeführt.

Aufreinigungsschema Nr. 6:

In der nachfolgenden Untersuchung wurden 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen ohne vorheriges Einkonzentrieren und Lys-C-Verdau direkt an einer C₂/C₁₈-HPLC-Säule aufgetrennt. Außerdem wurden im Vergleich zu vorausgegangenem C₂/C₁₈-Chromatographien die untersuchten Proben mit einem flachen Laufpuffergradienten eluiert (siehe Tab. 6, Nr. 4b). Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 38 dargestellt.

C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen Nr. 34 – 38 mit Retentionszeiten von 14,5 – 16,5 min wiesen nach der aminoterminalen Sequenzanalyse die Aminosäure-Reihenfolge „DLQNFLKKEKNEKVIEHMEDL“ auf. Nach einem Abgleich mit der FASTA-Proteindatenbank konnte die Peptidsequenz *Calgranulin B* zugeordnet werden. Diese nahm im Originalprotein die Positionen 44 bis 66 ein und ließ sich unter der durchgeführten Elektrophoresebedingung im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel als ein ca. 55 kDa-großes Protein bestimmen (siehe Abb. 39).

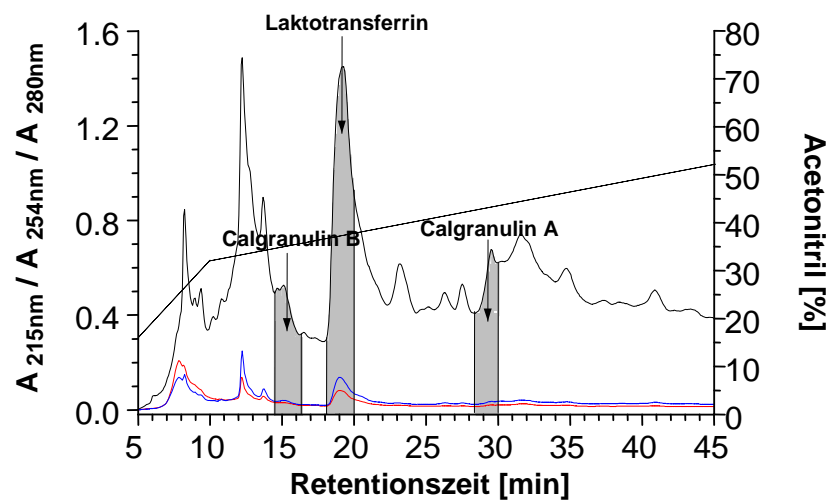


Abb. 38: C₂/C₁₈-HPLC- μ -Separation einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion. Eine 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fraktion wurde mit Hilfe einer C₂/C₁₈-Säule unter der Chromatographiebedingung Nr. 4b (siehe Tab. 6) aufgetrennt. C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die nach 14,5 min, 18 min und 28 min eluierten und dem Edman-Abbau unterzogen wurden, konnten als *Calgranulin B*, *Laktotransferrin* (*Laktoferrin*) und *Calgranulin A* identifiziert werden.

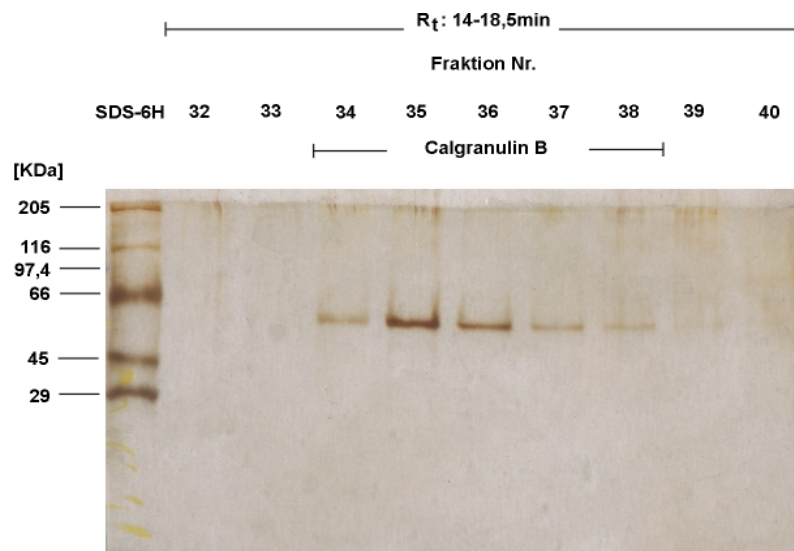


Abb. 39: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Aufreinigung einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion an einer C_2/C_{18} -Säule. 3 μ l C_2/C_{18} -HPLC-Fraktion (Nr. 32 – 40) wurden nach der Umkehrphasenchromatographie einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion (siehe Abb. 38) im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.11). Als Größenmarker dienten 100 ng SDS-6H. *Calgranulin B* ließ sich nach einer aminoterminalen Sequenzanalyse in den C_2/C_{18} -Fraktionen Nr. 34 – 38 (R_t : 14,5 – 16,5 min) als ein ca. 55 kDa-großes Protein identifizieren.

Calgranulin A, das mit *Calgranulin B* einen kalziumbindenden Komplex bildet, wurde mit der Aminosäuresequenz „MLTELEKALNSIVYKLIKGNF“ identifiziert. Die *Calgranulin A*-haltige C_2/C_{18} -HPLC-Fraktion Nr. 57 eluierte mit einer Retentionszeit von 28 min (41,6 % Acetonitril) und zeigte im Elektrophorese-Experiment zwei Proteinbanden unterhalb von 29 kDa (siehe Abb. 40). Da die Probe für die Sequenzanalyse nicht weiter aufgereinigt wurde, ließ sich *Calgranulin A* nur mit einer Molekulargröße von kleiner als 29 kDa zuordnen. Die ermittelte Aminosäuresequenz ist im Originalprotein an Positionen 1 bis 26 lokalisiert.

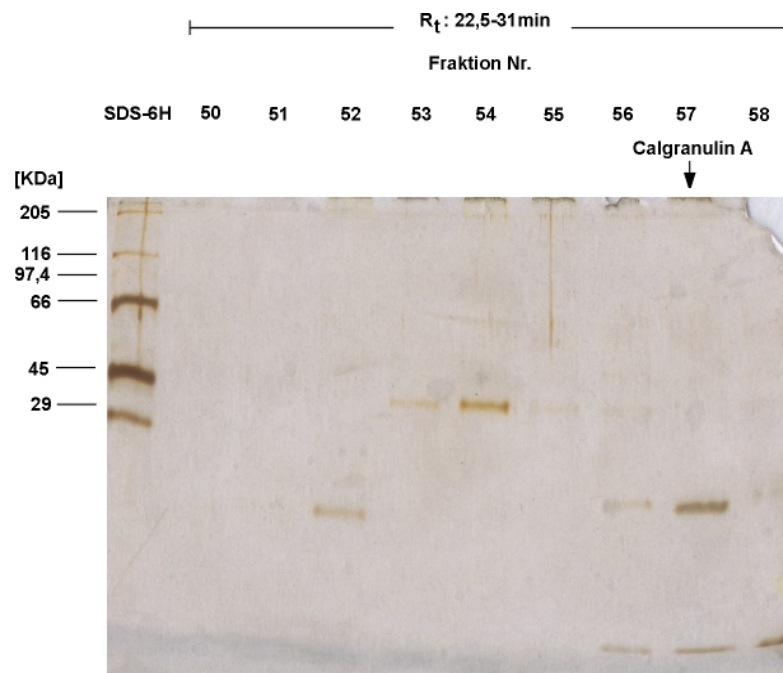


Abb. 40: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Aufreinigung einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion an einer C₂/C₁₈-Säule. C₂/C₁₈- μ -HPLC-Fractionen Nr. 50 – 58 (R_f: 22,5 – 31 min) wurden mit jeweils 3 μ l Volumen im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (vergl. Abb. 39 und Abb. 41). Dabei zeigte Fraktion Nr. 57 (R_f: 28 – 30 min; siehe Abb. 38) nach der Silbernitratfärbung, in der auch *Calgranulin A* mit Hilfe des Edman-Abbaus identifiziert worden war, Proteinbanden mit kleiner als 29 kDa-Größe.

Neben *Calgranulin A* und *B* ließ sich auch *Laktotransferrin (Laktoferrin)* nachweisen. Das Peptidfragment wurde nach 18 min (36,3 – 37,3 % Acetonitril) eluiert und migrierte im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel als ein 80 kDa-Protein (siehe Abb. 41). Die ermittelte Peptidsequenz setzte sich aus den Aminosäuren „GRRRRSVQWCAVSQPEATKCF“ zusammen und stimmte mit der des Originalproteins in den Positionen 19 bis 39 überein.

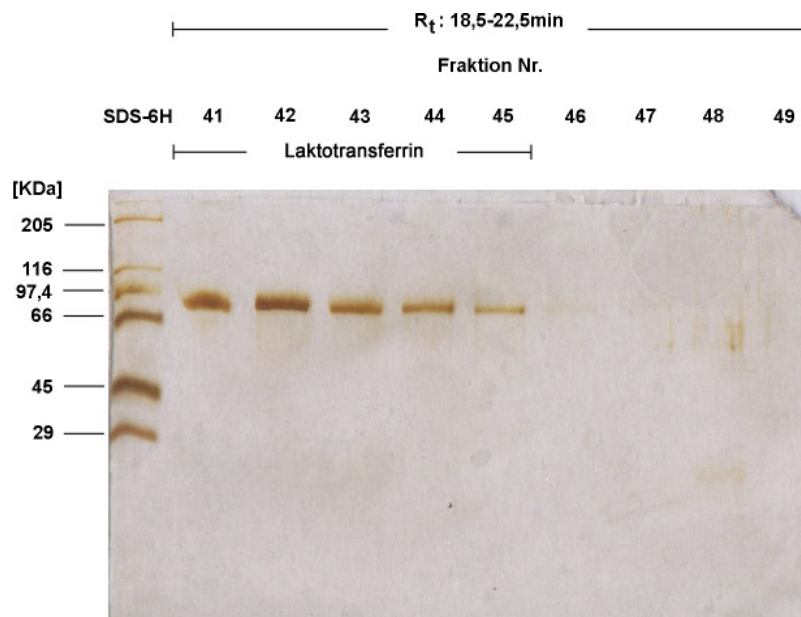


Abb. 41: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Aufreinigung einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion an einer C₂/C₁₈-Säule. Entsprechend der Tricine-SDS-Gelelektrophorese aus Abb. 39 und Abb. 40 wurden die C₂/C₁₈- μ -HPLC-Frak-tionen Nr. 41 – 49 aufgetrennt. Proteine, die in Zeitintervallen von 18,5 – 20 min eluiert worden waren (Fraktion Nr. 41 – 45; siehe Abb. 38), zeigten ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa und ließen sich in der aminoterminalen Sequenzanalyse als *Laktotransferrin* (*Laktoferrin*) nachweisen.

4.8 Nachweis der 5-HEDH-Aktivität nach Depletierung von β -Aktin und Laktotransferrin aus PMN-Lysaten mit Hilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern

Hinsichtlich der identifizierten Peptidfragmente wurden nun β -Aktin und Laktotransferrin an einer Affinitätssäule aufgereinigt und mit Hilfe von Antikörpern aus einem 5-HEDH-haltigen PMN-Lysat depletiert. Da ein Calgranulin-Antikörper zur Zeit der Untersuchung nicht kommerziell erhältlich war, ließ sich eine Depletierung von Calgranulin nicht durchführen. Die Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, ob die identifizierten Komponenten Bestandteile der 5-HEDH waren und ob sie Einfluß auf deren enzymatische Aktivität hatten.

Abb. 42 zeigt, daß die 5-HEDH-Aktivität im PMN-Lysat nach einer Depletierung des β -Aktins noch nachzuweisen war. Die enzymatische Aktivität im PMN-Lysat nahm zwar nach jedem Depletierungsschritt an einer Antikörper-beladenen Affinitätssäule tendenziell ab. Bezüglich der Ausgangsaktivität lag der Aktivitätsverlust der 5-HEDH jedoch unterhalb von 14 % (8,8 – 9,9 pmol 5-oxo-ETE/min). Im Gegensatz dazu war eine schwache Abnahme der 5-oxo-ETE-

Produktion nach einer Depletierung von Laktotransferrin beobachtet worden (siehe Abb. 43). Die 5-HEDH-Aktivität im Eluat sank nach dem ersten Depletierungsschritt um 10 % (- 0,7 Units) und war nach dem vierten Depletierungsschritt auf ca. 71 % der Ausgangsaktivität gefallen. Dabei ging die gebildete 5-oxo-ETE-Menge von ca. 7,7 pmol/min auf ca. 5,5 pmol/min zurück.

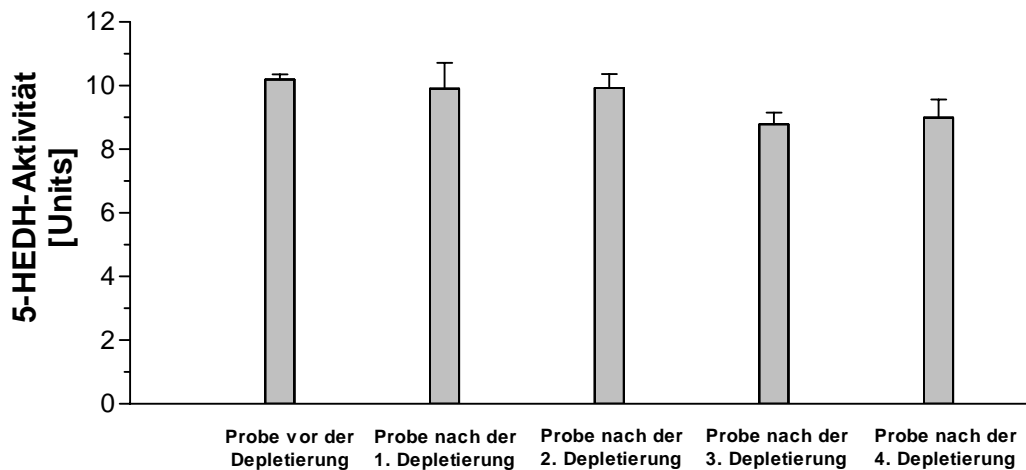


Abb. 42: 5-HEDH-Aktivität nach Auftrennung eines PMN-Lysates an einer Anti- β -Aktin-Affinitätssäule. 5 ml PMN-Lysat (100×10^6 PMN/ml) wurden viermal an einer Anti- β -Aktin-Affinitätssäule aufgetrennt. Nach jeder Depletierung wurde die 5-HEDH-Aktivität im Eluat mit Aliquots von 5×10^6 PMN bestimmt ($n = 2$). Die Enzymaktivität, die als Enzymeinheit (Unit) definiert war, entsprach der pro Minute gebildeten Menge an 5-oxo-ETE (pmol).

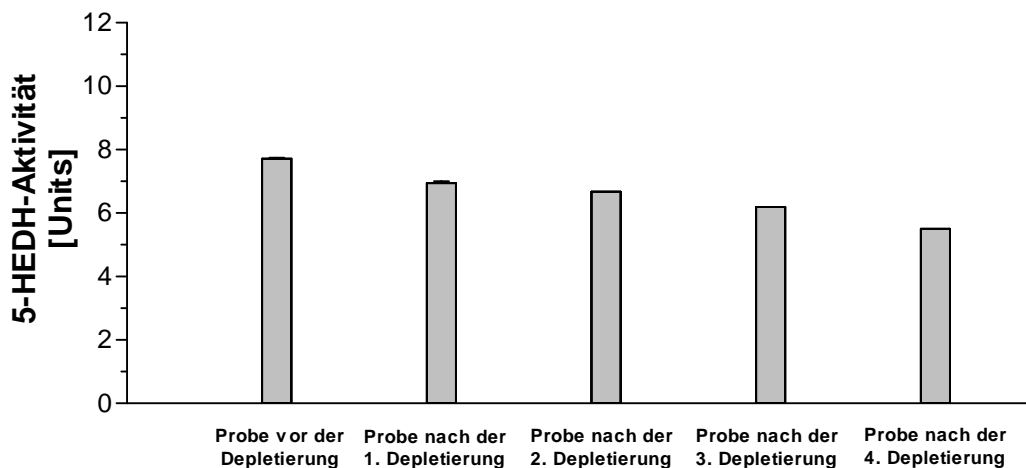


Abb. 43: 5-HEDH-Aktivität nach Auftrennung eines PMN-Lysates an einer Anti-Laktotransferrin-Affinitätssäule. Entsprechend der β -Aktin-Depletierung wurde auch Laktotransferrin sukzessiv an einer Anti-Laktotransferrin-Affinitätssäule gebunden und aus 5 ml PMN-Lysat entfernt. Die Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität erfolgte mit Aliquots von 5×10^6 PMN und wurde nach jedem Elutionsschritt durchgeführt ($n = 2$).

Aufgrund des minimalen Aktivitätsverlustes wurden 2 ml eines β -Aktin- und Laktotransferrin-depletierten PMN-Lysates an einer DEAE-P-HPLC-Säule aufgetrennt.

Aus Abb. 44 ist zu erkennen, daß im Zeitintervall von 36 – 43 min (5-HEDH-aktiver Elutionsbereich) nur noch wenig Bestandteile aus der Probe eluiert und bei 280 nm detektiert worden waren. Obwohl die 5-HEDH-Aktivität der untersuchten DEAE-P-HPLC-Fraktionen Nr. 14 – 18 nur minimal abnahm, war die UV-Absorption bei 280 nm, verglichen mit bisherigen DEAE-P-Chromatographien (vgl. Abb. 22 und Abb. 24), deutlich zurückgegangen. Die maximale Enzymaktivität von ca. 3,1 Units wurde in der DEAE-P-HPLC-Fraktion Nr. 16 (R_t : 38,5 – 40,5 min) nachgewiesen.

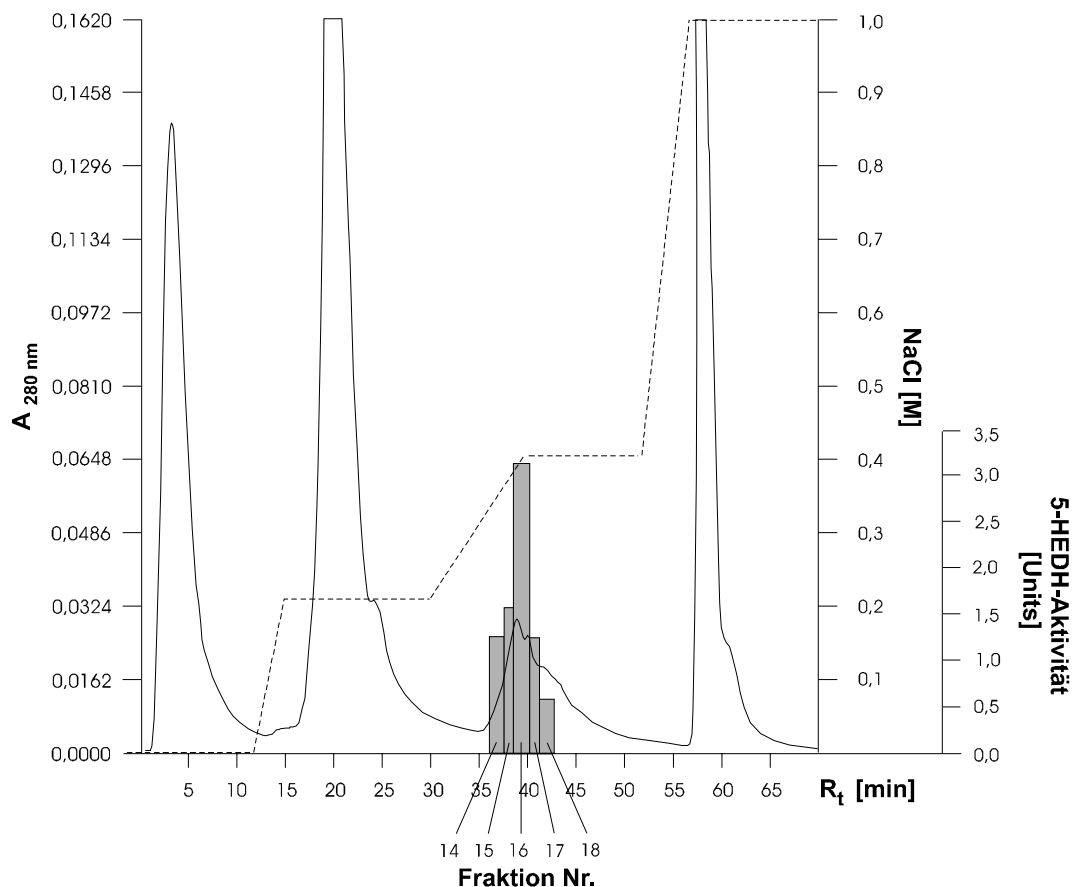


Abb. 44: DEAE-P-Chromatographie eines PMN-Lysates nach partiellen Abreicherung von β -Aktin und Laktotransferrin. 2 ml PMN-Lysat (100 Mio. PMN/ml) wurden vor der DEAE-P-Chromatographie (siehe Tab. 4, Nr. 2) viermal an einer Anti- β -Aktin- und an einer Anti-Laktotransferrin-Affinitätssäule partiell gereinigt. Zur Bestimmung der 5-HEDH-Aktivität wurde 200 μ l Fraktionsvolumen nach dem Standardverfahren untersucht ($n = 1$). Die Enzymaktivität (siehe ■ Fläche) war als Enzymeinheit (Unit) definiert und entsprach die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE (pmol).

Die elektrophoretische Auftrennung im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel zeigte (siehe Abb. 45), daß das β -Aktin- und Laktotransferrin-depletierte PMN-Lysat an einem geringen Proteinbandenmuster zu erkennen war (vergl. Abb. 23 und Abb. 45). Die DEAE-P-HPLC-Fraktionen (Nr. 13 – 19 mit R_t : 33 – 45 min) wiesen nur noch wenige Proteine auf. Durch die Depletierung wurden überwiegend Proteine zwischen 29 kDa und 45 kDa entfernt. Dies machte sich insbesondere in den 5-HEDH-aktiven DEAE-Fraktionen (Nr. 14 – 18, R_t : 36 – 43 min, 320 – 400 mM NaCl) bemerkbar.

Die DEAE-P-Fraktion Nr. 16 (R_t : 38,5-40,5 min), in der die höchste 5-HEDH-Aktivität nachgewiesen worden war, wies scharf voneinander getrennte Proteinbanden zwischen 80 kDa und 116 kDa auf. Diese gefärbten Proteine ließen sich in den benachbarten DEAE-P-Fraktionen ebenfalls identifizieren. Die Intensität der Proteinbanden stimmte mit der Stärke der zuvor ermittelten 5-HEDH-Aktivität überein.

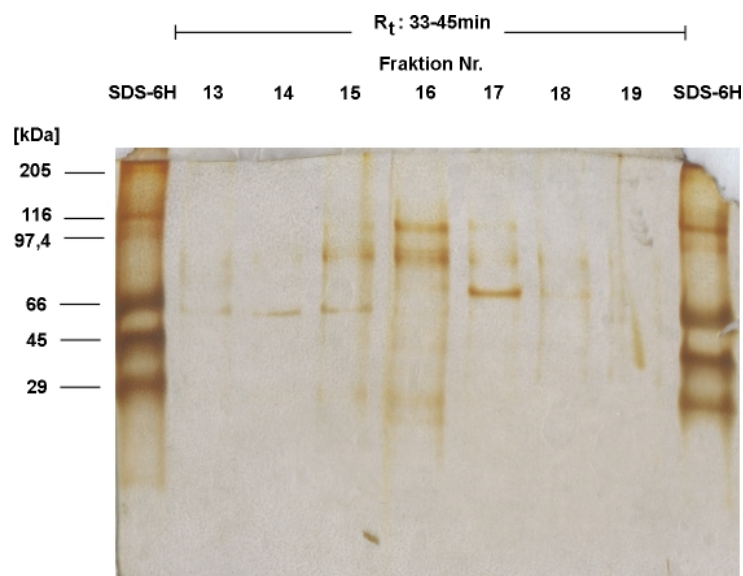


Abb. 45: Tricine-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionen. PMN-Lysat (5 ml) wurde nach der Affinitätschromatographie gegen β -Aktin und Laktotransferrin an einer schwachen Anionenaustauschersäule (DEAE-P) aufgereinigt (siehe Abb. 44). Die 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktionen Nr. 14 – 18 (5 μ l), die in Zeitintervallen von 36 – 43 min eluiert worden waren, wurden unter Standardbedingung elektrophoretisch untersucht (siehe 3.11). Als Größenmarkierung dienten 200 ng SDS-6H.

4.9 Einfluß von Kalziumchlorid (CaCl_2) auf die 5-HEDH-Aktivität

Calgranulin A (MRP8; S100A8) und Calgranulin B (MRP14; S100A9), die mit Hilfe des Edman-Abbaus im 5-HEDH-haltigen Präparat nachgewiesen worden waren, bilden zusammen einen heterogenen Komplex (Calprotektin; L1-Komplex), das in der Lage ist ungesättigte Fettsäure reversibel zu binden (Siegenthaler *et al.*, 1997). Dabei ist die Bindungskapazität des L1-Komplexes Kalzium abhängig. Um zu überprüfen, ob die 5-oxo-ETE-Produktion unter Standardtestbedingung (siehe 3.5.1) von der Fettsäure-Bindungseigenschaft des L1-Komplexes beeinflusst wird, wurde die enzymatische Aktivität der 5-HEDH im bezug auf zweiwertige Kationen (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) untersucht.

Eine Präzipitatbildung bzw. eine Fällung des 5-HEDH-Proteins ließ sich während der Enzymreaktion nicht beobachten. Weiterhin zeigte sich nach Ermittlung der enzymatischen Aktivität, daß die 5-oxo-ETE-Bildung von Ca^{2+} -Kationen abhängig war. Diese stieg nach Inkubation mit CaCl_2 (0 – 20 mM) steil an (+15,8 %) und nahm mit zunehmender Ca^{2+} -Konzentration von 20 mM an wieder ab. Eine vollständige Inhibition der Enzymaktivität wurde erst nach Inkubation mit 300 mM CaCl_2 festgestellt.

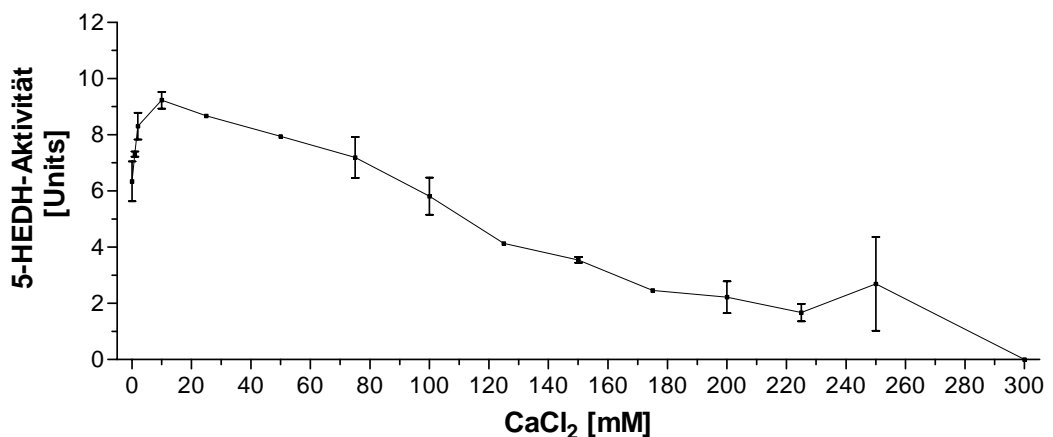


Abb. 46: Einfluß von Kalziumchlorid (CaCl_2) auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 MN wurden mit 0 – 300 mM CaCl_2 für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die 5-HEDH-Aktivität im Enzymstandardtest untersucht (n = 2). Die Enzymeinheit (Unit) war ein Maß für die Enzymaktivität und entsprach die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE-Menge (pmol).

4.10 Einfluß von Magnesiumchlorid (MgCl_2) auf die 5-HEDH-Aktivität

MgCl_2 zeigte im Vergleich zu CaCl_2 keinen nennenswerten Einfluß auf die 5-oxo-ETE-Bildung (siehe Abb. 47). Zwar stieg die 5-HEDH-Aktivität im Vergleich zum Kontrollansatz ohne MgCl_2 von 3,8 Units auf durchschnittlich 4,4 Units an. Eine tendenzielle Steigerung der Enzymaktivität, wie sie ansatzweise nach Inkubation mit 0 – 20 mM CaCl_2 nachzuweisen war, ließ sich aber nicht beobachten.

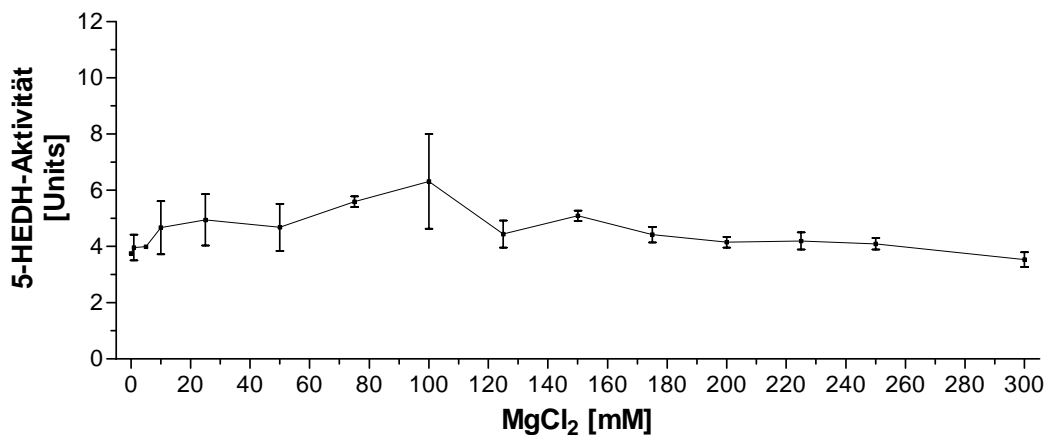


Abb. 47: Einfluß von Magnesiumchlorid (MgCl_2) auf die 5-HEDH-Aktivität. Aliquots von 3×10^6 PMN ($105.000 \times \text{g}$ -Überstand) wurden mit 0 – 300 mM MgCl_2 bei 25°C inkubiert. Nach 5 min wurde die 5-HEDH-Aktivität im Enzymstandardtest untersucht ($n = 2$).

4.11 Einfluß von Eisen-(II)-sulfat (FeSO_4) auf die 5-HEDH-Aktivität

Im Hinblick auf das eisenbindende Laktotransferrin (Brock, 2002), das ebenfalls in den 5-HEDH-haltigen Lysaten identifiziert worden war, wurde der Einfluß von Eisen-(II)-sulfat (0 – 10 mM FeSO_4) auf die 5-oxo-ETE-Produktion untersucht. Bei dieser Untersuchung wurde beobachtet, daß nach Zugabe von FeSO_4 Präzipitate aus dem Reaktionsansatz ausfielen. Die 5-HEDH-Aktivität wurde gleichzeitig mit 1 mM FeSO_4 gehemmt. Die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE-Menge lag bei ca. 1 pmol. Eine erhebliche Reduktion der 5-oxo-ETE-Bildung wurde durch höhere FeSO_4 -Konzentrationen beobachtet, wobei nach Inkubation mit 10 mM FeSO_4 keine 5-HEDH-Aktivität mehr nachzuweisen war (siehe Abb. 48).

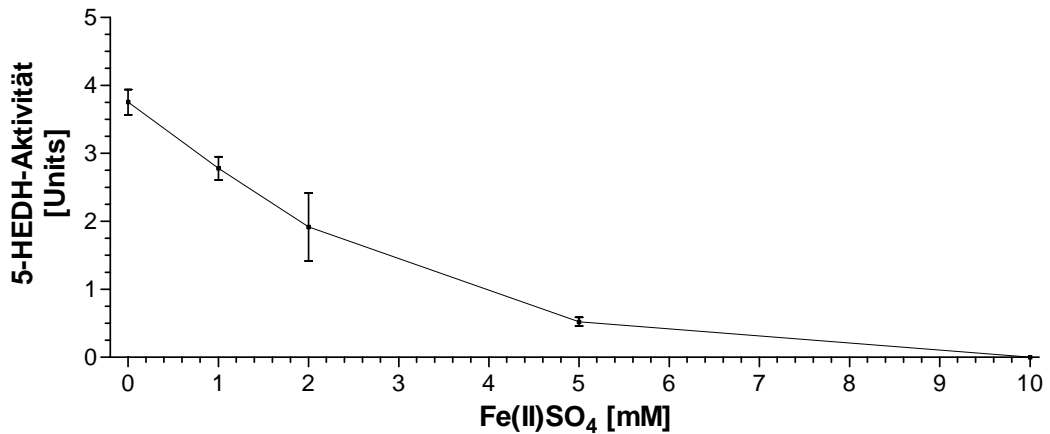


Abb. 48: Einfluß von Eisen-(II)-sulfat (FeSO₄) auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 PMN wurden mit 0–10 mM FeSO₄ für 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die 5-HEDH-Aktivität nach dem Grundscheema des Standardtest untersucht (n = 2).

4.12 Einfluß von Zinksulfat (ZnSO₄) auf die 5-HEDH-Aktivität

Da in der Literatur beschrieben worden ist, daß Zn²⁺-Kationen in submikromolarer Konzentration Dehydrogenase-Aktivitäten beeinflussen (Brown *et al.*, 2000; Gazaryan *et al.*, 2002), wurde untersucht, ob dies auch für 5-HEDH zutrifft. Wie Abb. 49 zeigt, ließ sich ein Einfluß von ZnSO₄ auf die 5-HEDH-Aktivität nicht beobachten. Die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE-Menge betrug im Kontrollansatz ohne ZnSO₄ ca. 7,4 pmol und nahm mit zunehmender ZnSO₄-Konzentration weniger als 9 % zu. Durchschnittlich lag die ermittelte Enzymaktivität bei ca. 8 Units.

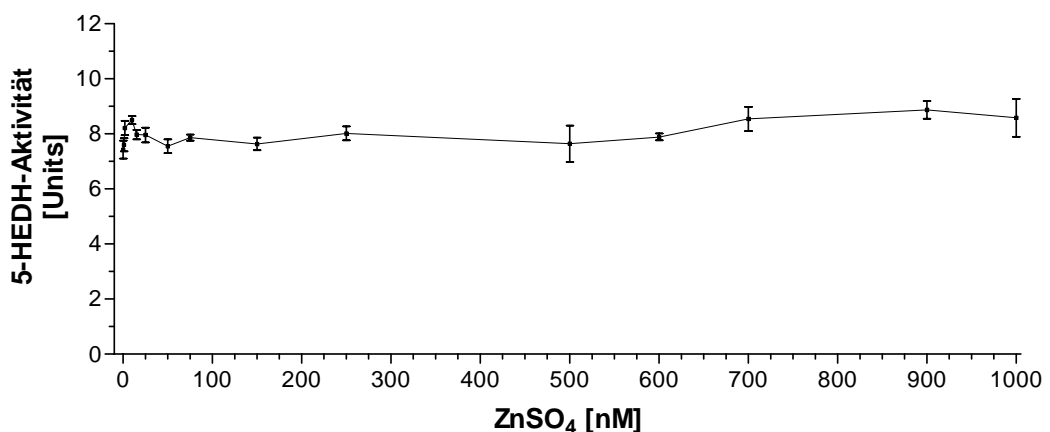


Abb. 49: Einfluß von Zinksulfat (ZnSO₄) auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 PMN wurden mit 0–1000 nM ZnSO₄ für 5 min bei 25 °C inkubiert. Die 5-HEDH-Aktivität, die als Enzymeinheit (Unit) definiert war und die pro Minute gebildete 5-oxo-ETE-Menge (pmol) entsprach, wurde nach dem Standardtestverfahren ermittelt (n = 2).

4.13 Einfluß von EDTA auf die 5-HEDH-Aktivität

Um zu überprüfen, ob ein Entzug zweiwertiger Metallkationen aus der Reaktionslösung die 5-oxo-ETE-Produktion beeinflusst, wurden Inkubationsansätze in Gegenwart von Chelatoren vorgenommen.

Abb. 50 zeigt, daß die 5-HEDH-Aktivität mit steigender EDTA-Konzentration abnahm. Die Kontrollansätze ohne EDTA-Zugabe wiesen dabei Enzymaktivitäten von ca. 5,5 Units auf. Eine Halbierung der 5-oxo-ETE-Produktion ließ sich in Anwesenheit von 15 mM EDTA (ca. 2,8 Units) beobachten.

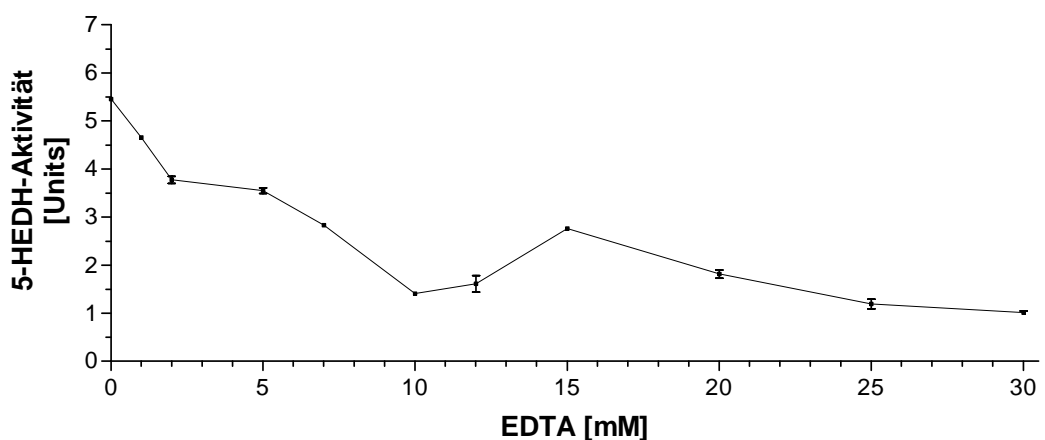


Abb. 50: Einfluß von EDTA auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 PMN wurden mit 0 – 30 mM EDTA für 5 min bei 25 °C inkubiert. Die 5-HEDH-Aktivität wurde mit dem Enzymstandardtest untersucht (n = 2).

4.14 Einfluß von EGTA auf die 5-HEDH-Aktivität

Um zu überprüfen, ob ein Entzug von Kalzium die 5-oxo-ETE-Produktion beeinflusst, wurden 5-HEDH-Aktivitäten in Gegenwart von EGTA, das spezifisch Ca^{2+} -Kationen komplexiert, untersucht.

Abb. 51 zeigt, daß die 5-oxo-ETE-Bildung und somit die 5-HEDH-Aktivität unter Standardtestbedingungen (siehe 3.5) bis zu 54 % durch Zugabe von 5 mM EGTA zunimmt. Die 5-oxo-ETE-Produktion ließ sich aber darüberhinaus durch Konzentrationserhöhung von EGTA (> 5 mM) nicht weiter erhöhen. Die Enzymaktivität nahm, wie entsprechend bei der EDTA-Untersuchung (siehe 4.13) zuvor, ab (*Daten nicht gezeigt*).

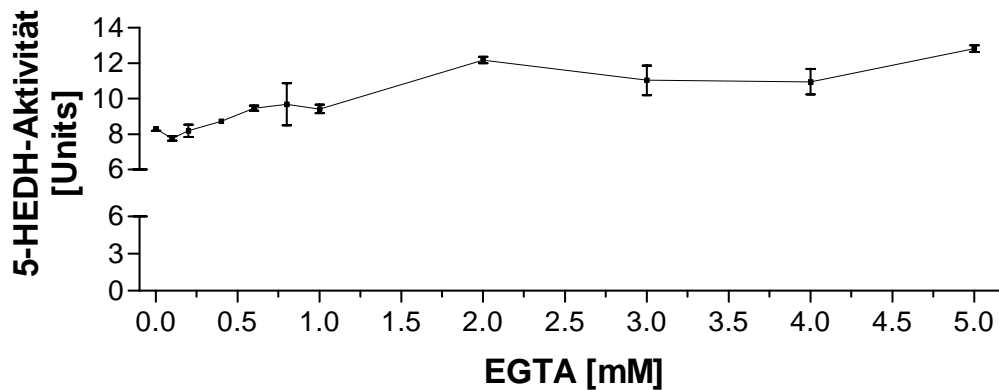


Abb. 51: Einfluß von EGTA auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 PMN wurden mit 0 – 5 mM EGTA für 5 min bei 25 °C inkubiert. Danach wurde die 5-HEDH-Aktivität mit Hilfe des Enzymstandardtests bestimmt (n = 2).

4.15 Einfluß von Calmidazoliumchlorid auf die 5-HEDH-Aktivität

Da sich 5-oxo-Eikosanoide in neutrophilen Granulozyten über einen Kalzium-/Calmodulin-abhängigen Reaktionsweg zu 6,7-Dihydro-5-oxo-ETE reduzieren und dementsprechend auch mit EGTA und Calmodulin-Antagonisten hemmen lassen (Berhane *et al.*, 1998), wurde untersucht, ob die Oxidation von 5-(S)-HETE zu 5-oxo-ETE ebenfalls durch Calmodulin beeinflusst wird. Ferner ist in der Literatur beschrieben worden, daß Calmodulin intrazellulär als Kalziumsensor dient und mit Hilfe von Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen die Enzymaktivitäten der Zelle reguliert (Stull, 2001; Hudmon *et al.*, 2002). Hierzu wurde die Wirkung von Calmidazoliumchlorid, ein speziell gegen Calmodulin-gerichteter Inhibitor, im PMN-Lysat untersucht.

Abb. 52 zeigt, daß die 5-oxo-ETE-Synthese von Calmodulin abhängig war. Die Inhibition verlief sigmoidal bei einer steigenden Calmidazoliumchlorid-Konzentration. Reaktionsansätze, die zuvor mit 0,1 μM Calmidazoliumchlorid inkubiert worden waren, wiesen nach Quantifizierung von 5-oxo-ETE nur noch 30 % der Ausgangsaktivität (ohne Calmidazolium) auf. Eine vollständige Inaktivierung von 5-HEDH wurde schließlich mit 0,2 μM Calmidazoliumchlorid erreicht.

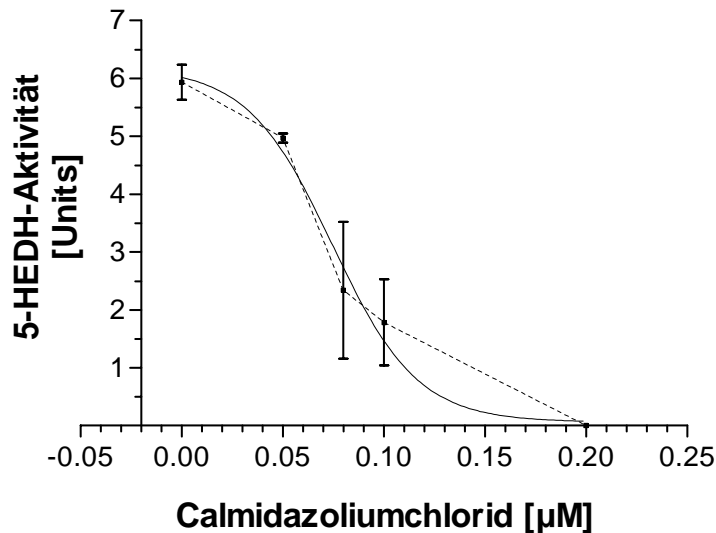


Abb. 52: Einfluß von Calmidazoliumchlorid auf die 5-HEDH-Aktivität. Zellysate von 3×10^6 PMN wurden mit 0 – 0,2 µM Calmidazoliumchlorid für 5 min bei 25 °C inkubiert. Die 5-HEDH-Aktivität wurde im Enzymstandardtest untersucht (n = 2).

4.16 Massenspektrometrische Untersuchung einer partiell aufgereinigten, 5-HEDH-aktiven HPLC-Fraktion

Um Aminosäuresequenz-Informationen der 5-HEDH-Aktivität enthaltenden DEAE-P-HPLC-Fractionen zu erhalten, wurden auch massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt (siehe 3.18). Hiernach wurden zwei bereits publizierte Aminosäuresequenzen aus einer partiell aufgereinigten, 5-HEDH-haltigen DEAE-P-HPLC-Fraktion (Rt: 38,5 – 39,5 min, siehe Paralleltrennung Abb. 22) mit Hilfe der Quadrupol-TOF™-Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte nach den relativen Massenverhältnissen von natürlich vorkommenden Isotopen der detektierten Atome. Da diese Methode eine Bestimmung des aminoterminalen Endes nicht ermöglichte, ließ sich die Reihenfolge der identifizierten Aminosäuren nicht exakt klären. Weiterhin ließen sich Isomere wie Leucin (L) und Isoleucin (I) aufgrund von gleichen molekularen Massenverhältnissen nicht voneinander unterscheiden.

Die erste ermittelte Aminosäuresequenz war „DLAALVVDNGSG“ und wurde in der FASTA-Proteindatenbank als ein Peptidfragment des humanen β-Aktins identifiziert (siehe Abb. 53; Accession: P02570; [gi:113270]). Da das ermittelte Leucin in Position 5 (siehe L) ebenso Isoleucin sein kann, und eine genaue Identifikation aufgrund der Isomerie nicht möglich ist, stimmt die ermittelte

Aminosäuresequenz zu annähernd 100 % mit dem Originalprotein in den Positionen 4 bis 15 überein.

Ermittelte Aminosäuresequenz *:

DLAALVV DNGSG

Originalprotein des β -Aktins (Accession: P02570; [gi:113270]):

1 MDDDIAALVV DNGSGMGC

* Buchstabensymbole der Aminosäuren; siehe Anhang.

Quelle; FASTA-Proteindatenbank

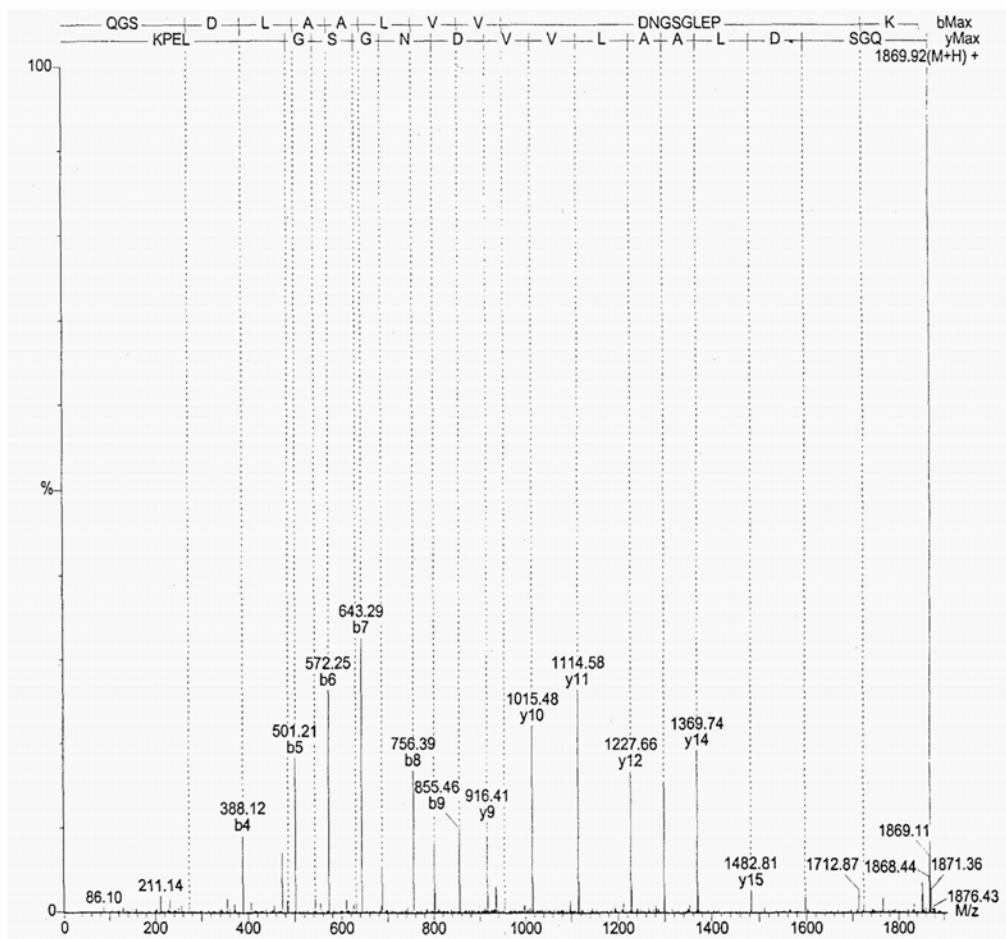


Abb. 53: Massenspektrometrische Analyse einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion.

Eine 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fraktion (R_f : 38,5 – 39,5 min; siehe Abb. 22) wurde nach Alkylierung und Lys-C-Verdau massenspektrometrisch untersucht. Mit Hilfe der Quadrupol-TOFTM-Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) und über eine Electrospray-Ionisationsmethode (ESI) ließ sich die Aminosäuresequenz „DLAALVV DNGSG“ bestimmen. Die Recherche in der FASTA-Proteindatenbank ergab, daß diese ermittelte Aminosäuresequenz zu 100 % identisch mit *humanem β -Aktin* ist. B4 – 9 und y9 – 15 repräsentieren positiv ionisierte Peptidfragmente, die nach Größe aufgetrennt wurden. Aminoterminale Bruchstücke, die CO⁺-Gruppen aufweisen, werden mit „b“, Carboxylterminale NH₃⁺-Bruchstücke hingegen mit „y“ bezeichnet. Die Stärke der Ionisation ist in Prozent-Einheiten dargestellt.

Das zweite Peptidfragment bestand aus der Aminosäure-Reihenfolge „APARVFPSLS“ (siehe Abb. 54) und hatte hohe Ähnlichkeit (ca. 80 % Identität) mit einer bekannten *NADH-Ubichinon Oxidoreduktase*, die im Rind (*Bos taurus*; Accession Q02376; [gi:400579]) nachgewiesen worden war. Dabei belegte das Peptidfragment im Originalprotein die Positionen 15 bis 24 (APAR_xFPS_xS). Außerdem wies diese Aminosäuresequenz bis zu 77,8 % Ähnlichkeit mit einer *putativen, eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase der Hefezelle Schizosaccharomyces pombe* auf (Accession: Q09669; [gi:1168356]). Das Peptidfragment wurde in Position 14 - 21 (PAR_xFPSL) des Originalproteins lokalisiert. In der dargestellten Aminosäuresequenz stellt x eine fehlende oder unbekannte Aminosäure dar.

Ermittelte Aminosäuresequenz *:

APARVFPSLS

Originalprotein der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (Accession Q02376; [gi:400579]):

```
1   MAPSALLRPF WKLLAPARFP SVSSRSKIFY IQEPPHGSPN WLKVGLTLGT
51  SVFLWIYLIK QHNEDVLEYK RRNGLE
```

Originalprotein der putativen, eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase (Accession: Q09669; [gi:1168356]):

```
1   MSILRSPFRL IRSPARFFPS LFHSSCNQSF TNGLKHQSTS SKAMPVSAFY
51  IPSFNLFKGG CLAEAAKQIK MSGFKNTLIV TDPGI IKVGL YDKVKALLEE
101 QSITVHLYDG VQPNTVGNV NQGLEIVKKE NCDSMVSIGG GSAHDCAKGI
151 ALLATNGGKI ADYEGVDKSS KPQLPLIAIN TTAGTASEMT RFAIITEETR
201 HIKMAIIDKH TMPILSVNDP ETMYGLPSSL TAATGMDALT HAVEAYVSTA
251 ANPITDACAV KCIELVNKYL KRAVDNGKDE EARDNMAYAE FLGGMAFNNA
301 SLGYVHAMAH QLGGFYGIPH GVCNAVLLAH VQKFNSRDPR ANARLGDIAF
351 HLGCEEHTAE AALDRISQLV LEVKIRPHLV DLGVKEKDFD VLVDHAMKDA
401 CGATNPIQPT HDEVKAIFKS AM
```

* Buchstabensymbole der Aminosäuren; siehe Anhang.

Quelle; FASTA-Proteindatenbank

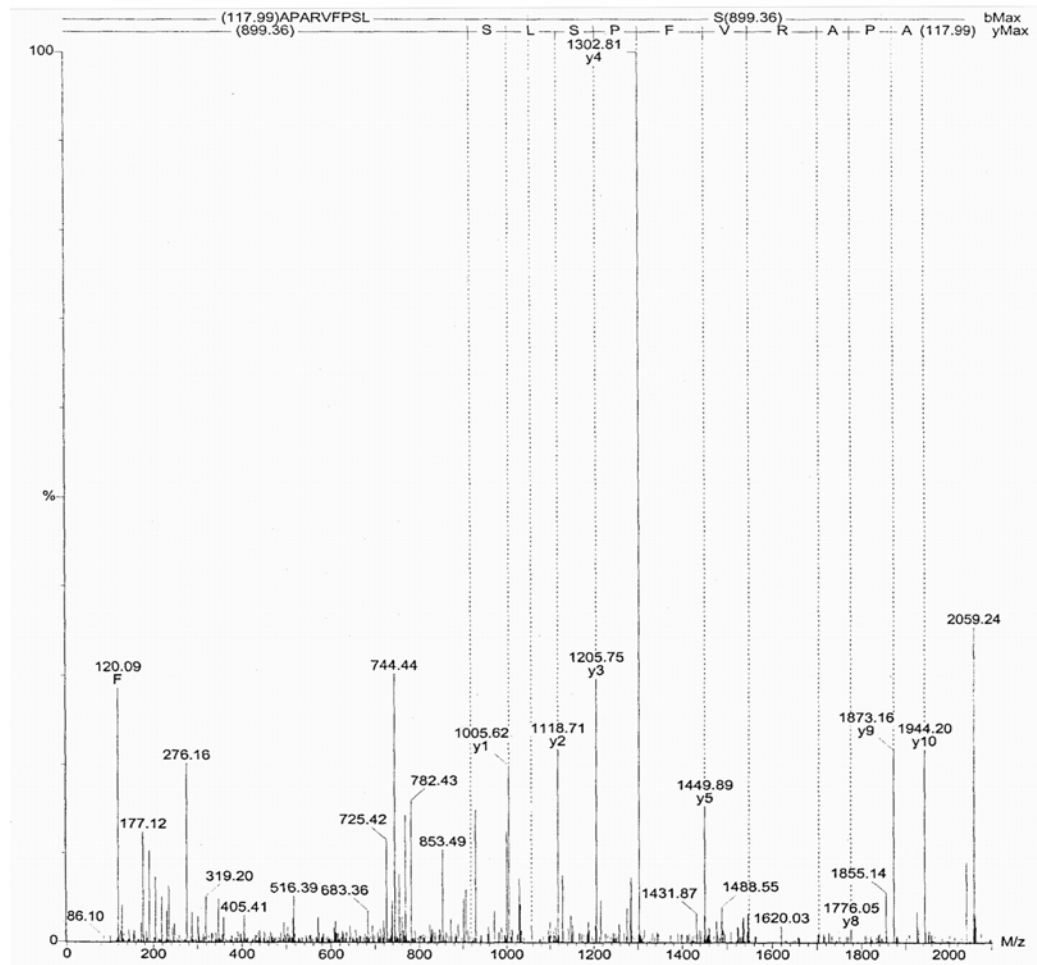


Abb. 54: Massenspektrometrische Analyse einer 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion. In der 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fraktion (R_f : 38,5 – 39,5 min; siehe Abb. 22) ließ sich noch ein zweites Peptidfragment massenspektrometrisch nachweisen (vergl. Abb. 53). Dabei handelt es sich um die Aminosäuresequenz „APARVFPSLS“, die bis zu 80 % Ähnlichkeit mit einer bekannten *NADH-Ubichinon Oxidoreduktase* (*Bos taurus*) und bis zu 77,8 % Identität mit einer *eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase* (*Schizosaccharomyces pombe*; Quelle: FASTA-Proteindatenbank) hatte. Y1 – 10 repräsentieren positiv ionisierte Peptidfragmente mit NH_3^+ -Gruppen, die nach der Größe aufgetrennt wurden. Die Stärke der Ionisation ist in Prozent-Einheiten dargestellt.

4.17 Amplifizierung eines Genabschnittes der *NADH-Dehydrogenase* bzw. der *eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase*

Eine Amplifizierung des Gens für die Aminosäuresequenz „APARVFPSLS“ (siehe Abb. 54) ließ sich mit der *RACE-PCR-Technik* nicht erfolgreich durchführen. Die Ursache dafür lag möglicherweise an dem hohen Degenerationsgrad der verwendeten, synthetischen Oligonukleotide. In den humanen Keratinozyten konnte keine erkennbare mRNA-Expression mit den eingesetzten „*Frohman-Adapter-*“ und „*Jack-1-Primern*“ induziert werden. Im Gegensatz dazu ließen sich mit Hilfe von „*Frohman-Adapter-*“ und „*Jack-2-Primern*“ mehrere DNA-Banden amplifizieren. Die gefärbten DNA-Banden waren jedoch unspezifische Primer-Produkte, die durch Selbstligation entstanden waren. Ein Indiz für die Selbstligation zeigten Kontrollansätze, die nur „*Jack-2-Primer*“ enthielten. Ähnliche Resultate ergaben auch Hautproben von zwei an Psoriasis erkrankten Patienten mit symptomatischer Plaque-Bildung (*Agarosegele nicht dargestellt*). Diesbezüglich war die anschließende nested-PCR, bei der auch cDNA-Produkte amplifiziert worden waren, trotz vorhandener Expressionsbanden nicht auszuwerten.

4.18 Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE auf die mRNA-Expression in menschlichen Hautzellen

4.18.1 Einfluß von 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE auf die mRNA-Expression von primären Keratinozyten

Primäre Keratinozyten der vierten Subkultur zeigten nach Stimulation (4 h, 24 h) mit 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE keine erkennbare Expression bezüglich der mRNA von Eotaxin-1, -2, -3 und Gro- α . Ebenso ließ sich eine mRNA-Expression von IL-1 α und IL-1 β nach 24 h-Stimulation nicht nachweisen. Die gebildeten Primer-Produkte ließen sich nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel nur wenig detektieren. Die mRNA-Expression war weder von der 5-(S)-HETE- noch von der 5-oxo-ETE-Konzentration abhängig (*semiquantitative Auswertungen nicht dargestellt*).

4.18.2 Einfluß von 5-(S)-HETE auf die IL-1 β -mRNA-Expression von primären Fibroblasten

Die mRNA-Expression von Eotaxin-1, -2, und -3 ließ sich auch in den primären Fibroblasten der vierten Subkultur nicht induzieren. Weder eine Erhöhung der 5-(S)-HETE-Konzentration von 1 nM auf 500 nM noch eine Verlängerung der Stimulationszeit (4 h auf 24 h) führte zu einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression. Ebenso konnte die Gro- α - und IL-1 α -mRNA-Expression nicht durch 5-(S)-HETE induziert werden. Im Gegensatz dazu ließ sich aber die IL-1 β -mRNA-Expression in primären Fibroblasten induzieren. Ein DNA-Fragment, das im Agarosegel bei 600 Bp lokalisiert worden war, konnte als Amplikon des genspezifischen IL-1 β -Primers (586 Bp) identifiziert werden. Die densitometrische Auswertung ergab, daß die IL-1 β -mRNA-Expression mit steigender 5-(S)-HETE-Konzentration und mit Verlängerung der Stimulationszeit relativ zu denen aus Kontrollkulturen zunahm.

Eine Steigerung in der IL-1 β -mRNA-Expression wurde auch in Fibroblastenkulturen festgestellt, die zuvor mit FCS-haltigem Nährmedium für 4 h stimuliert worden waren. Im Gegensatz zu 5-(S)-HETE-stimulierten Zellen und im Vergleich zu den beiden anderen Kontrollen (DMEM und DMEM mit 0,32 % Ethanol) nahm die Intensität der mRNA-Expression jedoch nach ca. 24 h wieder ab (siehe Abb. 55). Die mRNA-Expression ließ sich dabei nicht kontinuierlich steigern. Fibroblasten, die mit 500 nM 5-(S)-HETE stimuliert worden waren, zeigten in bezug auf den internen Standard (GAPDH) eine relativ schwache Expression von IL-1 β -mRNA.

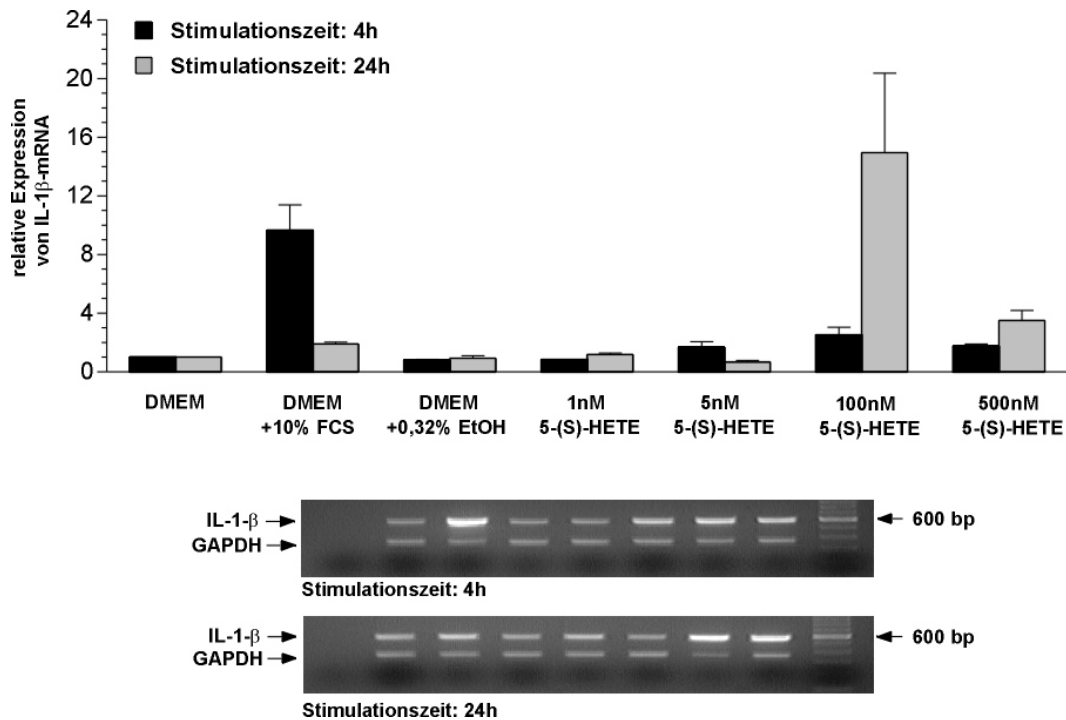


Abb. 55: Relative Expression der IL-1β-mRNA nach Stimulation primärer Fibroblasten mit 5-(S)-HETE. Primäre Fibroblasten wurden für 4 h und 24 h mit 5-(S)-HETE (1 – 500 nM) stimuliert (jeweils n = 2). Dabei dienten Zellkulturen als Kontrollen, die zuvor mit DMEM, DMEM und 10 % FCS bzw. 0,32 % Ethanol stimuliert worden waren. Eine Induktion der IL-1β-mRNA-Expression ließ sich mit Hilfe der RT-PCR-Technik (siehe 3.25) und der densitometrischen Bestimmungsmethode (siehe 3.26) nachweisen. Die linke Spur zeigt die Leerkontrolle (DMEM) und die rechte Spur stellt den 100 Bp-Ready-Load™-Marker dar (Life Technologies). Das genspezifische IL-1β-Produkt (586 Bp) wurde nach der Agarosegelelektrophorese bei 600 Bp identifiziert. In der Grafik ist die relative IL-1β-mRNA-Expression, entsprechend der elektrophoretischen Auftrennung, dargestellt.

4.18.3 Einfluß von 5-oxo-EETE auf die Gro-α-mRNA-Expression von primären Fibroblasten

Eine mRNA-Expression von Eotaxin-1, -2 und -3 ließ sich in den primären Fibroblasten nach Stimulation mit der biologisch aktiveren 5-oxo-EETE nicht induzieren. Die Induktion der Gro-α-mRNA-Expression war hingegen möglich (siehe Abb. 56). Die densitometrische Analyse ergab, daß die Gro-α-mRNA-Expression relativ zur 5-oxo-EETE-Konzentration und zur Stimulationszeit erhöht war. Das genspezifische Primer-Produkt wurde nach der elektrophoretischen Untersuchung im Agarosegel als 750 Bp DNA-Bande identifiziert. Entsprechend der Stimulation mit 5-(S)-HETE (siehe Abb. 55), ließ sich die Gro-α-mRNA-Expression auch in dieser Versuchsreihe mit FCS-haltigem Nährmedium

induzieren. Die Intensität der mRNA-Expression von Gro- α ging ebenfalls nach ca. 24 h-Stimulationszeit zurück. Kulturansätze, die mit 5-oxo-ETE-haltigen Nährmedien stimuliert worden waren, wiesen eine konzentrationsabhängige und stärkere Gro- α -mRNA-Expression auf.

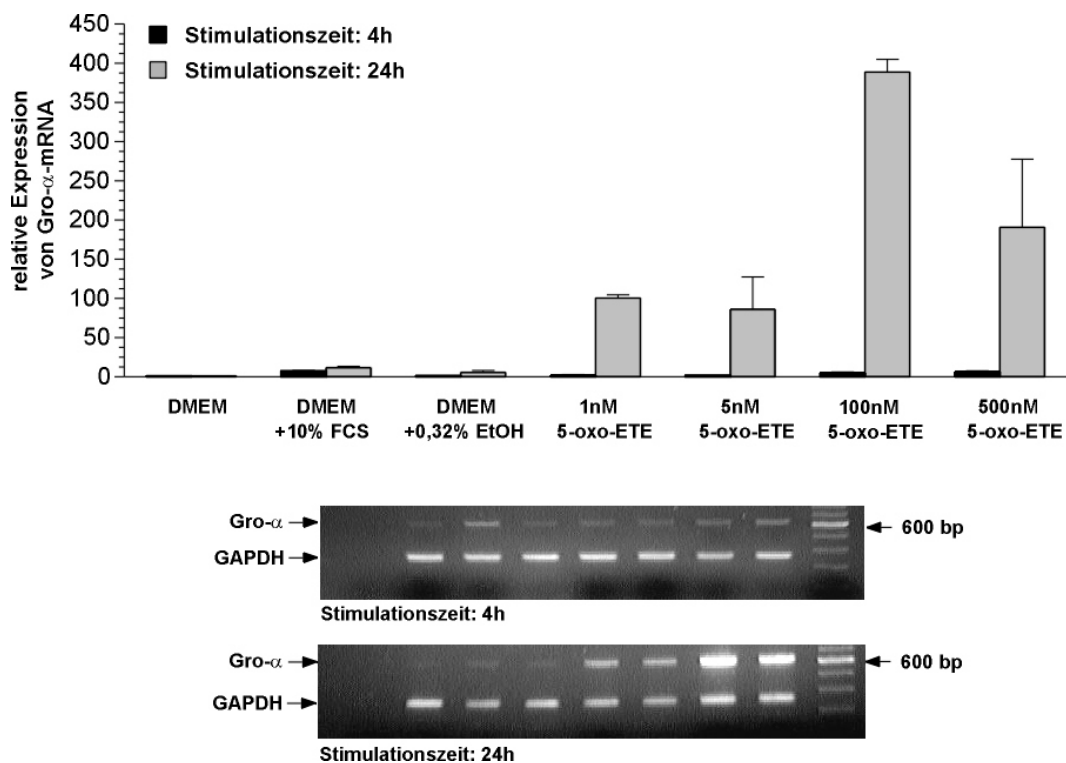


Abb. 56: Relative Expression der Gro- α -mRNA nach Stimulation primärer Fibroblasten mit 5-oxo-ETE. Primäre Fibroblasten wurden mit 5-oxo-ETE (1 – 500 nM) für 4 h und 24 h stimuliert (jeweils n = 2). Fibroblastenkulturen, die mit DMEM bzw. mit DMEM und einem Zusatz von 10 % FCS oder 0,32 % Ethanol stimuliert worden waren, dienen als Kontrollkulturen. Der Induktionsnachweis der Gro- α -mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der RT-PCR-Technik (siehe 3.25) und der Densitometrie (siehe 3.26). In der Grafik ist die relative Gro- α -mRNA-Expression, entsprechend der elektrophoretischen Auftrennung, dargestellt. Die linke Spur zeigt die Leerkontrolle (DMEM) und die rechte Spur den 100 Bp-Ready-Load™-Marker. Das genspezifische Gro- α -Produkt (750 Bp) wurde oberhalb eines 600 Bp-Markers identifiziert.

4.18.4 Einfluß von 5-oxo-ETE auf die IL-1 α - und IL-1 β -mRNA-Expression primärer Fibroblastenkulturen

Primäre Fibroblasten der vierten Subkultur, die mit 5-oxo-ETE (1 – 500 nM) stimuliert worden waren, exprimierten die mRNA von IL-1 α und IL-1 β . Die Intensität der IL-1 α -mRNA-Expression war sehr schwach und ließ sich erst mit

100–500 nM 5-oxo-EETE nach 24 h-Stimulationszeit nachweisen. Das IL-1 α -Genprodukt (757 Bp) wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel oberhalb eines 600 Bp-Markers identifiziert (siehe Abb. 57).

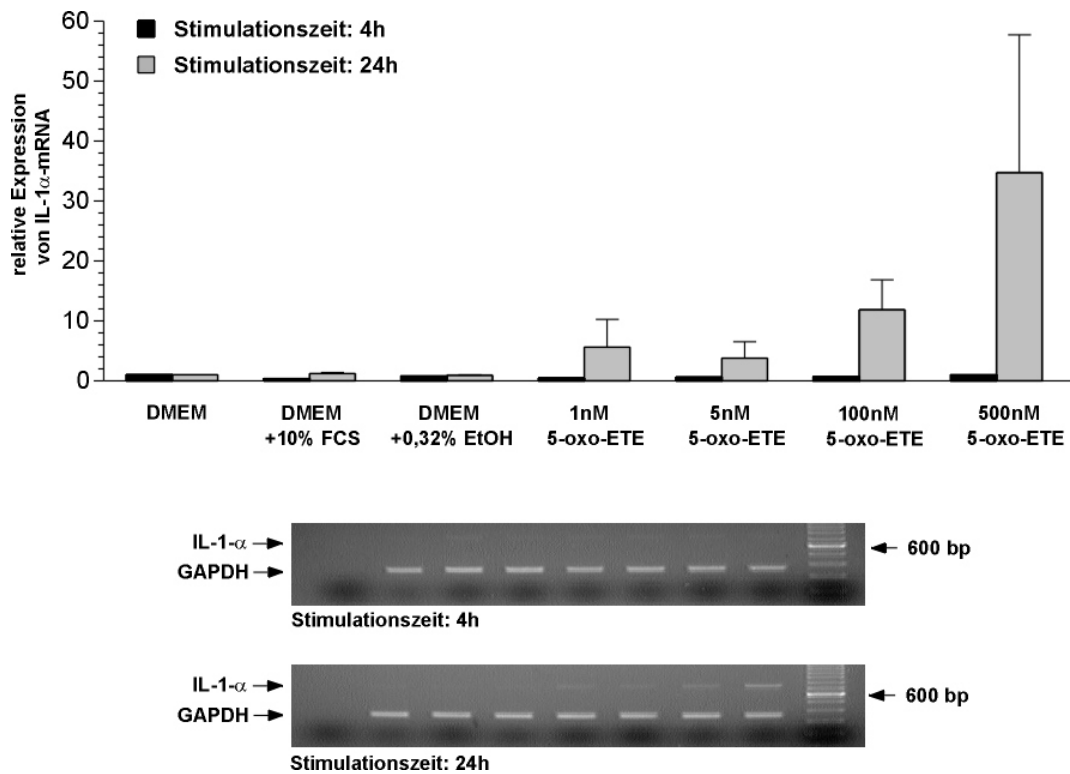


Abb. 57: Relative Expression der IL-1 α -mRNA nach Stimulation primärer Fibroblasten mit 5-oxo-EETE. Primäre Fibroblasten wurden mit 5-oxo-EETE (1 – 500 nM) für 4 h und 24 h stimuliert (4 h, n = 1; 24 h, n = 2). Zur Kontrolle wurden Fibroblasten mit DMEM wie auch mit DMEM mit einem Zusatz von 10 % FCS oder 0,32 % Ethanol stimuliert. Die IL-1 α -mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR-Methode (siehe 3.25) und einer densitometrischen Analyse bestimmt (siehe 3.26). In der Grafik ist die relative IL-1 α -mRNA-Expression, entsprechend der elektrophoretischen Auftrennung, dargestellt. In der linken Spur ist die Leerkontrolle (DMEM) aufgetragen und in der rechten Spur ist der 100 Bp-Ready-LoadTM-Marker dargestellt. Das IL-1 α -Genprodukt (757 Bp) wurde nach der Elektrophorese oberhalb von 600 Bp identifiziert.

Im Gegensatz dazu war eine Expression der IL-1 β -mRNA schon nach 4 h-Stimulationszeit festzustellen (siehe Abb. 58). Fibroblasten, die 24 h mit 5-oxo-EETE stimuliert worden waren, wiesen eine Zunahme der IL-1 β -mRNA-Expression bei einer ansteigenden 5-oxo-EETE-Konzentration auf.

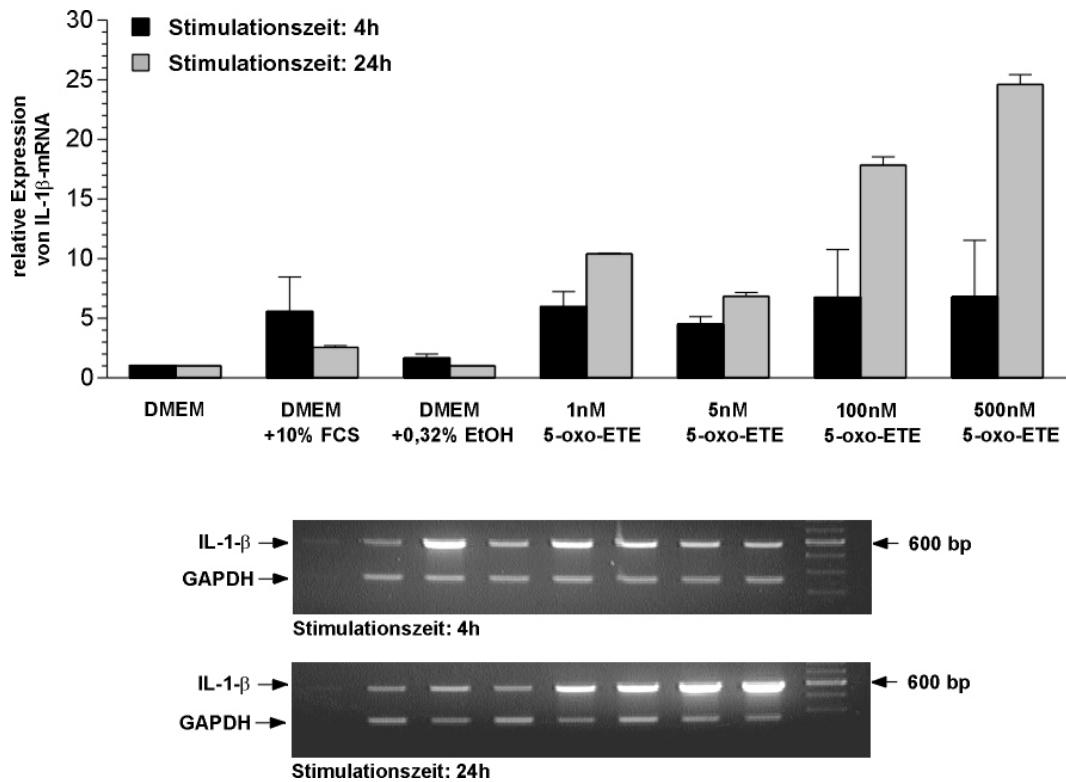


Abb. 58: Relative Expression der IL-1 β -mRNA nach Stimulation primärer Fibroblasten mit 5-oxo-ETE. Primäre Fibroblasten wurden mit 5-oxo-ETE (1-500 nM) für 4 h und 24 h stimuliert (jeweils n = 2). Fibroblasten, die mit DMEM oder mit DMEM und einem Zusatz von 10 % FCS oder 0,32 % Ethanol stimuliert worden waren, dienten als Kontrollansätze. Die Induktion der IL-1 β -mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR-Methode (siehe 3.25) und der Densitometrie nachgewiesen (siehe 3.26). Die linke Spur stellt die Leerkontrolle (DMEM) und die rechte Spur den 100 Bp-Ready-LoadTM-Marker dar. In der Grafik ist die relative IL-1 β -mRNA-Expression, entsprechend der Elektrophoreseauftrennung, dargestellt. Das IL-1 β -Primerprodukt (587 Bp) wurde unterhalb der 600 Bp-Bande identifiziert.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Chromatographischer Nachweis der 5-HEDH-Aktivität im Standardtest

Die membrangebundene 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH), die in Anwesenheit von NADP^+ als Co-Substrat die Oxidation der 5-(S)-HETE zu 5-oxo-EETE katalysiert, wurde indirekt über ihre Enzymaktivität nach chromatographischer Quantifizierung des Enzymproduktes nachgewiesen. Diesbezüglich wurde ein von Pareigis (1997) etabliertes Testsystem nach Erkenntnissen aus den Aktivitätsuntersuchungen weiterentwickelt. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur (siehe 4.4.1) und der NaCl-Konzentration bei pH 8,0 (siehe 4.4.2 und 4.4.3) wurde die 5-oxo-EETE-Bildung gesteigert und der Enzymstandardtest optimiert (siehe 3.5.1).

5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE wurden nach Beendigung der Enzymreaktion unter bereits etablierten Chromatographiebedingungen an einer RP_{18} -Säule aufgetrennt und quantifiziert (Pareigis, 1997). Das 5-Hydroxyeikosanoid und das 5-oxo-Eikosanoid, die jeweils bei 235 nm und 280 nm ihre Absorptionsmaxima zeigten, ließen sich unter Verwendung eines isokratischen Elutionsgradienten aus Methanol und Essigsäure separieren und detektieren (siehe 3.5.2). Das Elutionsprofil der beiden 5-HEDH-Metabolite (siehe Abb. 4) stimmte mit den von Pareigis (1997) dargestellten Chromatogrammen überein. Zwar konnten Powell *et al.* (1992) sowie Yu *et al.* (1995) die Elution der beiden Eikosanoide mit Hilfe eines linearen Gradienten aus Acetonitril-Essigsäure bzw. aus einem Gemisch von Acetonitril-Methanol-Trifluoressigsäure bis zu einer Retentionszeit von 25 min verringern. Eine schnellere Elution der Eikosanoide mit kürzerer Retentionszeit als 12 min wurde allerdings nicht erzielt.

Bei der chromatographischen Auftrennung von 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-EETE können Begleitsubstanzen wie Proteine, Salze und Stabilisatoren die UV-Detektion empfindlich stören. Deshalb wurden PMN-Lysate und 5-HEDH-haltige HPLC-Fractionen einer Vorsäulenextraktion nach Powell (1987) unterzogen. Die repräsentativen Eikosanoidpeaks wurden nach der RP_{18} -Chromatographie integriert, um die Produktzunahme zu ermitteln und um die 5-HEDH-Aktivität zu

berechnen. Basierend auf dieser Trennungsmethode sollte die 5-HEDH im Verlauf der Aufreinigung über die Enzymaktivität bestimmt, elektrophoretisch untersucht und mit Hilfe der Aminosäuresequenz-Analyse und der Massenspektrometrie charakterisiert werden.

5.1.2 Präparation und Stabilisierung der 5-HEDH

Die mikrosomale 5-HEDH wurde bislang in humanen Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen (Powell *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde die 5-HEDH-Aktivität bei der Suche nach einem eosinophilen, chemotaktischen Lipid (ECL) in humanen Eosinophilen und im Zusammenhang mit der Aktivität einer Sojabohnen-LOX-1 entdeckt (Schwenk *et al.*, 1995). Ebenso ließ sich die enzymatische Aktivität in den Keratinozyten-Zelllinien HaCaT, KB, A 431 sowie in immortalisierten Zellen mit hämatopoetischer (EoL-3) und promyeloischer Herkunft (HL-60) nachweisen (Pareigis, 1997). Zur Gewinnung von 5-HEDH-haltigen Zellysaten wurden humane, neutrophile Granulozyten verwendet. Die 5-HEDH-haltigen Proben wurden über eine Differentialzentrifugation (siehe Abb. 3 und Abb. 7) gewonnen. Durch Zusatz von 20 % Glycerin wurden Fragmente von Zellkernen sowie mitochondrialen und zytosolischen Zellbestandteilen, die sich ebenfalls im sukrosehaltigen Puffergradienten abtrennen ließen, weitgehend beseitigt (Gotoh *et al.*, 1989; Ozols, 1990; Wintergalen *et al.*, 1995). Da Proteine bei der Extraktion und Aufreinigung diversen Einflüssen wie pH-Wert-Änderung, Proteolyse, Schwermetalleinfluß und Luftoxidation ausgesetzt waren und innerhalb weniger Stunden denaturierten (siehe Abb. 8), wurden der Präparationslösung Schutzsubstanzen zugesetzt (Cooper, 1981: Kapitel 10; Deutscher, 1990).

Obwohl Phosphatpuffer für die Extraktion und Lagerung der 5-HEDH besser geeignet waren und **Tris/HCl-Puffer** eher als Testpuffer einzusetzen waren (Pareigis, 1997), wurde zur Aufreinigung der 5-HEDH dennoch das Tris/HCl-Puffersystem verwendet (siehe 3.3). Durch den Einsatz dieses einheitlichen Lösungsmittelsystems sollten vor allem zusätzliche Reinigungsschritte wie Umpufferung umgangen und ein Verlust der 5-HEDH, z.B. durch Absorption an Filtermembranen, verhindert werden (Blatt, 1971).

Während der Präparation wurde zum Erhalt der nativen 5-HEDH-Struktur **Glyzerin** hinzugesetzt. Die Wirkung des Polyols beruhte auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem wäßrigen Lösungsmittel, so daß eine Hydratisierung des Proteins sowie dessen Beweglichkeit in der Lösung verschlechtert und die Verfügbarkeit von Wassermolekülen für Reaktionsprozesse verringert wurden (Gekko *et al.*, 1981; Hjelmeland, 1990). Weiterhin erwies sich Glyzerin als guter Stabilisator in der Kryokonservierung, weil 5-HEDH-haltige PMN-Lysate, die glyzerinfrei bei -20 °C gelagert wurden, im Enzymstandardtest kein 5-oxo-ETE produzierten (siehe Abb. 9).

Zum Schutz der 5-HEDH und für den Erhalt der enzymatischen Aktivität, die u.a. von der Präparationstemperatur abhängen (siehe Abb. 10), war vor allem eine Inaktivierung von freigesetzten, zellulären Proteasen notwendig (Deutscher, 1990). Hierzu wurde **PMSF** (Phenylmethylsulfonylfluorid) eingesetzt, das spezifisch Serinproteasen inhibiert, indem es mit Seringruppen eine Bindung eingeht und das katalytische Zentrum des Enzyms irreversibel blockiert. Ein weiterer Effekt des Proteaseinhibitors lag auch in der Steigerung der 5-HEDH-Aktivität. Pareigis (1997) fand heraus, daß bei Anwesenheit von PMSF die 5-oxo-ETE-Produktion erhöht war. Es ist zu vermuten, daß dies auf einer verminderten Aktivität der zelleigenen Proteasen während der 5-HEDH-Präparation beruhte. Infolge der nachgewiesenen Instabilität in wäßriger Pufferlösung (James, 1977) mußte PMSF jedoch mehrmals der 5-HEDH-Präparation zugesetzt werden.

Weitere Metalloproteasen, die sich durch PMSF nicht hemmen ließen, wurden mit **EDTA** inaktiviert (Berman, 1975; Swann *et al.*, 1981). Durch Entzug von zweiwertigen Metallkationen sollte die native Proteinstruktur der Proteasen verändert und ihre enzymatische Aktivität gehemmt bzw. minimiert werden (Feinberg *et al.*, 1993). Außerdem schützt EDTA die extrahierten Proteine vor Oxidationsreaktionen. Als Chelator komplexiert es divalente Metallkationen und entzieht diese der Präparationslösung. Da die meisten Proteine eine Vielzahl an freien Sulfhydrylgruppen enthalten und unter Präparationsbedingungen inter- und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden können, wurde der Präparationslösung Di-Thio-Threitol (**DTT**) hinzugesetzt. Im Vergleich zu 2-Mercaptoethanol, das ebenfalls reduzierende Eigenschaften besitzt, bildet DTT nur einen intramolekularen Sechsring und unterbindet die Bildung von Disulfidbrücken mit Proteinen (Cleland, 1964). Da 1 mM DTT bereits zu einer ausgeprägten Inhibition

der 5-HEDH-Aktivität führt (Pareigis, 1997), wurde DTT ausschließlich für die 5-HEDH-Extraktion eingesetzt. Zur Ermittlung der 5-HEDH-Aktivität wurde dagegen eine DTT- und EDTA-freie Pufferlösung verwendet (siehe 3.5.1).

Eine Aufreinigung membrangebundener Proteine ist im allgemeinen sehr schwierig. Native Enzyme verlieren häufig ihre Aktivität, wenn sie aus ihrer lipophilen Umgebung herausgelöst werden. Dieses Phänomen demonstrierten Baron *et al.* (1975) am Beispiel einer membranassoziierten NADH-Dehydrogenase trotz Einsatz verschiedener Detergentien.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Solubilisierung der membrangebundenen 5-HEDH das nicht-ionische Detergens **Octyl- β -D-Glukopyranosid**, das bereits von Pareigis (1997) untersucht wurde, eingesetzt. Das Detergens hat ein relativ kleines Molekulargewicht und besitzt eine hohe kritische Mizellenkonzentration. Dadurch war eine effektive Beseitigung des Proteine-solubilisierenden Detergens mit Hilfe der Ultrafiltration oder HPLC möglich (Neugebauer, 1988, 1990; Goheen, 1991). Im Vergleich zu ionischen oder zwitterionischen Detergentien absorbiert Octyl- β -D-Glukopyranosid nicht an Matrixoberflächen von Ionenaustauschersäulen. Es besitzt außerdem eine geringe Absorption bei 280 nm, so daß eine Detektion im UV-Bereich während der Chromatographie nicht beeinträchtigt wird. Diese Eigenschaft des Oktyl-Glukosids wurde z.B. für die Aufreinigung einer Glukose-Transportase an einer Anionenaustauschersäule genutzt (Lundahl *et al.*, 1984). Ferner ließ sich die membrangebundene 5-HEDH mehrmals und ohne Beeinträchtigung der Enzymaktivität aus PMN-Mikrosomen herauslösen (*Daten nicht gezeigt*). Die „schonende“ Eigenschaft des Oktyl-Glukosids ließ sich auch von Stubbs *et al.* (1976) in der Untersuchung von bovinem Rhodopsin bestätigen.

Eine erfolgreiche Solubilisierung war aber von der Stabilität des untersuchten Enzyms sowie vom eingesetzten Testsystem, das durch die Detergenseigenschaften empfindlich gestört werden konnte, abhängig (Hjelmeland, 1984). So ließ sich im Vergleich zur vorliegenden Arbeit die enzymatische Aktivität einer Prolyl-Hydroxylase bereits mit 1 % Oktyl-Glukosid vollständig inaktivieren (Colquhoun *et al.*, 1983).

5.1.3 Versuche zur chromatographischen Aufreinigung der 5-HEDH

Komplexe Eikosanoidgemische wie Metabolite der Cyclooxygenase und Lipoxygenase lassen sich beispielsweise nach Zellextraktion effektiv an Normalphasen- wie auch an Umkehrphasensäulen auftrennen (Powell, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Pareigis (1997) etabliertes und unter Punkt 5.1.1 bereits erwähntes Chromatographiesystem zur Analyse und Quantifizierung der 5-HETE und 5-oxo-ETE verwendet.

Im Vergleich zur Eikosanoidauftrennung erwies sich die chromatographische Auftrennung der membrangebundenen 5-HEDH als sehr schwierig. Die enzymatische Aktivität ging insbesondere durch den Einsatz von Ammoniumsulfat in der hydrophoben Interaktionschromatographie (siehe 4.7.1) und durch den Einsatz von Acetonitril in der Umkehrphasenchromatographie vollständig verloren. Aus diesem Grunde wurden 5-HEDH-haltige PMN-Lysate an einer präparativen Anionenaustauschersäule mit schwacher Bindungskapazität (DEAE-P-Säule) aufgetrennt, die eine hohe Wiederfindungsrate der 5-HEDH in den HPLC-Fractionen bewirkte (siehe Abb. 22 und Abb. 24).

Für die chromatographische Aufreinigung der 5-HEDH wurden hauptsächlich partikelfreie PMN-Lysate (105.000 x g-Überstand) verwendet, da solubilisierete Mikrosomen nach drei bis vier Chromatographieschritten die DEAE-P-Säule trotz Einsatz eines Vorfilters vollständig verstopften. Obwohl die mikrosomalen Proben die höchste 5-HEDH-Aktivität aufwiesen (siehe Abb. 7), ließ ihre gallertartige Konsistenz und partikuläre Beschaffenheit eine effektive Auftrennung mit Hilfe des HPLC-Systems nicht zu.

Ein weiteres Kriterium für die Präferenz des partikelfreien PMN-Lysates (105.000 x g-Überstand) war auch die relative Reinheit der Probe. 5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen solubilisierter Mikrosomen (Nr. 24 – 30, Abb. 25) wiesen, verglichen mit denen aus PMN-Lysaten (Nr. 12 – 18, siehe Abb. 23), noch viele Proteinverunreinigungen auf.

Zur Stabilisierung der partiell aufgereinigten 5-HEDH und zum Erhalt der Enzymaktivität wurden HPLC-Fractionen mit ca. 10 mM Octyl- β -D-Glucopyranosid und ca. 20 % Glycerin versetzt. Da die verwendeten Stabilisatoren die Detektion im UV-Bereich empfindlich störten und die HPLC- μ -Separationsanlage (SMART[®]-Anlage) schnell verstopften, wurden sie im Verlauf der Chroma-

tographie nur mit halber Endkonzentration verwendet und bei der Endauftrennung gar nicht mehr eingesetzt. Stattdessen wurden die 5-HEDH-haltigen DEAE-P-HPLC-Fraktionen direkt weiter verarbeitet.

Die störende UV-Detektion in der Umkehrphasenchromatographie könnte auch auf eine Wechselwirkung des Detergens mit der C₂/C₁₈-Säulenmatrix (Thomas *et al.*, 1990) oder auf eine produktionsbedingte Verunreinigung des Oktyl-Glukosids, die sich im UV-Bereich zwischen 280 nm und 288 nm bemerkbar machte (Lorber *et al.*, 1990), beruhen. Ferner könnte die anfänglich beobachtete Drift der detektierten Absorptionswellenlänge auf eine Elution des viskosen Glycerins zurückzuführen sein (Chicz *et al.*, 1990).

Die präparative Auftrennung des PMN-Lysates an der DEAE-P-Säule zeigte, daß 5-HEDH in zwei Gradientenabschnitten eluiert wurde. Bezüglich der gesamten 5-HEDH-Aktivität im Eluat ließen sich 16,9 % zwischen 23 – 28 min und 83,1 % zwischen 36,5 – 44 min nachweisen (siehe Abb. 22).

Im Gegensatz dazu wiesen solubilisierte Mikrosomen nach der DEAE-Chromatographie nur einen Elutionsbereich mit 5-HEDH-Aktivität auf. Die 5-HEDH-haltige HPLC-Fraktion wurden mit ca. 4 min Verzögerung zwischen 40 min und 47 min eluiert (siehe Abb. 24). Die Verschiebung der Retentionszeit könnte möglicherweise auf eine schwächere Bindungseigenschaft der DEAE-P-Säule, die durch Oktyl-Glukosid, Glycerin oder durch die gallertartige Konsistenz der mikrosomalen Probe hervorgerufen wurde, beruhen. Da außerdem davon auszugehen war, daß solubilisierte Mikrosomen gegenüber PMN-Lysaten weniger kontaminierende Fremdproteine enthielten, lag eine Überladung des Anionenaustauschers (DEAE-P-Säule) nicht vor. 5-HEDH konnte mit höherer Effizienz an der DEAE-P-Säule binden und im distinkten Gradientenabschnitt eluiert werden. Diese bessere Bindungseigenschaft machte sich durch den Verlust des 5-HEDH-haltigen Elutionsbereiches zwischen 23 – 28 min bemerkbar.

Die relative 5-HEDH-Menge der separierten HPLC-Fraktionen ließ sich am Ausmaß der 5-oxo-ETE-Bildung und in der Proteinverteilung und Bandenintensität in der Tricine-SDS-Gelelektrophorese bestimmen. So war zu vermuten, daß 5-HEDH im Polyacrylamidgel mit einer Größe von 29 – 45 kDa wie auch zwischen 66 kDa und 97,4 kDa migrierte.

Zusätzliche Proteinbanden, die in 5-HEDH-aktiven DEAE-P-Fraktionen von Mikrosomenüberständen nachzuweisen waren und mit der Intensität der 5-HEDH-

Aktivität korrelierten (DEAE-P-Fraktion Nr. 24 – 30; siehe Abb. 25), mußten als Verunreinigungen betrachtet werden. Diese Proteine besaßen Molekulargrößen kleiner als 29 kDa und ließen sich im Vergleich zu 5-HEDH-aktiven DEAE-P-HPLC-Fractionen von PMN-Lysaten nicht im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel identifizieren (siehe Abb. 23).

Eine Wiedergewinnung der 5-HEDH aus vorgereinigten, enzymatisch aktiven DEAE-P-Proben war nach dem zweiten Chromatographieschritt im μ -HPLC-System sehr schwierig. Eine Probe, die beispielsweise aus einer Mischung von zwölf aktiven DEAE-P-Fractionen bestand (R_t : 39 – 41 min; siehe Abb. 22), besaß nach Auftrennung an der Mini-Q-Säule nur noch 3,2 % der anfangs vorkommenden 5-HEDH-Aktivität. Der hohe Verlust an Enzymaktivität, der sich durch schwache Proteinbanden im Polyacrylamidgel bemerkbar machte (Mini-Q-Fraktion Nr. 27 und 28, siehe Abb. 27), war vermutlich auf eine unspezifische Adsorption an der Ultrafiltrationsmembran während der Zwischenreinigung (Blatt, 1971) oder auf die starke Bindungskapazität der Mini-Q-Säulenmatrix zurückzuführen. Lediglich die Mini-Q-Fraktion Nr. 26, in der sich 1,6 % der applizierten Enzymaktivität wiederfand, wies schwach gefärbte Banden entsprechend 24 kDa- und 66 kDa-Proteinen auf. Diese Proteinbanden hatten offensichtlich keinen Einfluß auf die 5-HEDH-Aktivität, weil sie in den aktivitätsfreien Mini-Q-Fractionen (Nr. 24, 25) ebenfalls identifiziert worden waren. Der hohe 5-HEDH-Verlust (ca. 97,6 %), der sich durch schwache Proteinbanden im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel bemerkbar machte (siehe Abb. 27, Fraktion-Nr. 26 – 28), könnte vermutlich aus der Vorsäulenextraktion stammen, da die Mini-Q-Fractionen vor der SDS-Gelelektrophorese 5-HEDH-Aktivitäten aufwiesen. Durch die zuvor nachgewiesene Enzymaktivität wäre zu vermuten, daß nach jedem Reinigungsschritt ein Großteil der präparierten 5-HEDH verloren ging.

5-HEDH, das während der Mini-Q-Auftrennung in Zeitintervallen von 5 – 20 min eluiert worden war (siehe Abb. 26 und Abb. 28b), ließ sich nach Untersuchungen von Pareigis (1997) im breiten Elutionsbereich zwischen 7,8 – 26,2 min und mit einer Wiederfindungsrate von 14 - 33 % aufreinigen. Im Vergleich dazu lag die Wiederfindungsrate der 5-HEDH unter Einsatz von Stabilisatoren nur zwischen 9 % und 19 %. Die 5-HEDH-Auftrennung, die sich generell in einem breiten Aktivitätsbereich widerspiegelte, könnte auf eine Überladung der Trennungssäule beruhen. Ferner könnte die schlechtere Auftrennung durch die

partikuläre Eigenschaft der von Pareigis (1997) applizierten Probe oder auf eine „Maskierung“ der Säulenoberfläche durch Schutzsubstanzen stammen.

Um das μ -HPLC-System vor potentiellen, partikulären Bestandteilen zu schützen, wurden in der vorliegenden Arbeit nur ultrazentrifugierte 5-HEDH-Präparate (105.000 x g-Zellysate) für die chromatographische Auftrennung verwendet. 26.000 x g-Zellysate, die Pareigis (1997) für chromatographische Aufreinigungen verwendete, wurden nicht eingesetzt. Weiterhin wurden Stabilisatoren, wenn sie benötigt wurden, erst nach der HPLC-Fraktionierung hinzugesetzt. Während 5-HEDH ohne Überladung der Trennungssäule in den Mini-Q-HPLC-Fractionen kaum nachzuweisen war, ließ sich die enzymatische Aktivität nach der Umkehrphasenchromatographie nicht mehr bestimmen. 5-HEDH, die über hydrophobe Wechselwirkung an der C_2/C_{18} -Säule gebunden wurde, wurde unter Einsatz von Acetonitril und Trifluoressigsäure vollständig denaturiert. Eine Inaktivierung der 5-HEDH durch organische Lösungsmittel wurde bereits in den Voruntersuchungen bestätigt (siehe 4.3.4). Die 5-oxo-ETE-Bildung ließ sich mit 10 %iger Acetonitril-Lösung zu 14 % und mit 80 %iger Acetonitril-Lösung vollständig inhibieren. Eine Renaturierung der 5-HEDH im Reaktionspuffer führte zu einem Verlust der Enzymaktivität. Daher wurde zum einen unreines, enzymatisch aktives 5-HEDH aufgereinigt oder relativ sauberes, aber dafür inaktives 5-HEDH mit Hilfe der Umkehrphasenchromatographie separiert. Die Einzelbestandteile der 5-HEDH-haltigen HPLC-Fractionen ließen sich anschließend im Elektrophorese-Experiment nach der relativen Verteilung der Proteinbanden mit der zuvor ermittelten 5-HEDH-Aktivität nachweisen.

Infolge der irreversiblen Denaturierung durch Acetonitril wurde 5-HEDH-Präparate (Zellysate) auch an Affinitätssäulen, die nach dem Prinzip der spezifischen Antikörperbindung mit ihren natürlichen Liganden beruhte, aufgetrennt (Ostrove, 1990). Hierzu wurden 5-HEDH-haltige PMN-Lysate von Laktotransferrin und β -Aktin mit Hilfe von immobilisierten, monoklonalen und polyklonalen Antikörpern befreit und an einer DEAE-P-Säule aufgereinigt. Die sukzessive Depletierung von Laktotransferrin und β -Aktin an den jeweiligen Affinitätssäulen beeinträchtigte die 5-oxo-ETE-Bildung des Eluates nur wenig. Der Aktivitätsverlust lag bei 14 % und 29 % (siehe Abb. 42 und Abb. 43). Es ist daher auszuschließen, daß weder β -Aktin noch Laktotransferrin Bestandteile der 5-HEDH sind. Durch die partielle Verringerung von Laktotransferrin und β -Aktin

verschwand die opaleszierende Eigenschaft des PMN-Lysates. Zusätzlich wiesen vorgereinigte PMN-Lysate in der DEAE-P-Chromatographie eine schwächere UV-Absorption bei 280 nm auf (vgl. Abb. 22). Es ist zu vermuten, daß 5-HEDH effektiv an der Affinitätssäule aufgetrennt und nach Ermittlung der Enzymaktivität im distinkten Elutionsbereich zwischen 36 min und 43 min detektiert wurde (siehe Abb. 44).

Der höhere Aufreinigungsgrad zeigte sich vor allem im Tricine-SDS-Polyacrylamidgel. Die 5-HEDH-haltigen, Laktoferrin- und β -Aktin-freien DEAE-P-HPLC-Fractionen (Nr. 14 – 18, siehe Abb. 45) enthielten, verglichen mit denen der unbehandelten DEAE-P-HPLC-Fractionen Nr. 12 – 18 (siehe Abb. 23), nur wenig verunreinigende Proteine. 5-HEDH konnte den Molekulargewichten von 29 – 45 kDa bzw. 66 – 97,4 kDa nicht zugeordnet werden (vgl. Abb. 23 und Abb. 25), sondern korrelierten eher mit Proteinbanden um 70 – 116 kDa-Größe (siehe Fraktion Nr. 15 – 17, siehe Abb. 45). Die Verzögerung der elektrophoretischen Mobilität hatte vermutlich mehrere Ursachen. Einerseits war es möglich, daß 5-HEDH durch Entfernung von störenden Bestandteilen eine schwächere negative Oberflächenladung aufweist und dadurch langsamer zur Anode wandert. Andererseits war eine Selbstaggregation der hydrophoben 5-HEDH zu Di- und Multimeren denkbar (van Renswoude *et al.*, 1984), so daß die elektrophoretische Mobilität aufgrund der veränderten *Stoke'schen Radien* minimiert wurde.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 5-HEDH-Kinetik

Bei der Bildung von 5-oxo-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-ETE ist die stereospezifische Oxidation der 6-*trans* Doppelbindung im 5-(*S*)-Hydroxy-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-ETE-Molekül durch die 5-HEDH notwendig. Eikosanoide, die eine Hydroxylgruppe am C₈-, C₉-, C₁₁-, C₁₂- oder C₁₅-Atom aufweisen, lassen sich dagegen nicht metabolisieren (Powell *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die Substrat-Umsatzgeschwindigkeit bestimmt und die Enzymkinetik der 5-HEDH nach Michaelis-Menten sowie nach *Lineweaver-Burk* und *Eadie-Hofstee* untersucht. Als Funktion der Substratlimitierung war ein lineares Verhältnis zwischen eingesetzter Zellzahl (bis 8×10^6 PMN) und produzierter 5-oxo-ETE-

Menge festgestellt worden (siehe Abb. 16). Die Bildungsrate, auf die sich die Enzymeinheit [1 Unit = 1 pmol 5-oxo-ETE/min/mg Protein] pro 1×10^6 PMN bezog, stellte diese Korrelation deutlicher dar. Diesbezüglich zeigten die auf 5-HEDH untersuchten Reaktionsansätze zwischen $1 - 100 \times 10^6$ PMN eine transient verlaufende 5-oxo-ETE-Produktion (siehe Abb. 17). Als standardisierte Bedingungen wurde $2 \mu\text{M}$ 5-(S)-HETE-Substrat, eine Temperatur von 40°C und eine Reaktionszeit von 20 min gewählt. Eine Steigerung der 5-oxo-ETE-Produktion (bis zu 360 pmol/h), die auch zur Optimierung des Enzymstandardtests (siehe 3.5) wichtig war, ließ sich durch Verlängerung der Reaktionszeit erzielen. Jedoch war diese Methode für einen schnellen Aktivitätsnachweis ungeeignet (siehe Abb. 18).

Die enzymkinetische Analyse der 5-HEDH zeigte je nach Auswertungsmethode unterschiedliche K_M - und V_{\max} -Werte. Nach der Michaelis-Menten-Kinetik lagen die V_{\max} - und K_M -Werte bei ca. $0,2 \text{ pmol/s}$ und $1,3 \mu\text{M}$. Diese Daten waren um den Faktor $2 - 3,4$ niedriger als nach der Lineweaver-Burk-Auswertung (V_{\max} : $0,4 \text{ pmol/s}$ und K_M : $4,4 \mu\text{M}$) und $1,25 - 1,8$ -fach niedriger als in der Eadie-Hofstee-Darstellung (V_{\max} : $0,25 \text{ pmol/s}$ und K_M : $2,4 \mu\text{M}$). Im Vergleich dazu bestimmte Pareigis (1997) für 5-(S)-HETE ein V_{\max} von $0,9 \text{ pmol/min}/\mu\text{g}$ Protein sowie einen K_M -Wert von $1,5 \mu\text{M}$. Der K_M -Wert lag im Vergleich zur Michaelis-Menten-Kinetik hier um den Faktor $0,8$ höher, vergleichend zum Lineweaver-Burk-Plot hingegen $1,6 - 2,9$ -fach niedriger. Desweiteren ermittelten Powell *et al.* (1992) einen V_{\max} -Wert von $0,5 \text{ pmol/min}/\mu\text{g}$ Protein und einen K_M -Wert von $0,2 \mu\text{M}$. Im Hinblick auf die Lineweaver-Burk-Darstellung ließen sich K_M -Werte von $0,2 - 4,4 \mu\text{M}$ und V_{\max} -Werte von $0,4 \text{ pmol/s}$ bzw. $0,5 - 0,9 \text{ pmol/min}/\mu\text{g}$ Protein bestimmen. Die nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Darstellung zeigt die beste theoretische Annäherung an den asymptotischen Verlauf einer Kurve. Die Darstellung liefert Ergebnisse, die sich Werten des V -[S]-Diagramms am stärksten annähert. Ergebnisse aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm oder der Eadie-Hofstee-Darstellung, zweier Methoden zur Linearisierung der Michaelis-Menten-Kinetik, zeigen, daß bereits geringe Darstellungsabweichungen zu völlig anderen Ergebnissen führen. Die unterschiedlichen Werte sind möglicherweise eine Folge der verschiedenartig durchgeführten Präparationen der 5-HEDH. Pareigis (1997) verwendete PMN-Lysate nach der $26.000 \times g$ -Zentrifugation, wohingegen Powell

et al. (1992) mikrosomale Proben, die zuvor ultrabeschallt und bei 200.000 x g abzentrifugiert worden waren (fraktionierte Zentrifugation), untersuchten. Darüber hinaus lagen verschiedene Bedingungen im Aktivitätsnachweis vor. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die enzymatische Reaktion bei 40 °C mit 10 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0). Pareigis (1997) führte den Enzymstandardtest bei 37 °C mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 9,0) durch, und Powell *et al.* (1992) setzten hingegen eine pH 7,4-gepufferte Phosphatlösung mit diversen Salzen ein.

5.2.2 Nachweis von α -Aktinin-1, Aktin und α -Aktin in 5-HEDH-Präparationen

Die enzymatische Aktivität der 5-HEDH ließ sich nach der Umkehrphasenchromatographie nicht mehr nachweisen, weil das als Elutionsmittel verwendete Acetonitril die 5-HEDH-Proteinstruktur verändert hatte. Hinweise hierfür lieferten die Untersuchungen zur Hemmung der Enzymaktivität durch organische Lösungsmittel (siehe 4.3.4). Relativ sauberes, aber dafür inaktives 5-HEDH konnte nur mittels UV-Detektion (siehe Abb. 31 und Abb. 34) oder über die Intensität der gefärbten Proteinbanden im Elektrophorese-Experiment (siehe Abb. 32 und Abb. 35) zugeordnet werden. Nach dem Lys C-Endoprotease-Abbau und der Chromatographie an einer C₂/C₁₈-HPLC-Säule wurden Peptidfragmente der 5-HEDH-haltigen HPLC-Fractionen einem Edman-Abbau unterzogen. Die untersuchten Peptidfragmente ließen sich in der FASTA-Proteindatenbank als α -Aktinin-1 (siehe Abb. 33), Aktin und α -Aktin identifizieren (siehe Abb. 36).

α -Aktinin-1 ist ein aktinbindendes, quervernetztes Protein, das mit dem Zytoskelett-System ein komplexes, zelluläres Netzwerk bildet. Durch Bildung von röhrenförmigen, filamentösen Mikrotubuli wird die Zelle im Inneren mit Nährstoffen und Partikeln versorgt. Aktinfilamente bilden daneben die Dynamik und Form einer Zelle und tragen durch Depolymerisations- und Polymerisationsprozesse zur Zellkontraktion, -teilung und -mobilität bei (Pettit *et al.*, 1998; Sánchez-Madrid *et al.*, 1999). Ferner stellten Sawyer *et al.* (2001) in humanen Endothelzellen fest, daß eine Zerstörung der Mikrofilamente zur Freisetzung von PGE₂ und PGI₂ führt. Inwiefern Aktin die Eikosanoidbildung in diversen Blutzellen moduliert und die spezifische 5-HEDH-Aktivität bzw. die 5-oxo-ETE-

Synthese reguliert, ist nicht bekannt. Die mikrosomale 5-HEDH oder das bereits intrazellulär gebildete 5-oxo-EETE könnten durch „Reorganisation von Aktinfilamenten“ aktiviert und freigesetzt werden. Die Absorptionsfähigkeit des Aktins an 5-HETE und der Rückgang der proinflammatorischen Eikosanoidwirkung ließ sich bereits in RBL-1-Zellen nachweisen (Kang *et al.*, 1998). Daß das „Aktin-System“ (α -Aktinin, Aktin und α -Aktin) keine 5-HEDH- oder enzymatisch ähnliche Aktivität besitzt, zeigten Depletierungen von β -Aktin mit Hilfe der Anti- β -Aktin-Affinitätssäule (siehe Abb. 42). Die 5-HEDH-Aktivität ging nach Depletierung von β -Aktin auf 14 % zurück. Aktin ist demnach nicht enzymatisch aktiv, jedoch essentiell für die Bildung von 5-oxo-EETE.

5.2.3 Nachweis von Protein Kinase C-Inhibitor Protein-1 (KCIP-1 bzw. 14-3-3) in 5-HEDH-Fraktionen

In einem weiteren 5-HEDH-haltigen Fraktionsgemisch (siehe Abb. 34) wurde das 14-3-3 Protein nachgewiesen. 14-3-3 Protein, das auch als „Protein Kinase C Inhibitor Protein-1“ (KCIP-1) bezeichnet wird, ließ sich in den Isoformen *epsilon* und *eta* identifizieren (siehe Abb. 37). Es besitzt ein Molekulargewicht von 28 – 33 kDa und dient u.a. als regulatorisches Element des intrazellulären Signalweges bei der Exozytose und der Regulation des Zellzyklus. 14-3-3 Protein, das zu einer spontanen Selbstaggregation neigt und dabei Dimere bildet (Liu *et al.*, 1995), bindet insbesondere an phosphoserin-/phosphothreoninhaltigen Proteinbereichen seiner Zielproteine. Unter Beteiligung einer Calmodulin Kinase II aktiviert das 14-3-3 Protein z.B. die Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylase oder inhibiert die „Apoptose Signal-regulierende Kinase 1“. Die Regulation des Signalweges kann ebenso direkt über die Phosphorylierung des 14-3-3 Proteins erfolgen. Hierbei können Sphingosin-abhängige Protein Kinase 1, Casein Kinase 1 oder Protein Kinase C (PKC) beteiligt sein (Xiao *et al.*, 1995). Aufgrund der direkten Phosphorylierung werden Zielproteine vor einer Proteolyse oder Dephosphorylierung geschützt (Tzivion *et al.*, 2001). O’Flaherty *et al.* (1987) wiesen außerdem nach, daß die Translokation der zytosolischen PKC in die Zellmembran über eine intrazelluläre Kalzium-Freisetzung durch 5-HETE induziert wird. Da das 14-3-3 Protein hauptsächlich regulatorische Funktionen im zellulären Signalweg besitzt

und in der Literatur bislang keine Dehydrogenase-ähnliche Wirkung für das Protein beschrieben wurde, kann das 14-3-3 Protein als Verunreinigung des 5-HEDH-haltigen Fraktionsgemisches angesehen werden.

5.2.4 Nachweis von Calgranulin A und Calgranulin B in 5-HEDH-Fractionen

5-HEDH-aktive DEAE-P-HPLC-Fractionen wurden in einer weiteren Untersuchung direkt an einer C₂/C₁₈-HPLC-Säule aufgetrennt (siehe Abb. 38). Ausgewählte C₂/C₁₈-HPLC-Fractionen, die in dieser Umkehrphasenchromatographie eine ausgeprägte UV-Absorption bei 215 nm zeigten und vermutlich 5-HEDH enthielten, wurden dem Edman-Abbau unterzogen. Die Ergebnisse der Aminosäuresequenz-Analyse ergaben, daß die untersuchten HPLC-Fractionen u.a. Calgranulin A und Calgranulin B enthielten. Diese anionischen Proteine werden konstitutiv im Zytosol neutrophiler Granulozyten und von Monozyten (Hessian *et al.*, 1993) sowie nach Aktivierung von Makrophagen und Epithelzellen gebildet (Brandtzaeg *et al.*, 1995, Ross *et al.*, 2001). Calgranulin A und B, die auch als MRP8 und MRP14 (Odink *et al.*, 1987) bzw. S100A8 und S100A9 (Zimmer *et al.*, 1995) beschrieben worden sind, besitzen antimikrobielle Wirkung gegenüber Bakterien und Pilzen (Sohnle *et al.*, 1996; 2000a). Diese antimikrobielle Eigenschaft beruht auf einer Heterodimerbildung, wonach essentielle Zink-Kationen entzogen und das Wachstum von pathogenen Erregern gehemmt werden (Sohnle *et al.*, 2000b). Außerdem postulierten Nisapakultorn *et al.* (2001), daß die antimikrobielle Wirkung des Calprotektins auf eine verstärkte Zelloberflächenpräsentation beruht und damit auf einer Reduktion der Bindungsmöglichkeit des Erregers zurückzuführen sei. Obwohl MRP8 und MRP14 in der Literatur als 8 kDa und 14 kDa große Proteine beschrieben worden sind (Kojima *et al.*, 2000), wurde MRP14 mit einer Molekulargröße von ca. 55 kDa identifiziert (siehe Abb. 39). Die MRP8-haltige C₂/C₁₈-HPLC-Fraktion enthielt dagegen Proteine, die kleiner als 29 kDa waren (siehe Abb. 40). Die Diskrepanz im Größenunterschied, die vermutlich auf eine Multimerbildung beruht, wurde von Teigelkamp *et al.* (1991) bestätigt. Die kalziumabhängigen Proteinkomplexe wurden als Heterotrimer [(MRP8)₂(MRP14)₁] und als Heterotetramer

[(MRP8)₂ · (MRP14)₂] mit jeweils 35 kDa und 48,5 kDa Größe identifiziert (Teigelkamp *et al.*, 1991). Möglicherweise führen die gewählten Elektrophoresebedingungen (siehe 3.11) zu einer multimeren Komplexbildung der MRP14. Inwieweit 5-HEDH aber durch MRP8 und MRP14 beeinflusst werden könnte, ist nicht bekannt. Ein Nachweis anhand von Depletierungsversuchen konnte nicht durchgeführt werden, weil z.Z. der Untersuchung Calgranulin-Antikörper nicht kommerziell angeboten wurden. In der Literatur wurde jedoch beschrieben, daß MRP14 die transendotheliale Migration humaner Monozyten reguliert (Kerkhoff *et al.*, 1999a). Ferner wurde festgestellt, daß der heterodimere MRP8/14-Komplex Arachidonsäure bindet. Dagegen ließ sich die Bindungskapazität der Monomeren MRP8- und MRP14-Proteine nicht bestätigen (Siegenthaler *et al.*, 1997). Es ist zu vermuten, daß der MRP8/14-Komplex in Entzündungsprozessen als Transportprotein für Arachidonsäure dient (Kerkhoff *et al.*, 1999b). Ein Zusammenhang zwischen Calgranulin und an Endzündungsprozeß beteiligter Enzyme ist bereits beschrieben worden. Diebezüglich wiesen Lemarchand *et al.* (1992) nach, daß die Translokation des MRP8/14-Komplexes mit einer Sauerstoffradikalbildung durch NADPH-Oxidase korreliert. Diese enzymatische Aktivität ist kalzium- und magnesiumabhängig (Clark *et al.*, 1987) und benötigt u.a. einen stabilen Komplex aus Flavocytochrom *b* und Kofaktoren wie p47^{phox}, p67^{phox} und das GTP-bindende Protein Rac2 (Heyworth *et al.*, 1994; Cross *et al.*, 1999, 2000). Der MRP8/14-Komplex könnte in der Funktion eines Transportproteins (Kerkhoff *et al.*, 1999a, 1999b) die Aktivität der NADH-Oxidase und wahrscheinlich auch die der 5-HEDH beeinflussen, so daß auch Aktin, das bereits als Verunreinigung von 5-HEDH-haltigen Proben identifiziert worden war, in Transportprozessen bei der 5-oxo-ETE-Bildung beteiligt wäre. Ein Indiz hierfür stellt die Bindungsstelle für Ezrin im MRP8/14-Komplex dar. Ezrin, das zur ERM-(Ezrin, Radixin, Moesin)-Familie der Membran-Zytoskelett-Ankerproteine gehört, ist in der intrazellulären Domäne des MRP8/14-Komplexes vorzufinden (Dickson *et al.*, 2002).

Obwohl Aktin selbst keine enzymatische Wirkung besitzt, liegt die Vermutung aber nahe, daß die 5-HEDH-Aktivität neben MRP8 und MRP14 noch von einer „Ca²⁺- und Aktin-Reorganisation“ abhängig ist. Eine Erhöhung der 5-oxo-ETE-Bildung ließ sich mit submolarer Kalziumkonzentration steigern (siehe Abb. 46). Die enzymatische Aktivität nahm bei einer artifiziellen Zugabe von mehr als

20 mM Kalziumchlorid zum Reaktionsansatz jedoch wieder ab. Im Vergleich dazu beeinträchtigten Magnesium und Zink die 5-HEDH-Aktivität nicht (siehe Abb. 47 und Abb. 49). Eisen-(II)-Kationen störten hingegen die 5-oxo-ETE-Produktion erheblich (siehe Abb. 48). Die Inhibition der enzymatischen Aktivität könnte durch eine Veränderung des pH-Wertes hervorgerufen worden sein. Ebenso wäre eine Ausfällung des 5-HEDH-Proteins möglich, da sich während der Inkubation Präzipitate bildeten. EGTA, das Ca^{2+} spezifisch komplexiert und der Reaktionslösung unzugänglich macht, hemmt in hoher Konzentration ebenfalls die 5-HEDH-Aktivität (siehe 4.14). Eine hohe 5-oxo-ETE-Bildung war lediglich zwischen 2 – 5 mM EGTA festgestellt worden (siehe Abb. 51). Die Hemmung der enzymatischen Aktivität zeigte sich auch bei EDTA (siehe Abb. 50).

5.2.5 Hemmung der 5-HEDH-Aktivität durch Calmidazoliumchlorid

Um abschätzen zu können, inwieweit Aktin, Kalzium und das „Arachidonsäure-Transporterprotein“ MRP8/14 die 5-HEDH-Aktivität beeinflussen, wurde die Wirkung von Calmidazoliumchlorid untersucht. Da in der Literatur bereits ein Zusammenhang zwischen Steroidsynthesen, Reorganisation von Zytoskelett-Komponenten und Ca^{2+} /Calmodulin beschrieben worden ist (Hall, 1997), könnte dies auch für die Bildung von 5-oxo-ETE zutreffen. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch Calmidazoliumchlorid (siehe Abb. 52) bestätigten diese Hypothese. Dieser spezifische, gegen Calmodulin gerichtete Inhibitor hemmt sigmoidal mit steigender Konzentration die 5-HEDH-Aktivität. Die Hemmung durch Calmidazoliumchlorid wurde ebenfalls bei einer Olefinreduktase beobachtet (Berhane *et al.*, 1998). Die enzymatische Aktivität, die sich in der Reduktion von 5-oxo-(6*E*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-ETE zu 6,7-Dihydro-Metaboliten zeigte, ließ sich mit dem spezifischen Calmodulin-Antagonisten unterdrücken. Obwohl die Olefinreduktase im Zytosol lokalisiert ist und 5-HEDH mikrosomal vorliegt, könnten beide Enzyme potentiell von Calmodulin beeinflusst werden. Das Olefinreduktase-System könnte zur Inaktivierung von 5-oxo-ETE dienen, wohingegen 5-HEDH die Bildung von bioaktiven 5-oxo-Eikosanoid-Mediatoren fördert.

5.2.6 Nachweis von Laktoferrin in 5-HEDH-Fractionen

Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde nach der Auftrennung eines 5-HEDH-haltigen Präparates an einer C₂/C₁₈-HPLC-Säule neben Calgranulin (siehe 5.2.4) auch Laktoferrin nachgewiesen (siehe Abb. 38 und Abb. 41). Das Molekulargewicht des Laktoferrins von ca. 80 kDa stimmte dabei mit der in der Literatur angegebenen Masse überein. De Lillo *et al.* (1992) wiesen z.B. eine Proteinbande mit etwa 78 kDa nach. Brock (2002) identifizierte dagegen Laktoferrin als ein ca. 80 kDa großes Glykoprotein. Nach Depletierung von Laktoferrin aus einem 5-HEDH-haltigen Präparat ließen sich nur geringe Veränderungen der Dehydrogenase-Aktivität feststellen. Zwar ließ sich 5-oxo-ETE trotz Depletierung von Laktoferrin an einer mit Anti-Laktoferrin beschichteten Affinitätssäule nachweisen (siehe Abb. 41). Jedoch war ein Aktivitätsverlust von ca. 29 % die Folge. Die Abnahme der enzymatischen Aktivität wurde auf eine unbeabsichtigte Verdünnung der Probe durch das Elutionsmittel hervorgerufen und war nicht auf Laktoferrin zurückzuführen. Wie bei den zuvor identifizierten Proteinen (14-3-3-Protein, MRP8 und MRP14) wird auch die Freisetzung und Aktivierung des Laktoferrins über Calmodulin reguliert. Laktoferrin, das ubiquitär vorkommt und in großen Mengen in der Milch nachzuweisen ist, zeigt neben seiner antibakteriellen und antimykotischen Wirkung auch eine hemmende Eigenschaft bei Viren und Parasiten (Conneely, 2001; van der Strate *et al.*, 2001; Wakabayashi *et al.*, 2003). Die mikrobielle Abwehr beruht in erster Linie auf einer Inhibition der Biofilmbildung (Singh *et al.*, 2002). Dabei werden essentielle Eisenkationen durch freigesetztes Laktoferrin inkorporiert, wodurch die Bildung von Bakterienkolonien unterbunden und das Bakterienwachstum unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu postulierten van der Strate *et al.* (2001) für die virale Abwehr eine Inkorporation des Viruspartikels durch das Laktoferrin selbst und eine Blockierung des Zellrezeptors in der Frühphase der Infektion.

5.2.7 Massenspektrometrischer Nachweis einer putativen NADH-Dehydrogenase in 5-HEDH-Fractionen

Um die putative NADH-Dehydrogenase in nativer Form untersuchen zu können, wurden partiell aufgereinigte 5-HEDH-Fractionen unmittelbar nach Auftrennung an einem Anionenaustauscher alkyliert, mit Hilfe der Lys-C-Endoprotease verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Eine zusätzliche Auftrennung an der C₂/C₁₈-HPLC-Säule wurde nicht durchgeführt.

Die Recherchen in der FASTA-Proteindatenbank ergaben, daß die identifizierten Aminosäuresequenzen „DLAALVVDNGSG“ (siehe Abb. 53) und „APARVFPSLS“ (siehe Abb. 54) dem humanen β -Aktin und einem Peptidfragment, das zu 80 % mit einer NADH-Ubichinon Oxidoreduktase aus dem Rind (*Bos taurus*) bzw. zu ca. 77,8 % mit einer eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase aus *Schizosaccharomyces pombe* übereinstimmte, entsprachen.

Obwohl das humane Genom heute vollständig aufgeklärt ist, ließ sich die identifizierte Aminosäuresequenz „APARVFPSLS“ keinem bekannten Protein des Menschen zuordnen. Die ermittelte Peptidsequenz deutet jedoch die Zugehörigkeit zu einer funktionell ähnlichen Enzymklasse des Menschen an. Diese humane NADH-Ubichinon Oxidoreduktase, die eine essentielle Funktion im Elektronentransport besitzt, könnte auch möglicherweise die Umsetzung von 5-(S)-HETE zu 5-oxo-ETE katalysieren. Die Recherche in der Proteindatenbank „Swiss-Prot/TrEMBL“ zeigte, daß sich die ersten vier Aminosäuren „APAR“ sowie die letzte Aminosäure „S“ in einer 6 kDa-großen, mitochondrialen NADH-Ubichinon Oxidoreduktase des Menschen, deren Gensequenz auf Chromosom 4 lokalisiert ist, wiederfinden lassen (APARLPSGPS; Accession NP_002485; [gi: 4505367]). Andere humane NADH-Ubichinon Oxidoreduktasen, die ebenfalls mit Hilfe der Proteindatenbank verglichen wurden, wiesen entweder keine oder nur eine Übereinstimmung mit dem Aminosäuretriplett „APA“ auf. Ferner hatte die Sequenzrecherche ergeben, daß einige Aminosäurepaare auch im humanen „Zinkfingerprotein“ vorkommen (APARKFPT SAPGSLS; Accession Q9UPU6; [gi: 28380242]). Da ein induktiver Effekt für 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE vermutet wird, wäre eine Regulation der Gentranskription durch die putative NADH-Dehydrogenase, von der hier eine Teilsequenz identifiziert wurde, nicht auszuschließen.

Außerdem wies die Vergleichsuntersuchung darauf hin, daß das native Protein des identifizierten Peptidfragments „APARVFPSLS“ eine putative Bindungsstelle für Guanosintriphosphat (GTP) besitzen oder zu einem engen GTP-bindenden Proteinkomplex gehören könnte. Ein Indiz dafür waren die Aminosäuren „APARxF“, die ebenfalls im humanen GTP-Bindungsprotein nachzuweisen sind (Accession: Q9H4K7; [gi: 32469779]). Im Originalprotein des GTP-Bindungsproteins nimmt jedoch Cystein (C) die Position von Valin (V) ein; siehe x. Die putative Bindungsstelle für GTP ist hinsichtlich der Signaltransduktion insofern interessant, weil das Enzymsubstrat (5-(S)-HETE) wie auch das Enzymprodukt (5-oxo-ETE) der putativen Dehydrogenase über einen GTP-gekoppelten Zellrezeptor wirkt.

Die Ursache für die Diskrepanz zwischen identifizierter und recherchierter Peptidsequenz ist vermutlich auf einen Fehler bei der Sequenzierungsmethode zurückzuführen. Es kann in manchen Fällen vorkommen, daß Analysen aufgrund einer starken Verunreinigung der Probe Fehlsequenzen induzieren. Zudem könnte durch Punktmutation im entsprechenden 5-HEDH-Gen bzw. durch Polymorphismus, der bislang für dieses Enzym unentdeckt blieb, eine Identifikation verhindern. Daher ist aus heutiger Sicht eine Zuordnung des identifizierten Peptids zu einem bekannten Protein des Menschen nicht möglich. Zwar ist das humane Genom vollständig sequenziert worden, viele Funktionen von translatierten Proteinen sind aber noch weitgehend unbekannt.

Der Nachweis, daß die ermittelte Aminosäuresequenz ein Peptidfragment der gesuchten 5-HEDH war, ließ sich auch mit Hilfe der RACE-PCR-Technik bislang nicht klären. Die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifizierung des Gens für die kodierende Aminosäuresequenz „APARVFPSLS“ waren womöglich zu stark degeneriert. Es wurde auch vermutet, daß 5-HEDH zur Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short chain dehydrogenase/reductase; SDR) bzw. kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenasen (short chain alcohol dehydrogenase; SCAD) gehört. Diese Enzymgruppen stellen eine Vielzahl an hoch divergenten Enzymen dar, die abhängig vom Redoxstatus des beteiligten Kofaktors Oxidations- oder Reduktionsprozesse katalysieren (Persson *et al.*, 1995). Viele Vertreter der SDR/SCAD-Superfamilie sind wie die 5-HEDH in den subzellulären Membranen lokalisiert. Einige Dehydrogenasen/Reduktasen können auch im Zytosol exprimiert vorliegen. SDR/SCAD weisen untereinander eine Ähnlichkeit

von 15 – 30 % auf (Jörnvall *et al.*, 1995). Die Homologie beschränkt sich auf streng konservierte Peptidabschnitte im Molekül. Die katalytische Region setzt sich z.B. aus einer Aminosäuresequenz von Tyrosin (**Y**) und Lysin (**K**) zusammen (**YxxxK**). Dagegen bildet ein am Aminoterminus liegender, Glycin-reicher Peptidabschnitt (**GxxxGxG**) die Bindungsstelle für NAD(H) bzw. NADP(H) (Scrutton *et al.*, 1990). Dazwischen liegende Aminosäuren (x) können beliebig variieren. Viele Vertreter der SDR/SCAD-Familie sind in der Literatur beschrieben worden. cDNAs der Retinol-Dehydrogenase und deren translatierten Produkte ließen sich bereits exprimieren und klonieren (Chai *et al.*, 1995a, 1995b). Simon *et al.* (1999) stellten zudem fest, daß 11-*cis* RoDH am glatten Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, und daß die katalytische Protein-Domäne in das Lumen des Kompartimentes hinein ragt. Aufgrund dieser Beobachtung ist zu vermuten, daß die Aktivität der 11-*cis* RoDH mit einem Kompartimentierungsprozeß verbunden ist. Dieser Prozeß könnte die „Aktin-Reorganisation“ unter Beteiligung von Ca^{2+} /Calmodulin bei der 5-oxo-ETE-Bildung bestätigen, da 5-HEDH auch als ein mikrosomales, membrangebundenes Enzym beschrieben worden ist (Powell *et al.*, 1992).

Im Hinblick auf die identifizierten Peptidfragmente (siehe 5.2.4 und 5.2.6) könnte das katalytische Zentrum der SDR/SCAD auch in Calgranulin A (Position 19 – 23; **YSLIK**) und Laktoferrin (Position 420 – 424; **YTAGK**) enthalten sein (Jörnvall *et al.*, 1995). Eine in der Literatur beschriebene Kosubstrat-Bindungsstelle (**GxxxGxG**) könnte hingegen im Laktoferrin-Molekül in den Positionen 337 – 343 (**GLYLGSG**) lokalisiert sein (Scrutton *et al.*, 1990). Außerdem ließen sich mehrere „**GxxxG**“-Abschnitte in Laktoferrin identifizieren. Diese Abschnitte lagen in der Aminosäure-Sequenz an Position 180 – 184 (**GADKG..**), 310 – 314 (**GSPSG..**), 383 – 387 (**GLSEG..**) und 529 – 533 (**GDEQG..**). Im Vergleich dazu besitzt Calgranulin B weder die putative NAD(P)(H)/NAD(H)-Bindungsstelle noch die Peptidsequenz „**YxxK**“ für das katalytische Zentrum.

Inwieweit Laktoferrin und Calgranulin A in der Lage sind, 5-oxo-ETE zu synthetisieren, ist nicht bekannt. Zwar ließen sich mit Laktoferrin Protease- und Ribonuklease-Aktivitäten nachweisen (Devi *et al.*, 1994; Hendrixson *et al.*, 2003), und Calgranulin könnte möglicherweise als Arachidonsäure-Transporterprotein dienen (Siegenthaler *et al.*, 1997; Kerkhoff *et al.*, 1999a, 1999b). Aber dennoch ist auszuschließen, daß 5-(*S*)-HETE spezifisch durch Laktoferrin zu 5-oxo-ETE

oxidiert wird, da Depletierungen von Laktoferrin an einer mit Anti-Laktoferrin beschichteten Affinitätsäule nur minimale Verluste der 5-HEDH-Aktivität ergaben (siehe Abb. 43). Obwohl die 5-oxo-ETE-Synthese stereospezifisch ist, könnte ein Multienzymkomplex unter Beteiligung von Aktin, Calmodulin, Ca²⁺-bindenden Rezeptoren und vermutlich auch Calgranulin und Laktoferrin die spezifische Oxidation von 5-(S)-HETE katalysieren.

5.2.8 5-(S/R)-HETE und 5-oxo-ETE induzieren die mRNA-Expression von IL-1 α , IL-1 β und Gro- α in humanen Fibroblasten

In der Frühphase des Entzündungsprozesses migrieren Entzündungszellen, entlang eines Konzentrationsgradienten aus chemotaktischen Mediatoren, ins geschädigte Hautgewebe. Die Chemotaxine aktivieren akkumulierte Zellen und lösen die immunologische Abwehrreaktion aus, indem zelluläre Mediatoren freigesetzt werden. Die sezernierten Mediatoren können die Infiltration weiterer Entzündungszellen initiieren und zugleich auf Hautzellen des Entzündungsortes einwirken, so daß die inflammatorische Reaktion verstärkt wird.

5-oxo-ETE und das biologisch schwächere Vorläufermolekül 5-(S)-HETE sind Eikosanoide, die chemotaktisch gegenüber Eosinophilen wirken (Powell *et al.*, 1995b; Schwenk *et al.*, 1995; O'Flaherty *et al.*, 1996; Czech *et al.*, 1997; siehe Abb. 2). Infiltrationen und Akkumulationen von Eosinophilen sind charakteristisch für Parasiteninfektionen, atopische Dermatitis und allergisches Asthma (Leiferman *et al.*, 1986; Kroegel *et al.*, 1988; Kapp, 1993; Krug *et al.*, 1998). In der Haut generieren Keratinozyten und Endothelzellen 5-(S)-HETE (Janssen-Timmen *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002). Dagegen scheinen dendritische Zellen eine potentielle Quelle der 5-oxo-ETE zu sein (Zimpfer *et al.*, 2000). Der zellphysiologische Effekt von 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE ist intensiv studiert worden (Powell *et al.*, 1997, 1999). Die vorliegende Untersuchung hat zudem gezeigt, daß die 5-Hydroxy- und 5-oxo-Eikosatetraensäure in der Lage sind, proinflammatorische Zytokine zu induzieren (siehe 4.18). Abhängig von der Substratkonzentration und von der Reaktionszeit wurde die IL-1 β -mRNA-Expression in humanen Fibroblasten induziert (siehe Abb. 55 und Abb. 58). Außerdem ließ sich IL-1 α -mRNA durch 5-oxo-ETE exprimieren (siehe Abb. 57).

Eine transkriptionale Induktionswirkung durch 5-(S)-HETE wurde in der Literatur bereits beschrieben. Zeng *et al.* (2002) wiesen in mikrovaskulären Endothelzellen des Menschen nach, daß die 5-Hydroxyeikosatetraensäure die Bildung von „basic fibroblast growth factor 2“ (bFGF-2) induziert.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete IL-1-Expression durch 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE könnte indirekt die Infiltration von Eosinophilen erhöhen sowie ihre Persistenz in entzündetem Hautgewebe verlängern, indem weitere Zytokine oder Wachstumsfaktoren durch die Wirkung von IL-1 generiert werden. Diese Art der indirekten Zellaktivierung ließ sich durch *in vitro* Untersuchungen bestätigen, in denen Eosinophilen mit Kulturüberständen von IL-1 β -aktivierten Muskelzellen stimuliert worden waren. Dabei wurde die Induktion von „granulocyte macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF) als Auslöser für die gesteigerte Zellinfiltration und für die erhöhte Überlebensrate der Eosinophilen diskutiert (Hallsworth *et al.*, 1998; Esnault *et al.*, 2001).

In der Literatur wurde auch bestätigt, daß IL-1 befähigt ist, neben IL-8, das eosinophil-spezifische CC-Chemokin „Eotaxin“ zu induzieren (Chung *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2002). In bezug auf die Eotaxin-Induktion ist IL-1 β als Einzelstimulus aber eher schwach. In Kombination mit IL-4 oder IL-13 scheint IL-1 β ein wesentlich stärkerer Eotaxin-Induktor zu sein (Hirst *et al.*, 2002). Außerdem wiesen Nakamura *et al.* (2001) nach, daß der synergistische Effekt zwischen IL-1 β und IL-4 von der untersuchten Zielzelle abhängig ist. So hemmt z.B. IL-4 die IL-1 β -induzierte Eotaxin-Expression in peripheren, mononukleären Blutzellen, wohingegen IL-4 die Bildung von Eotaxin in Epithelzellen aktiviert. Verglichen mit den Untersuchungen von Hirst *et al.* (2002) und Nakamura *et al.* (2001) ließ sich Eotaxin in der vorliegenden Untersuchung nicht induzieren. Da Eotaxin die gleichen Zellreaktionen wie 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE hervorruft, könnten die Blut-Eosinophilie und die Eosinophilen-Akkumulation durch die zusätzliche Produktion von Eotaxin verstärkt werden (Palframan *et al.*, 1998). Diese Vermutung wird u.a. durch den Befund unterstützt, daß 5-oxo-ETE die Eotaxin- und RANTES-induzierte Eosinophilen-Chemotaxis verstärkt (Powell *et al.*, 2001). In der Literatur wurde beschrieben, daß eine pulmonale Eosinophilie sowohl durch 5-oxo-ETE als auch durch Eotaxin ausgelöst werden kann (Stamatiou *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999). Es ließ sich auch ein Anstieg der Eotaxin-mRNA-Expression in Bronchialbiopsien von Asthmatikern und in

Lungengewebe nach einer Allergenapplikation nachweisen (Humbles *et al.*, 1997; Brown *et al.*; 1998; Ying *et al.*, 1999; Lilly *et al.*, 2001).

Eine IL-1-induzierte Eotaxin-Expression könnte auch die physiologischen bzw. pathophysiologischen Eigenschaften von bereits akkumulierten Eosinophilen erhöhen, indem Speicherproteine und lipidartige Mediatoren verstärkt sezerniert werden (Badewa *et al.*, 2002). Schließlich kann durch eine Induktion der IL-1-Expression auch die Synthese weiterer CC-Chemokine (z.B. MCP-1, MIP-1 α , RANTES, MARCH-1), CXC-Chemokine (z.B. IL-8, Gro- α) oder TH₂-Zytokine (z.B. IL-3, IL-5, IL-6, IL-9) und die Aktivierung von zusätzlichen immunkompetenten Zellen initiiert werden (Lopez *et al.*, 1988; Schröder, 1995; Hültner *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002). IL-1 α , das ebenfalls durch 5-oxo-EETE induziert worden war (siehe Abb. 57), scheint zudem ein Induktor der Kollagenase und ein essentieller Regulator in der Wundheilung zu sein (Girard *et al.*, 1993; West-Mays *et al.*, 1995; Planus *et al.*, 1999).

Bislang sind die Zytokin-induzierenden Eigenschaften von 5-(S)-HETE bzw. 5-oxo-EETE und die synergistischen Effekte mit anderen inflammatorischen Mediatoren weitgehend vernachlässigt worden. Im Gegensatz dazu wurden die multiplen Funktionen der beiden IL-1-Formen ausführlich dargestellt (Dinarello, 1996). In der Literatur wurde lediglich bestätigt, daß der Synergismus zwischen 5-oxo-EETE und MCP-1 bzw. MCP-3 die Monozytenmigration verstärkt (Sozzani *et al.*, 1996). Außerdem wiesen Rola-Pleszczynski *et al.* (1992) nach, daß die IL-1 β -Expression ebenso durch LTB₄ induzierbar ist. Obwohl 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE ähnliche Zellreaktionen wie LTB₄ auslöst (O'Flaherty *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 1993), wirken sie über einen LTB₄-unabhängigen (Powell *et al.*, 1993; O'Flaherty *et al.*, 1994), heterotrimeren G-Proteinrezeptor (Czech *et al.*, 1997; O'Flaherty *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu LTB₄, das vorzugsweise polymorphkernige, mononukleäre Neutrophile des Menschen aktiviert, wirken 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE primär auf humane Eosinophile. Durchgeführte Datenbank-recherchen, Klonierungsuntersuchungen und Bindungsstudien deuten darauf hin, daß der spezifische 5-(S)-HETE- und 5-oxo-EETE-Rezeptor mit der G-Protein-Untereinheit G_{ai} gekoppelt ist (O'Flaherty *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003). Der erst kürzlich nachgewiesene G-Protein-abhängige Zellrezeptor TG1019, der ubiquitär vorkommt und in diversen Organen (z.B. Leber, Milz, Niere und Lunge) und Zellen (z.B. Leukozyten) exprimiert wird, zeigt eine hohe Bindungskapazität

gegenüber 5-oxo-EETE, 5-HPETE und Arachidonsäure auf (Hosoi *et al.*, 2002). Zudem wurde ein zweiter G-Protein-gekoppelter Zellrezeptor (R527) identifiziert, der sowohl in Eosinophilen als auch in Neutrophilen und Makrophagen des Atemweges exprimiert wird (Jones *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Untersuchung wurde auch eine Induzierbarkeit von „*growth related oncogene- α* “ (Gro- α , siehe Abb. 56) durch 5-oxo-EETE gesehen. Eine Expressionswirkung durch 5-(S)-HETE ließ sich dagegen nicht beobachten. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß 5-(S)-HETE ein weniger potenter Agonist als 5-oxo-EETE ist. Um die gleiche zelluläre Antwort wie 5-oxo-EETE zu erhalten, benötigt man viel höhere 5-(S)-HETE-Dosen, die jedoch unphysiologisch sind.

Obwohl 5-oxo-EETE eine selektive Eosinophilen-Infiltration hervorruft (Powell *et al.*, 1995b; O’Flaherty *et al.*, 1996; Czech *et al.*, 1997) und Gro- α als CXC-Chemokin vorwiegend Neutrophile aktiviert (Geiser *et al.*, 1993), ist eine zeitlich versetzte Zellakkumulation von Eosinophilen und Neutrophilen im Entzündungsprozeß nicht auszuschließen. Diese Vermutung wird vor allem durch den Befund unterstützt, daß das induzierbare IL-1 die IL-8-Expression auslösen kann (Jung *et al.*, 2002). Eine Induktion von IL-8 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet (*Daten nicht gezeigt*). Eine zeitlich versetzt Infiltration und Akkumulation von Eosinophilen und Neutrophilen am Ort der Entzündung ist aber möglich, weil Eosinophile selbst in der Lage sind, Gro- α zu produzieren (Persson-Dajotoy *et al.*, 2003). Somit könnten periphere Eosinophile nach Penetration am Ort der Entzündung die Blut-Neutrophilen anlocken. Diese Hypothese der versetzten Infiltration und Akkumulation von unterschiedlichen Granulozyten ist insofern interessant, da man bisher davon ausging, daß 5-oxo-EETE lediglich an Eosinophilen-assoziierten Erkrankungen beteiligt ist und daß Gro- α und IL-8 eher eine primäre Funktion in der Neutrophilen-bedingten Entzündung haben (Mukaida, 2003; Villard *et al.*, 1995). Eine unerwartete Neutrophilen-Infiltration ließ sich zudem *in vivo* durch die typischen Eosinophilen-Chemokine Eotaxin-1 und -2 hervorrufen. Dagegen konnte *in vitro* keine Aktivierung von Neutrophilen auf Eotaxin-1 und -2 nachgewiesen werden (Menzies-Gow *et al.*; 2002).

Im Gegensatz zu Fibroblasten ließen sich Keratinozyten durch 5-(S)-HETE und 5-oxo-EETE nicht aktivieren (*semiquantitative Auswertungen nicht dargestellt*). Weder die mRNA-Expression von Interleukin-1 (IL1 α , -1 β) noch die von Gro- α

ließen sich induzieren. Auch eine mRNA-Expression von Eotaxin-1, -2 und -3 konnte nicht ausgelöst werden. Da Keratinozyten vorwiegend die Epidermis aufbauen und Fibroblasten die Dermis bilden, ist zu vermuten, daß 5-oxo-ETE die Zytokinbildung in der Dermis reguliert. Dabei ist die Zytokinexpression von der Zielzelle und wahrscheinlich auch vom Entzündungsort und -status abhängig.

6 Zusammenfassung

Epithelien wie die menschliche Haut sind ständig einer Vielzahl schädlicher Umweltfaktoren ausgesetzt, zu denen eine große Anzahl an pathogenen Mikroorganismen und Parasiten zählen. Demzufolge findet man in der Haut eine Reihe von Abwehrmechanismen gegen diese Erreger. Neben der Barrierefunktion des *Stratum corneum* ist die Haut auch in der Lage sich durch antimikrobielle Substanzen und durch die natürliche Bakterienflora der Haut gegen potentielle Eindringlinge aus der Umwelt zu schützen. Bei Verletzungen werden aus dem Blut Entzündungszellen rekrutiert. Dabei stellen neutrophile und eosinophile Granulozyten die wichtigsten Abwehrzellen dar.

5-(*S*)-Hydroxyeikosatetraensäure (5-(*S*)-HETE) und 5-oxo-Eikosatetraensäure (5-oxo-ETE) sind chemotaktische Eikosanoide, die von Eosinophilen und Neutrophilen gebildet werden. Dabei setzt die stereospezifische 5-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase (5-HEDH) in Anwesenheit des Cofaktors NADP⁺ 5-(*S*)-HETE in die bioaktivere 5-oxo-ETE um. In der Haut scheinen dendritische Zellen eine potentielle Quelle der 5-oxo-ETE zu sein. 5-(*S*)-HETE und 5-oxo-ETE aktivieren primär Eosinophile aber auch Neutrophile. Die selektive, chemotaktische Wirkung von 5-oxo-ETE auf Eosinophile stärkt die Hypothese, daß das Lipid in der Parasitenabwehr und in anderen Eosinophilen-assoziierten Erkrankungen wie Asthma oder atopischer Dermatitis beteiligt ist. Da die molekulare Struktur der 5-HEDH bislang unbekannt ist und über die Regulation der 5-HEDH wenig Informationen vorhanden sind, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, die 5-HEDH aus Neutrophilen zu isolieren und zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde die 5-HEDH aus Neutrophilen-Lysaten und Mikrosomenfraktionen gewonnen und mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt. Dabei wurde die aufgereinigte 5-HEDH-Aktivität mit einem etablierten HPLC-Verfahren bestimmt, bei dem die enzymatische Umsetzung von 5-(*S*)-HETE zu 5-oxo-ETE untersucht wird. Eine strukturelle Charakterisierung der 5-HEDH erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese, und nach proteolytischer Spaltung, durch eine aminoterminalen Sequenzanalyse (Edman-Abbau) und mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden. Nach einer Kombination von Anionenaustausch- und „Reversed Phase“- (RP)-chromatographie ließen sich in gereinigten, 5-HEDH-aktiven Frak-

tionen Struktur- (z.B. Aktin, α -Aktin, α -Aktinin-1) und Regulatorproteine (z.B. Protein Kinase C-Inhibitorprotein-1; KCIP-1) sowie antimikrobielle Peptide (z.B. Calprotektin und Laktoferrin) nachweisen. Da die 5-HEDH-Aktivität mit dem Grad der Aufreinigung, insbesondere an der RP-Säule, verloren ging, wurde versucht, die partiell aufgereinigte 5-HEDH in der SDS-Gelelektrophorese anhand ihrer Proteinbandenintensität zu bestimmen. Da des öfteren Strukturproteine wie Aktin und α -Aktin in aufgereinigten 5-HEDH-Proben identifiziert wurden, ist zu vermuten, daß die 5-HEDH mit diesen Komplexe bilden könnte. Literatur- und Proteindatenbankrecherchen deuten zudem darauf hin, daß die identifizierten Peptide, Calprotektin und Laktoferrin, katalytische Regionen und putative Bindungsstellen für NAD(H) und NADP(H) besitzen, die für die Umsetzung von 5-(S)-HETE zu 5-oxo-ETE wichtig sind.

Desweiteren wurde bei einer massenspektrometrischen Analyse einer aufgereinigten 5-HEDH-Präparation sowohl ein Peptidfragment des β -Aktins sowie ein bisher unbekanntes Peptidfragment mit der Aminosäuresequenz „APARVFPSLS“ gefunden. Diese weist eine hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz einer NADH-Ubichinon Oxidoreduktase des Rindes und derjenigen einer eisenhaltigen Alkohol-Dehydrogenase des Hefepilzes *Schizosaccharomyces pombe* auf. Eine Recherche in der Proteindatenbank deutet darauf hin, daß diese Teilsequenz sowohl in der mitochondrialen NADH-Ubichinon Oxidoreduktase des Menschen als auch in einem humanen Zinkfingerprotein und einem GTP-Bindungsprotein vorkommt. Die Übereinstimmung von Teilsequenzen des identifizierten Peptidfragments mit der humanen NADH-Ubichinon Oxidoreduktase läßt vermuten, daß es sich bei der ermittelten NADH-Ubichinon Oxidoreduktase um die gesuchte 5-HEDH handeln könnte.

Mit Hilfe der RACE-PCR-Technik (RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde versucht, das Gen für das identifizierte Peptidfragment, das potentiell zu 5-HEDH gehören könnte, zu identifizieren. Es zeigte sich jedoch, daß eine Amplifikation des putativen 5-HEDH-Gens mit Hilfe der RACE-PCR-Technik nicht möglich war. Die Ursache hierfür könnte vermutlich der hohe Degenerationsgrad der verwendeten Oligonukleotide sein.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden Keratinozyten und Fibroblasten mit 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE stimuliert, um die Induktion von proentzündlichen

Zytokinen und mögliche Synergien zwischen den Eikosanoiden und Zytokinen oder Chemokinen besser zu verstehen.

Mit Hilfe reverser Transkription und Polymerasekettenreaktions-Technik (RT-PCR) konnte eine dosis- und zeitabhängige Interleukin-1 β (IL-1 β)-Induktion sowohl durch 5-oxo-ETE als auch durch 5-(S)-HETE in Fibroblasten gezeigt werden. Weiterhin wurde eine Induktion von Interleukin-1 α (IL-1 α) durch 5-oxo-ETE in Fibroblasten beobachtet. Ein weiterer Befund der vorliegenden Arbeit ist auch die Induzierbarkeit von „*growth related oncogene- α* “ (Gro- α) in Hautfibroblasten durch 5-oxo-ETE. Im Gegensatz zu den Fibroblasten wurden keine der untersuchten Zytokine durch 5-oxo-ETE und 5-(S)-HETE in Keratinozyten induziert. Zudem konnte eine Induktion des CC-Chemokins „Eotaxin“, das chemotaktisch auf Eosinophile wirkt und in der Parasitenabwehr eine primäre Funktion hat, weder in Fibroblasten- noch in Keratinozytenkultur durch 5-(S)-HETE und 5-oxo-ETE gezeigt werden. Diese Beobachtungen könnten ein Beleg dafür sein, daß 5-oxo-ETE die Zytokinbildung in der Dermis, die hauptsächlich von den Fibroblasten gebildet wird, reguliert. Es ist möglich, daß durch die IL-1-Induktion (IL-1 α , -1 β) die Migration von Eosinophilen sowie die Persistenz von peripheren Eosinophilen am Ort des Entzündungsprozesses durch die sekundäre Bildung von Entzündungs- und Wachstumsfaktoren wie „granulocyte/macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF) erhöht werden. Da Gro- α zu den CXC-Chemokinen gehört und primär Neutrophile aktiviert, stellt die Induktion von Gro- α durch 5-oxo-ETE einen neuen Aspekt in der Pathophysiologie Eosinophilen-assoziiierter Erkrankungen dar. 5-oxo-ETE, das in Langerhanszellen gebildet wird, könnte primär die Eosinophilen-Chemotaxis induzieren und sekundär Neutrophile aus dem Blut anlocken und aktivieren. Die zeitlich versetzte Zellinfiltration und die damit mögliche, zeitlich begrenzte Aktivierung der Eosinophilen und Neutrophilen könnte somit eine neue Bedeutung für 5-oxo-ETE im Eosinophilen-assoziierten Entzündungsprozeß haben.

7 Abstract

Epithelia like human skin are always exposed to an abundance of harmful environmental factors like microorganisms and parasites. Thus, there are a lot of host-defense mechanisms against these pathogens. In addition to the barrier function of the *stratum corneum*, human skin is capable of protecting against potential pathogens by antimicrobial substances and natural bacteria flora. If skin injuries occur, leukocyte infiltrate out of blood in the site of inflammation. Thereby, neutrophilic and eosinophilic granulocytes are the mainly important effector cells of the immune system.

5-(*S*)-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-(*S*)-HETE) and 5-oxo-eicosatetraenoic acid (5-oxo-ETE) represent chemotactic eicosanoids which are synthesized by eosinophils and neutrophils. The stereospecific 5-hydroxyeicosanoid dehydrogenase (5-HEDH) converts 5-(*S*)-HETE to the biologically active compound 5-oxo-ETE in the presence of NADP⁺ as a cofactor. In contrast to eosinophils and neutrophils, dendritic cells appear to be a potential source of 5-oxo-ETE in human skin. 5-(*S*)-HETE and 5-oxo-ETE activate primarily eosinophils and also neutrophils. The selective chemotactic properties of 5-oxo-ETE on eosinophils confirm the hypothesis that this lipid could take part in parasite defense or in other eosinophil-related diseases like asthma and atopic dermatitis.

Since the molecular structure of 5-HEDH is still unknown and there is only little information about regulation of 5-HEDH, the aim of the present work was to isolate and to characterize the 5-HEDH from human neutrophils. For these purposes, 5-HEDH was isolated from neutrophil supernatant and solubilized microsomal fraction. After partial purification step by high pressure liquid chromatography (HPLC), 5-HEDH was detected indirectly by an established chromatographic assay. Herein, the 5-HEDH activity was measured by converting 5-(*S*)-HETE to 5-oxo-ETE. The structural characterization of 5-HEDH was performed by using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and aminoterminal sequence analysis (Edman analysis) and mass spectroscopy after a proteolytic digestion.

After combination of the anion exchanger and with a reversed phase (RP) chromatography, we could detect cytoskeleton proteins (e.g. actin, α -actin, α -actinin-1) as well as regulatory proteins like protein kinase C-inhibitor protein-1

(KCIP-1) and anti-microbial peptides like calprotectin and lactoferrin in partial purified HPLC-fractions which contained 5-HEDH activity. With the increasing degree of purification, especially by the RP-chromatography, the 5-HEDH activity was lost completely. Therefore, the partial purified 5-HEDH could be determined only by means of the intensity of their protein bands after the SDS gel electrophoresis. As structure proteins like actin and α -actin were identified frequently in a partial purified sample, it is assumed that 5-HEDH may be able to form a complex with these components.

Literature and protein data bank research indicate that the identified peptides calprotectin and lactoferrin possess catalytic regions and putative NAD(H) and NADP(H) binding sites for converting 5-(S)-HETE to 5-oxo-EETE. Moreover, β -actin as well as an unknown fragment with the amino acid sequence „APARVFPSLS” were detected in purified 5-HEDH preparations by mass spectroscopy. This peptide shows highly strong homology to a bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase and to a putative iron alcohol dehydrogenase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Data bank research suggests that this sequence is found in a human mitochondrial oxidoreductase as well as in a human zinc finger protein and in a GTP-binding protein. According to this identified amino acid sequence, it was supposed that the determined NADH-ubiquinone oxidoreductase could represent the 5-HEDH. Using RACE-PCR-technique (RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends) we have tried to identify the gene coding for the identified peptide fragment, which could display 5-HEDH. However, it was impossible to amplify the putative 5-HEDH gene by the RACE-PCR. The reason for these vain efforts may base on the high degree of degradation of the used oligo nucleotides.

Furthermore, keratinocytes and fibroblasts were stimulated with 5-(S)-HETE and 5-oxo-EETE to examine the induction of proinflammatory cytokines and a potential synergism between eicosanoids and chemokines. Using reverse transcription and polymerase chain reaction technique (RT-PCR) we could show a dose- and time-dependent interleukin-1 β (IL-1 β) induction in fibroblasts after stimulation with 5-oxo-EETE and 5-(S)-HETE. Besides, we observed the expression of interleukin-1 α (IL-1 α) and growth related oncogene- α (Gro- α) after stimulation of fibroblasts with 5-oxo-EETE. In contrast to the fibroblasts, in keratinocytes cytokine expression could not be induced after stimulation with 5-

oxo-EETE und 5-(S)-HETE. Moreover, the CC-chemokines „Eotaxin“, which activates eosinophils and provides primarily parasite defense, could not be induced in keratinocytes neither by 5-(S)-HETE nor by 5-oxo-EETE. This observation could be an evidence that 5-oxo-EETE regulate the cytokine synthesis in dermal fibroblasts. Besides, through the induction of IL-1 expression, it is possible that the eosinophil migration as well as the persistence of eosinophils in the site of inflammation will be enhanced by the post synthesis of inflammatory and growth factors, e.g. “granulocyte/macrophage colony stimulating factor” (GM-CSF). Since Gro- α expression belongs to the group of CXC-Chemokine and activates primarily neutrophils, the induction of Gro- α by 5-oxo-EETE stands for a new aspect in the pathophysiology of eosinophil-related diseases. We postulate that 5-oxo-EETE, which is synthesized in Langerhans cell, is first of all responsible for the induction of eosinophil chemotaxis but also for the attraction and activation of neutrophils. The timely shift in the infiltration of eosinophils and neutrophils and the presumable time-limited specific activation of cells after stimulation by 5-oxo-EETE could have a fundamental meaning in eosinophil-related inflammatory processes.

8 Abkürzungen und Synonyme

A	Absorptionseinheit
A23187	Bezeichnung für ein Ca ²⁺ -Ionophor
A431	immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
Abb.	Abbildung
bFGF-2	basic fibroblast growth factor 2 (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor-2)
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BPE	bovine pituitary extract (Rinderhypophysenextrakt)
°C	Grad Celsius
Calprotektin	kovalentgebundener Komplex aus Calgranulin A (MRP-8 bzw. S100A8) und Calgranulin B (MRP-14 bzw. S100A9); auch als L1-Komplex bezeichnet
CD11b	Untereinheit des Adhäsionsmoleküles β_2 -Integrin
Chemokin	chemotaktisch-wirkendes Zytokin
COX	Cyclooxygenase
Da (kDa)	Dalton (Kilo-Dalton)
DEAE	Diethylaminoethan (Matrix einer Anionenaustauschersäule)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
5,15-diHETE	5-,15-Dihydroxyeicosatetraenoic acid (5,15-Dihydroxyeicosatetraensäure)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, cDNA	Desoxyribonukleinsäure, kopierte Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-phosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
ECL	Eosinophil Chemotactic Lipid
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EDN	Eosinophil Derived-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ERM	Membranzytoskelett-Ankerprotein der Ezrin, Radixin, Moesin-Familie
E-Selektin	Endotheliales Selektin
ESI	Elektrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum (Fetales Rinderserum)
g	Gravitationskonstante (9,80665 m/s ²) oder Gewichtseinheit: Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor)
Gro- α	growth related oncogene- α
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HaCaT	immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
5-HEDH	5-Hydroxyeicosanoid-Dehydrogenase
5-, 12-, 15-HETE	5-, 12-, 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-, 12-, 15-Hydroxyeicosatetraensäure)

hEGF	human epidermal growth factor (Humaner Epidermiswachstumsfaktor)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HL-60	Promyelozytische Leukämiezelllinie
5-HPETE	5-Hydroxy-(6,8,11,14)-Eikosatetraensäure
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ID	Innendurchmesser (zur Beschreibung von HPLC-Säulen)
IL-1,-3,-4,-5,-6,-9	Interleukin-1, -3, -4, -5, -6, -9
KB	immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie
KBM	Keratinozyten Basalmedium
KCIP-1	Protein Kinase C Inhibitor Protein-1; auch als 14-3-3 Protein bezeichnet
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
Laktoferrin	Laktotransferrin
5-, 12-, 15-LOX	5-, 12-, 15-Lipoxygenase
L-Selektin	Leukozytäres Selektin
LTA ₄ , B ₄ , C ₄ , D ₄	Leukotrien A ₄ , B ₄ , C ₄ , D ₄
M	Molarität [Mol/l]; 1 M = 1 mol/l 10 ⁻³ M = 1 mmol/l (mM) 10 ⁻⁶ M = 1 µmol/l (µM) 10 ⁻⁹ M = 1 nmol/l (nM) 10 ⁻¹² M = 1 pmol/l (pM)
MARC	monocyte chemotactic protein-3
MBP	major basic protein
MCP-1,-3	monocyte chemoattractant protein-1, -3
min	Minute
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1α
MRP-8, -14	migration inhibitory factor (MIF)-related protein-8, -14; siehe auch Calprotektin
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
NADH	β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
β-NADP ⁺	β-Triphosphopyridinnukleotid; (β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
ODS	Octadecylsilylsilica (Matrix einer Umkehrphasensäule)
Oktyl-Glukosid	Octyl-β-D-Glukopyranosid
5-oxo-EETE	5-oxo-Eicosatetraenoic acid (5-oxo-Eikosatetraensäure)
5-oxo-15-HETE	5-oxo-15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-oxo-15-Hydroxyeikosatetraensäure)
PAF	platelet-activating factor (Blutplättchen aktivierender Faktor)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PGE ₂ , G ₂ , H ₂ , D ₂	Prostaglandin E ₂ , G ₂ , H ₂ , D ₂
PG I ₂	Prostazyklin
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige, Mononukleäre Neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE-PCR	rapid amplification of cDNA ends-PCR

RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted
RNA, mRNA	Ribonukleinsäure (messenger Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	reversed phase-HPLC (Umkehrphasen-HPLC)
RT, <i>RT-PCR</i>	Reverse Transkription, - <i>PCR</i>
R_t	Retentionszeit [min]
s	Sekunde
[S]	Substratkonzentration
SCAD	short chain alcohol dehydrogenase (kurzkettige Alkoholdehydrogenase)
SDR	short chain dehydrogenase/reductase (kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase)
SDS	Sodium-dodecylsulfate
<i>SuperScript II</i>	RNase H Reverse Transkriptase von <i>E. coli</i>
t [s, min, h]	Zeit [Sekunden, Minuten, Stunden]
Tab.	Tabelle
TAE	Trisacetat-EDTA
<i>Taq-DNA-</i>	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i> Polymerase
TFA	trifluor acetic acid (Trifluoressigsäure)
Thesit [®]	Polyoxyethylene-9-laurylether
TH ₂ -Zelle	T-Helferzelle
T_m	Schmelztemperatur
TMED	N, N, N, N Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Unit; Aktivitätseinheit der 5-HEDH [pmol/min] oder Einheit für die UV-Absorption
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität: pmol/s) oder Volt
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1 (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1)
VLA-4	very late antigen-4
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [pmol/s]
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

9 Literaturverzeichnis

- Abu-Ghazaleh, R. I.; Dunnette, S. L.; Loegering, D. A.; Checkel, J. L.; Kita, H.; Thomas, L. L. and Gleich, G. J. (1992) Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* 52 (6): 611-618.
- Badewa, A. P.; Hudson, C. E. and Heiman, A. S. (2002) Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp. Biol. Med.* 227 (8): 645-651.
- Baron, C.; Thompson, T. E. (1975) Solubilization of bacterial membrane proteins using alkyl glucosides and dioctanoyl phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.* 382 (3): 276-285.
- Behm, C. A. and Ovington, K. S. (2000) The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today.* 16 (5): 202-209.
- Berhane, K.; Ray, A. A.; Khanapure, S. P.; Rokach, J. and Powell, W.S. (1998) Calcium / calmodulin-dependent conversion of 5-oxoeicosanoids to 6, 7-dihydro metabolites by a cytosolic olefin reductase in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273 (33): 20951-20959.
- Berman, M. B. (1975) Collagenase inhibitors: rationale for their use in treating corneal ulceration. *Int. Ophthalmol. Clin.* 15 (4): 49-66.
- Blatt, W. F. (1971) Ultrafiltration for Enzyme Concentration. *Methods in Enzymology* 22: 39-49.
- Boeglin, W. E.; Kim, R. B. and Brash, A. R. (1998) A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (12): 6744-6749.
- Brandtzaeg, P.; Gabrielsen, T. O.; Dale, I.; Müller, F.; Steinbakk, M. and Fagerhol, M. K. (1995) The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defence factor at epithelial surfaces. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A: 201-206.
- Brock, J. H. (2002) The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 80 (1): 1-6.
- Brown, A. M.; Kristal, B. S.; Effron, M. S.; Shestopalov, A. I.; Ullucci, P. A.; Sheu, K. F.; Blass, J. P. and Cooper, A. J. (2000) Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *J. Biol. Chem.* 5; 275 (18): 13441-13447.
- Brown, J. R.; Kleimberg, J.; Marini, M.; Sun, G.; Bellini, A. and Mattoli S. (1998) Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin. Exp. Immunol.* 114 (2): 137-146.
- Butterworth, A. E. (1984) Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol.* 23: 143-235.
- Capdevila, J.; Marnett, L. J.; Chacos, N.; Prough, R. A. and Estabrook, R. W. (1982) Cytochrome P450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyeicosatetraenoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 767-770.
- Capdevila, J.; Yadagiri, P.; Manna, S. and Falck, J. R. (1986) Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal Cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 1007-1011.
- Capdevila, J.; Falck, J. R. and Estabrook, R. W. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* 6: 731-736.

- Chai, X.; Boerman, M. H.; Zhai, Y. and Napoli, J. L. (1995a) Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270 (8): 3900-3904.
- Chai, X.; Zhai, Y.; Popescu, G. and Napoli, J. L. (1995b) Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. Expression of its mRNA relative to type I. *J. Biol. Chem.* 270 (47): 28408-28412.
- Chicz, R. M.; Regnier, F. E. (1990) High-Performance Liquid Chromatography: Effective Protein Purification by Various Chromatographic Modes. *Methods in Enzymology* 182: 392-421.
- Chung, K. F.; Patel, H. J.; Fadlon, E. J.; Rousell, J.; Haddad, E. B.; Jose, P. J.; Mitchell, J. and Belvisi, M. (1999) Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br. J. Pharmacol.* 127 (5): 1145-1150.
- Clark, R. A.; Leidal, K. G.; Pearson, D. W. and Nauseef, W. M. (1987) NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J. Biol. Chem.* 262 (9): 4065-4074.
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Calbiochem-Novabiochem International Inc.*; Reprinted from *Biochemistry* 3: 480.
- Coffman, R. L.; Seymour, B. W.; Hudak, S.; Jackson, J. and Rennick, D. (1989) Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245 (4915): 308-310.
- Colquhoun, J. E. and Dresden, M. H. (1983) Activation and partial characterization of prolyl hydroxylase from regenerating limbs of the adult newt *Notophthalmus viridescens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B, No. 4: 671-679.
- Conneely, O. M. (2001) Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.* Vol. 20, No. 5: 389S-395S.
- Cooper, T. G. (1981) Biochemische Arbeitsmethoden; Kapitel 10: 334-389, *Reinigung von Proteinen*. 3. Auflage, DeGruyter Verlag, Berlin.
- Cross, A. R.; Erickson, R. W. and Curnutte, J. T. (1999) The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. *Biochem. J.* 341, 251 – 255.
- Cross, A. R. (2000) P40 (phox) Participates in the activation of NADPH oxidase by increasing the affinity of p47(phox) for flavocytochrome b(558). *Biochem. J.* 349 (Pt 1): 113-117.
- Czech, W.; Barbisch, M.; Tenscher, K.; Schöpf, E.; Schröder, J.-M. and Norgauer, J. (1997) Chemotactic 5-Oxo-Eicosatetraenoic Acids Induce Oxygen Radical Production, Ca²⁺-Mobilization, and Actin Reorganization in Human Eosinophils via a Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein. *J. Invest. Dermatol.* 108: 108-112.
- Daniel, L. W. (1985) Prostaglandins, Leukotrienes and Cancer. „Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism“. Chapter 10: 175-193, *Phospholipase*. W. E. M. Lands (ed.), *Martinus Nijhoff Publishing, Boston*.
- De Lillo, A.; Tejerina, J. M. and Fierro, J. F. (1992) Interaction of calmodulin with lactoferrin. *FEBS Lett.* 298 (2-3): 195-198.
- Del Prete, G.; Maggi, E.; Parronchi, P.; Chretien, I.; Tiri, A.; Macchia, D.; Ricci, M.; Banchereau, J.; De Vries, J. and Romagnani, S. (1988) IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* 140 (12): 4193-4198.
- Del Prete, G. (1992) Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 47 (5): 450-455.

- Deutscher, M. P. (1990) Maintaining Protein Stability. *Methods in Enzymology* 182: 83-89.
- Devi, A. S.; Das, M.R. and Pandit, M. W. (1994) Lactoferrin contains structural motifs of ribonuclease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1205 (2): 275-281.
- Dickson, T. C.; Mintz, C. D.; Benson, D. L. and Salton, S. R. (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J. Cell. Biol.* 157 (7): 1105-1112.
- Dinarello, C. A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (6): 2095-2147.
- Esnault, S. and Malter, J. S. (2001) Minute quantities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prolong eosinophil survival. *J. Interferon Cytokine Res.* 21 (2): 117-124.
- Falgueyret, J.-P.; Riendeau, D. (2000) LTA₄-derived 5-oxo-eicosatetraenoic acid: pH-dependent formation and interaction with the LTB₄ receptor of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys. Acta* 1484: 51-58.
- Feinberg, H.; Greenblatt, H. M. and Shoham, G. (1993) Structural studies of the role of the active site metal in metalloenzymes. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 33: 501-516.
- Ferrante J. V.; Huang, Z. H.; Nandoskar, M.; Hii, C. S. T.; Robinson, B. S.; Rathjen, D. A.; Poulos, A.; Morris, P. and Ferrante, A. (1997) Altered Responses of Human Macrophages to Lipopolysaccharide by Hydroperoxy Eicosatetraenoic Acid, Hydroxy Eicosatetraenoic Acid, and Arachidonic Acid: Inhibition of Tumor Necrosis Factor Production. *J. Clin. Invest.* 99 (6): 1445-1452.
- Finkelman, F. D.; Pearce, E. J.; Urban, J. F. Jr. and Sher, A. (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol. Today* 12 (3): A62-66.
- Ford-Hutchinson, A. W. (1991) Arachidonate 15-lipoxygenase; characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids* 4: 65-74.
- Frohman, M. A.; Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8998-9002.
- Garcia-Zepeda, E. A.; Rothenberg, M. E.; Ownbey, R. T.; Celestin, J.; Leder, P. and Luster, A. D. (1996) Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat. Med.* 2 (4): 449-456.
- Gazaryan, I. G.; Krasnikov, B. F.; Ashby, G. A.; Thorneley, R. N.; Kristal, B. S. and Brown, A. M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277 (12): 10064-10072.
- Geiser, T.; Dewald, B.; Ehrenguber, M. U.; Clark-Lewis, I. and Baggiolini M. (1993) The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J. Biol. Chem.* 268 (21): 15419-15424.
- Gekko, K. and Timasheff, S. M. (1981) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20: 4677-4686.
- Giembycz, M. A. and Lindsay, M. A. (1999) Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev.* 51 (2): 213-340.
- Girard, M. T.; Matsubara, M.; Kublin, C.; Tessier, M. J.; Cintron, C. and Fini M. E. (1993) Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *J. Cell. Sci.* 104 (Pt 4): 1001-1011.
- Goheen, S. C. (1991) HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides; Chapter 16: 555-571, *HPLC Purification of Detergent-Solubilized Membrane Proteins.* M. T. W. Hearn (ed.), VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

- Gordon, E. E.; Gordon, J. A. and Spector, A. A. (1991) HETEs and coronary artery endothelial cells: metabolic and functional interactions. *Am. J. Physiol.* 261 (4 Pt 1): C623-633.
- Gotoh, Y.; Sumimoto, H. and Minakami, S. (1989) Purification and characterization of 20-hydroxy-leukotriene B⁴ dehydrogenase in human neutrophils. *Eur. J. Biochem.* 179: 315-321.
- Gravel, J.; Falgoutyret, J.-P.; Yergey, J.; Trimble, L.; Riendeau, D. (1993) Identification of 5-Keto-(7E,9E,11Z,14Z)-Eicosatetraenoic Acid as a Novel Nonenzymatic Rearrangement Product of Leukotriene A₄. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 469-475.
- Green, F. A. (1990) Transformation of 5-HETE by Activated Keratinocyte 15-Lipoxygenase and the Activation Mechanism. *Lipids* 25 (10): 618-623.
- Grimminger, F. and Maysers, P. (1995) Lipid Mediators, Free Fatty Acids and Psoriasis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 52: 1-15.
- Guo, R. F.; Ward, P. A.; Jordan, J. A.; Huber-Lang, M.; Warner, R. L. and Shi, M. M. (1999) Eotaxin expression in Sephadex-induced lung injury in rats. *Am. J. Pathol.* 155 (6): 2001-2008.
- Hall, P. F. (1997) The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells. *Steroids* 62 (1): 185-189.
- Hallsworth, M. P.; Soh, C. P.; Twort, C. H.; Lee, T. H and Hirst, S. J. (1998) Cultured human airway smooth muscle cells stimulated by interleukin-1beta enhance eosinophil survival. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 19 (6): 910-919.
- Hendrixson, D. R.; Qiu, J.; Shewry, S. C.; Fink, D. L.; Petty, S.; Baker, E. N.; Plaut, A. G.; St. Geme, J. W. 3rd. (2003) Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. *Mol. Microbiol.* 47 (3): 607-617.
- Hessian, P. A.; Edgeworth, J. and Hogg, N. (1993) MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca²⁺-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 53 (2): 197-204.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. (Staining of sodium dodecyl sulfate gels). *Electrophoresis* 9: 28-32.
- Heyworth, P. G.; Bohl, B. P.; Bokoch, G. M. and Curnutte, J. T. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J. Biol. Chem.* 269 (49): 30749-30752.
- Hirst, S. J.; Hallsworth, M. P.; Peng, Q. and Lee, T. H. (2002) Selective induction of eotaxin release by interleukin-13 or interleukin-4 in human airway smooth muscle cells is synergistic with interleukin-1beta and is mediated by the interleukin-4 receptor alpha-chain. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (8): 1161-1171.
- Hjelmeland, L. M. and Chrambach, A. (1984) Solubilization of Functional Membrane Proteins. *Methods in Enzymology* 104: 305-318.
- Hjelmeland, L. M. (1990) Solubilization of Native Membrane Proteins. *Methods in Enzymology* 182: 253-264.
- Holtzman, M. J. (1991) Arachidonic Acid Metabolism. Implications of Biological Chemistry for Lung and Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143: 188-203.
- Hosoi, T.; Koguchi, Y.; Sugikawa, E.; Chikada, A.; Ogawa, K.; Tsuda, N.; Suto, N.; Tsunoda, S.; Taniguchi, T. and Ohnuki, T. (2002) Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J. Biol. Chem.* 277 (35): 31459-31465.
- Hudmon, A. and Schulman, H. (2002) Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 364 (Pt 3): 593-611.

- Hültner, L.; Kolsch, S.; Stassen, M.; Kaspers, U.; Kremer, J. P.; Mailhammer, R.; Moeller, J.; Broszeit, H. and Schmitt, E. (2000) In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J. Immunol.* 164 (11): 5556-5563.
- Humbles, A. A.; Conroy, D. M.; Marleau, S.; Rankin, S. M.; Palframan, R. T.; Proudfoot, A. E.; Wells, T. N.; Li, D.; Jeffery, P. K.; Griffiths-Johnson, D. A.; Williams, T. J. and Jose P. J. (1997) Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. *J. Exp. Med.* 186 (4): 601-612.
- Irvine, R. F. (1982) How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204: 3-16.
- Jakobsson, P.-J.; Mancini, J. A.; Riendeau, D. and Ford-Hutchinson, A. W. (1997) Identification and Characterization of a Novel Mikrosomal Enzyme with Glutathion-dependent Transferase and Peroxidase Activities. *J. Biol. Chem.* 272: 22934-22939.
- James, G. T. (1977) Inactivation of the Protease Inhibitor Phenylmethylsulfonyl Fluoride in Buffers. *Anal. Biochem.* 86: 574-579.
- Janssen-Timmen, U.; Vickers, P. J.; Wittig, U.; Lehmann, W. D.; Stark, H. J.; Fusenig, N. E.; Rosenbach, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. and Habenicht, A. J. (1995) Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (15): 6966-6970.
- Jörnvall, H.; Persson, B.; Krook, M.; Atrian, S.; Gonzalez-Duarte, R.; Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34 (18): 6003-6013.
- Jones, C. E.; Holden, S.; Tenaillon, L.; Bhatia, U.; Seuwen, K.; Tranter, P.; Turner, J.; Kettle, R.; Bouhelal, R.; Charlton, S.; Nirmala, N. R.; Jarai, G. and Finan, P. (2003) Expression and characterization of a 5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid receptor highly expressed on human eosinophils and neutrophils. *Mol. Pharmacol.* 63 (3): 471-477.
- Jung, Y. D.; Fan, F.; McConkey, D. J.; Jean, M. E.; Liu, W.; Reinmuth, N.; Stoeltzing, O.; Ahmad, S. A.; Parikh, A. A.; Mukaida, N. and Ellis, L. M. (2002) Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine* 18 (4):206-213.
- Kang, L. T. and Vanderhoek, J. Y. (1998) Mono (S) hydroxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin. *J. Lipid Res.* 39 (7): 1476-1482.
- Kapp, A. (1993) The role of eosinophils in the pathogenesis of atopic dermatitis-eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* 48 (1): 1-5.
- Kerkhoff, C.; Eue, I. and Sorg, C. (1999a) The regulatory role of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) in the transendothelial migration of human leukocytes. *Pathobiology* 67 (5-6): 230-232.
- Kerkhoff, C.; Klempt, M.; Kaever, V. and Sorg, C. (1999b) The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 274 (46): 32672-32679.
- Kojima, T.; Andersen, E.; Sanchez, J. C.; Wilkins, M. R.; Hochstrasser, D. F.; Pralong, W. F. and Cimasoni, G. (2000) Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J. Dent. Res.* 79 (2): 740-747.
- Kragballe, K.; Pinnamaneni, G.; Desjarlais, L.; Duell, E. A. and Voorhees, J. J. (1986) Dermis-Derived 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Inhibits Epidermal 12-Lipoxygenase Activity. *J. Invest. Dermatol.* 87: 494-498.
- Kroegel, C.; Costabel, U.; Matthys, H. and Barnes, P. J. (1988) Die pathogenetische Bedeutung des eosinophilen Granulozyten. *DMW* 113 Jg. (36): 1405-1411.

- Krug, N.; Tschernig, T.; Holgate, S. and Pabst, R. (1998) How do lymphocytes get into the asthmatic airways? Lymphocyte traffic into and within the lung in asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 28 (1): 10-18.
- Kulmacz, R. J. (1985) Prostaglandins, Leukotrienes and Cancer. „Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism“. Chapter 1: 1-8, *Mechanisms of Cyclooxygenase and Peroxidase Catalysis by Prostaglandin H Synthase*. W. E. M. Lands (ed.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
- Kühn, H.; Schewe, T. and Rapoport, S. M. (1986) The Stereochemistry Of The Reactions Of Lipoxygenases And Their Metabolites. Proposed Nomenclature Of Lipoxygenases And Related Enzymes. *Adv. Enzymol.* 58: 273-311.
- Kumar, A. and Busse, W. W. (1994) Airway Inflammation in Asthma. *Scientific American; Science & Medicine March/April*: 38-47.
- Leiferman, K. M.; Peters, M. S. and Gleich, G. J. (1986) The eosinophil and cutaneous edema. *J. Am. Acad. Dermatol.* 15 (3): 513-517.
- Leiferman, K. M. (1991) A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24 (6 Pt 2): 1101-1112.
- Lemarchand, P.; Vaglio, M.; Mael, J. and Markert, M. (1992) Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation. *J. Biol. Chem.* 25; 267 (27): 19379-19382.
- Lilly, C. M.; Nakamura, H.; Belostotsky, O. I.; Haley, K. J.; Garcia-Zepeda, E. A.; Luster, A. D. and Israel, E. (2001) Eotaxin expression after segmental allergen challenge in subjects with atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163 (7): 1669-1675.
- Lindl, T. und Bauer, J. (1994) Zell- und Gewebekultur. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Liu, S.-C. and Karasek, M. (1978) Isolation and Growth of Adult Human Epidermal Keratinocytes in Cell Culture. *J. Invest. Dermatol.* 71: 157-162.
- Liu, D.; Bienkowska, J.; Petosa, C.; Collier, R. J.; Fu, H. and Liddington, R. (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376 (6536): 191-194.
- Lopez, A. F.; Sanderson, C. J.; Gamble, J. R.; Campbell, H. D.; Young, I. G. and Vadas, M. A. (1988) Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 167 (1): 219-224.
- Lorber, B.; Bishop, J. B. and DeLucas, L. J. (1990) Purification of octyl- β -D-glucopyranoside and re-estimation of its micellar size. *Biochim. Biophys. Acta* 1023: 254-265.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Far, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lundhal, P.; Greijer, E.; Lindblom, H. and Fägerstam, L. G. (1984) Fractionation of human red cell membrane proteins by ion-exchange chromatography in detergent on Mono-Q, with special reference to the glucose transporter. *J. Chromatogr.* 297: 129-137.
- Makino, S. and Fukuda, T. (1995) Eosinophils and allergy in asthma. *Allergy Proc.* 16 (1): 13-21.
- Mancini, J. A.; Waterman, H. and Riendeau, D. (1998) Cellular Oxygenation of 12-Hydroxy-eicosatetraenoic Acid and 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid by 5-Lipoxygenase Is Stimulated by 5-Lipoxygenase-activating Protein. *J. Biol. Chem.* 273: 32842-32847.
- May, P.; Schniertshauer, U.; Gerhartz, C.; Horn, F. and Heinrich P. C. (2003) Signal transducer and activator of transcription STAT3 plays a major role in gp130-mediated acute phase protein gene activation. *Acta Biochim. Pol.* 50 (3): 595-601.

- Menzies-Gow, A.; Ying, S.; Sabroe, I.; Stubbs, V. L.; Soler, D.; Williams, T. J.; Kay, A. B. (2002) Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers. *J. Immunol.* 169 (5): 2712-2718.
- Meyer, J. E.; Berner, I.; Teran, L. M.; Bartels, J.; Sticherling, M.; Schröder, J. M. and Maune, S. (1998) RANTES production by cytokine-stimulated nasal fibroblasts: its inhibition by glucocorticoids. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117 (1): 60-67.
- Mochizuki, M.; Schröder, J.-M.; Christophers, E. and Yamamoto, S. (1999) IL-4 induces eotaxin in human dermal fibroblasts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120 Suppl. 1: 19-23.
- Morita, E.; Schröder, J.-M. and Christophers, E. (1990a) Production of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by purified human eosinophils and neutrophils. *Scand. J. Immunol.* 32: 497-502.
- Morita, E.; Schröder, J. M. and Christophers, E. (1990b) Identification of a novel and highly potent eosinophil chemotactic lipid in human eosinophils treated with arachidonic acid. *J. Immunol.* 144 (5): 1893-1900.
- Mukaida, N. (2003) Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284 (4): L566-L577.
- Nakamura, H.; Luster, A. D.; Tateno, H.; Jedrzkiewicz, S.; Tamura, G.; Haley, K. J.; Garcia-Zepeda, E. A.; Yamaguchi, K. and Lilly C. M. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (5): L1288-L1302.
- Neugebauer, J. M. (1988) A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry. *Calbiochem-Novabiochem International, Inc.*
- Neugebauer, J. M. (1990) Detergents: An Overview. *Methods in Enzymology* 182: 239-253.
- Nisapakultorn, K.; Ross, K. F. and Herzberg, M. C. (2001) Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* 69 (6): 3692-3696.
- Norgauer, J.; Barbisch, M.; Czech, W.; Pareigis, J.; Schwenk, U. and Schröder, J.-M. (1996) Chemotactic 5-oxo-eicosatetraenoic acids activate a unique pattern of neutrophil responses – analysis of phospholipid metabolism, intracellular Ca²⁺ transients, actin reorganization, superoxide-anion production and receptor up-regulation. *Eur. J. Biochem.* 236: 1003-1009.
- Odink, K.; Cerletti, N.; Bruggen, J.; Clerc, R. G.; Tarcsay, L.; Zwadlo, G.; Gerhards, G.; Schlegel, R. and Sorg, C. (1987) Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 5-11; 330 (6143): 80-82.
- O'Flaherty, J. T. (1985) Neutrophil Degranulation: Evidence Pertaining to its Mediation by the Combined Effects of Leukotriene B₄, Platelet-Activating Factor, and 5-HETE. *J. Cell. Physiol.* 122: 229-239.
- O'Flaherty, J. T. and Nishihira, J. (1987) 5-Hydroxyicosatetraenoate Promotes Ca²⁺ and Protein Kinase C Mobilization in Neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 (2): 575-581.
- O'Flaherty, J. T.; Jacobson, D. and Redman, J. (1988) Mechanism involved in the Mobilization of Neutrophil Calcium by 5-Hydroxyeicosatetraenoate. *J. Immunol.* 140: 4323-4328.
- O'Flaherty, J. T.; Cordes, J. F.; Redman, J. and Thomas, M. J. (1993) 5-oxo-eicosatetraenoate, a potent human neutrophil stimulus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 129-134.

- O'Flaherty, J. T.; Cordes, J. F.; Lee, S. L.; Samuel, M. and Thomas, M. J. (1994) Chemical and biological characterization of oxo-eicosatetraenoic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1201: 505-515.
- O'Flaherty, J. T.; Kuroki, M.; Nixon, A. B.; Wijkander, J.; Yee, E.; Lee, S. L.; Smitherman, P. K.; Wykle, R. L. and Daniel, L. W. (1996) 5-Oxo-Eicosatetraenoate Is a Broadly Active, Eosinophil-Selective Stimulus for Human Granulocytes. *J. Immunol.* 157: 336-342.
- O'Flaherty, J. T.; Taylor, J. S. and Thomas, M. J. (1998) Receptors for the 5-oxo class of eicosanoids in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273 (49): 32535-32541.
- O'Flaherty, J. T.; Taylor, J. S. and Kuroki, M. (2000) The Coupling of 5-Oxo-Eicosanoid Receptors to Heterotrimeric G Proteins. *J. Immunol.* 164: 3345-3352.
- Okano, M.; Satoskar, A. R.; Abe, M.; Harn, D. A.; Jr. Okano, M.; Nishizaki, K.; Takeda, Y.; Yoshino, T.; Brombacher, F. and Satoskar, A. A. (2000) Interleukin-4-independent production of Th2 cytokines by nasal lymphocytes and nasal eosinophilia in murine allergic rhinitis. *Allergy* 55 (8): 723-731.
- Ostrove, S. (1990) Affinity Chromatography: General Methods. *Methods in Enzymology* 182: 357-371.
- Ozols, J. (1990) Preparation of Membrane Fractions. *Methods in Enzymology* 182: 225-235.
- Pace-Asciak, C. R. and Smith, W. L. (1983) The Enzymes, Vol. XVI; Chapter 16: 543-603, *Enzymes in the Biosynthesis and Catabolism of the Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and Hydroxy Fatty Acids. 3rd Edition, P. D. Boyer (ed.), Academic Press Inc., London.*
- Palframan, R. T.; Collins, P. D.; Williams, T. J. and Rankin, S. M. (1998) Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 91 (7): 2240-2248.
- Papatheofanis, F. J. and Lands, W. E. M. (1985) Prostaglandins, Leukotrienes and Cancer. „Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism“. Chapter 2: 9-39, *Lipoxygenase Mechanisms. W. E. M. Lands (ed.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston.*
- Pareigis, J. (1997) Untersuchung zur biochemischen und biologischen Charakterisierung der 5-(S)-Hydroxyeikosanoid-Dehydrogenase. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.*
- Persson, B.; Krook, M. and Jörnvall, H. (1995) Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 5. Edited by H. Weiner et al., Plenum Press, N.Y..*
- Persson-Dajotoy, T.; Andersson, P.; Bjartell, A.; Calafat, J. and Egesten, A. (2003) Expression and production of the CXC chemokine growth-related oncogene-alpha by human eosinophils. *J. Immunol.* 170 (10): 5309-5316.
- Pettit, E. J. and Fay, F. S. (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol. Rev.* 78 (4): 949-967.
- Planus, E.; Galiacy, S.; Matthay, M.; Laurent, V.; Gavrilovic, J.; Murphy, G.; Clerici, C.; Isabey, D.; Lafuma, C. and d'Ortho, M. P. (1999) Role of collagenase in mediating in vitro alveolar epithelial wound repair. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 2): 243-252.
- Powell, W. S. (1985) High Pressure Liquid Chromatography of Eicosanoids (Chapter 22: 375-403.). *Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism. W. E. M. Lands (ed.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston.*
- Powell, W. S. (1987) Precolumn Extraction and Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography of Prostaglandins and Leukotrienes. *Anal. Biochem.* 164: 117-131.

- Powell, W. S.; Gravelle, F. and Gravel, S. (1992) Metabolism of 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid and other 5(S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 19233-19241.
- Powell, W. S.; Gravelle, F. and Gravel, S.; Hashefi, M. (1993) Stimulation of Human Neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid by a Mechanism Independent of the Leukotriene B₄ Receptor. *J. Biol. Chem.* 268: 9280-9286.
- Powell, W. S.; Hashefi, M.; Falck, J. R.; Chauhan, K.; Rokach, J.; Wang, A. S.; Mills, E. and MacLeod, J. (1995a) Effects of oxo and dihydro metabolites of 12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid on chemotaxis and cytosolic calcium levels in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 57: 257-263.
- Powell, W. S.; Chung, D. and Gravel, S. (1995b) 5-Oxo-6,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid Is a Potent Stimulator of Human Eosinophil Migration. *J. Immunol.* 154: 4123-4132.
- Powell, W. S.; Gravel, S.; Halwani, F.; Hii, C. S.; Huang Z. H.; Tan, A.-M. and Ferrante A. (1997) Effects of 5-Oxo-6,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid on Expression of CD11b, Actin Polymerization, and Adherence in Human Neutrophils. *J. Immunol.* 159:2952-2959.
- Powell, W. S.; Gravel, S. and Halwani, F. (1999) 5-oxo-6,8,11,14-Eicosatetraenoic Acid Is a Potent Stimulator of L-Selectin Shedding, Surface Expression of CD11b, Actin Polymerization, and Calcium Mobilization in Human Eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 163-170.
- Powell, W. S.; Ahmed, S.; Gravel, S. and Rokach, J. (2001) Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (2): 272-278.
- Rådmark, O. P. (2000) The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2 Pt 2): S11-15.
- Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344.
- Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J. (1992) Cytokine gene regulation by PGE₂, LTB₄ and PAF. *Mediators of Inflammation* 1: 5-8.
- Rosenbach, T.; Czernielewski, J.; Hecker, M. and Czarnetzki, B. (1990) Comparison of eicosanoid generation by highly purified human Langerhans cells and keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 95 (1): 104-107.
- Ross, K. F. and Herzberg, M. C. (2001) Calprotectin expression by gingival epithelial cells. *Infect. Immun.* 69 (5): 3248-3254.
- Samuelsson, B. (1982) Advances in Prostaglandin, Thromboxanes, and Leukotriene Research. „Leukotrienes and other Lipoxygenase Products“ Vol. 9: 1-17, *The Leukotrienes: An Introduction*. B. Samuelsson, R. Paoletti (ed.), Raven Press, N. Y..
- Samuelsson, B. (1991) Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Z. Rheumatol.* 50 Suppl 1:3-6.
- Samuelsson, B. (2000) The discovery of the leukotrienes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2 Pt 2): S2-S6.
- Sánchez-Madrid, F. and del Pozo, M. A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18 (3): 501-511.
- Sato, E.; Simpson, K. L.; Grisham, M. B.; Koyama, S. and Robbins, R. A. (1999) Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity in vitro. *Am. J. Pathol.* 155 (2): 591-598.

- Sawyer, S. J., Norvell, S. M.; Ponik, S. M.; and Pavalko, F. M. (2001) Regulation of PG E₂ and PG I₂ release from human umbilical vein endothelial cells by actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C1038–C1045.
- Schägger, H. and v. Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schröder, J. M. (1995) Cytokine networks in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 105 (1 Suppl.): 20S-24S.
- Schwenk, U.; Morita, E.; Engel, R. and Schröder, J.-M. (1992) Identification of 5-Oxo-15-hydroxy-6,8,11,13-eicosatetraenoic Acid as a Novel and Potent human Eosinophil Chemotactic Eicosanoid. *J. Biol. Chem.* 267: 12482-12488.
- Schwenk, U. and Schröder, J.-M. (1995) 5-Oxo-eicosanoids Are Potent Eosinophil Chemotactic Factors. *J. Biol. Chem.* 270: 15029-15036.
- Scrutton, N. S.; Berry, A. and Perham, R. N. (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343 (6253): 38-43.
- Sedgwick, J. B.; Calhoun, W. J.; Gleich, G. J.; Kita, H.; Abrams, J. S.; Schwartz, L. B.; Volovitz, B.; Ben-Yaakov, M. and Busse W. W. (1991) Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144 (6): 1274-1281.
- Serhan, C. N. and Drazen, J. M. (1997) Antiinflammatory Potential of Lipoxygenase-derived Eicosanoids: A Molecular Switch at 5 and 15 Positions ? *J. Clin. Invest.* 99 (6): 1147-1148.
- Shahabuddin, S.; Ponath, P. and Schleimer, R. P. (2000) Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J. Immunol.* 164 (7): 3847-3854.
- Siegenthaler, G.; Roulin, K.; Chatellard-Gruaz, D.; Hotz, R.; Saurat, J. H.; Hellman, U. and Hagens, G. (1997) A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J. Biol. Chem.* 4; 272 (14): 9371-9377.
- Simon, A.; Romert, A.; Gustafson, A. L.; McCaffery, J. M. and Eriksson, U. (1999) Intracellular localization and membrane topology of 11-cis retinol dehydrogenase in the retinal pigment epithelium suggest a compartmentalized synthesis of 11-cis retinaldehyde. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt. 4): 549-558.
- Singh, P. K.; Parsek, M. R.; Greenberg, E. P. and Welsh, M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417 (6888): 552-555.
- Skoog, M. T.; Nichols, J. S.; Harrison, B. L. and Wiseman, J. S. (1988) Specificity of an HPETE peroxidase from rat PMN. *Prostaglandins.* 36 (3): 373-384.
- Sohnle, P. G.; Hahn, B. L. and Santhanagopalan, V. (1996) Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *J. Infect. Dis.* 174 (6): 1369-1372.
- Sohnle, P. G. and Hahn, B. L. (2000a) Effect of zinc-reversible growth-inhibitory activity in human empyema fluid on antibiotic microbicidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (1): 139-142.
- Sohnle, P. G.; Hunter, M. J.; Hahn, B. and Chazin, W. J. (2000b) Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J. Infect. Dis.* 182 (4): 1272-1275.

- Sozzani, S.; Zhou, D.; Locati, M.; Bernasconi, S.; Luini, W.; Mantovani, A. and O'Flaherty, J. T. (1996) Stimulating properties of 5-oxo-eicosanoids for human monocytes: synergism with monocyte chemotactic protein-1 and -3. *J. Immunol.* 15; 157 (10): 4664-4671.
- Spanbroek, R.; Stark, H. J.; Janssen-Timmen, U.; Kraft, S.; Hildner, M.; Andl, T.; Bosch, F. X.; Fusenig, N. E.; Bieber, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. and Habenicht, A. J. (1998) 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2): 663-668.
- Stamatiou, P.; Hamid, Q.; Taha, R.; Yu, W.; Issekutz, T. B.; Rokach, J.; Khanapure, S. P. and Powell, W. S. (1998) 5-oxo-ETE induces pulmonary eosinophilia in an integrin-dependent manner in Brown Norway rats. *J. Clin. Invest.* 102 (12): 2165-2172.
- Stubbs, G. W.; Smith, G. and Litman Jr., B. J. (1976) Alkyl Glucosides as effective solubilizing agents for bovine rhodopsin. A comparison with several commonly used detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 425: 46-56.
- Stull, J. T. (2001) Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series. *J Biol Chem.* 276 (4): 2311-2312.
- Swann, J. C.; Reynolds, J. J. and Galloway, W. A. (1981) Zinc metalloenzyme properties of active and latent collagenase from rabbit bone. *Biochem. J.* 195: 41-49.
- Teigelkamp, S.; Bhardwaj, R. S.; Roth, J.; Meinardus-Hager, G.; Karas, M. and Sorg, C. (1991) Calcium-dependent complex assembly of the myeloid differentiation proteins MRP-8 and MRP-14. *J. Biol. Chem.* 15; 266 (20): 13462-13467.
- Thomas, T. C. and McNamee, M. G. (1990) Purification of Membrane Proteins. *Methods in Enzymology* 182: 499-520.
- Thornhill, M. H.; Wellicome, S. M.; Mahiouz, D. L.; Lanchbury, J. S.; Kyan-Aung, U. and Haskard, D. O. (1991) Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J. Immunol.* 146 (2): 592-598.
- Tzivion, G. and Avruch, J. (2001) 14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation by Serine/Threonine Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277 (5): 3061-3064.
- Vane, J. R.; Bakhle, Y. S. and Botting, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 97-120.
- van der Strate, B. W.; Beljaars, L.; Molema, G.; Harmsen, M. C. and Meijer, D. K. (2001) Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* (3): 225-239.
- Van Renswoude, J. and Kempf, C. (1984) Purification of Integral Membrane Proteins. *Methods in Enzymology* 104: 329-339.
- Villard, J.; Dayer-Pastore, F.; Hamacher, J.; Aubert, J. D.; Schlegel-Haueter, S. and Nicod, L. P. (1995) GRO alpha and interleukin-8 in Pneumocystis carinii or bacterial pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (5 Pt 1): 1549-1554.
- Wakabayashi, H.; Takakura, N.; Teraguchi, S. and Tamura, Y. (2003) Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated Candida albicans. *Microbiol. Immunol.* 47 (1): 37-43.
- Wardlaw, A. J. (1994) Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad. Med. J.* 70 (826): 536-552.
- Wardlaw, A. J. (2001) Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med.* 1 (3): 214-218.

- West-Mays, J. A.; Strissel, K. J.; Sadow, P. M. and Fini, M. E. (1995) Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 alpha autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92 (15): 6768-6772.
- Wintergalen, N.; Thole, H. H.; Galla, H.-J.; Schlegel, W. (1995) Prostaglandin-E₂ 9-reductase from corpus luteum of pseudopregnant rabbit is a member of the aldo-keto reductase superfamily featuring 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Eur. J. Biochem.* 234: 264-270.
- Xiao, B.; Smerdon, S. J.; Jones, D. H.; Dodson, G. G. ; Soneji, Y. ; Aitken, A. and Gamblin, S. J. (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376 (6536): 188-191.
- Yang, Y.; Loy, J.; Ryseck, R. P.; Carrasco, D. and Bravo, R. (1998) Antigen-induced eosinophilic lung inflammation develops in mice deficient in chemokine eotaxin. *Blood* 92 (10): 3912-323.
- Ying, S.; Meng, Q.; Zeibecoglou, K.; Robinson, D. S.; Macfarlane, A.; Humbert, M. and Kay, A. B. (1999) Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 163 (11): 6321-6329.
- Yu, W. and Powell, W. S. (1995) Analysis of Leukotrienes, Lipoxins, and Monooxygenated Metabolites of Arachidonic Acid by Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 226: 241-251.
- Zarini, S. and Murphy, R. C. (2003) Biosynthesis of 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid from 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid in the murine macrophage. *J. Biol. Chem.* 28; 278 (13): 11190-11196.
- Zeng, Z. Z.; Yellaturu, C. R.; Neeli, I. and Rao, G. N. (2002) 5-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. *J. Biol. Chem.* 277 (43): 41213-41219.
- Zhang, Y.; Styhler, A. and Powell, W. S. (1996) Synthesis of 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by human monocytes and lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 59: 847-854.
- Zhang, Y. Y.; Walker, J. L.; Huang, A.; Keaney, J. F.; Clish, C. B.; Serhan, C. N. and Loscalzo, J. (2002) Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem J.* 361 (Pt 2): 267-276.
- Zheng, X.; Karsan, A.; Duronio, V.; Chu, F.; Walker, D. C.; Bai, T. R. and Schellenberg, R. R. (2002) Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. *Immunology* 107 (3): 306-315.
- Zimmer, D. B.; Cornwall, E. H.; Landar, A. and Song, W. (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res. Bull.* 37 (4): 417-429.
- Zimpfer, U.; Hofmann, C.; Dichmann, S.; Schöpf, E. and Norgauer, J. (1998) Synthesis, biological effects and pathophysiological implications of the novel arachidonic acid metabolite 5-oxo-eicosatetraenoic acid. *Int. J. Mol. Med.* 2 (2): 149-153.
- Zimpfer, U.; Dichmann, S.; Termeer, C. C.; Simon, J. C.; Schröder, J.-M. and Norgauer, J. (2000) Human dendritic cells are a physiological source of the chemotactic arachidonic acid metabolite 5-oxo-eicosatetraenoic acid. *Inflamm. Res.* 49: 633-638.

10 Anhang

10.1 Berechnung der relativen Zentrifugalkraft

$$\text{RCF} = \frac{r \times \omega^2}{g} = 1,12 \times r \times \left(\frac{\text{Upm}}{1000} \right)^2$$

RCF: „Relative Centrifugal Force“ (relative Zentrifugalkraft)	SW28-Rotor	r_{max}	r_{av}	r_{min}
	11.000 Upm	23.214 x g	16.546 x g	9.880 x g
ω: Winkelgeschwindigkeit	50-Ti-Rotor	r_{max}	r_{av}	r_{min}
r: Rotorradius; in drei Meßpunkten unterteilt				
g: Erdbeschleunigung	40.000 Upm	144.793 x g	105.907 x g	67.020 x g
Upm: Umdrehung pro Minute				

Für die Differentialzentrifugation wurden Rotoren der Firma Beckmann, München, aus der Modellreihe SW28 und 50-Ti verwendet.

10.2 Abkürzungen und Buchstabensymbole der Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzungen und Buchstabensymbole	
Valin	Val	V
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	O

Aminosäure	Abkürzungen und Buchstabensymbole	
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Cystein	Cys	C
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Glu	Q
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
Histidin	His	H
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E

(Literaturquelle: Lubert Stryer, 1991, Biochemie, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin, New York).

10.3 Kodierungssequenz der Aminosäuren

		zweite Base			
		U	C	A	G
erste Base	U	UUU	UCU	UAU	UGU
		UUC Phe	UCC	UAC Tyr	UGC Cys
		UUA	UCA	UAA	UGA Termination
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Termination	UGG Trp
	C	CUU	CCU	CAU	CGU
		CUC	CCC	CAC His	CGC
		CUA	CCA	CAA	CGA
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
	A	AUU	ACU	AAU	AGU
		AUC	ACC	AAC Asn	AGC Ser
		AUA Ile	ACA	AAA	AGA
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
	G	GUU	GCU	GAU	GGU
		GUC	GCC	GAC Asp	GGC
		GUA	GCA	GAA	GGA
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Es existieren 61 Codons, die die Aminosäuren kodieren. Außer Methionin und Tryptophan werden alle Aminosäuren durch mehr als ein Codon repräsentiert. Drei Codons (UAA, UAG, UGA) führen zum Syntheseabbruch. Die Reihenfolge der Basen in einem Codon erfolgt in 5' → 3'-Richtung. (Literaturquelle: Benjamin Lewin, 1991, *Gene*, 2. Auflage, VCH-Verlag).

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder danke ich aufrichtig für die Vergabe des Themas und für die intensive Betreuung dieser Dissertation. Die ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Ratschlägen zur Durchführung und Erstellung dieser Arbeit waren von großem Nutzen für mich.

Frau Prof. Dr. K. Krupinska danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit und für die Bereiterklärung zur Begutachtung.

Vielen Dank an Dr. J. Bartels für die Hilfestellung bei den Sequenzierungsarbeiten.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. M. Schunck für die sorgfältige und ausführliche Durchsicht dieser Arbeit.

Allen anderen Mitarbeitern der Hautklinik danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meine Mutter danke ich dafür, daß sie mir stets einen Rückhalt und Unterstützung gegeben hat.

Abschließend möchte ich mich für den Rückhalt meiner Freunde Birge Bargmann, Familie Barz, Till Böhmert, Familie Dr. P. Ernst, Familie Dr. M. Ernst, Familie Dr. K. Fleck und Prof. Dr. Wiedow bedanken.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig erstellt wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die Stellen der vorliegenden Dissertation, einschließlich Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, sind in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen und wurde, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Eine solche Veröffentlichung wird von mir auch nicht vor Abschluß des Promotionsverfahrens vorgenommen werden. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Shing Kit Lee

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit

Lee, S. K.; Pareigis, J. and Schröder, J.-M. (1998) Purification and properties of specific microsomal 5-(S)-hydroxyeicosanoid dehydrogenase. *International Investigative dermatology (IID), Köln (Poster)*.

Lee, S. K. and Schröder, J.-M. (2000) Eosinophil-chemotactic Eicosanoids induce Proinflammatory Cytokine mRNA in dermal Fibroblasts. *Tagung des Arbeitskreises dermatologischer Forschung (ADF), Wien (Poster)*.

13 Lebenslauf

Name: Shing Kit Lee

Geburtsdatum: 28. Juli 1969

Geburtsort: Hong Kong

Eltern: Mutter: Choi Chun Lee, geb. Cheung
Vater: Yun Fat Lee (verstorben 1986)

Familienstand: ledig

Wohnort: Kiel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Lebensaufenthalt: 1969 – 1975 in China, Hong Kong
ab 1975 in Deutschland

Schulbildung: 1976 – 1980
Grundschule-Forsmannstraße in Hamburg
1980 – 1989
Heinrich-Hertz-Schule (Gymnasium) in Hamburg

Studium: Oktober 1990 – Dezember 1996
Biologie an der
Fakultät der Biologie der Universität Bielefeld

Diplomarbeit mit dem Thema:
„Untersuchungen zur Zell-Zell-Wechselwirkung
zwischen Endothelzellen und HL-60-Zellen“

Promotionsstudium: Januar 1997 – Februar 2004
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dissertationsarbeit mit dem Thema:
„Biochemische Charakterisierung der 5-Hydroxy
eikosanoid-Dehydrogenase und biologische Funktion
der 5-Hydroxy- und 5-oxo-Eikosatetraensäure“

Beruf: seit Januar 2001 bei Proteo Biotech AG, Kiel