

**Genetische Assoziationen von *ALOX5*-Varianten bei
Patienten mit Tuberkulose und Kontrollen in Ghana
und funktionelle Bedeutung der strukturellen
Veränderung der 5-Lipoxygenase**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Florian Herb

- Hamburg 2007 -

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis November 2007 unter der Leitung von Prof. Dr. Meyer in der Sektion Tropenmedizinische Grundlagenforschung des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Chris Meier

(Universität Hamburg)

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Meyer

(Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg)

2. Gutachter: Prof. Dr. Dorothee Dartsch

(Universität Hamburg)

eingereicht: 2. Januar 2008

Datum der Disputation: 15. Februar 2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. TUBERKULOSE.....	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE DER TUBERKULOSE.....	1
1.1.2. MIKROBIOLOGIE DER TUBERKULOSE-ERREGER.....	2
1.1.3. KLINIK UND THERAPIE DER TUBERKULOSE	5
1.1.3.1. KLINIK.....	5
1.1.3.2. THERAPIE	5
1.1.4. IMMUNANTWORT GEGENÜBER ERREGERN DES MTB-KOMPLEXES	6
1.1.4.1. ANGEBORENE IMMUNITÄT	6
1.1.4.2. ERWORBENE IMMUNITÄT.....	7
1.1.4.3. ANTI- UND PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE	8
1.1.5. EMPFÄNGLICHKEIT FÜR TUBERKULOSE.....	8
1.2. ALOX5.....	10
1.2.1. ALOX5-KNOCK-OUT-MÄUSE UND MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	10
1.2.2. REGULATION DER ALOX5-GENEXPRESSION.....	10
1.2.3. STRUKTUR UND FUNKTIONEN DER 5-LIPOXYGENASE	12
1.2.3.1. STRUKTUR.....	12
1.2.3.2. FUNKTIONEN.....	14
1.2.4. FAKTOREN DER 5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄT	15
1.2.4.1. CALCIUM.....	15
1.2.4.2. ADENOSINTRIPHOSPHAT	16
1.2.4.3. PHOSPHOLIPIDE	16
1.2.4.4. LIPIDHYDROPEROXIDE	16

1.2.5.	5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄT IN DER ZELLE	16
1.2.6.	LEUKOTRIENE UND LIPOXINE.....	17
1.2.6.1.	FUNKTION DER LEUKOTRIENE.....	17
1.2.6.2.	FUNKTION DER LIPOXINE.....	18
1.2.7.	PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON STÖRUNGEN DER 5-LIPOXYGENASE- AKTIVITÄT	19
1.3.	FRAGESTELLUNG: GENETISCHE ASSOZIATIONEN VON <i>ALOX5</i> -VARIANTEN BEI PATIENTEN MIT TUBERKULOSE UND KONTROLLEN IN GHANA UND FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER STRUKTURELLEN VERÄNDERUNG DER 5-LIPOXYGENASE.....	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1.	MATERIAL.....	23
2.1.1.	STUDIENKOLLEKTIV	23
2.1.2.	CHEMIKALIEN, BIOCHEMIEKALIEN UND REAGENZIEN.....	24
2.1.3.	OLIGONUKLEOTIDE.....	25
2.1.4.	ENZYME	26
2.1.5.	KULTURMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	26
2.1.5.1.	KULTURMEDIEN UND PUFFER.....	26
2.1.5.2.	LÖSUNGEN.....	28
2.1.6.	REAGENZISYSTEME.....	28
2.1.7.	PROTEIN- UND DNA-STANDARDS	29
2.1.8.	VEKTOREN	29
2.1.9.	ZELLEN	29
2.1.10.	ANTIKÖRPER.....	29
2.1.11.	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	30
2.1.12.	GERÄTE	30
2.1.13.	DATENBANKEN UND PROGRAMME	31
2.2.	METHODEN	32
2.2.1.	DNA-EXTRAKTION	32
2.2.1.1.	DNA-EXTRAKTION AUS VOLLBLUT	32

2.2.1.2.	DNA-EXTRAKTION AUS FILTERPAPIER	32
2.2.1.3.	DNA-EXTRAKTION AUS AGAROSEGEL.....	32
2.2.2.	POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	33
2.2.3.	GENOTYPISIERUNG MITTELS <i>FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER</i> (FRET).....	34
2.2.4.	MULTIFLUORESZIERENDE FRAGMENTLÄNGENBESTIMMUNG.....	36
2.2.5.	SEQUENZIERUNG	38
2.2.6.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	40
2.2.7.	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> -ZELLEN	40
2.2.7.1.	MINI-PRÄPARATION MIT NUCLEOSPIN® PLASMID KIT.....	40
2.2.7.2.	MINI-PRÄPARATION MIT CTAB-METHODE	40
2.2.7.3.	MAXI-PRÄPARATION MIT NUCLEOBOND™ RC500 KIT	41
2.2.8.	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	41
2.2.9.	<i>IN VITRO</i> ORTSGERICHTETE MUTAGENESE	41
2.2.10.	RESTRIKTIONSVERDAU	42
2.2.11.	ZELLKULTUR.....	43
2.2.11.1.	<i>ESCHERICHIA COLI</i> -ZELLEN	43
2.2.11.2.	HELA-ZELLEN	43
2.2.11.3.	MONO MAC 6-ZELLEN.....	43
2.2.12.	ISOLATION VON NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN AUS BLUT	43
2.2.13.	PLASMID-TRANSFORMATION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> -ZELLEN	44
2.2.14.	5-LIPOXYGENASE-EXPRESSION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> -ZELLEN.....	45
2.2.15.	AUFSCHLUSS VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> -ZELLEN	45
2.2.16.	TRANSFEKTION VON HELA-ZELLEN	45
2.2.17.	Ernte der HeLa-Zellen	46
2.2.18.	NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	46
2.2.19.	<i>WESTERN BLOT</i> UND IMMUNODETEKTION	47
2.2.20.	5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄTSASSAY	49

2.2.20.1.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG IN <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	49
2.2.20.2.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG IN HELA-ZELLEN UND NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....	49
2.2.21.	HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE (HPLC)	49
2.2.22.	TRANSLOKATIONSASSAY	52
2.2.23.	STATISTIK.....	53
3.	ERGEBNISSE	54
3.1.	POWERBERECHNUNG DER ASSOZIATIONSSTUDIE.....	54
3.2.	EXONISCHE <i>ALOX5</i> -VARIANTE G.760G>A.....	54
3.2.1.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	54
3.2.2.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN NACH STRATIFIZIERUNG IN MYKOBAKTERIENSPEZIES UND MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN.....	56
3.2.2.1.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND ASSOZIIERTE MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN.....	57
3.2.2.2.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI MIT EINER BESTIMMTEN MYKOBAKTERIENSPEZIES ODER MYKOBAKTERIELLEN GENOTYPGRUPPE ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	57
3.2.3.	GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND DER KONTROLLGRUPPE NACH STRATIFIZIERUNG IN GESCHLECHT UND IN MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN.....	60
3.2.4.	POTENTIELLE KOVARIABLEN	61
3.3.	<i>ALOX5</i> -PROMOTOR VNTR-POLYMORPHISMUS	62
3.3.1.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	62
3.3.2.	VERTEILUNG DER GENOTYPGRUPPEN DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN NACH STRATIFIZIERUNG IN MYKOBAKTERIEN- SPEZIES UND MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN.....	64
3.3.2.1.	ALLEL- UND GENOTYPVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN UND ASSOZIIERTE MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN.....	65

3.3.2.2.	VERTEILUNG DER ALLELE UND GENOTYPGRUPPEN DES VNTR-POLY- MORPHISMUS BEI MIT EINER BESTIMMTEN MYKOBAKTERIENSPEZIES ODER MYKOBAKTERIELLEN GENOTYPGRUPPE ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	65
3.3.3.	POTENTIELLE KOVARIABLEN	66
3.3.4.	GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS IN EINER VERGLEICHSGRUPPE	66
3.4.	INTERAKTION UND HAPLOTYPEN DER G.760G>A-VARIANTE UND DES VNTR-POLYMORPHISMUS.....	67
3.4.1.	INTERAKTION DER G.760G>A-VARIANTE MIT DEM VNTR-POLYMORPHISMUS.....	67
3.4.2.	VERTEILUNG DER HAPLOTYPEN BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	67
3.4.3.	VERTEILUNG DER HAPLOTYPEN BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN NACH STRATIFIZIERUNG IN MYKOBAKTERIENSPEZIES UND MYKOBAKTERIELLE GENOTYPGRUPPEN	68
3.5.	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ZUM AMINOSÄUREAUSTAUSCH P.GLU254Lys (G.760G>A)	70
3.5.1.	ORTSGERICHTETE MUTAGENESE VON 5-LO-PLASMIDEN UND RESTRIKTIONSVERDAU	70
3.5.2.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER 5-LIPOXYGENASE IN <i>ESCHERICHIA COLI</i> -LYSATEN	71
3.5.2.1.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER 5-LIPOXYGENASE IN ABHÄNGIGKEIT DER ARACHIDONSÄURE-KONZENTRATION	72
3.5.2.2.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER 5-LIPOXYGENASE IN ABHÄNGIGKEIT DER ENZYM-KONZENTRATION.....	73
3.5.2.3.	VERGLEICH DER KINETIK IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ENZYM- KONZENTRATION	74
3.5.2.4.	AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER 5-LIPOXYGENASE IN ABHÄNGIGKEIT VON CALCIUM.....	76
3.5.2.5.	VERGLEICH DER KINETIK IN ABHÄNGIGKEIT VON CALCIUM.....	76
3.5.2.6.	AKTIVITÄT DER 5-LIPOXYGENASE IN ABHÄNGIGKEIT VON PHOSPHATIDYLCHOLIN	77

3.5.2.7.	AKTIVITÄT DER 5-LIPOXYGENASE IN ABHÄNGIGKEIT VOM REDOXSTATUS DES KATALYTISCHEN EISENS.....	78
3.5.2.8.	OXYGENASEAKTIVITÄT UND LTA ₄ -SYNTHASEAKTIVITÄT DER 5-LIPOXYGENASE	80
3.5.3.	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN IN HELA ZELLEN.....	82
3.5.3.1.	AKTIVITÄT DER 5-LIPOXYGENASE IN HELA-ZELLEN	82
3.5.3.2.	AKTIVITÄT DER 5-LIPOXYGENASE IN HELA-ZELLEN NACH KOTRANSFEKTION MIT FLAP	83
3.5.3.3.	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO	84
4.	DISKUSSION	86
4.1.	DIE MÖGLICHE ROLLE VON <i>ALOX5</i> IN DER IMMUNITÄT GEGENÜBER ERREGERN DER TUBERKULOSE.....	86
4.2.	ASSOZIATION DER EXONISCHEN <i>ALOX5</i> -VARIANTE MIT DEM RISIKO EINER TUBERKULOSE.....	88
4.3.	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN DES AMINOSÄUREAUSTAUSCHS P. GLU254LYS DER 5-LIPOXYGENASE.....	95
4.4.	ASSOZIATION DES VNTR-POLYMORPHISMUS MIT DEM RISIKO EINER TUBERKULOSE.....	103
4.5.	INTERAKTION UND VERTEILUNG DER HAPLOTYPEN.....	108
4.6.	AUSBLICK.....	109
5.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	110
6.	LITERATUR	112
7.	ANHANG.....	134
	DANKSAGUNG.....	140
	LEBENS LAUF	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
5-H(p)ETE	5(S)-Hydro(pero)xy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure
5-LO	5-Lipoxygenase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Absorptionskoeffizienz
A	Adenin
AA	Arachidonsäure
<i>ad</i>	bis zu
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATL	<i>aspirin-triggered lipoxins</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BPB	Bromphenolblau
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CD4 ⁺ -Zellen	CD4-positive T-Lymphozyten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-terminal	Carboxy-terminal
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTS	<i>Directly observed treatment, short-course</i>
DTH	<i>delayed-type hypersensitivity</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E</i>	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMB	Ethambutol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
Fe	Eisen
FLAP	<i>5-lipoxygenase-activating protein</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
Glu	Glutaminsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPx	Glutathion-Peroxidase
H ₂ O	Wasser
<i>HBB</i>	<i>Hämoglobin-Beta</i>
HCL	Salzsäure
Hepes	4-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
INH	Isoniazid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
<i>K</i>	<i>Klebsiella</i>
Kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
konz	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LO	Lipoxygenase
LOOH	Lipidhydroperoxide
Lsg.	Lösung
LT	Leukotrien
LX	Lipoxin
Lys	Lysin
M	molar
<i>M</i>	<i>Mycobacterium</i>
MDR-TB	<i>multidrug-resistant tuberculosis</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl	Magnesiumchlorid
Mill	Millionen
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM6-Zellen	Mono Mac 6-Zellen
MSMD	<i>Mendelian susceptibility to mycobacterial disease</i>
Mt	Mutante
MTB-Komplex	<i>M. tuberculosis</i> -Komplex
Multifluor. Fragm	Multifluoreszierende Fragmentlängenbestimmung

N	normal
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nramp1	<i>natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
n.s.	nicht signifikant
NTB	Ghanaisches Nationales Tuberkuloseprogramm
N-terminal	Stickstoff-terminal
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien
OD	optische Dichte
OR	Odds Ratio
<i>P</i>	P-Wert
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
<i>P_c</i>	auf multiples Testen korrigierter P-Wert
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGB _{1/2}	Prostaglandin B _{1/2}
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pmol	Picomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPD	<i>Purified Protein Derivative</i>
PZA	Pyrazinamid
RD	<i>region of difference</i>
RMP	Rifampicin
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLC11A1	<i>solute carrier family 11</i>
STI	<i>soybean trypsin inhibitor</i>
t _{1/2} max	Zeitpunkt der halb-maximalen Aktivität
T(B)E	Tris-(Borat-)EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	<i>transforming-growth factor-β</i>
Th1-Zellen	Typ-1-Helfer-Lymphozyten
Th2-Zellen	Typ-2-Helfer-Lymphozyten
TLR-2	Toll-like Rezeptor 2
TM, ®	eingetragene Warenzeichen

T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
vgl	vergleiche
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
vs.	<i>versus</i>
WHO	World Health Organization
Wt	Wildtyp
XDR-TB	<i>extensively drug-resistant tuberculosis</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1:	GESCHÄTZTE ANZAHL AN TUBERKULOSE-NEUERKRANKUNGEN IM JAHR 2005	1
ABBILDUNG 2:	PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER MYKOBAKTERIEN	3
ABBILDUNG 3:	GEOGRAPHISCHE VERBREITUNG DER MYKOBAKTERIELLEN GENOTYPEN	4
ABBILDUNG 4:	TRANSKRIPTIONSFaktor-BINDUNGSSTELLEN IM <i>ALOX5</i> -PROMOTOR	12
ABBILDUNG 5:	3-DIMENSIONALES-MODELL DER 5-LIPOXYGENASE	13
ABBILDUNG 6:	LEUKOTRIEN- UND LIPOXIN-BIOSYNTHESE	15
ABBILDUNG 7:	ZELLULÄRE AKTIVIERUNG DER 5-LIPOXYGENASE	17
ABBILDUNG 8:	VORGEHENSWEISE BEI DER DURCHFÜHRUNG DER ARBEIT	22
ABBILDUNG 9:	GENOTYPISIERUNG DER VARIANTE G.760G>A MITTELS FRET	35
ABBILDUNG 10:	GENOTYPISIERUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS	37
ABBILDUNG 11:	SEQUENZIERUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS	39
ABBILDUNG 12:	HPLC-DIAGRAMME EINER 5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG IM <i>E. COLI</i> -LYSAT	51
ABBILDUNG 13:	TRANSLOKATIONSASSAY DER 5-LIPOXYGENASE IN HELA-ZELLEN	52
ABBILDUNG 14:	GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG BEI MIT EINER BESTIMMTEN MYKOBAKTERIELLEN GENOTYPGRUPPE ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND BEI KONTROLLEN	58
ABBILDUNG 15:	ABBILD DER GELELEKTROPHORESE DER PLASMID-FRAGMENTE NACH <i>AvaI</i> -VERDAU	71
ABBILDUNG 16:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ARACHIDON- SÄURE-KONZENTRATION	72
ABBILDUNG 17:	<i>WESTERN BLOT</i> -ANALYSEN VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> -LYSATEN	73
ABBILDUNG 18:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMKONZENTRATION	74
ABBILDUNG 19:	KINETIK DER 5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMKONZENTRATION	75
ABBILDUNG 20:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT VON CALCIUM	76
ABBILDUNG 21:	KINETIK DER 5-LIPOXYGENASE-AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABWESENHEIT VON CALCIUM	77
ABBILDUNG 22:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT VON PHOSPHATIDYL- CHOLIN	78
ABBILDUNG 23:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ZUGESETZTEN MENGE ZELLYSAT VON MONO MAC-6 ZELLEN OHNE CALCIUM-ZUGABE	79
ABBILDUNG 24:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ZUGESETZTEN MENGE ZELLYSAT VON MONO MAC-6 ZELLEN MIT CALCIUM-ZUGABE	80
ABBILDUNG 25:	OXYGENASE:LTA ₄ -SYNTHESE-VERHÄLTNIS BEI 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO	81
ABBILDUNG 26:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN HELA-ZELLEN	83
ABBILDUNG 27:	AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN HELA-ZELLEN IN ANWESENHEIT VON FLAP	84
ABBILDUNG 28:	<i>WESTERN BLOT</i> DER MEMBRANFRAKTION DER 5-LIPOXYGENASE	85
ABBILDUNG 29:	<i>WESTERN BLOT</i> DER ZYTOSOLFRAKTION DER 5-LIPOXYGENASE	85
ABBILDUNG 30:	<i>WESTERN BLOT</i> DER GESAMTPROTEINMENGE DER 5-LIPOXYGENASE	85

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	STUDIEN ZU MÖGLICHEN ASSOZIATIONEN DES <i>ALOX5</i> -VNTR-POLYMORPHISMUS	20
TABELLE 2:	WEITERE VERWENDETE CHEMIKALIEN, BIOCHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	24
TABELLE 3:	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	25
TABELLE 4:	VERWENDETE ENZYME	26
TABELLE 5:	ANGEWENDETE REAGENZIENSYSTEME	28
TABELLE 6:	VERWENDETE PROTEIN- UND DNA-STANDARDS	29
TABELLE 7:	VERWENDETE VEKTOREN	29
TABELLE 8:	EINGESETZTE ZELLEN	29
TABELLE 9:	EINGESETZTE ANTIKÖRPER	29
TABELLE 10:	VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALEN	30
TABELLE 11:	VERWENDETE GERÄTE	30
TABELLE 12:	PCR-REAKTIONSANSATZ I	33
TABELLE 13:	PCR-REAKTIONSBEDINGUNGEN I	34
TABELLE 14:	PCR-REAKTIONSANSATZ II	36
TABELLE 15:	PCR-REAKTIONSANSATZ III	39
TABELLE 16:	PCR-REAKTIONSBEDINGUNGEN II	39
TABELLE 17:	PCR-REAKTIONSANSATZ IV	42
TABELLE 18:	PCR-REAKTIONSBEDINGUNGEN III	42
TABELLE 19:	ABSORPTIONSKOEFFIZIENTEN UND MOLEKULARGEWICHTE DER LEUKOTRIENE	51
TABELLE 20:	ALLELVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	55
TABELLE 21:	GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	55
TABELLE 22:	GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG VON G.760G>A BEI FÄLLEN DIFFERENZIERT NACH MYKOBACTERIENSPEZIES UND MYKOBAKTERIELLER GENOTYPGRUPPE	56
TABELLE 23:	ALLELVERTEILUNG VON G.760G>A BEI MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	59
TABELLE 24:	ALLELVERTEILUNG VON G.760G>A BEI MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ODER <i>M. BOVIS</i> ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	59
TABELLE 25:	GENOTYPVERTEILUNG VON G.760G>A BEI MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ODER <i>M. BOVIS</i> ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	60
TABELLE 26:	ALLELVERTEILUNG BEI MÄNNLICHEN MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	61
TABELLE 27:	GENOTYPVERTEILUNG BEI MÄNNLICHEN MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	61
TABELLE 28:	ALLELVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	62
TABELLE 29:	GENOTYP UND GENOTYPGRUPPENVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	63
TABELLE 30:	GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI FÄLLEN DIFFERENZIERT NACH MYKOBACTERIENSPEZIES UND MYKOBAKTERIELLER GENOTYPGRUPPE	64

TABELLE 31: ALLELVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI MIT DER <i>M. TUBERCULOSIS</i> EAST-ASIAN-GRUPPE ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND FÄLLEN ANDERER ASSOZIIERTER MYKOBAKTERIELLER GENOTYPGRUPPEN	65
TABELLE 32: VERTEILUNG DER GENOTYPGRUPPEN DES VNTR-POLYMORPHISMUS BEI MIT DER <i>M. TUBERCULOSIS</i> EURO-AMERICAN-GRUPPE ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	66
TABELLE 33: GENOTYP- UND ALLELVERTEILUNG DES VNTR-POLYMORPHISMUS IN EINER VERGLEICHSGRUPPE	67
TABELLE 34: <i>ALOX5</i> -VARIANTEN-HAPLOTYPVERTEILUNG BEI FÄLLEN UND KONTROLLEN	68
TABELLE 35: VERTEILUNG DER HAPLOTYPEN BEI MIT <i>M. AFRICANUM</i> WEST-AFRICAN 2 ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	68
TABELLE 36: VERTEILUNG DER HAPLOTYPEN BEI MIT <i>M. TUBERCULOSIS</i> EURO-AMERICAN ASSOZIIERTEN FÄLLEN UND KONTROLLEN	69
TABELLE 37: ZEITPUNKT DER HALBMAXIMALEN AKTIVITÄT DER 254GLU-5-LO UND 254LYS-5-LO IN ABHÄNGIGKEIT DER ENZYMKONZENTRATION	75

1. EINLEITUNG

1.1. Tuberkulose

1.1.1. Epidemiologie der Tuberkulose

Nach Schätzungen der World Health Organization (WHO) ist etwa ein Drittel der Menschheit mit Erregern der Tuberkulose infiziert [WHO, 2007a]. Eine Infektion führt aber nicht zwangsläufig zur Ausbildung einer manifesten Tuberkulose; lediglich bei fünf bis zehn Prozent aller Infizierten kommt es zu einer klinisch relevanten Erkrankung [WHO, 2007b].

In Industrieländern weisen die Inzidenzen und Mortalitätsraten der Tuberkulose eine kontinuierlich fallende Tendenz auf [Kunitz *et al.*, 2007]. Die Gesamtzahl der Neuerkrankungen hat weltweit jedoch in den vergangenen Jahren stetig zugenommen und lag 2005 bei über acht Millionen [WHO, 2007a]. Die meisten Neuerkrankungen treten in Südostasien auf. Im Verhältnis zu der Anzahl der Bewohner ist allerdings die Region südlich der Sahara am stärksten betroffen [WHO, 2007b] (Abbildung 1); dort werden auch die meisten Todesfälle durch Tuberkulose registriert [WHO, 2007a]. Weltweit sterben an den Folgen einer Tuberkulose jährlich etwa zwei Millionen Menschen [Dye, 2006].

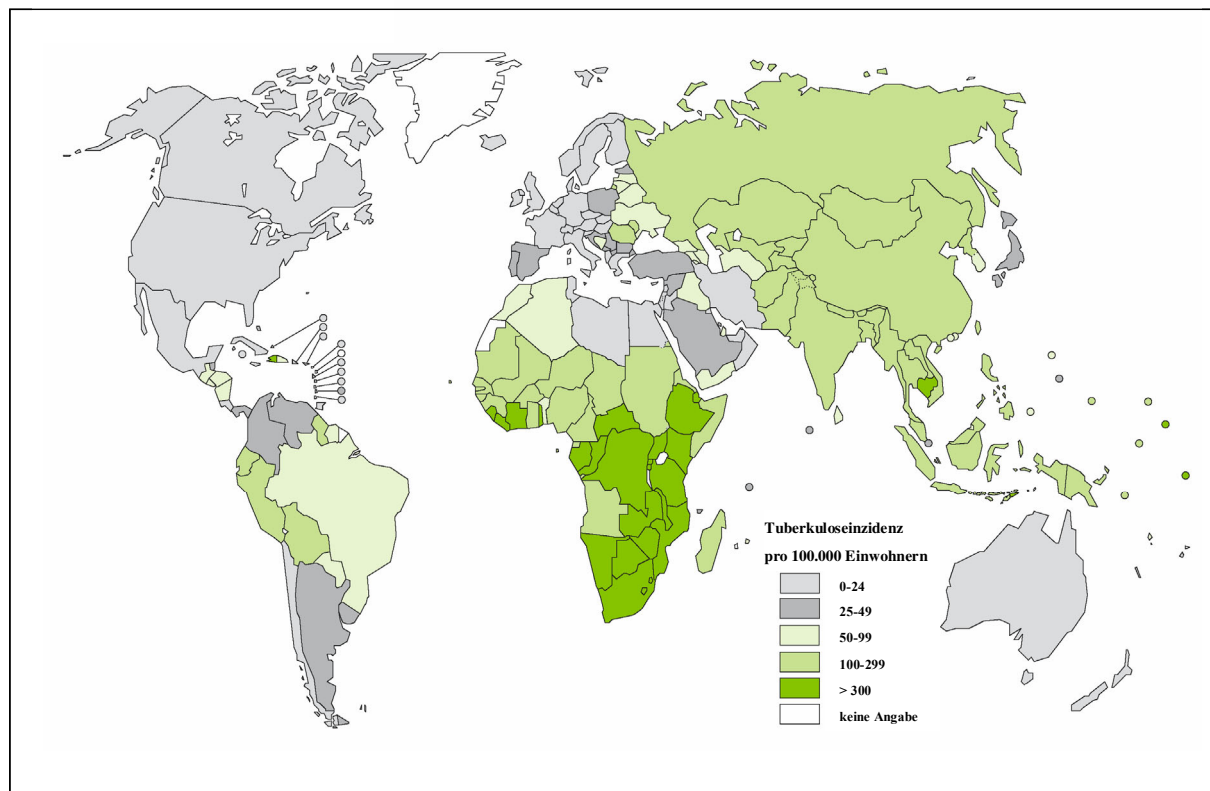


Abbildung 1: Geschätzte Anzahl an Tuberkulose-Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr 2005 [Grafik aus WHO, 2007b]

1.1.2. Mikrobiologie der Tuberkulose-Erreger

Eine Tuberkulose wird durch eine Infektion mit Mykobakterien hervorgerufen. Mykobakterien gehören der Ordnung Actinomycetales, Familie Mycobacteriaceae und Gattung *Mycobacterium* an. Innerhalb der Gattung *Mycobacterium* werden die Erreger der Tuberkulose im *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTB-Komplex) zusammengefasst. Von diesem Komplex sind die so genannten atypischen Mykobakterien (heute: NTM; nicht-tuberkulöse Mykobakterien) abzugrenzen [Griffith, 1997; van Soolingen, 2001].

Die Erreger des MTB-Komplexes sind aerobe, unbewegliche, langsam wachsende, stäbchenförmige und obligat intrazellulär lebende Bakterien [Ratledge, 1976]. Der routinemäßig durchgeführte diagnostische Nachweis der Erreger erfolgt nach Ziehl-Neelsen-Färbung lichtmikroskopisch [Barksdale & Kim, 1977] oder mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Auramin-Färbung [Steingart *et al.*, 2006]. Die mykobakteriellen Spezies lassen sich anhand der Morphologie und Geschwindigkeit des Koloniewachstums in speziellen flüssigen und festen Kulturmedien unterscheiden (Middlebrook-Medium, Löwenstein-Jensen-Medium) [Shinnick & Good, 1994]. Die Generationszeit der Mykobakterien (16 bis 20 Stunden) erfordert lange Anzuchtzeiten. Positive Befunde sind frühestens nach ein bis zwei Wochen zu erwarten, während eine negative Beurteilung erst nach etwa sechs bis acht Wochen Kultivierung erfolgen darf [Türk, 2006].

Mit biochemischen Methoden lässt sich der MTB-Komplex in die Spezies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* und *M. bovis* unterteilen. Die Differenzierung erfolgt durch den Nachweis der für die Spezies charakteristischen Stoffwechselprodukte (Nitratreduktase-, Niacin-, Pyrazinamidase-Test) [Damato *et al.*, 1984]. Die ebenfalls dem MTB-Komplex zuzurechnenden Spezies *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* und *M. caprae* sind nur durch molekulargenetische Verfahren zu unterscheiden. Die Bedeutung dieser Spezies für die Tuberkulose beim Menschen ist umstritten [van Soolingen *et al.*, 1997; Cousins *et al.*, 2003]. In den meisten Fällen werden zur zweifelsfreien Typisierung mehrere Verfahren eingesetzt (IS6110-Fingerprint-Methode, Spoligotyping, Deletions-Typisierung, gyrB-PCR-RFLP). Diese Methoden beruhen auf der Bestimmung charakteristischer, teilweise repetitiver Polymorphismen, Deletionen und Insertionen im Mykobakteriengenom [Niemann *et al.*, 2000; Gori *et al.*, 2005; Tsolaki *et al.*, 2005].

Mit diesen Methoden ist auch die weitere Differenzierung in mykobakterielle Genotypen möglich. Die Struktur eines phylogenetischen Stammbaums wird von den verwendeten genetischen Markern bestimmt [Sreevatsan *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2004; Gagneux *et al.*, 2006; Brudey *et al.*, 2006; Filliol *et al.*, 2006]. Es wurde vorgeschlagen, die Genotypen der *M. tuberculosis*- und *M. africanum*-Spezies nach dem Vorkommen bestimmter Deletionen im mykobakteriellen Genom in sechs Genotypgruppen einzuteilen (Abbildung 2). Dieser

Einteilung folgend, ergeben sich für die Spezies *M. tuberculosis* die phylogenetischen Zweige Indo-Oceanic, East-Asian, East-African-Indian und Euro-American. *M. africanum* gliedert sich danach in die mykobakteriellen Genotypgruppen West-African 1 und West-African 2. *M. bovis* ist anhand seines Deletionsmusters offenbar eng mit *M. africanum* verwandt [Gagneux & Small, 2007].

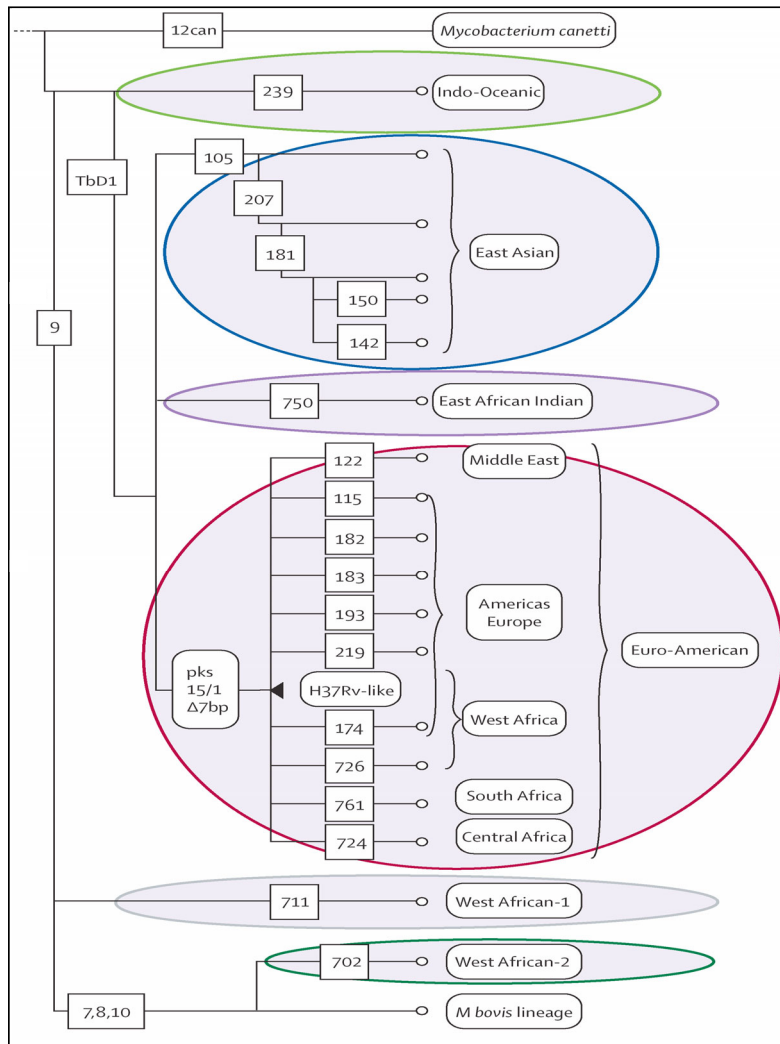


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Mykobakterien-Spezies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* [Grafik aus Gagneux & Small, 2007]

Nach dem Vorkommen von Deletionen (schwarze Kästen) im mykobakteriellen Genom wurden die Spezies *M. tuberculosis* und *M. africanum* in Genotypgruppen eingeteilt; hellgrün: Indo-Oceanic; blau: East-Asian; violett: East-African-Indian; rot: Euro-American; grau: West-African 1; dunkelgrün: West-African 2.

Die unterschiedlichen mykobakteriellen Genotypen weisen eine charakteristische geographische Verbreitung auf. Vertreter der Euro-American-Gruppe sind in Europa und Amerika in nahezu allen untersuchten Isolaten gefunden worden und auch in Afrika machen sie einen großen Teil der dort identifizierten Genotypen aus. Im asiatischen Raum überwiegen Genotypen der East-Asian-, Indo-Oceanic- und East-African-Indian-Gruppe. Die

Genotypen der West-African-1- und West-African-2-Gruppe sind dagegen nahezu ausschließlich auf Afrika beschränkt (Abbildung 3).

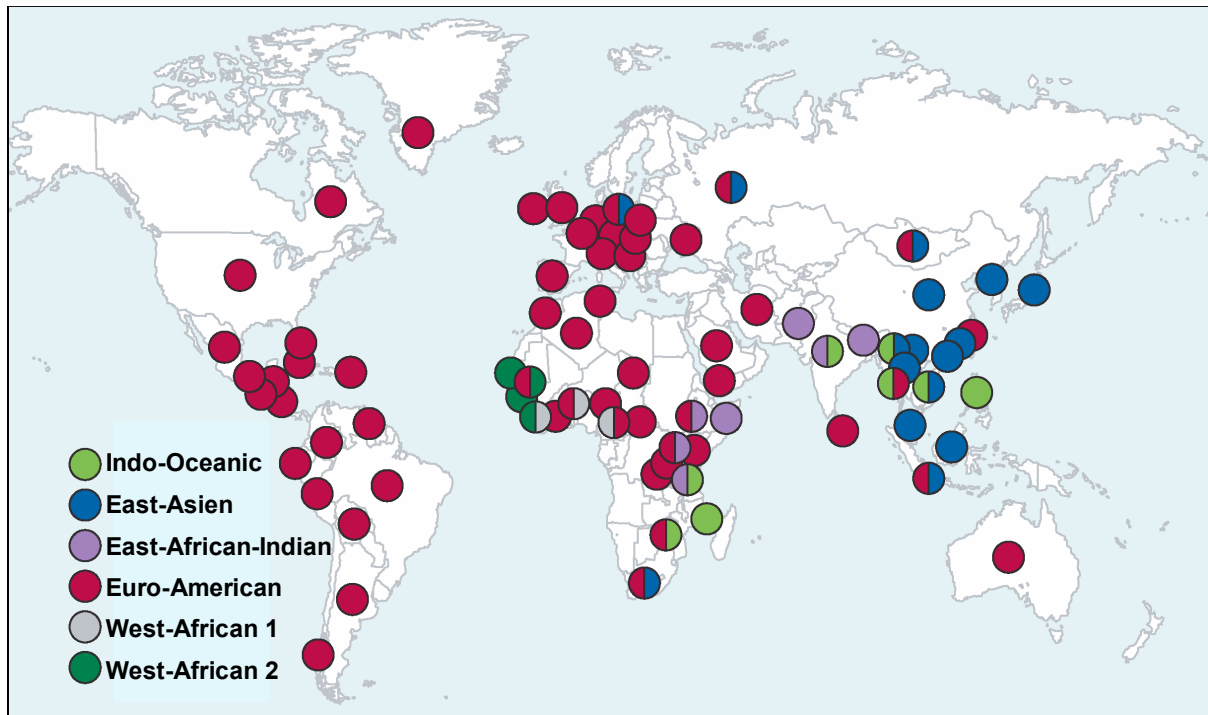


Abbildung 3: Geographische Verbreitung der mykobakteriellen Genotypgruppen [Grafik aus Gagneux & Small, 2007]

Die Farbe der Kreise stellt die vorherrschenden mykobakteriellen Genotypgruppen der jeweiligen Region dar. Die Daten basieren auf der Differenzierung von Mykobakterien-Isolaten durch Gagneux *et al.*, 2006 und Filliol *et al.*, 2006.

Es wird vermutet, dass sich die verschiedenen Spezies und auch einzelne Genotypen hinsichtlich ihrer Virulenz, ihrer Immunogenität und des verursachten klinischen Phänotyps unterscheiden [de Jong *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2007]. So wurde im Genom des *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), dem durch wiederholte Fortzuchtung entwickelten abgeschwächten Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose, die Deletion RD 1 (*region of difference 1*) als charakteristisches Merkmal für die nicht mehr vorhandene Virulenz identifiziert [Mahairas *et al.*, 1996]. Auch die unterschiedliche Struktur der Lipidmembranen verschiedener mykobakterieller Genotypen kann einen entscheidenden Einfluss auf die angeborene Immunität des Wirts und den Verlauf einer Infektion haben [Mendelson *et al.*, 2005]. Weiterhin wurden eine Korrelationen der Anzahl an Deletionen im mykobakteriellen Genom mit dem klinischen Phänotyp gefunden [Gagneux & Small, 2007]. Je mehr Deletionen vorhanden waren, desto schwächer war beispielsweise die Ausprägung der pulmonalen Kavernenbildung infizierter Patienten [Kato Maeda *et al.*, 2001].

1.1.3. Klinik und Therapie der Tuberkulose

1.1.3.1. Klinik

Die Erreger der Tuberkulose werden nahezu ausschließlich durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Alternative Infektionswege, z.B. durch Bluttransfusionen, das Trinken von Kuhmilch (*M. bovis*) oder durch Organtransplantationen, sind selten.

Erreichen die Erreger das Epithel der Lungenbläschen, werden sie von Alveolarmakrophagen phagozytiert und lysiert. Gelingt es nicht, den Erreger effektiv abzutöten, vermehrt sich dieser innerhalb der Wirtszellen bis zu deren Absterben. Die frei werdenden Mykobakterien locken weitere Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr an. Es bildet sich ein lokaler Entzündungsherd [Schluger & Rom, 1998].

T-Zellen, Epithelzellen und differenzierte Makrophagen führen zu einer Eingrenzung des aus abgetöteten Makrophagen, lebenden Mykobakterien und deren Zellwandbestandteilen bestehenden Entzündungsherds. In diesem so genannten Granulom sind die Stoffwechselaktivität und Replikationsrate der eingeschlossenen Erreger reduziert; die Infektion befindet sich in einem latenten Stadium. In 90 % aller Fälle kann eine weitere Progression der Infektion unterbunden werden und die verbliebenen eingeschlossenen viablen Mykobakterien können jahrelang persistieren [Tufariello *et al.*, 2003; Chan & Flynn, 2004].

Im Verlauf eines Lebens kann es durch Beeinträchtigungen der Immunabwehr des Wirts oder durch eine erneute Infektion zu einer Reaktivierung kommen. Dabei entsteht im Inneren des Granuloms eine Gewebsnekrose, die nach Bildung einer Kaverne Anschluss an das Bronchialsystem erhalten kann. In diesem Stadium können Mykobakterien ausgehustet werden; der Patient ist infektiös (offene Tuberkulose). Durch bronchogene Streuung können Infiltrate und großflächige Nekrosen in weiteren Lungenabschnitten entstehen. Das Ausmaß der Verschattungen, die pleuralen Ergüsse und Verdickungen sowie die Kavernenbildung sind radiologisch verifizierbar. Symptome der Lungentuberkulose sind Husten mit oft blutigem Auswurf, Brustschmerzen, Atemnot, Schwächegefühl, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Fieber und Nachtschweiß. Durch den Anschluss der Kavernen an Blut- und Lymphgefäße können sich extrapulmonale Verlaufsformen der Tuberkulose entwickeln [Brändli, 1998].

1.1.3.2. Therapie

Die antituberkulöse Chemotherapie orientiert sich heute an den Empfehlungen der WHO und nationaler Institutionen. Die im Rahmen der WHO-Strategie DOTS (*directly observed treatment, short course*) aufgestellten Therapieempfehlungen raten zu einer überwachten Einnahme einer anfänglich zweimonatigen Vierer- und in der Folge sechsmonatigen Zweier-

Wirkstoffkombination. Mittel der ersten Wahl sind Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) [Schaberg *et al.*, 2001; WHO, 2003]. Die konsequente Einhaltung der Therapieempfehlungen ist für die Verhinderung von Rezidiven und die Vermeidung von Resistenzen bedeutsam. Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 50 Millionen Menschen mit multiresistenten Tuberkulose-Erregern (*multidrug-resistant tuberculosis*; MDR-TB) infiziert. Bei MDR-TB liegt eine Resistenz des entsprechenden Mykobakterien-Isolats mindestens gegen INH und RMP vor. In diesem Fall muss auf Reservemedikamente zurückgegriffen werden. Vermehrt sind in den letzten Jahren Stämme mit einer Resistenz gegenüber INH und RMP sowie einer zusätzlichen Resistenz gegenüber Fluoroquinolonen und mindestens drei injizierbaren Reservetherapeutika aufgetreten (*extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB) [WHO, 2007c]. Daher sind die Entwicklung weiterer Wirkstoffe und die Entdeckung neuer Angriffsstellen (*drug targets*) von großer Bedeutung [Schraufnagel, 1999]. Eine Resistenztestung kann entweder in Kultur durch die Proportionsmethode [Canetti *et al.*, 1969] oder durch die Identifizierung charakteristischer genetischer Marker im mykobakteriellen Genom erfolgen [Sekiguchi *et al.*, 2007]. So liegt beim Vorkommen bestimmter Varianten des für die Katalase-Peroxidase kodierenden *katG*-Gens eine Resistenz gegenüber INH vor [Heym *et al.*, 1995].

1.1.4. Immunantwort gegenüber Erregern des MTB-Komplexes

1.1.4.1. Angeborene Immunität

Alveolarmakrophagen stellen die erste Verteidigungslinie gegen die Erreger des MTB-Komplexes dar. Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen erkennen strukturelle Gegebenheiten der Mykobakterien und initiieren deren Phagozytose. Typische Vertreter sind der Mannose-Rezeptor [Kang & Schlesinger, 1998] und der Toll-like Rezeptor 2 [Drennan *et al.*, 2004].

Nach Erregeraufnahme kommt es zur Phagolysosomenbildung. In dessen Inneren wird der Erreger von hydrolytischen Enzymen degradiert. Der in der Phagolysosomenmembran lokalisierte Kationentransporter Nramp1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) reguliert den Eisentransport und beeinflusst dadurch die mykobakteriziden Vorgänge im Phagolysosom [Vidal *et al.*, 1995; Canonne-Hergaux *et al.*, 1999]. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimuliert über Bindung an den auf der Oberfläche von Monozyten exprimierten Vitamin-D-Rezeptor (VDR) die Produktion mykobakterizider reaktiver Stickstoffspezies [Nicholson *et al.*, 1996; MacMicking *et al.*, 1997] und kann so die Vermehrung der Erreger eindämmen [Denis, 1991]. Schon vor Verfügbarkeit der antimykobakteriellen Therapeutika wurde Vitamin D in der Tuberkulosebehandlung verwendet [Davies, 1985; Rockett *et al.*, 1998].

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen sind weitere Zellen der angeborenen Immunität, die an der Abwehr gegenüber Erregern des MTB-Komplexes beteiligt sind. PMN werden durch Interleukin (IL)-12 zur Phagozytose und Abtötung der Erreger stimuliert [Brown *et al.*, 1987; Kisich *et al.*, 2002]. NK-Zellen können Apoptose befallener Phagozyten induzieren und proinflammatorische Mediatoren freisetzen [Brill *et al.*, 2001; Raja, 2004; Feng *et al.*, 2006]. Dendritische Zellen tragen über den auf ihrer Oberfläche exprimierten *dendritic-cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin* Rezeptor (DC-SIGN) zur Früherkennung und Phagozytose der Erreger und in der Folge zur Antigenpräsentation bei [Tailleux *et al.*, 2003].

1.1.4.2. Erworbene Immunität

T-Zellen sind Zellen der erworbenen Immunität und haben eine wichtige Funktion in der Immunität gegenüber Erregern des MTB-Komplexes. Zwei bis vier Wochen nach einer Infektion werden mykobakterielle Antigene von Humanen Leukozytenantigenen der Klasse II (HLA-Klasse-II) auf der Oberfläche infizierter Makrophagen präsentiert. CD4-positive T-Lymphozyten (CD4⁺-Zellen) können mittels ihres T-Zell-Rezeptors präsentierte Antigene erkennen und die Produktion von Zytokinen initiieren [Stenger & Modlin, 1999; Flynn & Chan, 2001]. Darüber hinaus werden auch über HLA-Klasse-I-Moleküle Antigene präsentiert und durch CD8⁺-positive T-Lymphozyten (CD8⁺-Zellen) erkannt. Diese können daraufhin infizierte Makrophagen lysieren und ebenfalls Zytokine freisetzen [Sud *et al.*, 2006].

Die Sensibilisierung der T-Lymphozyten durch Mykobakterienexposition lässt sich noch Jahre nach der Infektion mit dem Tuberkulin-Test nachweisen. Durch intradermale Applikation eines gereinigten Überstands einer Mykobakterienkultur (*Purified Protein Derivative*; PPD) entsteht im Rahmen einer T-Zell vermittelten Hypersensibilität (*delayed-type hypersensitivity* (DTH)-Reaktion) eine gerötete indurierte Schwellung. Der Test verfügt über eine hohe Sensitivität, dabei jedoch über eine geringe Spezifität. Ein positiver Tuberkulin-Test (PPD-positiv) kann auch durch in der Vergangenheit erfolgte Tuberkulin-Tests (*Booster-Effekt*), eine Tuberkuloseimpfung mit BCG oder die Infektion mit NTM hervorgerufen werden. Außerdem sagt der Tuberkulin-Test nichts über eine mögliche akute oder zurückliegende Tuberkulose und die Infektiosität aus [Lange *et al.*, 2006].

In der Folge der T-Zell-vermittelten Immunantwort ist die Bildung und Aufrechterhaltung eines Granuloms entscheidend für die lokale Begrenzung der Erreger und die Verhinderung einer Reaktivierung der Primärinfektion. CD4⁺- und CD8⁺-Zellen sowie Makrophagen, Fibroblasten und dendritische Zellen bewirken eine Abschottung des Infektionsherds. Das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen wird hauptsächlich von Chemokinen und Zytokinen kontrolliert [Flynn & Chan, 2003; Ulrichs & Kaufmann, 2006; Saunders & Britton, 2007].

1.1.4.3. Anti- und proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind die Signalvermittler des Immunsystems. Die Sekretion von IL-12 durch Makrophagen setzt unmittelbar nach der Phagozytose der Erreger ein. IL-12 steuert die Differenzierung der T-Helfer-Lymphozyten zu Typ-1-Helfer-Lymphozyten (Th1-Zellen). Diese Weichenstellung ist für den weiteren Verlauf der Immunreaktion wichtig, da hiermit der Weg der zellulären Abwehr gebahnt wird [Cooper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995]. Th1-Zellen sezernieren Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α). Durch diese beiden Mediatoren kommt es in Makrophagen zur Stimulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) [Flynn & Chan, 2001]. IFN- γ bewirkt außerdem eine verstärkte Antigenpräsentation und führt so zur Aktivierung weiterer T-Zellen [Raja, 2004]. TNF- α kommt eine wichtige Funktion bei der Bildung des Granuloms zu [Algood *et al.*, 2005]. IL-4 und IL-10 sind wichtige antiinflammatorische Mediatoren; beide Zytokine sind Gegenregulatoren der Th-1-Antwort. Zum einen wird die IL-12-Freisetzung gehemmt und damit auch die Aktivierung weiterer Makrophagen, zum anderen induzieren sie die Differenzierung zu Typ-2-Helfer-Lymphozyten (Th2-Zellen) [Rojas *et al.*, 1999; Rook, 2007].

1.1.5. Empfänglichkeit für Tuberkulose

Das Auftreten von Tuberkulose korreliert zum einen mit Fehl- und Mangelernährung, zum anderen mit jeglicher Form der Immunsuppression, einschließlich einer HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)-Infektion [Lienhardt, 2001]. Erste Hinweise auf eine Rolle angeborener Faktoren in der Immunität gegenüber Erregern des MTB-Komplexes zeigten sich 1930 beim Impfunglück von Lübeck. Damals wurde Säuglingen versehentlich ein nicht attenuierter, hoch-virulenter Tuberkuloseimpfstamm (BCG) appliziert. Von den 251 geimpften Neugeborenen starben 77, davon 72 an autoptisch nachgewiesener Tuberkulose; die übrigen Säuglinge überlebten [Lange, 1930; Rieder, 2003]. Hinweise auf wirtsabhängige genetische Faktoren verdichteten sich mit der Beobachtung einer erhöhten Konkordanz für eine klinische Tuberkulose bei eineiigen gegenüber zweieiigen Zwillingspaaren [Diehl, 1933; Kallman & Reisner, 1943; Comstock, 1978].

Bereits 1949 formulierte J.B.S. Haldane die These, dass Infektionserkrankungen einen Evolutionsdruck auf Menschen ausüben und dadurch zur Erhaltung und Weitervererbung schützender Varianten beitragen [Haldane, 1949; Weatherall, 1993; Lederberg, 1999]. Dies wird am Beispiel der Malaria und der Sichelzellanämie deutlich. Die mit Sichelzellanämie assoziierte Punktmutation im Kodon 6 des *Hämoglobin-Beta (HBB)*-Gens, die einen relativen Schutz vor Malaria tropica verleiht, kommt überwiegend in ehemaligen und aktuellen Malariagebieten vor [Nagel & Fleming, 1992; Hill, 1992]. Während homozygote Träger dieser

Variante an Sichelzellanämie erkranken, ist bei Heterozygotie das Krankheitsbild bei einem gleichzeitigen Schutz vor Malaria kaum ausgeprägt. Ein solcher selektiver Vorteil für heterozygote Träger einer humanen Genvariante gegenüber einem erniedrigten Risiko für Tuberkulose wurde bisher nicht beschrieben.

Dagegen ist jedoch das vermehrte Auftreten einer Tuberkulose bei Individuen mit bestimmten genetischen Defekten auffällig. Bei Patienten mit „Mendelian susceptibility to mycobacterial disease“ (MSMD), bei welchen unter anderem die Zytokine IL-12 und IFN- γ oder deren Rezeptoren in ihrer Funktion eingeschränkt sind, besteht ein erhöhtes Risiko einer klinischen Tuberkulose [Ottenhoff *et al.*, 1998; Casanova & Abel, 2002; van de Vosse *et al.*, 2004]. Die Gene, die MSMD bedingen, wurden daher in tierexperimentellen Versuchen und Fall-Kontroll-Studien untersucht. Es wurde sowohl bei *IL12B-Knock-out*- als auch bei *IFNG-Knock-out*-Mäusen eine deutlich eingeschränkte Immunabwehr gegenüber Erregern des MTB-Komplexes beobachtet [Cooper *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 1993]. In Fall-Kontroll-Studien wurden widersprüchliche Ergebnisse zu möglichen Assoziationen bestimmter *IFNG*- [Lio *et al.*, 2002; Fitness *et al.*, 2004], *IFNGR1*- [Fraser *et al.*, 2003; Awomoyi *et al.*, 2004], *IL12B*- [Tso *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003] und *IL12RB1*-Varianten [Akahoshi *et al.*, 2003] mit dem Risiko einer Tuberkulose erhalten. HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Moleküle wurden aufgrund der hohen, möglicherweise evolutionär bedingten Variabilität und der zentralen Rolle in der zellulären Abwehr schon früh als mögliche Determinanten einer veränderten Empfänglichkeit für Tuberkulose in Assoziationsstudien untersucht [Weitkamp, 1981]. Unter anderem war das Allel HLA-DR2 in mehreren Studien mit einem erhöhten Tuberkuloserisiko assoziiert [zusammengefasst in Meyer *et al.*, 1998; Kettaneh *et al.*, 2006]. Der Haplotyp DRB1*1501 entspricht dem HLA-DR2-Allel der serologischen Nomenklatur und zeigte bei der Bestimmung mit molekulargenetischen Methoden ein erhöhtes Risiko für Tuberkulose [Rajalingam *et al.*, 1996]. Aber auch zu diesem Haplotyp finden sich Beispiele negativer Assoziationen [Goldfeld *et al.*, 1998]. Bereits 1941 wurde bei verschiedenen Kaninchenstämmen eine unterschiedliche Empfänglichkeit für Tuberkulose beobachtet [Lurie, 1941]. Wie wichtig tierexperimentelle Studien zur Identifizierung und Überprüfung von Kandidatengenen sind, zeigte sich unter anderem bei *NRAMP1-Knock-out*-Mäusen (damals *bcg-Knock-out*-Mäuse) [Vidal *et al.*, 1993; Skamene, 1994]. Deren erhöhte Resistenz gegenüber einer Infektion mit Mykobakterien führte zur Genotypisierung von Varianten des analogen humanen Gens *SLC11A1* (*solute carrier family 11*) in einer Vielzahl von Fall-Kontroll-Studien. In einer Meta-Analyse wurden 17 Fall-Kontroll-Studien zur Assoziation von *SLC11A1*-Varianten mit Tuberkulose analysiert [Li *et al.*, 2006]. Während drei Polymorphismen bei Afrikanern mit einem bis zu 65 % erhöhten Risiko für Tuberkulose assoziiert waren, wurden bei Europäern keine Assoziationen gefunden.

1.2. ALOX5

1.2.1. ALOX5-Knock-out-Mäuse und *Mycobacterium tuberculosis*

Eine mögliche Rolle der 5-Lipoxygenase (5-LO) in der Regulation der Immunantwort auf *M. tuberculosis* wurde in einem tierexperimentellen Modell untersucht [Bafica *et al.*, 2005]. Der Verlauf der Infektion wurde bei 5-LO-defizienten Mäusen (*ALOX5-Knock-out-Mäuse*) und Wildtyp-Mäusen verglichen. Hierzu wurden die Serumkonzentrationen von Leukotrien B₄ (LTB₄), Lipoxin A₄ (LXA₄), IL-12 und TNF, die pulmonale Mykobakterienlast, das Ausmaß inflammatorischer Reaktivität und nekrotischer Gewebsveränderungen in der Lunge, die Überlebenszeit der Mäuse und die mRNA-Konzentrationen von IL-12, TNF, IL-10, IFN- γ und iNOS in der Lunge bestimmt.

Die Mäuse wurden durch Aerosolinhalation des *M. tuberculosis*-Laborstamms H37Rv infiziert. Die Infektionsdosen betragen 50 bzw. 300 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Versuchstier. Es zeigte sich, dass sowohl die LTB₄- als auch die LXA₄-Serumkonzentration bei Wildtyp-Mäusen nach der Infektion anstiegen. Die LXA₄-Konzentration war über den gesamten Messzeitraum (42 Tage) erhöht, während die LTB₄-Konzentration zehn Tage nach der Infektion wieder abnahm. *ALOX5-Knock-out-Mäuse* hatten während des gesamten Versuchs geringere LTB₄- und LXA₄-Konzentrationen als die Wildtyp-Mäuse. Die Zahl der Erreger in der Lunge war bei Wildtyp-Mäusen nach der Infektion signifikant höher als bei *Knock-out-Mäusen*. Auch die Gewebeproben der Lunge wiesen bei den Wildtyp-Mäusen stärkere Entzündungszeichen und Nekrosen auf. Nach hohen Infektionsdosen (300 KBE/Versuchstier) betrug die Überlebensrate 200 Tage nach der Infektion bei *Knock-out-Mäusen* etwa 50 %, während die Wildtyp-Mäuse bereits alle der Infektion erlegen waren. Grundsätzlich waren bei beiden Mauslinien die Spiegel aller analysierten Zytokine nach der Infektion erhöht. Die mRNA-Levels von IL-12, IFN- γ und iNOS sowie die IL-12-Serumkonzentration waren bei 5-LO-defizienten Mäusen signifikant erhöht. Die mRNA-Mengen von TNF und IL-10 unterschieden sich hingegen nicht [Bafica *et al.*, 2005].

Die Ergebnisse führten zu der Folgerung, dass die 5-LO eine entscheidende Rolle in der Immunantwort der Maus auf eine Infektion mit *M. tuberculosis* spielt. Daher bot es sich an zu untersuchen, ob Varianten des humanen *ALOX5*-Gens ebenfalls einen Einfluss auf die Empfänglichkeit für Tuberkulose haben könnten.

1.2.2. Regulation der ALOX5-Genexpression

ALOX5 ist auf Chromosom 10 lokalisiert (10q11.2) und kodiert für die 5-LO. Das Gen besteht aus 14 Exons und 13 Introns und umfasst einen Bereich von 82 Kilobasenpaaren (kb)

genomischer DNA [Funk *et al.*, 1989]. In der *ALOX5*-Promotorregion fehlen die typischen, die Genexpression regulierenden, TATA-/CCAAT-Sequenzen. Es existieren jedoch einige putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Sp1, Egr-1, AP-2) sowie Erkennungssequenzen für den VDR und *transforming-growth factor-β* (TGF-β) [Hoshiko *et al.*, 1990; Steinhilber *et al.*, 1995; Sorg *et al.*, 2006] (Abbildung 4). Mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays wurden im Promotor von *ALOX5* zwei positiv regulierende (-5900 bis -3700 Basenpaare (bp); -931 bis -854 bp), zwei negativ regulierende (-3400 bis -1557 bp; -727 bis -292 bp) und eine für die Genexpression essentielle Region (-179 bis -56 bp) charakterisiert [Hoshiko *et al.*, 1990].

In der essentiellen Region liegen mehrere Bindungssequenzen (GGGCGG) für den Transkriptionsfaktor Sp1. Dieser gehört zur Klasse der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und wird in fast allen menschlichen Zelltypen exprimiert [Resendes & Rosmarin, 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit und in weiteren Studien wurde bei unterschiedlichen Ethnien eine hohe Heterogenität in diesem Promotorabschnitt gefunden. Bei Kaukasiern grenzen überwiegend fünf dieser Bindungsstellen zwischen den Nukleotidpositionen -176 und -147 bp direkt aneinander (*variable number of tandem repeats*; VNTR) (Abbildung 4). Die Abweichungen vom kaukasischen Wildtyp mit fünf Kopien reichen von zwei bis zu acht aufeinander folgenden Kopien [Drazen *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2003; Dwyer *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005a; Kalayci *et al.*, 2006; Poole *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007]. An Stelle der Sp1- können auch Egr-1-Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich binden. Die Egr-1-Bindungssequenz überlappt jeweils mit dem Anfang und dem Ende einer Sp1-Bindungssequenz (GCGGGGCG). Ein Einfluss der Anzahl der Sp1- und Egr-1-Bindungsstellen auf die *ALOX5*-Expression wurde in HeLa- und Schneider-Zellen beobachtet [In *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998].

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und TGF-β erhöhten in Mono Mac 6-Zellen (MM6-Zellen) die *ALOX5*-Expression und 5-LO-Aktivität um das Hundertfache [Brungs *et al.*, 1995]. Es wird vermutet, dass die Erhöhung der 5-LO-mRNA-Spiegel in differenzierten myeloiden Zellen durch diese beiden Mediatoren vermittelt wird [Rådmark *et al.*, 2007]. In Alveolarmakrophagen liegen im Vergleich zu undifferenzierten Blutmonozyten bis zu siebenfach erhöhte 5-LO-Konzentrationen vor [Chavis *et al.*, 1992].

Auch entzündliche Prozesse haben eine Auswirkung auf die Expression von *ALOX5*. So wurden in PMN von Patienten mit Asthma bronchiale erhöhte 5-LO-mRNA-Mengen gefunden [Koshino *et al.*, 1998]. Es ist nicht bekannt, ob die erhöhten Konzentrationen 5-LO-abhängiger Produkte in Alveolarmakrophagen und im Pleuraexsudat von Patienten mit Tuberkulose und anderen pulmonalen Erkrankungen wie Asthma, Sarkoidose, Pneumonie

und Bronchialkarzinom auf eine stärkere Aktivität der 5-LO oder eine Erhöhung der *ALOX5*-Expression zurückzuführen sind [Damon *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1990; Pace *et al.*, 2004].

Das Th-2-Zytokin IL-4 hat einen hemmenden Einfluss auf die *ALOX5*-Expression. Im Gegensatz dazu wird die Expression der 15-Lipoxygenase (15-LO) durch IL-4 erhöht [Spanbroek *et al.*, 1998]. Außerdem wird die *ALOX5*-Expression vom Ausmaß der DNA-Methylierung [Uhl *et al.*, 2004] und der Histon-Acetylierung beeinflusst [Klan *et al.*, 2003].

-402	GGCCTTGGCGAAGCCGAGGCAGGCAGGCAGGGCAAAGGGTGGGAAGCAATT
-352	CAGGAGAGAACGAGTGAACGAATGGATGAGGGGTGGCAGCCGAGGTTGCC
-302	CCAGTCCCCTGGCTGCAGGAACAGACACCTCGCTGAGGAGAGACCCAGGA
-252	GCGAGGCCCTGCCCGCCCCGAGGCAGGTCCC GCCCAGT CCGCGCCGCG
-202	TGAAGAGTGGGAGAGAAGTACTGCGGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGG
-152	GGGCGGGGGCAGCCGGGAGCCTGGAGCCAGACCGGGGCGGGGCCGGGACC
-102	GGGGCCAGGGACCAGTGGTGGGAGGAGGCTGCGGCGCTAGATGCGGACAC
-52	CTGGACCGCCGCGCCGAGGCTCCC GGCCTCGCTGCTCCC GCGGCCCGCG
-2	CCATGCCCTCCTACACGGTCACCGTGGCCACTGGCAGCCAGTGGTTCGCC

<u>GGGCAAAGGGTGGGA</u>	Vitamin-D-Rezeptor	AGTCCCCTGG	AP2
<u>TGCCCCAGTCC</u>	TGF- β Rezeptor	GGGCGG	Sp1
<u>GCGGGGGCG</u>	Egr-1		

Abbildung 4: Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im *ALOX5*-Promotor

Die Nummerierung der Nukleotide erfolgt ausgehend vom ATG-Startkodon (grün). Die Nukleotide des Promotors werden mit negativem Vorzeichen angegeben. Die Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden von Hoshiko *et al.*, 1990; Steinhilber *et al.*, 1995; Sorg *et al.*, 2006 beschrieben.

1.2.3. Struktur und Funktionen der 5-Lipoxygenase

1.2.3.1. Struktur

Die humane 5-LO besteht aus 673 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht (MG) von etwa 78-Kilodalton (kDa) [Matsumato *et al.*, 1988]. Die Expression des Enzyms erfolgt vorwiegend in Zellen myeloiden Ursprungs (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen). Erythrozyten und Thrombozyten sind 5-LO-negativ [Steinhilber, 1994]. 5-LO wurde auch in B-Lymphozyten [Steinhilber *et al.*, 1995], T-Lymphozyten [Cook-Moreau *et al.*, 2007], Langerhans-Zellen [Spanbroek *et al.*, 1998] und Keratinozyten [Janssen-Timmen *et al.*, 1995] nachgewiesen. 5-LO ist instabil und neigt zur raschen Selbstoxidation. Das ge-

reinierte Enzym weist unter 4°C nach 24 Stunden und bei 20°C bereits nach zehn Stunden nur noch die 50 %ige Aktivität auf [Rådmark & Samuelsson, 2005].

Obwohl die kristalline Struktur der 5-LO noch nicht charakterisiert wurde, ließ sich aus experimentellen Daten und durch den Vergleich mit pflanzlichen und tierischen Lipoxygenasen (LO) ein Strukturmodell der humanen 5-LO erstellen [Gillmor *et al.*, 1997; Hemak *et al.*, 2002; Rådmark & Samuelsson, 2005]. Die katalytische Domäne der 5-LO befindet sich am C-terminalen Ende (Aminosäuren 121 bis 673). Eingebettet in eine α -Helix-Sekundärstruktur liegt ein nicht an Hämoglobin gebundenes Eisenion [Zhang *et al.*, 1993; Hammarberg *et al.*, 1995]. Im Ruhezustand der 5-LO ist das Eisenion zweiwertig (Fe^{2+}). Während der 5-LO-Reaktion durchläuft das Eisen verschiedene Redoxstadien und ist dabei Elektronenakzeptor (Fe^{2+}) und Elektronendonator (Fe^{3+}). Die N-terminale Domäne, die sich zwischen den Aminosäuren 1 bis 114 erstreckt, bildet eine β -Barrel-Struktur aus. Diese konservierte Struktureinheit besteht aus acht antiparallel verlaufenden β -Faltblatteinheiten und wird auch als C2-ähnliche Domäne bezeichnet [Hammarberg *et al.*, 2000] (Abbildung 5).

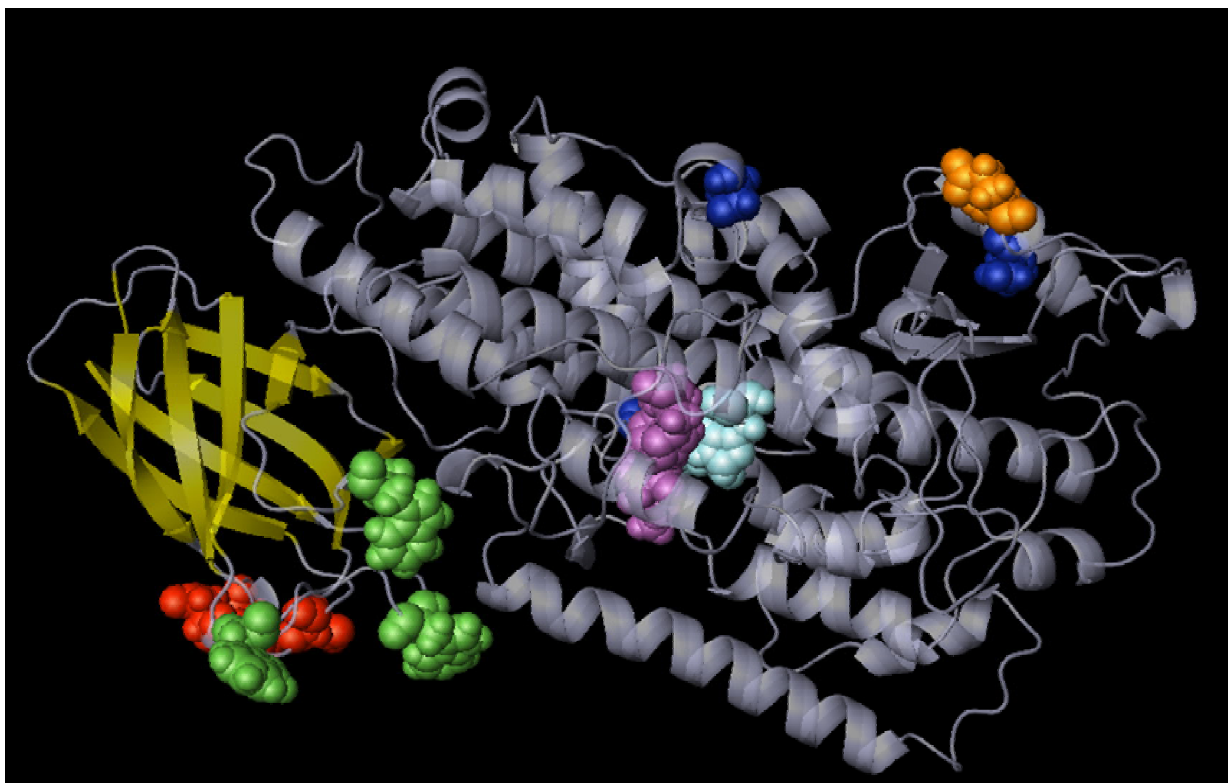


Abbildung 5: 3-dimensionales-Modell der 5-Lipoxygenase

Die Position des Aminosäureaustauschs (p.Glu254Lys) ist orange markiert. Das katalytische Zentrum ist durch die türkise und violett markierten Aminosäuren, die β -Faltblattstruktureinheiten des β -Barrels durch die gelben Pfeile und die Ca^{2+} -Bindungsstelle durch die rot bzw. grün markierten Aminosäuren dargestellt. Die blau markierten Aminosäuren kennzeichnen Phosphorylierungsstellen. Die Abbildung wurde von Lutz Franke, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

1.2.3.2. Funktionen

5-LO ist neben den Cyclooxygenasen-1 und -2 (COX-1/-2) das zentrale Enzym im Arachidonsäure-Stoffwechsel. 5-LO ist eine Dioxygenase und katalysiert in einer zweistufigen Reaktion (Oxygenase-/LTA₄-Synthaseaktivität) die Bildung von Leukotrien A₄ (LTA₄) aus Arachidonsäure (AA). Im ersten Oxidationsschritt wird aus AA durch den stereospezifischen Einbau molekularen Sauerstoffs 5(S)-Hydro(pero)xy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-H(p)ETE) gebildet (Oxygenaseaktivität). Im zweiten Schritt wird 5-H(p)ETE durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms zum Epoxid LTA₄ umgesetzt (LTA₄-Synthaseaktivität) (Abbildung 6). 5-H(p)ETE kann aber auch der weiteren Umsetzung durch 5-LO entgehen und zur 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) reduziert werden.

LTA₄ ist Edukt aller weiteren Leukotriene (LT) und wird, je nach Enzymausstattung der Zelle, entweder nicht-enzymatisch zu den biologisch inaktiven 6-trans-LTB₄ und 12-epi-6-trans-LTB₄ hydrolysiert oder durch enzymatische Hydrolyse mit der in menschlichen Zellen ubiquitär vorkommenden LTA₄-Hydrolase zu biologisch aktivem LTB₄ umgesetzt [Surette *et al.*, 1999]. Alternativ kann LTA₄ in eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie in Mastzellen durch Konjugation mit Glutathion zu Leukotrien C₄ (LTC₄) umgesetzt werden [Lewis *et al.*, 1990]. Die 5-LO ist damit essentiell für die Bildung aller LT (Abbildung 6).

Die Synthese von Lipoxinen (LX) ist ebenfalls 5-LO-abhängig. An den drei existierenden LX-Synthesewegen ist neben der 5-LO immer eine weitere LO oder COX beteiligt. Die Bildung von LXA₄ und Lipoxin B₄ (LXB₄) erfolgt zum einen aus LTA₄ durch die hauptsächlich in Thrombozyten exprimierte 12-LO, zum anderen durch die 5-LO-katalysierte Oxidation der in Endothel- und Epithelzellen exprimierten 15-S-H(p)ETE. Der dritte LX-Syntheseweg beruht auf einer unnatürlichen Hemmung der COX durch Acetylsalicylsäure. Durch die Hemmung wird nur die Synthese der Prostaglandine, nicht aber die Umsetzung der AA zu 15-R-H(p)ETE unterbunden. Dieses wird in einem weiteren Schritt durch 5-LO zu 15-epi-LX oxidiert (Abbildung 6). Die auch als *Aspirin-triggered lipoxins* (ATL) bezeichneten Moleküle sind biologisch stärker aktiv als die anderen LX-Stereoisomere [Maddox *et al.*, 1997].

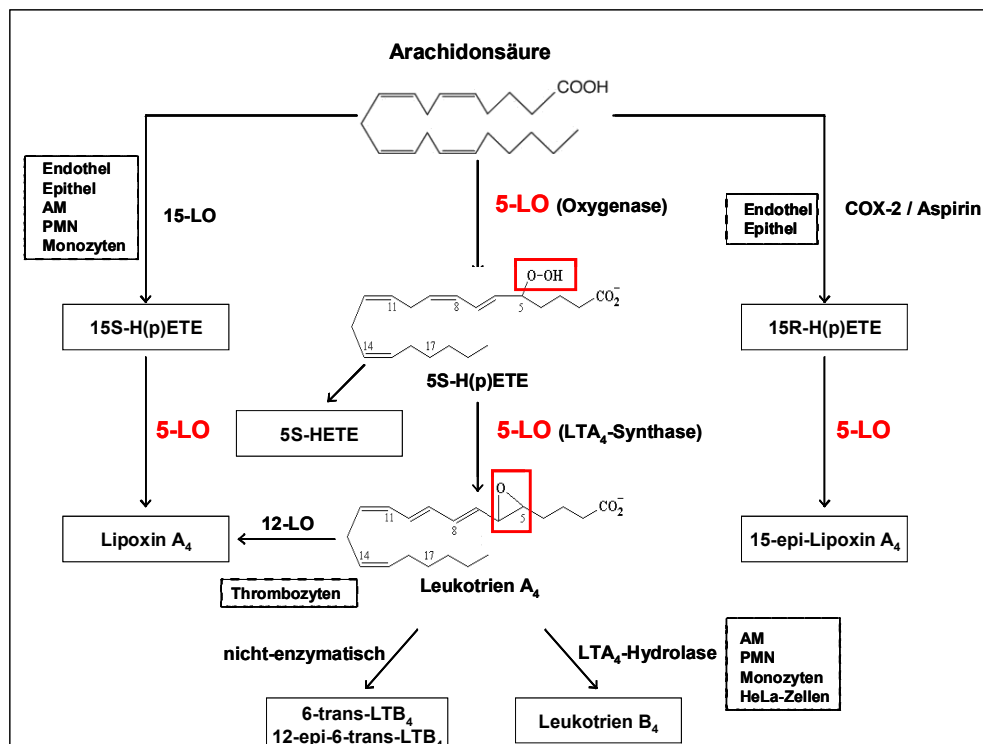


Abbildung 6: Leukotrien- und Lipoxin-Biosynthese

AM: Alveolarmakrophagen; PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten; COX: Cyclooxygenase
 LO: Lipoxygenase; 5-H(p)ETE: 5(S)-Hydro(peroxy)-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure; LT: Leukotrien.

Der Hauptreaktionsort der 5-LO ist die Nukleusmembran; hier wird AA umgesetzt. Im inaktivierten Zustand ist die subzelluläre Lokalisation der 5-LO stark zelltypabhängig. In PMN, Monozyten, peritonealen Makrophagen und MM6-Zellen liegt 5-LO überwiegend im Zytosol vor. In Alveolarmakrophagen und den Langerhans-Zellen der Haut ist sie dagegen vorwiegend im Nukleus zu finden [Peters-Golden *et al.*, 1993; Pouliot *et al.*, 1996; Werz *et al.*, 2002a; Luo *et al.*, 2004].

1.2.4. 5-Lipoxygenase-Aktivität beeinflussende Faktoren

1.2.4.1. Calcium

Ein wichtiges Stimulans der 5-LO ist die reversible Bindung von Calciumionen (Ca^{++}) [Rouzer & Samuelsson, 1987; Rouzer & Kargman, 1998; Chen & Funk, 2001; Kulkarni *et al.*, 2002]. Die durchschnittliche maximale Bindungskapazität von 1 mol 5-LO beträgt in etwa 2 mol Ca^{++} [Hammarberg & Rådmark, 1999; Kulkarni *et al.*, 2002]. Konzentrationen von 1-2 μM reichen bereits aus, um gereinigte 5-LO zu aktivieren; die maximale Aktivierung ist bei 4 μM erreicht [Percival *et al.*, 1992; Noguchi *et al.*, 1994]. Da die 5-LO auch ohne Ca^{++} aktiv ist, scheint dieses nicht an der Katalyse der Reaktion beteiligt zu sein; allerdings ist die Aktivität in

Abwesenheit von Ca^{++} stark vermindert [Noguchi *et al.*, 1994]. Die Assoziation von Ca^{++} steigert wahrscheinlich den hydrophoben Charakter der 5-LO und führt damit zu einer effektiveren Translokation an Lipidstrukturen der Nukleusmembran. Durch Ca^{++} wird außerdem die Verzögerungsphase der Reaktion verkürzt und ein schnelleres Einstellen der *steady-state*-Konzentration erreicht [Aharony & Stein, 1986].

1.2.4.2. Adenosintriphosphat

Adenosintriphosphat (ATP) bindet an die 5-LO und erhöht deren Aktivität. Eine ATP-Hydrolyse findet jedoch nicht statt. Die Bindung von ATP dient wahrscheinlich lediglich der Stabilisierung der 5-LO [Rådmark & Samuelsson, 2005].

1.2.4.3. Phospholipide

Während der Aufreinigung der 5-LO aus Leukozyten wurde beobachtet, dass die Enzymaktivität von der Anwesenheit mikrosomaler Membranen abhing [Rouzer & Samuelsson, 1985]. In *in vitro*-Assays lässt sich ein Teil der stimulierenden Wirkung der zellulären Membranen durch Zugabe synthetischer Phosphatidylcholin-Vesikel ersetzen [Puustinen, 1988].

1.2.4.4. Lipidhydroperoxide

Lipidhydroperoxide (LOOH) sind für die Oxidation des Fe^{++} im katalytischen Zentrum der 5-LO verantwortlich [Rouzer & Samuelsson, 1986]. In 5-LO-positiven Zelllysaten und bei isolierter 5-LO wird durch die Zugabe von LOOH die Verzögerungsphase der AA-Umsetzung verringert [Riendeau *et al.*, 1989].

1.2.5. 5-Lipoxygenase-Aktivität in der Zelle

Eine Möglichkeit der Aktivierung von 5-LO *in vivo* erfolgt durch Wechselwirkung G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCR) mit IL-8 oder durch Bindung der Zytokine TNF- α und IL-1 an weitere Rezeptoren. Der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung folgt jeweils die Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade, in deren Verlauf es zur intrazellulären Ca^{++} -Freisetzung oder Phosphorylierung der 5-LO kommt. Durch osmotischen Schock, chemischen Stress, UV-Licht oder Hitzeschock kann es ebenfalls zur Aktivierung der 5-LO kommen [Werz *et al.*, 2002a]. Eine *in vitro*-Aktivierung von isolierten Zellen kann unter anderem durch das Ca^{++} -Ionophor A23187 erfolgen [Borgeat & Samuelsson, 1979].

Die Bereitstellung von AA ist neben dem Redoxstatus des katalytischen Eisens und der Translokation zur Nukleusmembran ein weiterer wichtiger Faktor der Synthese der 5-LO-

Produkte in der Zelle. AA wird durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) aus der Lipidmembran abgespalten [Gijon *et al.*, 2000] (Abbildung 7).

Die Umsetzung von AA durch die 5-LO wird durch *5-lipoxygenase-activating protein* (FLAP) unterstützt. FLAP besteht aus 161 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 18 kDa, besitzt 3 Transmembrandomänen und wird in den meisten myeloiden 5-LO-positiven Zellen exprimiert [Peters-Golden & Brock, 2003]. Im Ruhezustand und nach Aktivierung ist FLAP an der Nukleusmembran lokalisiert. Die genaue Funktion von FLAP ist noch nicht vollständig geklärt; es scheint als Transferprotein zu fungieren, das die durch PLA₂ abgespaltene AA der 5-LO zuführt [Mancini *et al.*, 1993; Abramovitz *et al.*, 1993] (Abbildung 7).

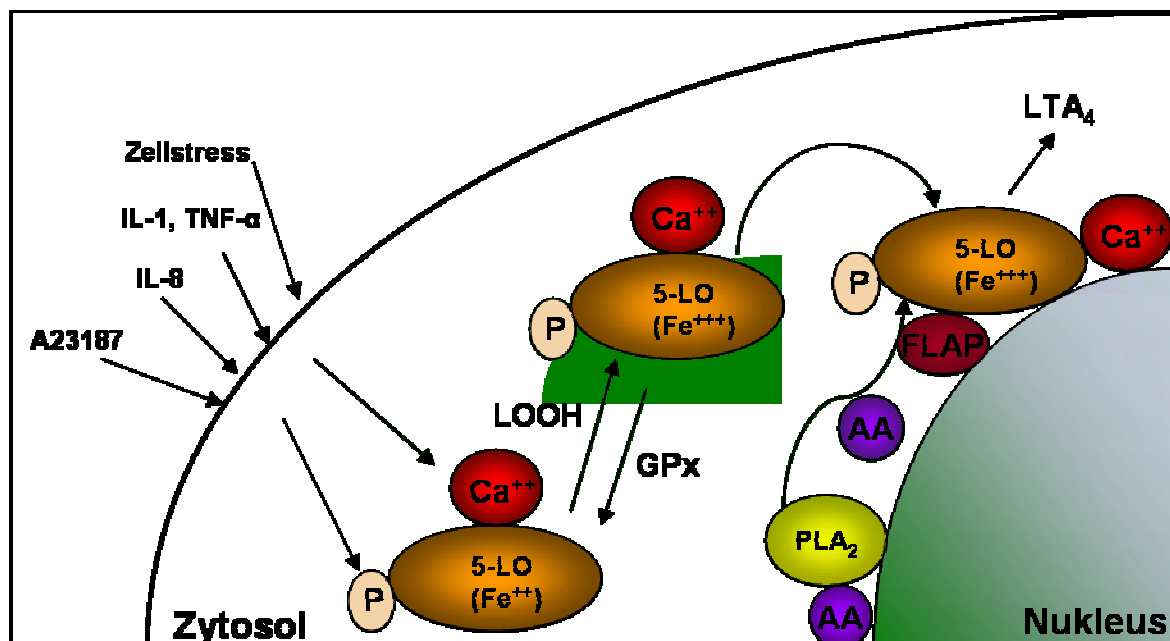


Abbildung 7: Zelluläre Aktivierung der 5-Lipoxygenase

Stimulantien wie das Ionophor A23187, Interleukin (IL)-8, IL-1 und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) sowie Zellstress können über Freisetzung bzw. Einstrom von Calcium (Ca⁺⁺) oder die Initiierung einer Phosphorylierungskaskade (P) die 5-Lipoxygenase (5-LO) aktivieren. Lipidhydroperoxide (LOOH) oxidieren das katalytische Eisen (Fe⁺⁺ → Fe⁺⁺⁺). Durch die Aktivierung kommt es zur Translokation der 5-LO an die Nukleusmembran. Dort wird durch Phospholipase A₂ (PLA₂) Arachidonsäure (AA) aus der Nukleusmembran abgespalten und durch *5-lipoxygenase-activating protein* (FLAP) der 5-LO zugeführt. 5-LO setzt dann AA zu Leukotrien A₄ (LTA₄) um.

1.2.6. Leukotriene und Lipoxine

1.2.6.1. Funktion der Leukotriene

LT sind proinflammatorische Mediatoren der menschlichen Immunantwort und haben eine Bedeutung bei entzündlichen Erkrankungen. LTB_4 wirkt chemotaktisch auf PMN und lockt diese an Entzündungs- und Infektionsherde. Es fördert die Adhäsion von PMN an Endothelien [Dahlen *et al.*, 1981; Palmblad *et al.*, 1981] sowie Degranulation und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und lysosomaler Enzyme [Lewis & Austen, 1984; Pitrak *et al.*, 1993].

PMN sind Zellen der angeborenen Immunität. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Lyse von Mykobakterien wurde mehrfach beschrieben [Brown *et al.*, 1987; Kisich *et al.*, 2002]. Eine LT-Abhängigkeit dieser Abtötung wurde bei PMN, die mit *M. bovis* infiziert waren, beobachtet. Nach Infektion waren die LTB_4 -Konzentrationen erhöht. Eine pharmakologische Hemmung von FLAP mit MK886 führte zu verminderter Erregerabtötung [Coffey *et al.*, 2004]. Die Abhängigkeit der Phagozytose von LTB_4 wurde bei Mäusen, die mit *Klebsiella pneumoniae* infiziert waren, untersucht. Sowohl die pharmakologische Hemmung der 5-LO als auch die Inaktivierung des *ALOX5*-Gens verminderten die Phagozytoseaktivität der PMN. Eine Rekonstitution der Phagozytose war durch exogene Zugabe von LT möglich [Mancuso *et al.*, 2001]. Auch bei Alveolarmakrophagen wurde die Phagozytoseaktivität von Mykobakterien in Abhängigkeit der 5-LO bei Mäusen, die mit *K. pneumoniae* infiziert waren, untersucht. In Analogie mit den Befunden bei PMN waren nach der Infektion die Konzentrationen von LTB_4 , LTC_4 und 5-HETE erhöht. Eine Deletion des *ALOX5*-Gens, pharmakologische Hemmung der 5-LO durch Zileuton oder Blockade des LTB_4 -Rezeptors durch LY292476 verminderten auch in Alveolarmakrophagen die Phagozytose der Erreger [Bailie *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 1998]. Außerdem wurde bei mit *K. pneumoniae* infizierten *ALOX5*-Knock-out-Mäusen eine abgeschwächte Erregerabtötung und eine verkürzte Überlebenszeit beobachtet [Bailie *et al.*, 1996]. NK-Zellen werden durch LT ebenfalls aktiviert [Bray & Brahmi, 1986]. Durch ihren stimulierenden Einfluss auf die IL-12- und IFN- γ -Freisetzung unterstützen LT die Differenzierung von T-Vorläuferzellen zu Th1-Zellen [Parkinson, 2006].

1.2.6.2. Funktion der Lipoxine

LX sind antiinflammatorische Mediatoren und haben oftmals eine den LT gegensätzliche Wirkung auf Zellen und Zytokine des Immunsystems. LX vermindern die Adhäsion von PMN an Endothelzellen [Colgan *et al.*, 1993; Papayianni *et al.*, 1996] sowie deren Migration in entzündetes Gewebe [Lee *et al.*, 1989; Serhan *et al.*, 1995; Clish *et al.*, 1999]. Außerdem werden die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies [Levy *et al.*, 1999] und die zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen unterbunden [Ramstedt *et al.*, 1987]. Im Gegensatz zu den

vorwiegend inhibitorischen Effekten der LX auf die meisten Zellen der angeborenen Immunität, wirken sie auf Monozyten stimulierend. Monozyten werden an Entzündungsorte gelockt und dort zur Phagozytose apoptotischer PMN angeregt [Maddox *et al.*, 1997]. LX beeinflussen die Produktion mehrerer Zytokine. Während die TNF- α -, IL-5-, IL12- und IL-13-Freisetzung blockiert wird [Bandeira-Melo *et al.*, 2000; Ariel *et al.*, 2003; Aliberti *et al.*, 2002a], kommt es zur einer Erhöhung der IL-4-Spiegel [Hachicha *et al.*, 1999].

1.2.7. Pathophysiologische Bedeutung von Störungen der 5-Lipoxygenase-Aktivität

Montelukast ist der einzige in Deutschland zugelassene in den 5-LO-Stoffwechsel eingreifende Wirkstoff. Die Substanz blockiert die Rezeptoren der Cysteinyl-Leukotriene und wird in der Therapie des Asthma bronchiale eingesetzt. Als weiteres Medikament stand einige Zeit der 5-LO-Inhibitor Zileuton zur Verfügung, das aber aufgrund des Verdachts hepatotoxischer Nebenwirkungen in Deutschland wieder vom Markt genommen werden musste [McGill & Busse, 1996; Werz & Steinhilber, 2006]. Experimente an *ALOX5-Knock-out*-Mäusen sowie die guten Erfahrungen mit Montelukast und Zileuton in der Therapie des Asthma bronchiale lassen kaum mehr an der Beteiligung der 5-LO in der Pathophysiologie des Asthmas zweifeln. Daher wird in Strategien zur Optimierung der Asthma-Therapie auch über den Einsatz von LX-Analoga nachgedacht. In tierexperimentellen Studien [Levy *et al.*, 2002] und bei schweren Asthmaverläufen [Vachier *et al.*, 2005] wurde die positive Wirkung der LX bereits nachgewiesen. Das Ansprechen von Patienten mit Asthma bronchiale auf eine Therapie mit 5-LO-Inhibitoren war abhängig von der Anzahl der Kopien des Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotivs im *ALOX5*-Promotor (VNTR-Polymorphismus). Eine Verbesserung der Asthmasymptome zeigte sich besonders bei Individuen, die homozygot für das Allel mit fünf Kopien waren [Drazen *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2005]. Der Therapieerfolg einer Behandlung mit LT-Rezeptor-Antagonisten war dagegen von der Kopienanzahl unabhängig [Fowler *et al.*, 2002]. Der Schweregrad des durch Analgetika induzierten Asthmas (Analgetika-Asthma) und des Asthma bronchiale korrelierte mit der Anzahl der Kopien des Sp1-Bindungsmotivs. Individuen, die auf keinem der Allele fünf Kopien hatten, waren häufiger von schwereren Verläufen betroffen [Kim *et al.*, 2005a; Kalayci *et al.*, 2006]. Ein erhöhtes Risiko für Asthma bronchiale bestand jedoch nicht [Drazen *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2003]. Der Einfluss des VNTR-Polymorphismus auf Arteriosklerose, Morbus Alzheimer, Myokardinfarkt und kolorektales Karzinom wurde ebenfalls in Assoziationsstudien untersucht [Qu *et al.*, 2001; Dwyer *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Weiterhin wurden mögliche Assoziationen der *ALOX5*-Promotorvarianten g.-1708G>A und g.-1700G>A sowie der exonischen Varianten g.21C>T und g.760G>A mit dem Risiko eines kolorektalen Karzinoms untersucht [Goodman *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2007]. Die Varianten g.-1708G>A, g.21C>T, g.270G>A und g.1728A>G sowie fünf intronische Varianten wurden auch auf eine mögliche Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Analgetika-Asthma überprüft. Nur bei Haplotyp-Analysen zeigten sich signifikante Assoziationen [Choi *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005b].

Tabelle 1: Studien zu möglichen Assoziationen des *ALOX5*-VNTR-Polymorphismus

Studie	Assoziierter Phänotyp	Fälle (n) / Kontrollen (n)	Allele, Genotypgruppen	P-Wert
Drazen <i>et al.</i>, 1999	Asthmasymptome nach Behandlung mit 5-LO-Inhibitor (ABT-761)	221	„5/5“ vs. „5/nicht-5“ vs. „nicht-5/nicht-5“	0,0001
Qu <i>et al.</i>, 2001	early-onset-Morbus-Alzheimer	17 / 17	„5/5“ vs. „5/nicht-5“, „nicht-5/nicht-5“	n.s.
Fowler <i>et al.</i>, 2002	Asthmasymptome nach Behandlung mit LT-Rezeptor-Antagonisten	40 / 12	„5/5“ vs. „5/nicht-5“	n.s.
Sayers <i>et al.</i>, 2003	Asthma	341 / 184	Allele	n.s.
Dwyer <i>et al.</i>, 2004	Verdickung der Koronararterie	470	„nicht-5/nicht-5“ vs. „5/nicht-5“, „nicht-5/nicht-5“	<0,001
Lima <i>et al.</i>, 2005	Asthmasymptome nach Behandlung mit Montelukast	252	„5/5“ vs. „5/nicht-5“ vs. „nicht-5/nicht-5“	0,045
Kim <i>et al.</i>, 2005a	Schwerer Verlauf des Analgetika-Asthas	107 / 228	„5/5“ vs. „5/nicht-5“, „nicht-5/nicht-5“	0,003
Kalayci <i>et al.</i>, 2006	Schwerer Verlauf des Asthma bronchiale	113 / 508	„nicht-5/nicht-5“ vs. „5/nicht-5“, „nicht-5/nicht-5“	0,008
Poole <i>et al.</i>, 2006	Kolorektales Karzinom	616 / 522	„5/5“ vs. „5/nicht-5“ vs. „nicht-5/nicht-5“	n.s.
González <i>et al.</i>, 2007	Myokardinfarkt	312 / 376	Allele	n.s.

Genotypgruppen: „5“: Allel mit fünf Kopien; „nicht-5“: Allel mit < oder > als fünf Kopien; n: Anzahl der Individuen; n.s.: nicht signifikant.

Bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen (Prostatakarzinom, Cystische Fibrose, Atopische Dermatitis, Psoriasis, Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Nierenentzündungen, Rheumatoide Arthritis, Osteoporose, Akne, Multiple Sklerose, Parodontose) wurde eine regulatorische Funktion der 5-LO diskutiert und der Einsatz von 5-LO-Inhibitoren oder LX-Analoga erwogen [Ghosh & Myers, 1998; Karp *et al.*, 2004; Wedi & Kapp, 2001; Goh *et al.*, 2003; Clarkson *et al.*, 1998; Weinblatt *et al.*, 1992; Zouboulis *et al.*, 2005; Gallwitz *et al.*, 1993; Whitney *et al.*, 2001; van Dyke *et al.*, 2003].

1.3. Fragestellung: Genetische Assoziationen von *ALOX5*-Varianten bei Patienten mit Tuberkulose und Kontrollen in Ghana und funktionelle Bedeutung der strukturellen Veränderung der 5-Lipoxygenase

Das Projekt „Association and linkage approaches to identify human genetic variants contributing to natural protection against pulmonary tuberculosis“ des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) hat zum Ziel, genetische Wirtsfaktoren, die die Empfänglichkeit für Tuberkulose beeinflussen, zu identifizieren. Im Mittelpunkt des Projekts steht die Untersuchung von Genvarianten, die eine möglicherweise unterschiedliche Verteilung zwischen einer Gruppe von etwa 2000 Patienten mit Tuberkulose und einer etwa 2000 gesunde Individuen umfassenden Kontrollgruppe aus Ghana aufweisen. Die Auswahl der Gene, die möglicherweise eine Bedeutung in der Entwicklung einer Tuberkulose beim Menschen haben, wird auf der Grundlage funktioneller Untersuchungen, anderer Assoziationsstudien oder tierexperimenteller Versuche getroffen.

Ein erster Anhalt für eine mögliche Bedeutung von *ALOX5* ergab sich aus den bereits beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen, in denen *ALOX5-Knock-out*-Mäuse, die mit *M. tuberculosis* infiziert waren, die Bakterienlast limitieren konnten und im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen länger überlebten [Bafica *et al.*, 2005]. Daher beinhaltete die Vorgehensweise (Abbildung 8) dieser Arbeit zunächst die Auswahl und Genotypisierung geeigneter Varianten des *ALOX5*-Gens.

Des Weiteren sollten die Allel- und Genotypverteilung der selektierten Varianten zwischen Fällen und Kontrollen der ghanaischen Studiengruppe statistisch unter Einbeziehung potentieller Kovariablen wie Mykobakterienspezies, mykobakterieller Genotyp, Reaktivität des PPD-Tests, Medikamentenresistenzen, klinischer Symptome einer Tuberkulose und radiologischer Befunde ausgewertet werden.

Bei positiven Assoziationen sollten sich funktionelle Untersuchungen anschließen, um die Auswirkungen der Variante auf den Phänotyp zu bestimmen.

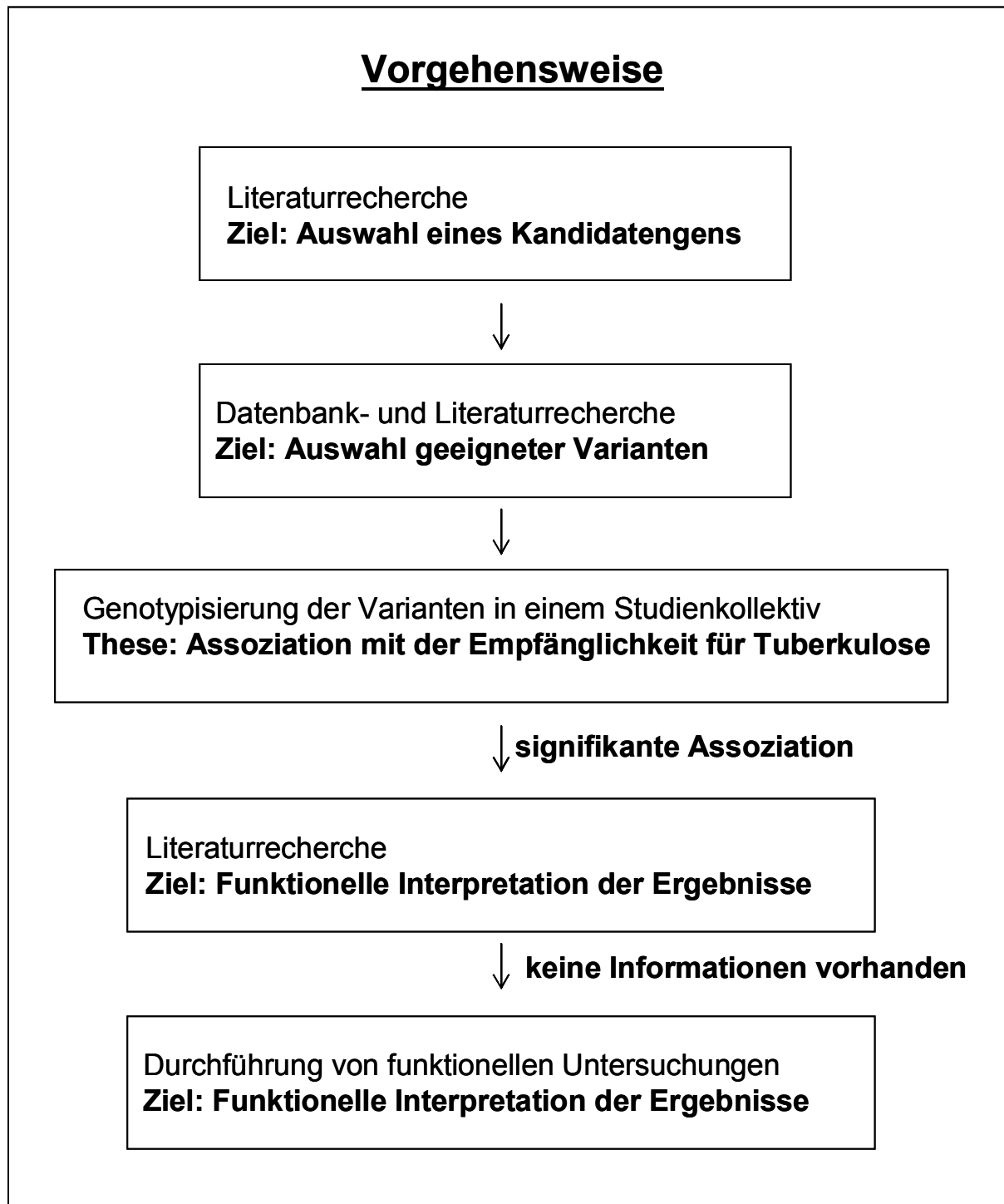


Abbildung 8: Vorgehensweise bei der Durchführung der Arbeit

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Studienkollektiv

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Studiengruppe bestand aus Individuen, die im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projekts des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) „Association and linkage approaches to identify human genetic variants contributing to natural protection against pulmonary tuberculosis“ in Ghana, Westafrika, rekrutiert worden waren. Die Identifizierung und Rekrutierung von Patienten mit Lungentuberkulose und der Kontrollgruppe erfolgte von September 2001 bis Juli 2004. Die Studie war durch das “Committee on Human Research, Publications and Ethics, School of Medical Sciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology”, Kumasi, und das “Ethics Committee of the Ghana Health Services”, Accra, Ghana genehmigt worden. Alle Teilnehmer hatten nach eingehender Aufklärung über den Studienzweck ihre freiwillige Teilnahme durch Unterschrift/Daumenabdruck bestätigt. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer und die Durchführung der klinischen Untersuchungen wurden von Ärzten und Krankenschwestern in Ghana durchgeführt.

Patienten wurden am Korle Bu Teaching Hospital, Accra, Komfo Anokye Teaching Hospital Kumasi, den Distrikt-Krankenhäusern von Obuasi, Agona, Mampong, Agogo, Konongo, Nkawie (Ashanti Region), Nkawkaw, Atobie (Eastern Region), Assin Fosu und Dunkwa (Central Region) sowie an 15 weiteren Krankenhäusern und Polikliniken in Accra und Kumasi identifiziert. Einschlusskriterien waren eine neu und erstmalig diagnostizierte Tuberkulose, ein Alter der Patienten zwischen 6 und 60 Jahren und ein negativer HIV-Status. Ausschlusskriterien waren mit Immunsuppression einhergehende Erkrankungen, Alkohol- und Drogenmissbrauch und die Rücknahme der Einverständniserklärung. Unter stringenter Anwendung der Kriterien ergab sich nach Ausschluss von 1124 Individuen ein Fallkollektiv von 2004 Patienten. Die Diagnose der Tuberkulose erfolgte durch Nachweis der Mykobakterien (Ziehl-Neelsen-Färbung) in zwei unabhängigen Sputumproben, eine posterior-anteriore Röntgenaufnahme der Lunge und die Kultivierung der Mykobakterien auf Löwenstein-Jensen-Medium. Es wurden eine klinische Untersuchung, ein HIV-Test und die Dokumentation der Symptome und demographischer Daten durchgeführt. Alle Patienten wurden im Rahmen des vom Ghanaischen Nationalen Tuberkuloseprogramm (NTP) organisierten DOTS (*directly observed treatment, short-course*)-Programms behandelt.

Die Kontrollgruppe bestand aus Individuen, die in engem Kontakt mit Tuberkulosepatienten standen, jedoch nicht mit diesen verwandt waren. Es wurde zwischen im gleichen Haushalt

mit Tuberkulosepatienten lebenden (Kontakt-Gruppe) und in der Nachbarschaft lebenden Individuen (Nachbarschafts-Gruppe) unterschieden. Bei den Kontrollindividuen wurde nach der Dokumentation demographischer Daten eine Röntgenaufnahme der Lunge angefertigt und ein Tuberkulin-Test (Hautstempeltest „Tuberculin-Test PPD Merieux“) durchgeführt. Hautindurationen, die nach 3 bis 7 Tagen 2 mm oder größer waren, wurden als PPD-positiv bewertet. Ausschlusskriterien waren radiologische Anzeichen einer akuten oder zurückliegenden Tuberkulose, Abweichung von den definierten Altersgrenzen (6 bis 66 Jahre), Rücknahme der Einverständniserklärung und unvollständige Dokumentation. Die Kontrollgruppe bestand nach Ausschluss von 1632 Individuen aus 1231 Kontakt-Individuen (1117 PPD-positiv, 114 PPD-negativ) und 1135 Nachbarschafts-Kontrollen (1120 PPD-positiv, 15 PPD-negativ).

Das Häufigkeitsverhältnis von Männern zu Frauen war in der Gruppe der Fälle 1/0,5, in der PPD-positiven Gruppe 1/0,7 und in der PPD-negativen Gruppe 1/1,3. Der Altersdurchschnitt der gesamten Gruppe betrug 33,2 Jahre. Die Studienteilnehmer gehörten den Ethnien der Akan (61,5 %), Ga-Adangbe (17,4 %), Ewe (8,3 %) und einer ethnisch heterogenen Gruppe aus Nord Ghana (11,4 %) an. Bei 1,5 % der Individuen war keine ethnische Zuordnung möglich.

Den Studienteilnehmern wurden 10 ml Blut (Citrat-Röhrchen) entnommen. Aus diesem Blut wurden in Ghana B-Lymphozyten isoliert und der restliche Blutanteil zur Stabilisierung der DNA mit einem äquivalenten Volumen einer Urea-Lösung [8 M] versetzt. Den Patienten wurden weitere 5 ml Blut in Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen abgenommen. Mit diesen Proben wurde ein HIV-Test, der die Typen HIV-1 und HIV-2 detektiert, durchgeführt.

2.1.2. Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien

Die zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen eingesetzten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad (*pro analysi*). Chemikalien wurden, soweit nicht in Tabelle 2 aufgeführt, von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 2: Weitere verwendete Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
10x Reaction Buffer BD	Solis BioDyne, Tartu, Estland
10x Solution S	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Aqua ad injectabilia	DeltaSelect, Dreieich, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Bio-Rad, Hercules, USA
Dextran (M = 500.000)	Fluka, Buchs, Schweiz

Fortsetzung Tabelle 2:

Chemikalie	Hersteller
DMEM mit Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Formamid	Amresco [®] , Solon, USA
Hi-Di [™] Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
LiChrosolv [®] ; HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ [25 mM]	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Natrium-Pyruvat-Lösung [100 mM]	PAA, Pasching, Österreich
NEBuffer	New England Biolabs [®] , Ipswich, USA
Nycoprep [®] 1.077	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Pen/Strep	PAA, Pasching, Österreich
RPMI-1640 mit Glutamin	Invitrogen [™] , Carlsbad, USA
Sephadex [™] G-50 Superfine	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich

2.1.3. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	T _m [°C]	Verwendung
ALOX5F_E254K	5'-GGAAGACCTGATGTTTGGCTA-3'	57,9	FRET
ALOX5R_E254K	5'-GCTCCAGGCTGCACTCTA-3'	58,2	FRET
ALOX5_sensor	5'-CAGAGCTGCCCAAGAAGC-3'	58,2	FRET
ALOX5_anchor	5'-CCCGGTGACCACGGAGAT-3'	60,5	FRET
ALOX5F_FAM	5'-CAGGAACAGACACCTCGCTG-3'	61,4	Multifluor. Fragm.
ALOX5F_HEX	5'-CAGGAACAGACACCTCGCTG-3'	61,4	Multifluor. Fragm
ALOX5F_TET	5'-CAGGAACAGACACCTCGCTG-3'	61,4	Multifluor. Fragm
ALOX5R_prom	5'-GCGGCGGTCCAGGTGTCCG-3'	62,0	Multifluor. Fragm.
ALOX5F_seq	5'-AAGCAATTCAGGAGAGAACGAGT-3'	58,9	Sequenzierung
ALOX5R_seq	5'-CTGAGGTAGATGTAGTCGTCAGT-3'	60,6	Sequenzierung
E254K_f	5'-GCTGCACAGAGCTGCCCAAGAAGCTCC CGGTGA-3'	75,0	Mutagenese
E254K_r	5'-GTCACCGGGAGCTTCTTGGGCAGCTCT GTGCA-3'	74,6	Mutagenese
E254K_fseq	5'CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3'	61,0	Sequenzierung
E254K_rseq	5'GTTCCCTTGCTGGACCTCCTGCTC-3'	63,6	Sequenzierung

Anwendung und Modifikationen der Oligonukleotide werden bei der jeweiligen Methode beschrieben. T_m: Schmelztemperatur der Oligonukleotide (*Annealing*-Temperatur); FRET: *fluorescence resonance energy transfer*; Multifluor. Fragm.: Multifluoreszierende Fragmentlängenbestimmung.

2.1.4. Enzyme

Tabelle 4: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
5-Lipoxygenase	Universität Frankfurt, Deutschland, Steinhilber D
Aval / BsoBI	New England Biolabs®, Ipswich, USA
FIREPol®	Solis Biodyne, Tartu, Estland
HOT FIREPol®	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Lysozym	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase A	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

2.1.5. Kulturmedien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1. Kulturmedien und Puffer

10x PBS-Puffer		PBS/Glukose-Puffer	
KH ₂ PO ₄	14,4 g	PBS-Puffer	500 ml
Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O	7,95 g	Glukose-Lsg. (40 %)	1,25 ml
pH 7,4			
H ₂ O	<i>ad</i> 1 l	10x TE Puffer	
10x TBE-Puffer		Tris-HCl	12 g
Tris	108 g	EDTA	2,92 g
Borsäure	55 g	H ₂ O	<i>ad</i> 1 l
EDTA	7,3 g	STET-Puffer	
H ₂ O	<i>ad</i> 1 l	Glukose	80 g
SOC-Medium		Triton X-100	5 ml
Trypton	20 g	EDTA	14,6 g
Hefe-Extrakt	5 g	Tris-HCl	1,2 g
NaCl	0,5 g	H ₂ O (steril filtriert)	<i>ad</i> 1 l
KCl [1 M]	2,5 ml	Homogenisierungs-Puffer	
MgCl ₂ × H ₂ O [2 M]	5 ml	Triethanolamin [1 M] pH 8,0	50 ml
Glukose	3,6 g	EDTA [0,2 M]	25 ml
H ₂ O	<i>ad</i> 1 l	H ₂ O	<i>ad</i> 1 l
10x Transfer-Puffer			
Tris	58,2 g		
Glycin	29,3 g		
SDS	0,375 g		
H ₂ O	<i>ad</i> 800 ml		

SDS-Loading-Puffer		Lyse-Puffer	
Tris	240 mg	Homogenisierungs-Puffer	50 ml
EDTA [0,2 M]	1 ml	STI [60 mg/ml]	50 µl
SDS	5 ml	DTT [2 M]	50 µl
Mercaptoethanol	10 ml	PMSF [100 mM]	200 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml	Lysozym	25 mg
		NaCl	4 g
		H ₂ O	<i>ad</i> 400 ml
		Sterilisation im Autoklav	
		Ampicillin-Lösung	400 µl
1x Transfer-Puffer		Stop-Puffer	
10x Transfer Puffer	80 ml	EDTA [0,2 M]	500 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 800 ml	1x TBS-Puffer	50 ml
MeOH	200 ml		
10x Running-Puffer		LB-Medium	
Glycin	144,2 g	NaCl	9 g
Tris	30,3 g	Pepton	9 g
SDS	10,0 g	Hefe-Extrakt	4,5 g
H ₂ O	<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O	<i>ad</i> 900 ml
Detektions-Puffer		Modifiziertes RPMI-Medium	
Tris	12 g	RPMI-1640 mit Glutamin	1000 ml
NaCl	5 g	FCS (inaktiviert)	100 ml
H ₂ O (pH 9,5)	<i>ad</i> 100 ml	Pen/Strep [10000 u/ml]	10 ml
		Insulin [2,5 mg/ml]	4 ml
		100x MEM	10 ml
		Natriumpyruvat-Lösung	10 ml
		Oxalacetat-Lösung [1 mM]	10 ml
Hepes-Puffer		Milli-Q-Wasser	
NaCl	1,64 g	Aufreinigung mit Milli-Q® UF PLUS	
Hepes	1,19 g		
Na ₂ HPO ₄	0,021 g		
pH 7,05–7,12 (NaOH 10 N)			
H ₂ O	<i>ad</i> 100 ml		
steril filtiert			
Modifiziertes DMEM-Medium			
DMEM mit Glutamin	1000 ml		
Natriumpyruvat-Lösung	500 µl		
FCS (inaktiviert)	50 ml		
Pen/Strep [10000 u/ml]	5 ml		

2.1.5.2. Lösungen**PGB_{1/2}-Lösung [20 ng/μl]**

PGB _{1/2}	1 mg
MeOH	1 ml
1:10 verdünnen; Extinktion bei 278 nm = 0,16	

Triethanolamin-Lösung

Triethanolamin	14,92 g
pH 8,0 (HCl konz.)	
H ₂ O	ad 101,62 g

ATP-Lösung

ATP-dinatriumsalz	220,4 g
H ₂ O	1970 μl
pH 4-5 (10 N NaOH)	

Bromphenolblau-Stammlösung

BPB	1 %
H ₂ O	

Ca⁺⁺-Ionophor [2 mM]

Ca ⁺⁺ -Ionophor A23187	1 mg
MeOH	1 ml
1:1000 verdünnen; Extinktion bei 278 nm = 0,350	

Arachidonsäure [8 mM]

Arachidonsäure	24,3 g
Ethanol	10 ml

EDTA-Lsg. [0,2 M]

EDTA	3,72 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 7,0 (10 N NaOH)	

2.1.6. Reagenziensysteme

Im Folgenden werden die verwendeten kommerziellen Reagenziensysteme (Kits) aufgeführt. Chemikalien, Materialien und die Anwendung der Kits werden im Methodenteil beschrieben.

Tabelle 5: Angewendete Reagenziensysteme

Kitbezeichnung	Hersteller	Anwendung
AGOWA [®] mag Maxi DNA Isolations Kit	AGOWA GmbH, Berlin, Deutschland	DNA-Isolation
GENECLEAN [®] SPIN	QBIOgene, Morgan Irvine, USA	DNA-Isolation
BigDye [®] Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA	Sequenzierung
QuickChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene [®] , La Jolla, USA	Mutagenese
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Mini-Präparation
NucleoBond [®] RC500	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Maxi-Präparation

2.1.7. Protein- und DNA-Standards

Tabelle 6: Verwendete Protein- und DNA-Standards

Standard	Firma
GENESCAN™-500 TAMRA™ STANDARD	Applied Biosystems, Foster City, USA
100 bp DNA-Ladder	New England Biolabs®, Ipswich, USA
SeeBlue®	Invitrogen™, Carlsbad, USA
peqGOLD-Protein-Marker IV	peqLab, Erlangen, Deutschland

2.1.8. Vektoren

Tabelle 7: Verwendete Vektoren

Enzym	Verwendung	Plasmid	Bezugsquelle
5-LO	Transfektion HeLa-Zellen	pcDNA3.1	Rådmark O ¹
5-LO	Transformation <i>E. coli</i> -Zellen	pT3	Rådmark O ¹
FLAP	Transfektion HeLa-Zellen	pSG5	Hatzelmann A ²

¹ Karolinska Institut, Stockholm, Schweden; ² Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

2.1.9. Zellen

Tabelle 8: Eingesetzte Zellen

Zelllinie	Bezugsquelle
BL21	Werz O ¹
DH5α	Werz O ¹
XL1-Blue	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
HeLa-Zellen	Steinhilber D ²
Mono Mac 6-Zellen	Werz O ¹

¹ Eberhard Karls Universität Tübingen, Deutschland; ² Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland

2.1.10. Antikörper

Tabelle 9: Eingesetzte Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-5-LO	Rådmark O ¹
Anti-FLAP	Hatzelmann A ²
Anti-β-Actin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-goat IgG – Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

¹ Karolinska Institut, Stockholm, Schweden; ² Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland

2.1.11. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Firma
Einmalpipetten	2 ml bis 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier	903 [®] Specimen collection filter	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland, jetzt: Whatman [®] , Brentford, Großbritannien
HPLC-Gefäße	HPLC vials MicroInsert	VWR, Darmstadt, Deutschland
Lochplatten	96-Loch und 384-Loch	ABgene, Epsom, Großbritannien
Pipettenspitzen	10 µl bis 1000 µl	RAININ [®] , Oakland, USA Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Platiggefäße	0,2 µl bis 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plastikgefäße	15 ml bis 50 ml	BD Biosciences, San Jose, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Sephadexplatte	MultiScreen [™] HTS	Millipore, Billerica, USA
Zellkratzer	BD Falcon [™] Cell Scraper	BD Biosciences, San Jose, USA
Zellkulturflaschen	250 ml und 550 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen	100 mm und 145 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.12. Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Firma
Brutschrank	Heraeus Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoreseapparatur ¹	Agagel Mini	Biometra [®] , Göttingen, Deutschland
Elektrophoreseapparatur ²	Mini Protean	Bio-Rad, Hercules, USA
Festphasenextraktion	Vac Varian [®]	Varian, Palo Alto, USA
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kapillar-Sequenziergerät	ABI 3100	Applied Biosystems, Foster City, USA
Laminar Flow	LaminAir [®] HB 2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
LightTyper	LightTyper 1.0	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
HPLC-Anlage	D-7000	Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Säule	RCM 8×10	Waters, Milford, USA
PCR-Gerät 384	Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
PCR-Gerät 96	T3 Thermocycler	Biometra [®] , Göttingen, Deutschland
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Einfach- und Mehrfachpipetten	RAININ [®] , Oakland, USA

Fortsetzung Tabelle 11:

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Firma
Pipettierroboter	Genesis Workstation 200 / Freedom eva	Tecan, Mannedorf, Schweiz
Platten-Sequenziergerät	ABI Prism 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reinwasseranlage	Milli-Q® UF PLUS	Millipore, Billerica, USA
Spektrometer	Lamda 12	Perkin Elmer®, Waltham, USA
Ultrazentrifuge	Optima L-60; Rotor 75Ti	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge	Sorvall RC50 Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Heraeus Varifuge 3.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Beckman CS-6R	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Zentrifuge	Zentrifuge Sigma 3E	Sigma, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

¹Agarosegel; ²Polyacrylamidgel.

2.1.13. Datenbanken und Computerprogramme

Mit dem frei verfügbaren Programm BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>] des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurden die konzipierten Primer auf ihre spezifische Bindung im erwünschten Bereich des humanen Genoms überprüft. Die Lokalisation von Schnittstellen wurde mit dem frei zugänglichen Programm von New England Biolabs® (Ipswich, USA) NEBcutter V2.0 [<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>] durchgeführt. Wissenschaftliche Literatur und Information über Gensequenzen wurden in den Datenbanken des NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] und der Datenbank „ensembl“ [<http://www.ensembl.org>] des Gemeinschaftsprojekts des European Bioinformatics Institute und des Wellcome Trust Sanger Institute recherchiert. Die Power der Assoziationsstudie wurde mit der online verfügbaren CATS software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>) berechnet. Die Durchführung der logistischen Regression und Berechnung der Odds Ratios, P-Werte und Konfidenzintervalle erfolgte mit der STATA 8 software (Stata Corporation, College Station, USA) und GraphPad Prism®. Mit zusätzlichen STATA-Modulen wurden das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und die Allelverteilung berechnet (<http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/stata/genassoc>). Zur Berechnung der Haplotypfrequenzen und des relativen Risikos mit den entsprechenden globalen P-Werten wurde durch die "UNPHASED" software (version 3.0.9; <http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>) verwendet. Die graphische Gestaltung der Abbildungen wurde mit SigmaPlot 9.0 und Microsoft® Powerpoint® 2002 durchgeführt. Die Dissertation wurde mit dem Programm Microsoft® Word® 2002 und dem zusätzlichen Modul „dissertation hu“ der Humboldt-Universität Berlin erstellt.

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion

2.2.1.1. DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Extraktion aus dem Vollblut der ghanaischen Studienpopulation erfolgte mit dem AGOWA[®] mag Maxi DNA Isolations Kit nach Angaben des Herstellers. Modifikationen waren eine Verlängerung der Zellyse (30 Minuten) und Bindung (30 Minuten), ein geringeres Volumen des Waschpuffers (1,8 ml) und ein zusätzlicher Waschvorgang (2x Waschpuffer 1). Ein Teil der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Pipettierroboters in 384-Loch-Platten aliquotiert und anschließend bei -20°C gelagert. Der nicht aliquotierte Anteil der DNA wurde bei 5°C gelagert.

2.2.1.2. DNA-Extraktion aus Filterpapier

Die Isolation kleiner DNA-Mengen im Rahmen der Genotypisierung des VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Polymorphismus in der Kontrollgruppe des Bernhard-Nocht-Instituts erfolgte aus wenigen Blutropfen der Testpersonen. Der durch den Stich einer Lanzette in die Fingerbeere gebildete Blutropfen wurde auf ein imprägniertes Filterpapier (Schleicher & Schüll), dessen Matrix Proteine und Hämoglobin bindet, übertragen. Die für die Imprägnierung verwendeten Chemikalien führten zu einer Lyse der Zellen.

Nach 2 Stunden Trocknung bei Raumtemperatur (RT) wurde mit einer Stanze ein Stück des Blut enthaltenden Filterpapiers herausgetrennt, in ein 0,2 ml Plastikgefäß überführt, nach Zugabe von 30 µl HPLC-Wasser gevortext, für eine Minute mit 2000 U/min bei RT zentrifugiert (Centrifuge 5415 D) und bei 95°C 30 Minuten gekocht. Nachdem diese Schritte wiederholt worden waren, wurde das Wasser mit der darin gelösten DNA entnommen und in einem neuen Plastikgefäß bei 5°C gelagert.

2.2.1.3. DNA-Extraktion aus Agarosegel

Ein Produktgemisch einer unspezifischen Polymerase-Kettenreaktion kann im Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente nach Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid durch langwelliges UV-Licht (366 nm) visualisiert werden (2.2.2). Zur Sequenzierung eines gewünschten Fragments dürfen keine Verunreinigungen in Form anderer DNA-Fragmente vorliegen. Daher war es bei der Sequenzierung der repetitiven Promotorvariante in einigen Fällen notwendig, die DNA-Bande der erwarteten Produktgröße mit einem Skalpell auszuschneiden. Die Isolation der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem GENE CLEAN[®] SPIN Kit den Angaben des Herstellerprotokolls entsprechend.

2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) wurde bei der ortsgerechten Mutagenese der 5-LO-Plasmide, den Genotypisierungen der exonischen Variante mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) und der repetitiven Promotorvariante mittels multifluoreszierender Fragmentlängenbestimmung sowie zur Sequenzierung der Promotorvariante eingesetzt. Dabei wird ein durch die Bindung zweier Oligonukleotide (Primer) an den 3'-Enden der beiden DNA-Einzelstränge definierter DNA-Abschnitt in mehreren Temperaturzyklen vervielfältigt [Mullis *et al.*, 1986]. Grundsätzlich enthält ein PCR-Reaktionsansatz neben der DNA-Matrize die spezifisch bindenden Primer (*forward primer* und *reverse primer*), die zur DNA-Neusynthese erforderlichen Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidin-triphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), eine *Taq*-Polymerase und einen Magnesium-haltigen Reaktionspuffer. Nachdem die Matrizen-DNA bei 95°C denaturiert wurde, werden in repetitiven Temperaturzyklen die folgenden Schritte durchlaufen: Anlagerung der Primer bei einer für ihr Bindungsverhalten spezifischen Temperatur (*annealing*), Synthese neuer DNA-Stränge durch Extension der Primer bei 72°C und erneute Denaturierung der DNA-Matrize bei 95°C. Das gewünschte DNA-Fragment wird dadurch exponentiell vervielfältigt. In Tabelle 12 ist als Beispiel die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für die Amplifikation des VNTR-Polymorphismus bei der multifluoreszierenden Fragmentlängenbestimmung (2.2.5) angegeben. In Tabelle 13 sind die Reaktionsbedingungen der entsprechenden PCR aufgeführt. Die für die weiteren Anwendungen erforderlichen Modifikationen sind bei den entsprechenden Methoden beschrieben.

Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz I

Substanz	Konzentration	µl / Reaktion	Endkonzentration
Puffer BD	10x	1,00	1x
MgCl ₂	25 mM	0,60	1,5 mM
<i>forward primer</i>	10 pmol/µl	0,40	0,4 µM
<i>reverse primer</i>	10 pmol/µl	0,40	0,4 µM
Solution S	10x	1,00	1x
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	jeweils 10 mM	0,20	200 µM
HotStart- <i>Taq</i> -Polymerase	5 u/µl	0,10	0,5 u
DNA	etwa 5 ng/µl	2,00	Etwa 10 ng
Aqua destillata		4,30	
Gesamt-Volumen		10,00	

Tabelle 13: PCR-Reaktionsbedingungen I

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
1.	94°C	15 min	Initiale Denaturierung
2.	94°C	45 s	Denaturierung der DNA-Matrize
3.	55°C	30 s	Anlagerung der Primer
4.	72°C	30 s	DNA-Synthese

Schritte 2.-4. wurden 36-mal wiederholt. Schritt 4. wurde nach der 36. Wiederholung um 10 Minuten verlängert.

2.2.3. Genotypisierung mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)

Die Methode wurde eingesetzt, um das Vorkommen der Punktmutationen g.760G>A im gesamten Studienkollektiv zu bestimmen. Die Methode beruht auf dem Prinzip strahlungsfreier Energieübertragung eines angeregten Fluoreszenzmoleküls (Donor) auf ein Akzeptorfluorophor, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt [Förster, 1948].

Zum Nachweis der Punktmutation wurden zwei mit Fluorophoren markierte Oligonukleotidsonden, ALOX5_sensor (Flourescein) und ALOX5_anchor (Cyanin 5.18; Cy5), eingesetzt (2.1.3). Eines der beiden Oligonukleotide überspannte die zu untersuchende Punktmutation (*sensor*), während das andere Oligonukleotid im Abstand einer Base von dessen mit dem Fluorophor markierten Ende entfernt band (*anchor*). Der ALOX5_sensor entsprach in seiner Sequenz der des mutierten Strangs (Abbildung 9). Weiter war zu beachten, dass die beiden Oligonukleotide sich mit ihren markierten Enden gegenüberlagern, das 5'-gelabelte Oligonukleotid am 3'-Ende phosphoryliert war und die Schmelztemperatur des *sensors* mindestens 2°C unter der des *anchors* lag. In einer asymmetrischen PCR wurde der die beiden markierten Oligonukleotide bindende DNA-Abschnitt mittels zweier diese Region flankierenden Primer, ALOX5F_E254K und ALOX5R_E254K, amplifiziert (2.1.3). PCR-Reaktionsansatz II (Tabelle 14) wurde verwendet und mittels des Pipettierroboters auf die mit der DNA der Studienteilnehmer beladenen 384-Loch-Platten verteilt und zum Schutz vor Verdampfung mit Mineralöl überschichtet. Die DNA-Proben der 2004 Fälle und 2366 Kontrollen waren auf insgesamt 13 Platten verteilt. Die PCR wurde nach PCR-Reaktionsbedingungen I (Tabelle 13) mit modifizierter initialer Denaturierung (3 statt 15 Minuten), Zyklanzahl (45 statt 37), zyklischer Denaturierung (20 Sekunden statt 45 Sekunden) und Dauer des abschließenden Syntheseschritts (5 statt 10 Minuten) durchgeführt (Primus 96 plus). Nach der Amplifizierung wurden die Proben für eine Minute mit 3000 U/min bei RT zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 3E).

In einem Gerät (LightTyper) wurden die Proben dann mit Licht des Absorptionsbereichs des Donors bestrahlt (475 nm) und kontinuierlich die Temperatur erhöht (0,05°C/s). Veränderungen der Emission des Akzeptorfluorophors wurden bei 510 nm in Abhängigkeit der Temperatur aufgezeichnet. Überstieg die Temperatur die Schmelztemperatur (T_m) eines der Oligonukleotide, löste sich dieses von der Matrize und die Emission erlosch. Die bei einem Wildtyp-Allel nur um eine einzige Base veränderte Zielstruktur des *sensors* erniedrigte nachweisbar dessen Schmelztemperatur und führte so zu einer schnelleren Ablösung. Bereits bei einer Temperatur 50,5 °C dissoziierte der *sensor* von der Wildtyp-Matrize (g.760G). Bei etwa 58,5°C löste sich der *sensor* auch von der die Variante tragenden Matrize (g.760A) ab. Anhand der Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität/Temperatur-Kurve ließ sich zwischen homozygotem Wildtyp, Heterozygotie und homozygoter Mutante unterscheiden (Abbildung 9).

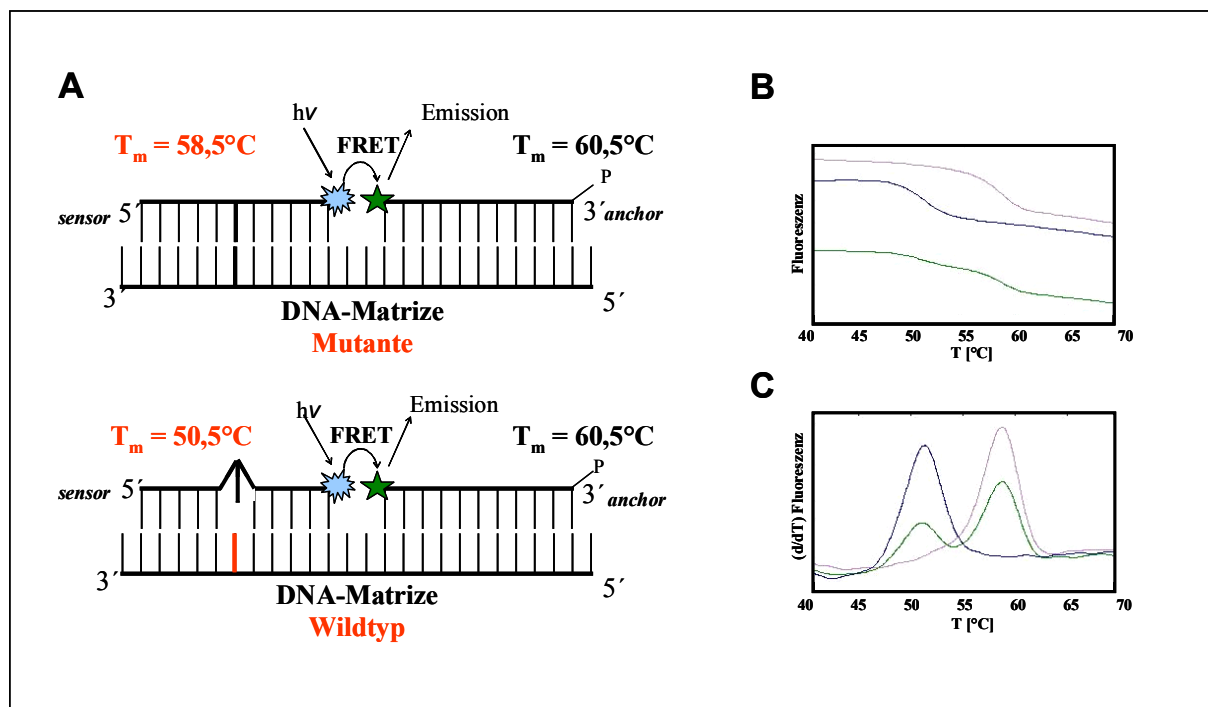


Abbildung 9: Genotypisierung der Variante g.760G>A mittels FRET

A: Der *sensor* hat die gleiche Frequenz wie die Matrize der Mutante (g.760A); von der Matrize des Wildtyps (g.760G) unterscheidet sich der *sensor* in einer Base (roter vertikaler Strich). Dadurch kommt es bereits bei einer Temperatur von 50,5°C zur Ablösung des *sensors*. Die Übertragung der Energie des Fluoresceins (blau) auf Cy5 (grün) ist unterbrochen. T_m : Schmelztemperatur. **B:** Anhand der Fluoreszenz/Temperatur-Kurve erkennt man diese unterbrochene Übertragung an der Abnahme der Fluoreszenz bei 50,5°C. Der zweite Abfall bei 58,5°C tritt ein, wenn sich der *sensor* von der Matrize der mutierten DNA (g.760A) gelöst hat. **C:** In der integralen Darstellung (d/dT) erkennt man den homozygoten Wildtyp (blau), Heterozygotie (grün) und die homozygote Mutante (violett).

Tabelle 14: PCR-Reaktionsansatz II

Substanz	Konzentration	µl / Reaktion	Endkonzentration
Puffer BD	10x	1,00	1x
MgCl ₂	25 mM	0,40	1 mM
<i>forward primer</i> (ALOX5_E254K)	10 pmol/µl	0,20	0,2 µM
<i>reverse primer</i> (ALOX5_E254K)	10 pmol/µl	1,00	1 µM
<i>sensor</i> (ALOX5_sensor)	5 pmol/µl	0,50	0,25 µM
<i>anchor</i> (ALOX5_anchor)	5 pmol/µl	1,00	0,50 µM
Solution S	10x	1,00	1x
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	jeweils 10 mM	0,20	200 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,10	0,5 U
DNA	etwa 5 ng/µl	2,00	etwa 10 ng
Aqua destillata		2,60	
Gesamt-Volumen		10,00	

2.2.4. Multifluoreszierende Fragmentlängenbestimmung

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten VNTR-Polymorphismus handelt es sich um Deletionen bzw. Additionen eines aus sechs Basen (GGGCGG) bestehenden Bindungsmotivs. Fragmente mit einem solchen Unterschied lassen sich im Polyacrylamidgel nach der Größe auftrennen und detektieren. Die Detektion der Banden im Polyacrylamidgel erfolgte in einem automatischen Platten-Sequenziergerät (ABI Prism 377 DNA-Sequencer). Hierfür wurde der die Variante enthaltende DNA-Abschnitt mit fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden amplifiziert. Die Kapazität eines Sequenzierlaufs ist durch die Anzahl der 64 Taschen im Polyacrylamidgel limitiert. Da mit dem Sequenziergerät eine Detektion der Emission bei unterschiedlichen Wellenlängen möglich ist, wurden durch den Einsatz verschiedener fluoreszierender Farbstoffe mehrere PCR-Reaktionsprodukte in einer Gelbahn analysiert und die Kapazität pro Lauf auf 192 Proben erhöht. Das 5'-Ende der *forward primer* wurde einem der Fluoreszenzfarbstoffe HEX, FAM oder TET verlinkt (ALOX5F_HEX, ALOX5F_FAM, ALOX5F_TET). Als *reverse primer* wurde für alle Reaktionen ALOX5R_PROM gewählt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die DNA-Proben der Studienteilnehmer verteilten sich auf dreizehn 384-Loch-Platten. Die Amplifizierung der DNA einer Platte wurde einheitlich mit einem der drei markierten *forward*-Primer durchgeführt. Die Verteilung des PCR-Reaktionsansatzes I (Tabelle 12) auf die Platten erfolgte mit dem Pipettierroboter. Die PCR (Primus 96 plus) wurde nach PCR-Reaktionsbedingungen I (Tabelle 13) durchgeführt.

Da sich die Intensität der Emission der drei Fluorophore unterschied, konnten Signale der schwächer emittierenden Fluorophore überdeckt werden. Um dies zu verhindern, wurden die unterschiedlich markierten PCR-Produkte in einem Verhältnis gemischt, dass eine vergleichbar starke Emission der drei Fluorophore gewährleistet. Der Längenstandard TAMRA™ ist ebenfalls ein Fluorophor, dessen Konzentration entsprechend angepasst werden musste. Daher wurden mit dem Pippetierroboter 6 µl HEX-PCR-Produkt, 2 µl FAM-PCR-Produkt und 3 µl TET-PCR-Produkt gemischt. 5 Teile des Längenstandards wurden mit 2 Teilen Dextran Blue in Formamid versetzt und 2 µl dieser Lösung zu 1 µl der PCR-Produkt-Mischung gegeben.

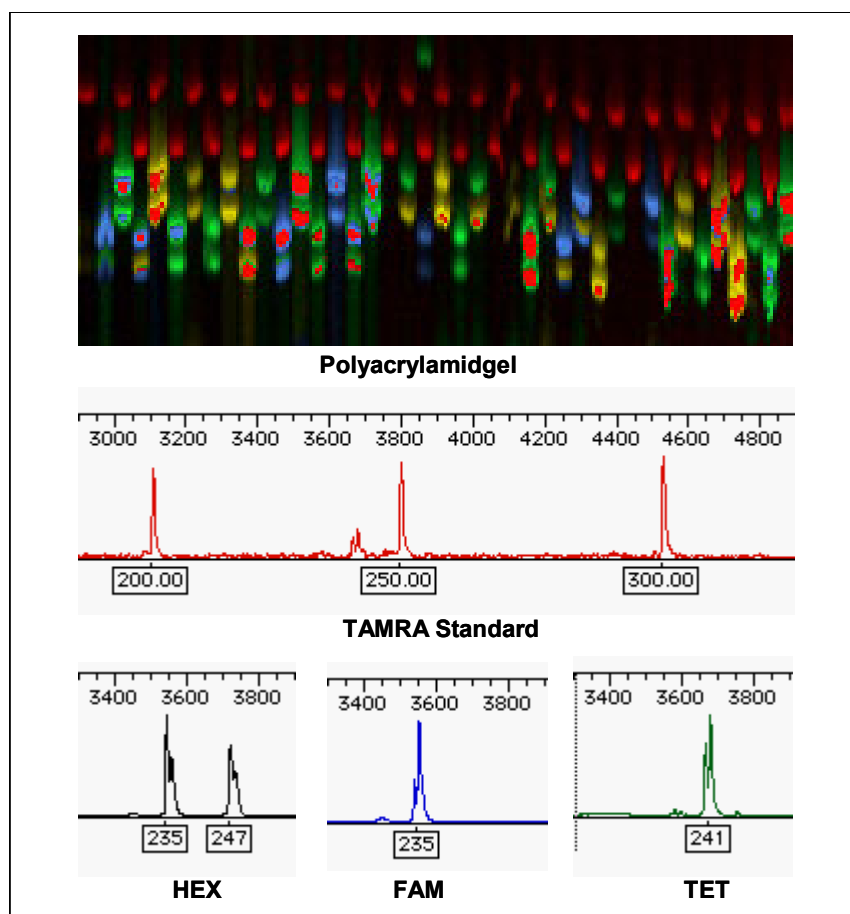


Abbildung 10: Genotypisierung des VNTR-Polymorphismus mittels multifluoreszierender Fragmentlängenbestimmung im Polyacrylamidgel

Oberer Abschnitt: Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel zur Bestimmung des VNTR-Polymorphismus. Rot: Marker; Grün: TET; Gelb: HEX; Blau: FAM. Das Bild wurde bei Detektion des gesamten Fluoreszenzspektrums aufgenommen; optional ist die Detektion einer bestimmten für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge möglich. Unterer Teil: Intensitäten der PCR-Produkte einer Probe in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Detektion. Die Zahlen unter den Peaks beziehen sich auf die Fragmentgröße des Amplikons: 235: 3-Allel, 241: 4-Allel und 247: 5-Allel.

Für die Elektrophorese wurde ein 5 %iges Polyacrylamidgel hergestellt. Hierfür wurden 18 g Urea unter Rühren bei 50°C in 7,5 ml 30 % Acrylamid-Lösung, 6 ml 10x TBE-Puffer und 23 ml H₂O gelöst. Danach wurde die Lösung entgast und die Polymerisation mit 350 µl Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) initiiert. Dann wurde unverzüglich ein blasenfreies Gel gegossen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamidgel wurde das Gemisch der unterschiedlich markierten PCR-Produkte und des Längenstandards bei 94°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Auftragung von 1 µl Probe pro Geltasche erfolgte mit einer Hamilton-Pipette unter Aussparung je einer Gelbahn. Vor dem Start der Elektrophorese wurde das Gel auf > 55°C vorgeheizt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 2500 V. Nach 5 Minuten wurde diese unterbrochen und die verbliebenen Geltaschen wurden befüllt. Die Dauer der Elektrophorese betrug 4 Stunden.

2.2.5. Sequenzierung

Zur Kontrolle der Ergebnisse der Genotypisierungen des VNTR-Polymorphismus und zur Überprüfung des korrekten Einbaus der Mutation in die 5-LO-Plasmide wurden DNA-Abschnitte der Proben sequenziert und mit der erwarteten Sequenz verglichen. Die Sequenzierungen der Plasmid-Klone wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenz, der dort verwendeten Primer (E254K_fseq, E254K_rseq) sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Zur Sequenzierung der repetitiven Promotorvariante wurden die Primer, ALOX5F_seq und ALOX5R_seq (Tabelle 3), so gewählt, dass sie bei Vorliegen von fünf Kopien des Sp1-Bindungsmotivs einen Bereich von 434 bp umschlossen. Es wurde der PCR-Reaktionsansatz I (Tabelle 12) verwendet. Die HotStart-Polymerase wurde durch eine normale Taq-Polymerase ersetzt. Die PCR wurde nach den PCR-Reaktionsbedingungen I (Tabelle 13) mit folgenden Abweichungen durchgeführt: Verkürzung der initialen Denaturierung auf 5 Minuten, Erhöhung der zyklischen Denaturierung auf 1 Minute und Reduktion der Zyklenzahl auf 33. Nach der PCR wurden die Produkte in einem Agarosegel auf ihre Reinheit kontrolliert. Beim Vorliegen unspezifischer PCR-Produkte wurde die Bande des Fragments mit der gewünschten Größe mit einem Skalpell herausgetrennt und aufgereinigt (2.2.1.3). Die PCR-Produkte wurden über präparierte Sephadex-Säulen von überschüssigen Primer- und Nukleotidresten getrennt. Es folgte eine Sequenzierungs-PCR nach dem Kettenabbruchverfahren [Sanger *et al.*, 1977]. Die Sequenzierung wurde jeweils mit einem der Primer ALOX5F_seq oder ALOX5R_seq und PCR-Reaktionsansatz III (Tabelle 15) bei PCR-Reaktionsbedingungen II durchgeführt (Tabelle 16). Nach weiterer Aufreinigung über

Sephadexsäulen wurden die Proben zur Stabilisierung mit Hi-Di™ Formamid versetzt und im Kapillarsequenzier (ABI 3100) analysiert.

Tabelle 15: PCR-Reaktionsansatz III

Substanz	Konzentration	µl / Reaktion	Endkonzentration
Big Dye Puffer		3,00	
<i>forward</i> oder <i>reverse</i> Primer	10 pmol/µl	0,50	0,5 µM
Big Dye		1,00	
DNA	etwa 5 ng/µl	2,00	etwa 10 ng
Aqua destillata		3,50	
Gesamt-Volumen		10,00	

Tabelle 16: PCR-Reaktionsbedingungen II

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
1.	96°C	3 min	Initiale Denaturierung
2.	96°C	30 s	Denaturierung der DANN-Matrize
3.	50°C	15 s	Anlagerung der Primer
4.	60°C	4 min	DNA-Synthese

Schritte 2.-4. wurden 24-mal wiederholt

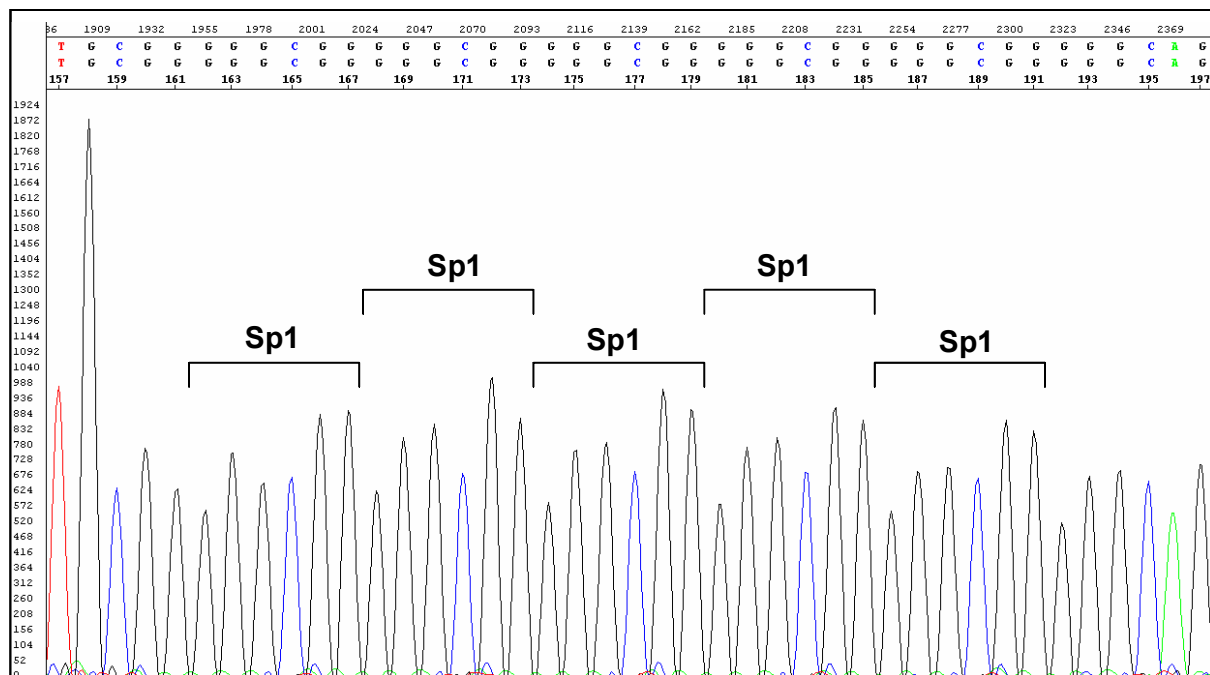


Abbildung 11: Sequenzierung des VNTR-Polymorphismus

Ausschnitt der Sequenz der Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im Promotor von *ALOX5*. Verwendet wurde der *ALOX5F_seq*-Primer. Es handelt sich um DNA eines Individuums mit 55-Genotyp. Die Klammern umschließen die Sp1-Bindungsstellen; Die Peaks stellen die Nukleotide dar: Blau: Cytosin; Schwarz: Guanin; Rot: Thymin; Grün: Adenin. Im oberen Abschnitt sind die Originalsequenz für das 5-Allel und die tatsächlich analysierte Sequenz angegeben.

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen. Durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches mit DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese Methode wurde verwendet, um die bei einer PCR-Reaktion gebildeten Produkte zu überprüfen und zur Bestimmung der Fragmentlängen nach Restriktionsverdau eines 5-LO-Plasmids.

Für ein 1,5 %iges Agarosegel wurden 6 g Agarose in 400 ml TBE-Puffer unter leichtem Aufkochen gelöst. Zur abgekühlten Lösung wurden 16 µl Ethidiumbromid-Lösung (1%) gegeben. Die Geltaschen wurden mit 4 µl eines PCR-Produkts und 1 µl Bromphenolblau befüllt. Als Marker wurde ein DNA-Längenstandard (100 bp DNA-Ladder) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 bis 120 V durchgeführt.

2.2.7. Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Zellen

2.2.7.1. Mini-Präparation mit NucleoSpin® Plasmid Kit

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse aus Flüssigkulturen (Birnboim & Doly, 1979). Dazu werden *Escherichia coli*-Zellen durch Zugabe von NaOH und Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*; SDS) aufgeschlossen. Während Proteine und genomische DNA durch Neutralisation gefällt werden, bleibt die Plasmid-DNA in Lösung.

Für eine DNA-Ausbeute bis zu 25 µg und zur Sequenzierung bestimmte Plasmid-DNA wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Eine Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie wurde in 5 ml LB (Luria Bertani)-Medium mit 5 µl Ampicillin-Lösung für 30 Sekunden mit 11.000 x g bei RT zentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.0). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das NucleoSpin® Plasmid Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.7.2. Mini-Präparation mit CTAB-Methode

Eine Alternative zu dem kommerziell verfügbaren Kit bestand in der Methode der Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Präparation (Del Sal *et al.*, 1988). Von einer *E. coli*-Kultur wurden 1,5 ml für 2 Minuten mit 13.000 x g bei RT zentrifugiert (Centrifuge 5415 D) und die Zellen in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 4 µl frisch angesetzter Lysozym-Lösung (5 mg/100 µl) und 250 µg/ml RNase A wurde der Ansatz für 7 Minuten bei RT inkubiert, anschließend für 45 Sekunden aufgekocht (100°C) und dann für 5 Minuten mit 13.000 x g bei RT zentrifugiert (Centrifuge 5415 D). Das Pellet aus aggregierter

chromosomaler DNA und Proteinen konnte mit einem sterilen Holzstäbchen entnommen werden. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 8 µl 5 %-CTAB-Lösung (35-40°C) bei leichtem Mischen präzipitiert und anschließend für 10 Minuten mit 13.000 x *g* bei RT zentrifugiert (Centrifuge 5415 D). Das Präzipitat wurde in 300 µl 1,2 M NaCl-Lösung aufgenommen, mit 700 µl 70 % Ethanol ausgefällt und nochmals für 5 Minuten mit 13.000 x *g* bei 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5415 D). Die DNA konnte nun in H₂O resuspendiert werden.

2.2.7.3. Maxi-Präparation mit NucleoBond™ RC500 Kit

Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis zu 500 µg) zur Transfektion von HeLa-Zellen wurde mit dem NucleoBond Kit™ nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

2.2.8. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm. Als Referenz diente H₂O.

2.2.9. *In vitro* ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese (*site directed mutagenesis*) ist es möglich, in doppelsträngige Plasmide Mutationen einzuführen. Die Verwendung des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene®) erlaubt eine gerichtete Mutagenese ohne den Einsatz spezieller Restriktionsenzyme und Vektoren. Das Prinzip besteht darin, dass Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, als Startermoleküle einer PCR verwendet werden. Mit Hilfe dieses Kits wurde die Variante g.760G>A an der entsprechenden Position im *E. coli*-Expressionsplasmid pT3-5-LO und im HeLa-Expressionsplasmid pcDNA3.1 eingebaut.

Hierzu wurden zwei komplementäre Mutationsprimer (E254K_f; E254K_r; Tabelle 3), die den Basenaustausch an der entsprechenden Position enthielten, konzipiert und mit der *Pfu*-Turbo-Polymerase in einer PCR verlängert. Es entstanden mutierte Plasmide mit Einzelstrangbrüchen (*nicks*). Die PCR (T3 Thermocycler) wurde mit dem PCR-Reaktionsansatz IV (Tabelle 17) und bei den Reaktionsbedingungen III (Tabelle 18) durchgeführt.

Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz IV

Substanz	Konzentration	µl / Reaktion	Endkonzentration
10x reaction buffer	10X	5,00	1X
<i>primer forward</i>	100 ng/µl	1,25	2,5 ng/µl
<i>primer reverse</i>	100 ng/µl	1,25	2,5 ng/µl
dNTPs	-	2,00	
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 u/µl	1,00	0,05 U/µl
Plasmid-DNA	40 ng/µl	1,00	0,8 ng/µl
Aqua destillata	-	39,5	
Gesamt-Volumen		50	

Tabelle 18: PCR-Reaktionsbedingungen III

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
1.	95°C	30 s	Initiale Denaturierung
2.	95°C	30 s	Denaturierung der DANN-Matrize
3.	55°C	60 s	Anlagerung der Primer
4.	72°C	5 min	DNA-Synthese

Schritte 2.-4. wurden 17-mal wiederholt. Schritt 4 wurde nach der 17. Wiederholung um 5 Minuten verlängert

Zum Abbau nicht mutierter DNA folgte der PCR eine Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *DpnI*. Dieses Restriktionsenzym schneidet die entsprechenden Stellen (GA↓TC) nur dann, wenn diese methyliert sind. Während das ursprüngliche Plasmid methyliert war und folglich abgebaut wurde, blieb die neu synthetisierte, nicht-methylierte DNA, die die gewünschte Mutation aufwies, erhalten. Das PCR-Produkt wurde mit 1 µl *DpnI* Restriktionsendonuklease (10 u/µl) versetzt, vorsichtig vermischt, für 1 Minute mit 5000 U/min bei RT zentrifugiert (Centrifuge5415 D) und dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um die *nicks* in den Strängen der Plasmide wieder zu schließen, mussten die Plasmide in kompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen transformiert werden (2.2.13).

2.2.10. Restriktionsverdau

Der Nachweis des korrekten Einbaus der Mutation in das 5-LO-Plasmid kann durch einen Restriktionsverdau geführt werden. Wenn die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease im Bereich der veränderten Sequenz liegt, werden unterschiedliche Fragmente erhalten, die im Agarosegel aufgetrennt werden können. Es wurde je 1 µl der 5-LO-Plasmide mit 1 µl *AvaI* (C↓YCGRG), 25 µl H₂O und 3 µl NEBuffer 4 in sterilen Eppendorfgefäßen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit 80°C für 20 Minuten eine Hitze-Inaktivierung durchgeführt und die Proben auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen.

2.2.11. Zellkultur

2.2.11.1. *Escherichia coli*-Zellen

Die Aufzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium). Die Lagerung der *E. coli*-Zellen erfolgte bei -80°C. Von transformierten *E. coli*-Zellen wurden Glycerolstammlösungen angelegt. Hierzu wurden 60 % Glycerol und *E. coli*-Übernacht-Kultur im Verhältnis 1:1 gemischt, auf Eis gekühlt und bei -80°C gelagert. Bei BL21-Zellen ist der Glycerol-Gesamtanteil zu reduzieren und darf höchstens 8 % betragen. Es wurden je nach Verwendung unterschiedliche *E. coli*-Stämme eingesetzt. Zur Lagerung und zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden DH5 -Zellen verwendet. Die Ligation der Einzelstrang-Plasmid-DNA erfolgte in XL1-Blue. Zur Proteinexpression wurden BL21-Zellen verwendet.

2.2.11.2. HeLa-Zellen

Für die Expression rekombinanter DNA in eukaryonten Zellen wurde die permanente humane Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa verwendet. Die Kultivierung erfolgte in modifiziertem Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit Glukose (4,5 g/l) in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen bei 6 % CO₂ und 37°C im Brutschrank. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 70 % passagiert. Die Ablösung der adhärennten Zellen erfolgte mittels Trypsin/EDTA. Ein Teil der abgelösten HeLa-Zellen wurde mit 20 Teilen neuem Medium versetzt.

2.2.11.3. Mono Mac 6-Zellen

Bei Mono Mac 6-Zellen (MM6) handelt es sich um eine humane monozytäre Suspensions-Zelllinie. MM6 haben phänotypische und funktionelle Merkmale reifer Monozyten. Die Zellen wurden in dieser Arbeit zur Gewinnung von Glutathion-Peroxidase verwendet. MM6 wurden in modifiziertem RPMI-Medium kultiviert und bei einer Dichte von 0,7 Millionen/ml umgesetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 2500 U/min (Beckman CS-6R).

2.2.12. Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Blut

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) wurden als Positivkontrolle bei 5-LO-Aktivitätsassays verwendet. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte durch Isolation aus menschlichem Blut. Das Blut wurde freiwilligen Spendern der Eberhard Karls Universität Tübingen entnommen. Zudem wurden Lymphozytenkonzentrate (*Buffy Coats*) anonymisierter Blutspender verwendet. Das Blut oder das Lymphozytenkonzentrat wurde 1:5 (Vollblut) oder 1:1 (*Buffy coats*) mit PBS verdünnt. Danach wurde ein Viertel des Gesamtvolumens an 5 %-Dextran/PBS zugegeben. Nach 30 Minuten Sedimentation der

Erythrozyten wurde der Überstand der gebildeten Suspension abgenommen. Ein Plastikgefäß wurde mit 10 ml Nyco-Prep[®] gefüllt und vorsichtig mit dem Überstand überschichtet. Durch diesen Dichtradien sollten sich die PMN nach einer Zentrifugation über 10 Minuten mit $800 \times g$ bei RT (Beckman CS-6R) in der Nyco-Prep-Phase konzentrieren. Die Zentrifuge musste zum Erhalt des Gradienten ungebremst auslaufen. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in 1 ml eiskaltem 1x PBS-Puffer mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Danach wurden die Zellen in den Plastikröhrchen mit 10 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten mit $300 \times g$ bei RT zentrifugiert (Beckman CS-6R). Nach Absaugen des Überstands wurden 10 ml eiskaltes Milli-Q-Wasser zum Pellet gegeben und das Gemisch sofort für 45 Sekunden gevortext, um restliche Erythrozyten zu lysieren. Daraufhin wurde erneut mit 40 ml 1x PBS-Puffer gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten mit $200 \times g$ bei RT (Beckman CS-6R) wurde das Pellet schließlich in 2 ml Glukose/PBS (1 g/l) resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch Zugabe von 0,2 %-Trypanblau (in 0,9 % NaCl-Lösung) in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe des Lichtmikroskops bestimmt. Die PMN-Ausbeute betrug etwa 1-2 Millionen/ml für Vollblut und 4 Millionen/ml für *Buffy Coats*.

2.2.13. Plasmid-Transformation in *Escherichia coli*-Zellen

Um die beiden 5-LO-Enzymformen 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in *E. coli*-Zellen zu exprimieren, mussten die beiden 5-LO-Plasmide in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Zur Vorbereitung wurden LB-Agarplatten hergestellt. Hierfür wurden 6 g Agar in 400 ml LB-Medium gelöst, autoklaviert und nach Abkühlung auf 50°C mit 400 µl Ampicillin-Lösung (100 µg/ml) versetzt. Die Platten wurden dann ausgegossen.

Zur Transformation wurden 10 µl pT3-5LO-Plasmid (0,1 ng) in ein Eppendorfgefäß mit 100 µl kompetenten DH5α- oder BL21-Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden und eine erneute Kühlung auf Eis für 5 Minuten. Nun wurden 900 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Lösung 90 Minuten auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 1200 U/min für 1 Minute zentrifugiert (Centrifuge 5415 D). 650 µl des Überstands wurden verworfen. Mit der restlichen Flüssigkeit wurde das Pellet resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einem sterilen Holzstäbchen ein Klon gepickt und in einen Kolben mit 10 ml LB-Medium und 10 µl Ampicillin-Lösung (100 µg/ml) überführt. Aus dieser Kultur konnten nach 12 Stunden Glycerolstammlösungen der *E. coli*-Zellen angelegt werden.

2.2.14. 5-Lipoxygenase-Expression in *Escherichia coli*-Zellen

Um einen Vergleich der 5-LO-Aktivität zwischen Wildtyp und Mutante durchzuführen, müssen die beiden Enzymformen in *E. coli*-Zellen exprimiert werden. Aus den *E. coli*-Glycerolstammlösungen wurde mit einem sterilen Holzstäbchen eine kleine Zellmenge entnommen, in einen 100 ml Kolben mit 10 ml LB-Medium und 10 µl Ampicillin-Lösung (100 µg/ml) überführt und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5 ml der Übernachtskultur in einen 500 ml Kolben mit 200 ml LB-Medium, 200 µl Ampicillin, 200 µl FeSO₄ [5mM] und 400 µl MgSO₄ [1mM] überführt und bei 30°C geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD) zwischen 0,2 und 0,3 bei einer Wellenlänge von 620 nm erreicht war. Zur Induktion der Expression des *ALOX5*-Gens im 5-LO-Plasmid wurden 500 µl Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) (1,5 ml H₂O/90 mg IPTG) zugegeben. IPTG ist ein Galaktoseanalogon und wirkt wie dieses als Aktivator der lac-Promotor abhängigen Transkription von nachgeschalteten Genen im 5-LO-Plasmid. Die Expressionskultur wurde bei RT über Nacht geschüttelt.

2.2.15. Aufschluss von *Escherichia coli*-Zellen

Um die Aktivität der 5-LO zu bestimmen, musste das exprimierte Enzym aus den *E. coli*-Zellen freigesetzt werden und durch Zentrifugation von festen und nicht löslichen Bestandteilen getrennt werden. Die OD der Wildtyp- und Mutante-Expressionskulturen sollte sich maximal ab der zweiten Dezimalstelle unterscheiden. Die Zellsuspension wurde mit 7700 × g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Sorvall RC50 Plus) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zur Überprüfung der Proteinmenge gewogen und danach in Lyse-Puffer vollständig gelöst. Nach 5 Minuten bei RT wurde die Lösung 25 Minuten auf Eis gekühlt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Lösung 3 × 10 Sekunden homogenisiert. Die Abtrennung fester Bestandteile erfolgte durch Zentrifugation mit 40.000 × g für 20 Minuten bei 4°C (Sorvall RC50 Plus). Der Überstand (S40-Überstand) wurde in Plastikröhrchen überführt und diente als Ausgangslösung für die sich sofort anschließenden 5-LO-Aktivitätsassays.

2.2.16. Transfektion von HeLa-Zellen

Um die Aktivität der 5-LO in HeLa-Zellen zu bestimmen, musste das Plasmid von HeLa-Zellen aufgenommen werden. Hierfür wurde die Methode der Calcium-Präzipitation angewendet. Zur Transfektion wurden HeLa-Zellen mit einer Konfluenz von 60 bis 70 % eingesetzt.

1,25 ml steriler Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)-Puffer wurde in einem 50 ml Plastikröhrchen vorgelegt. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 10 bis 50 µg Plasmid-DNA mit 125 µl CaCl₂-Lösung (2,5 M) versetzt und mit H₂O auf 1,25 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde mit sterilisierten Pasteurpipetten tröpfchenweise über einen Zeitraum von 90 Sekunden zu den 1,25 ml Hepes-Puffer zupipettiert. Gleichzeitig wurde der Puffer konstant mit einer 5 ml Pipette belüftet. Unmittelbar nach Zugabe wurde die Lösung 5 Sekunden gevortext. Da es bei RT normalerweise innerhalb von 20 Minuten zur Präzipitation von Calcium-Phosphat-Kristallen mit der konjugierten DNA kommt, wurden nach 25 Minuten 2,5 ml dieses Präzipitats zu den Zellen in die Zellkulturschalen gegeben und diese leicht durchmischt. Nach 16 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 6 % CO₂ wurde das Medium erneuert und nach weiteren 24 Stunden konnten die HeLa-Zellen geerntet werden.

2.2.17. Ernte von HeLa-Zellen

Die Ernte adhärenter HeLa-Zellen und die Aufnahme in einem Puffer sind Voraussetzung für nachfolgende Aktivitätsbestimmungen in der intakten Zelle. Das Medium der transfizierten Zellen wurde entfernt und 5 ml frisches modifiziertes DMEM-Medium hinzugegeben. Die HeLa-Zellen wurden mit einem Zellkratzer schonend von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt. Verbliebene Zellen in der Zellkulturschale wurden mit 5 ml 1x PBS aufgenommen und ebenfalls in das 50 ml Plastikröhrchen überführt. Die Proben wurden bei 4°C für 10 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert (Beckman CS-6R) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2 ml PBS/Glukose resuspendiert. Zur Quantifizierung viabler HeLa-Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau angefärbt und die nicht angefärbten HeLa-Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.2.18. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird für die Auftrennung von Proteinen nach deren Größe verwendet. Hier wurden 5-LO, FLAP und β-Actin aufgetrennt, um durch einen nachfolgenden Immunoblot die entsprechenden Proteinmengen zu bestimmen. Da die Polypeptidketten mit dem anionischen Detergenz SDS entfaltet werden, bilden sich Mizellen mit konstant negativer Ladung pro Masseneinheit, die im elektrischen Feld zur Anode wandern [Laemmli, 1970].

Zur Trennung wurde ein diskontinuierliches Gel aus einem grobporigen Sammelgel (pH 6,8) und einem feinporigen Trenngel (pH 8,8) verwendet. Je nach Proteingröße wurden unterschiedliche Vernetzungsgrade durch variierende Acrylamid-Anteile im Trenngel verwendet. Zur Trennung von 5-LO und β -Actin von Kontaminanten wurden 10 %ige oder 8,5 %ige Gele verwendet. Die Auftrennung von FLAP erfolgte in einem 14 %igen Gel.

Beispiel für ein 10 % Gel:

	Sammelgel [ml]	Trenngel [ml]
H ₂ O	1,35	2,95
30 % Acrylamid (37,5:1)	0,335	2,5
1,5 M Tris pH 8,8	0,25	1,9
10 % SDS	0,02	0,075
10 % APS	0,02	0,075
TEMED	0,002	0,003

Zur Vorbereitung wurden die S40-Überstände des *E. coli*-Lysats, die in PBS/Glukose gelösten HeLa-Zellen oder die ebenfalls in PBS/Glukose gelösten PMN 1:1 mit 2x SDS-Loading-Puffer verdünnt und bei 95°C 5 Minuten denaturiert. Proben aus intakten Zellen (HeLa, PMN) mussten vor dem Auftragen homogenisiert werden. Zum Auftragen wurden 20 μ l der Proben mit 6 μ l Bromphenolblau (0,05 % BPB Stammlösung / 50 % Glycerol) versetzt. Bei großen Geltaschen wurden 20 μ l, bei kleinen Geltaschen 10 μ l eingefüllt. Zusätzlich wurden ein Molekulargewichtsstandard (SeeBlue[®], peqGOLD) und rekombinante 5-LO aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x Running-Puffer bei 80 V gestartet und nach 10 auf 120 V erhöht.

Mit Coomassie R-250-Färbelösung konnten die Proteine auf dem Gel visualisiert werden und die erfolgreiche Auftrennung überprüft werden. Die Färbung erfolgte über 16 Stunden.

2.2.19. Western Blot und Immunodetektion

Mit Hilfe des *Western Blot*-Verfahrens wird das Bandenmuster elektrophoretisch aufgetrennter Proteine durch ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und im Falle eines Immunoblots durch Antikörper und nachfolgende chemische Reaktionen spezifisch angefärbt. Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um 5-LO, FLAP und β -Actin in Zellhomogenaten nachzuweisen und deren Proteinmengen zu bestimmen.

Das Polyacrylamidgel wurde vorsichtig von den Glasplatten entfernt und für 5 Minuten mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Gleichzeitig wurden Schwämme und Filterpapier in 1x Transfer-

Puffer sowie die Nitrozellulosemembran in Milli-Q-Wasser konditioniert. Es wurde das *Tank-blot*-Verfahren angewendet. Auf die Kathode der *Western Blot*-Apparatur wurden ein Schwamm, 4 Filterpapiere, das Trenngel und die Nitrozellulosemembran sowie 3 weitere Lagen Filterpapier und ein zweiter Schwamm gelegt. Der Transfer erfolgte über 90 Minuten bei einer konstanten Spannung von 90 V in einer Tank-Blot-Kammer mit 1x Transfer-Puffer und Eiskühlung.

Durch Anfärbung mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) wurde der Erfolg der Proteinübertragung auf die Membran überprüft. Die Färbung in Ponceau S-Lösung dauerte 1 bis 2 Minuten und ließ sich rückstandslos mit 1 N NaOH entfernen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 10 Minuten in 1x TBS-Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindungen wurde die Membran mit bovinem Serum-Albumin (BSA) für eine Stunde inkubiert und danach dreimal in 1x TBS-Puffer gewaschen.

Abhängig von den analysierten Zelltypen wurden die Proteine β -Actin, 5-LO oder FLAP durch spezifische Primärantikörper und nachfolgende Bindung eines Sekundärantikörpers sowie einer chemischen Farbreaktion auf der Membran nachgewiesen. Zur Bindung des Primärantikörpers wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einem 50 ml Plastikröhrchen mit der Antikörperlösung inkubiert.

Zur Herstellung der 5-LO-Antikörperlösung wurden 100 μ l des anti-5-LO-Antikörpers zu einer filtrierten Lösung aus 0,025g BSA, 100 μ l 5% NaN_3 und 4800 μ l TBS-Puffer gegeben. Diese Antikörperlösung hatte bei einer Lagertemperatur von -80°C über einen Zeitraum von annähernd zwei Wochen eine ausreichende Reaktivität. Für die Antikörperlösungen von FLAP und β -Actin wurden 10 μ l Antikörper zu 200 μ l FCS und 10 ml TBS-Puffer gegeben. Danach wurden 200 μ l 5% NaN_3 und 50 μ l Tween 20 hinzugefügt. Diese Lösungen waren etwa 4 Wochen haltbar. 15 μ l Sekundärantikörper wurden zu einer Lösung von 15 ml TBS-Puffer, 750 μ l FCS und 150 μ l Tween 20 gegeben. Zur Detektion von anti-5-LO und anti-FLAP wurde ein *anti-rabbit*-Sekundärantikörper eingesetzt. Zur Bindung des anti- β -Actin-Antikörpers wurde ein *anti-goat*-Sekundärantikörper verwendet.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit 1x TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 4 Stunden bei RT. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte mit 1x PBS-Puffer; einmalig erfolgte eine Zugabe von 0,1 % Nonidet P40 zum Waschpuffer. Danach wurde die Membran in Detektions-Puffer 10 Minuten konditioniert. Die Detektion erfolgte in 25 ml Detektions-Puffer mit 165 μ l NBT-Lösung (100 mg / 70 % DMF) und 85 μ l BCIP-Lösung (100 mg / 2 ml DMF). Sobald die Banden deutlich erkennbar waren, wurde die Membran in Stop-Puffer überführt. Die Zeit bis zur Visualisierung betrug bei β -Actin etwa 5 bis 20 Sekunden, bei FLAP und 5-LO etwa 2 bis 15 Minuten.

2.2.20. 5-Lipoxygenase-Aktivitätsassay

2.2.20.1. Aktivitätsbestimmung in *Escherichia coli*-Zellen

Die Bestimmung der 5-LO-Aktivität erfolgte im S40-Überstand eines *E. coli*-Lysats. Der S40-Überstand wurde mit 1x PBS-Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Das Probenvolumen betrug für alle Versuche 1 ml. Als Reaktionsgefäß wurden aufgrund der besseren Wärmeleitung gläserne Zentrifugenröhrchen verwendet.

Die Standardbedingungen wurden wie folgt definiert: 1 ml S40-Überstand, ATP [1 mM] und Phosphatidylcholin (PC) [25 µg/ml] wurden gevortext und im Wasserbad bei 37°C für 30 Sekunden vorgewärmt. Anschließend wurden die Proben erst mit 2 mM Ca⁺⁺ und unmittelbar danach mit 20 µM Arachidonsäure (AA) [8 mM] stimuliert und nach jeder Zugabe für eine Sekunde gevortext. Die Inkubation im Wasserbad betrug 10 Minuten bei 37°C. Die Terminierung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml 100 % Methanol (MeOH) und Kühlung auf Eis.

2.2.20.2. Aktivitätsbestimmung in HeLa-Zellen und neutrophilen Granulozyten

Die Bestimmung der 5-LO-Aktivität in HeLa-Zellen und PMN erfolgte in der intakten Zelle. Vor Aktivierung wurden die in PBS/Glukose gelösten Zellen in gläserne Zentrifugenröhrchen verteilt. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 0,5 bis 2 Millionen HeLa-Zellen oder 3 bis 10 Millionen PMN pro Zentrifugenröhrchen eingesetzt.

Die Standardbedingungen wurden wie folgt definiert: 1 ml Zellsuspension und 1 mM Ca⁺⁺ wurden gevortext und 45 Sekunden bei 37°C im Wasserbad vorwärmt. Nach Zugabe von 20 µl AA [8 mM] und 2,5 µl Ionophor A23187 [2 mM] wurde jeweils erneut gevortext und die Proben bei 37°C im Wasserbad für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch die Zugabe von 1 ml MeOH und Kühlung auf Eis gestoppt.

Die 5-LO-Aktivitätsbestimmung in einem HeLa- oder PMN-Homogenat erfolgte analog der Bestimmung bei *E. coli*-Zellen. Zur Ca⁺⁺-Komplexierung wurden die Proben vor der Homogenisation mit 1 mM EDTA versetzt. Bei PMN wurden 5-10 Millionen homogenisierte Zellen, bei HeLa 1-3 Millionen homogenisierte Zellen pro Probe im 5-LO-Aktivitätsassay eingesetzt.

2.2.21. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Bestimmung der Aktivität der 5-LO erfolgte über die Quantifizierung der von der 5-LO unter definierten Bedingungen synthetisierten Produkte. Die Proben der 5-LO-Aktivitätsassays wurden durch Zugabe von 10 µl Prostaglandin B₁ (PGB₁) [20 µg/ml] oder

Prostaglandin B₂ (PGB₂) [20 µg/ml], 30 µl HCl und 500 µl 1x PBS-Puffer für die Analyse in der HPLC präpariert.

PGB₁ und PGB₂ sind Prostaglandine, die durch die Cyclooxygenase unter Umsetzung von AA entstehen. Beide Substanzen haben ähnliche Retentionszeiten wie die 5-LO-Produkte und dienen daher als interner Standard. HCl wurde zur Protonierung der Säuregruppe der Leukotriene (LT) und PBS-Puffer zur Reduzierung der MeOH-Konzentration zugegeben.

Nach einer Zentrifugation (Sorvall RC50 Plus) mit $300 \times g$ für 10 Minuten bei RT folgte eine Extraktion über C-18-Festphase-Säulen. Die Säulen wurden vor der Probenauftragung mit 1 ml H₂O und 1 ml MeOH (100 %) konditioniert. Nach Extraktion der Proben wurden die Säulen mit 1 ml H₂O und 1 ml MeOH (25%) gewaschen. Die 5-LO-Produkte wurden mit 300 µl MeOH (100 %) eluiert. Das Eluat wurde mit 120 µl MilliQ-Wasser in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert. Zur Analyse der Proben wurden die Eppendorfgefäße kurz gevortext und ein Aliquot von 150 µl in spezielle HPLC-Glasgefäße überführt. Diese wurden durch eine Kappe mit Gummimembran verschlossen.

Es wurde eine Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) mit einer C-18 Säule als stationäre Phase und einem Fließmittel aus MeOH, H₂O und Trifluoressigsäure (TFA) als mobile Phase durchgeführt. Das Fließmittel wurde durch MeOH- oder H₂O-Zugabe auf eine Dichte von 0,865 eingestellt und mit einer Vakuumpumpe entgast. Der Anteil TFA betrug 0,007 %. Die Proben wurden durch einen Autosampler in das HPLC-System injiziert. Die Durchflussrate betrug 1,2 ml/min. Um den Verschleiß der Säule durch Verunreinigungen zu vermindern, wurden die Proben vor der Passage der Hauptsäule durch eine Vorsäule gereinigt. Ein Lauf einer Probe dauerte 22,5 Minuten. Vor dem Ende jedes Laufs wurde die Säule mit 100 % MeOH (0,007 % TFA) gespült. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarraydetektor simultan bei 280 nm und 235 nm.

Die Retentionszeiten divergierten je nach Polarität des Fließmittels. Nach 2 bis 3 Minuten eluierte PGB₁; trans-LTB₄, epi-trans-LTB₄ und LTB₄ eluierten in dieser Reihenfolge zwischen der dritten und fünften Minute. Die Absorption wurde bei 280 nm bestimmt. Bei 235 nm wurde zwischen Minute 12 und 15 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) detektiert (Abbildung 12).

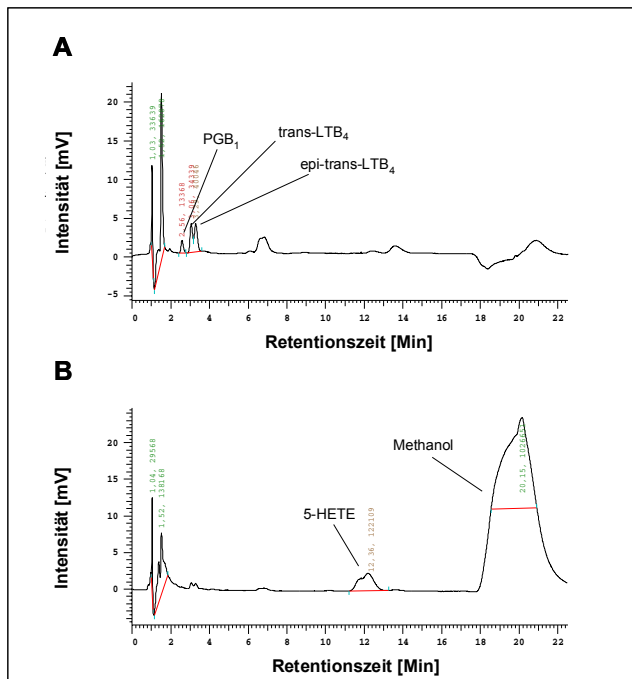


Abbildung 12: HPLC-Diagramme einer 5-Lipoxygenase-Aktivitätsbestimmung im *Escherichia coli*-Lysat

A Absorptionsspektrum bei 280 nm: Nach 2,7 Minuten wurde PGB₁, nach 3 Minuten trans-LTB₄ und nach 3,3 Minuten epi-trans-LTB₄ eluiert. **B**: Absorptionsspektrum bei 235 nm: Nach 12 Minuten wurde 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) eluiert. Das hohe Signal zum Ende des Laufs wird durch das Methanol des Waschschritts hervorgerufen.

Die Quantifizierung erfolgte über das Verhältnis der Peakfläche der untersuchten Substanz (*area under the curve*; AUC) zu der AUC des internen Standards unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten und Molekulargewichte (Tabelle 19).

Tabelle 19: Absorptionskoeffizienten und Molekulargewichte der Leukotriene

Substanz	Wellenlänge	A	M
PGB ₁ (Standard)	280 nm	268000	336,5
12R-6-trans-LTB ₄	280 nm	400000	336,4
12S-6-trans-LTB ₄	280 nm	400000	336,4
LTB ₄	280 nm	400000	336,4
5-HETE	235 nm	305000	320,5

A = Absorptionskoeffizient; M = Molekulargewicht; PG = Prostaglandin; LT = Leukotrien; 5-HETE = 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure

Die Menge der einzelnen Substanzen wurde mit folgender Formel errechnet:

$$M_X = m_S \times M_X \times AUC_X \times A_S / M_S \times AUC_S \times A_X$$

S: Standard; X: Probe; M: Molekulargewicht; A: Absorptionskoeffizient; AUC: Peakfläche; m: Masse.

2.2.22. Translokationsassay

Die Lokalisation eines Enzyms in der Zelle kann durch Trennung einzelner Zellfraktionen mittels Zentrifugation oder lysierenden Substanzen und nachfolgender Detektion mit einem spezifischen Antikörper erfolgen. In HeLa-Zellen liegt ein Großteil der unstimulierten 5-LO im Nukleus und nur ein kleiner Anteil im Zytosol vor. Nach der Stimulation mit einem Ionophor transloziert die 5-LO an die Nukleusmembran. Daher wurde das Verhältnis der gelösten 5-LO zur membrangebundenen 5-LO bestimmt.

2 Millionen isolierte HeLa-Zellen in 1 ml PBS/Glukose-Puffer wurden in einem Zentrifugenröhrchen mit 1 mM Ca^{++} versetzt und nach 3 Minuten bei 37°C auf dem Wasserbad mit 5 µl Ionophor A23187 für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die Probe für 4 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei RT mit 1100 U/min (Beckman CS-6R) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml TKM-Puffer aufgenommen, homogenisiert und mit $100.000 \times g$ bei 4°C für 1 Stunde in einem speziell angefertigten Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (Optima L-60; Rotor 75Ti). In der Folge wurden der Überstand mit der löslichen Fraktion und das Pellet mit der Membran-Fraktion getrennt behandelt. 100 µl des Überstands wurden mit 100 µl SDS-Loading-Puffer vermischt und bis zur Auftragung auf ein SDS-Gel gekühlt. Das Pellet wurde in TKM-Puffer resuspendiert und homogenisiert. Das Homogenat wurde 1:1 mit SDS-Loading-Puffer gemischt und dann bei 5000 U/min (Centrifuge 5415 D) für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ebenfalls bis zur Auftragung auf Eis gekühlt.

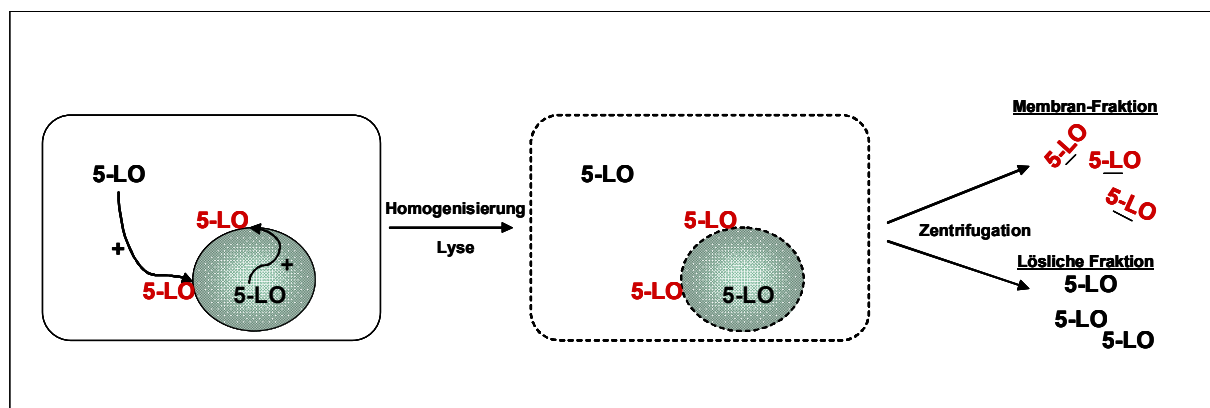


Abbildung 13: Translokationsassay der 5-Lipoxygenase in HeLa-Zellen

Grün: Nukleus; Schwarz: lösliche 5-LO im Zytosol oder Nukleus; Rot: durch Aktivierung an die Nukleusmembran translozierte 5-LO. Homogenisation und Lyse führen zu einer Auflösung der Zell- und Nukleusmembran der HeLa-Zelle (gestrichelte schwarze Linien). Durch Zentrifugation lässt sich die an Membranfragmente gebundene 5-LO von der löslichen 5-LO trennen.

2.2.23. Statistik

Das relative Risiko, das angibt, um wie viel wahrscheinlicher es ist, bei Vorhandensein eines bestimmten Allels oder Genotyps zu der Gruppe der Tuberkulosefälle zu gehören, wird in dieser Arbeit als Odds Ratio (OR) > 1 unter der Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (KI) ausgedrückt. Die entsprechenden P-Werte (P) und die auf multiples Testen korrigierten P-Werte (P_c) wurden berechnet. Die P-Werte der Genotypverteilungen wurden um mögliche beeinflussende Parameter (Ethnie, Alter, Geschlecht) mittels logistischer Regression bereinigt.

Die Untersuchung mehrerer Varianten und Stratifizierungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit, signifikante (P-Wert $< 0,05$) Ergebnisse zu erhalten. Daher muss für jeden zusätzlichen statistischen Test das Signifikanzniveau korrigiert werden (Bonferroni-Korrektur bzw. Korrektur auf multiples Testen). Werden die genotypisierten Varianten auf der Grundlage funktioneller oder genetischer Studien ausgewählt und ergibt sich daraus auf Grund funktioneller Modifikationen oder bereits beschriebener Assoziationen eine schlüssige Arbeitshypothese, kann auf die Korrektur verzichtet werden.

Die Konzeption der vorliegenden Arbeit basierte auf der in Tierexperimenten beobachteten Auswirkung einer Infektion mit Erregern der Tuberkulose nach einer gezielten Deletion des *ALOX5*-Gens. Der Zusammenhang des *ALOX5*-Gens mit einer Tuberkulose im Menschen wurde bisher jedoch noch nicht untersucht. Daher müssen die P-Werte dieser Arbeit auf die Anzahl der durchgeführten Tests korrigiert werden. Da zwei *ALOX5*-Varianten getestet wurden, galt grundsätzlich für alle Ergebnisse der Korrekturfaktor 2. Eine Stratifizierung in Untergruppen erhöhte die Anzahl der Tests und erforderte entsprechend einen höheren Korrekturfaktor. Die Stratifizierung in mykobakterielle Genotypgruppen erforderte einen Korrekturfaktor von 6, da in die Gruppen *M. africanum* West-African 1, *M. africanum* West-African 2, *M. tuberculosis* Euro-American, *M. tuberculosis* Indo-Oceanic, *M. tuberculosis* East-Asian und *M. bovis* getrennt wurde. So betrug der Korrekturfaktor beim Vergleich der Verteilung der *ALOX5*-Variante g.760G>A bei Fällen, die mit *M. africanum* West-African 2 assoziiert waren und den Kontrollen 12 (2×6). Der Korrekturfaktor erhöhte sich bei weiteren Stratifizierungen (Geschlecht, Alter) entsprechend. Die Darstellung des Korrekturfaktors erfolgt als tiefergestellte Zahl bei der Angabe des korrigierten P-Werts (P_{ox}).

3. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden zunächst die Resultate der Genotypisierungen der exonischen *ALOX5*-Variante g.760G>A und des *ALOX5*-Promotor VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Polymorphismus dargestellt (3.2, 3.3, 3.4). Anschließend werden die Ergebnisse der funktionellen Analysen des durch g.760G>A kodierten Aminosäureaustauschs p.Glu254Lys beschrieben (3.5).

3.1. Powerberechnung der Assoziationsstudie

Die Powerkalkulation erlaubt eine Aussage darüber, einen Effekt, sofern er vorhanden ist, auch nachweisen zu können. Die Wahrscheinlichkeit, ein relatives Risikos von 1,3 bei einer Frequenz von 0,1 des Risikoallels und einer Inzidenz der Tuberkulose in Afrika von 0,004 mit einer Signifikanz von < 0,05 nachzuweisen, lag bei dieser Studiengruppe über 90 %.

3.2. Exonische *ALOX5*-Variante g.760G>A

3.2.1. Allel- und Genotypverteilung von g.760G>A bei Fällen und Kontrollen

Die Häufigkeitsverteilung der exonischen *ALOX5*-Variante g.760G>A wurde in der gesamten Studiengruppe mittels der *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Methode bestimmt. Bei 199 Individuen konnte wegen einer fehlerhaften Polymerase-Kettenreaktion (PCR), meist aufgrund minderwertiger Qualität der Matrix-DNA, oder nicht zuverlässig interpretierbarer Fluoreszenzsignale keine eindeutige Bestimmung des Genotyps erfolgen. Eine erfolgreiche Genotypisierung wurde bei 1916 Fällen und 2269 Kontrollen durchgeführt.

Die Berechnung der Verteilung der Allele der Variante g.760G>A in der gesamten Studiengruppe ergab einen Anteil von 91,2 % für das Allel „g.760G“ gegenüber 8,8 % für das Allel „g.760A“. Die Verteilung der Allele in der Gruppe der Fälle und der Gruppe der Kontrollen war signifikant unterschiedlich. Das Allel „g.760A“ kam in der Fallgruppe um den Faktor 1,21 häufiger vor (Tabelle 20).

Tabelle 20: Allelverteilung von g.760G>A bei Fällen und Kontrollen

Allel	Fälle (n=3832)	Kontrollen (n=4538)	Gesamt (n=8370)	Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	n / %	OR	KI	P	P _{c2}
A	368 / 9,6	366 / 8,1	734 / 8,8	1,21	1,04-1,41	0,013	0,026
G	3464 / 90,4	4172 / 91,9	7636 / 91,2	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; *P*: nomineller P-Wert; *P*_{c2}: P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten; n: Anzahl der Allele.

Tabelle 21 gibt die Häufigkeiten des Vorkommens der drei Genotypen „G/G“, „A/G“ und „A/A“ in der Studiengruppe an. Der „G/G“-Genotyp war mit 83,3 % am häufigsten vertreten, gefolgt vom „A/G“-Genotyp mit 15,8 %. Der „A/A“-Genotyp wurde nur bei weniger als 1 % der Individuen detektiert. Die Genotypverteilung dieser Variante zeigte in der Gesamtgruppe sowie jeweils in der Fall- und Kontrollgruppe keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bei einem Vergleich der Genotypverteilung der g.760G>A-Variante zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe kamen der „AA“-Genotyp 1,84-mal und der „AG“-Genotyp 1,17-mal häufiger in der Fallgruppe vor. Diese erhöhte Häufigkeit des „A/A“- und „A/G“-Genotyps bei Fällen unterschied sich aber nicht signifikant von den Genotypfrequenzen in der Kontrollgruppe (Tabelle 21).

Tabelle 21: Genotypverteilung von g.760G>A bei Fällen und Kontrollen

Genotyp	Fälle (n=1916)	Kontrollen (n=2269)	Gesamt (n=4185)	Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	n / %	OR	KI	P	P _{c2}
A/A	22 / 1,2	14 / 0,6	36 / 0,9	1,84	0,97-3,81	0,060	n.s.
A/G	324 / 16,9	238 / 14,9	662 / 15,8	1,17	0,99-1,39	0,065	n.s.
G/G	1570 / 81,9	1917 / 84,5	3467 / 83,3	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; *P*: nomineller P-Wert; *P*_{c2}: P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten; n: Anzahl der Individuen; n.s.: nicht signifikant.

3.2.2. Allel- und Genotypverteilung von g.760G>A bei Fällen und Kontrollen nach Stratifizierung in Mykobakterienspezies und mykobakterielle Genotypgruppen

Der mikroskopische Nachweis von Mykobakterien in den Sputumproben der Patienten erfolgte nach Ziehl-Neelsen-Färbung. Die Sputumproben wurden weiter aufbereitet und auf Löwenstein-Jensen-Medium kultiviert. Am Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien (Forschungszentrum Borstel) wurde die Differenzierung der Mykobakterien mit konventionellen biochemischen und molekulargenetischen (*IS6110*-DNA-Fingerprinting, Spoligotyping) Techniken unter Leitung von Dr. Rüscher-Gerdes durchgeführt. Bei insgesamt 1617 Proben konnte die Bestimmung erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden die Spezies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* und *M. bovis* identifiziert. Die Genotypen der Spezies *M. tuberculosis* wurden in die Genotypgruppen Euro-American, East-Asian und Indo-Oceanic eingeteilt. *M. africanum* wurde in *M. africanum* West-African 1 und *M. africanum* West-African 2 differenziert [Gagneux & Small, 2007] (Tabelle 22).

Tabelle 22: Genotyp- und Allelverteilung von g.760G>A bei Fällen differenziert nach Mykobakterienspezies und mykobakterieller Genotypgruppe

Mykobakterien-spezies	Mykobakterielle Genotypgruppe	g.760G>A Genotypen			Gesamt [n/%]
		A/A [n/%]	A/G [n/%]	G/G [n/%]	
<i>M. africanum</i>		6/1,8	82/18,1	364/80,1	452/29,4
	West-African 1	3/0,9	52/16,3	264/82,8	319/20,7
	West-African 2	3/2,3	30/22,6	100/75,2	133/8,6
<i>M. tuberculosis</i>		10/0,9	184/17,1	884/82,0	1078/70,0
	Euro-American	10/1,0	173/16,7	853/82,3	1036/67,3
	East-Asian	0/0	5/21,7	18/78,3	23/1,5
	Indo-Oceanic	0/0	6/31,6	13/68,4	19/1,2
<i>M. bovis</i>		2/20,0	0/0	8/80,0	10/0,6
Gesamt		18/1,2	266/17,3	1256/81,5	1540

Die Zuteilung zu den Mykobakterien-Genotypgruppen erfolgte analog der Einteilung von Gagneux & Small, 2007. Die Typisierung in mykobakterielle Genotypen wurde durch das Forschungszentrum Borstel durchgeführt; n: Anzahl der Individuen.

In Tabelle 22 sind die 1540 der 1916 genotypisierten Fälle der g.760G>A-Variante aufgeführt, bei welchen die Bestimmung der Spezies und des mykobakteriellen Genotyps vorgenommen werden konnte. Die am häufigsten vorkommende Spezies war *M. tuberculosis* mit 70,0 %, gefolgt von *M. africanum* mit 29,4 %. *M. bovis* wurde nur bei 0,6 % der Fälle gefunden. Die Genotypgruppe mit der höchsten Frequenz war die Euro-American-Gruppe mit 67,3 % vor der West-African-2-Gruppe mit 20,7 % und der West-African-1-Gruppe mit 8,6 %. Die drei anderen Genotypgruppen Indo-Oceanic, East-Asian und die Spezies *M. bovis* machten zusammen weniger als 4 % aus (Tabelle 22).

3.2.2.1. Allel- und Genotypverteilung von g.760G>A bei Fällen und assoziierte mykobakterielle Genotypgruppen

Betrachtet man in weiteren Subanalysen lediglich Fälle und die Verteilung von g.760G>A, kommen die humanen Allele und Genotypen je nach assoziierter Mykobakterienspezies bzw. mykobakteriellen Genotypgruppe unterschiedlich häufig vor (Tabelle 22). In der Gruppe der Fälle, bei denen im Mykobakterien-Isolat Erreger der Genotypgruppe *M. africanum* West-African 2 identifiziert worden waren, kam „g.760A“ 1,5-mal häufiger vor als bei Fällen mit Erregern anderer Genotypgruppen (95%-Konfidenzintervall (KI) = 1,00 – 2,19 / nomineller P-Wert (P) = 0,032). Nach Bonferroni-Korrektur auf multiples Testen war diese Verteilung nicht mehr signifikant unterschiedlich (P_{c12} = n.s.; P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n.s.: nicht signifikant).

3.2.2.2. Allel- und Genotypverteilung von g.760G>A bei mit einer bestimmten Mykobakterienspezies oder mykobakteriellen Genotypgruppe assoziierten Fällen und Kontrollen

Die Verteilung der Allele und Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe war nach Stratifizierung der Mykobakterien in Mykobakterienspezies und mykobakterielle Genotypgruppen unterschiedlich. Bei Fällen, die mit der Spezies *M. africanum* assoziiert waren, kam „g.760A“ 1,32-mal häufiger vor als bei Kontrollen. Nach Bonferroni-Korrektur war dieser Unterschied jedoch nicht mehr signifikant (KI = 1,03 - 1,69 / P = 0,14 / P_{c4} = 0,084). In Abbildung 14 ist das relative Risiko für das Vorkommen des Allels „g.760A“ sowie der „A/A“- und „A/G“-Genotypen bei Fällen, die mit einer bestimmten mykobakteriellen Genotypgruppe assoziiert waren, gegenüber einem Vorkommen in der Kontrollgruppe dargestellt.

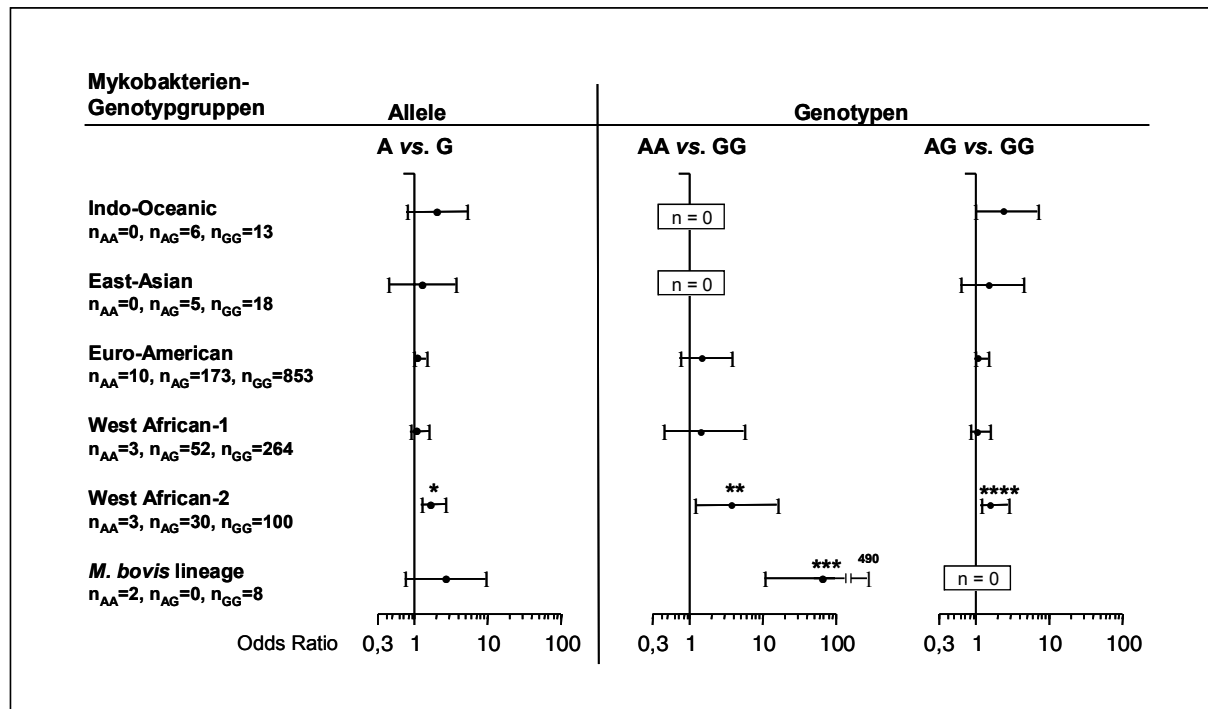


Abbildung 14: Genotyp- und Allelverteilung bei mit einer bestimmten mykobakteriellen Genotypgruppe assoziierten Fällen und bei Kontrollen.

Die Darstellung der Odds Ratio auf der y-Achse erfolgte logarithmisch (0,3 bis 100). Die Punkte geben die Odds Ratio an. Die Odds Ratio entspricht dem relativen Risiko für das Vorkommen des „g.760A“-Allels bei Fällen, die mit einer bestimmten mykobakteriellen Genotypgruppe assoziiert sind. Die horizontalen Striche geben den Bereich des 95%-Konfidenzintervalls (KI) an. n: Anzahl der Individuen; * P_{C12} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; * $P = 0,002$, $P_{C12} = 0,024$; ** $P = 0,31$, $P_{C12} =$ nicht signifikant; *** $P < 0,001$, $P_{C12} < 0,0012$; **** $P = 0,012$, $P_{C12} =$ nicht signifikant.

Der Unterschied der Häufigkeiten des „A/A“-Genotyps bei mit *M. bovis* assoziierten Fällen gegenüber Kontrollen ist signifikant (OR = 71,4 / KI = 10,1 – 490) (Abbildung 14). Ebenso signifikant unterschiedlich ist die Verteilung von „g.760A“ bei mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen gegenüber Kontrollen (Abbildung 14). Das Allel „g.760A“ kommt 1,7-mal häufiger bei den Fällen vor (Tabelle 23).

Tabelle 23: Allelverteilung von g.760G>A bei mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen

Allel	<i>M. africanum</i> West-African 2 Fälle (n=266)	Kontrollen (n=4538)	<i>M. africanum</i> West-African 2 Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c12}
A	36 / 13,5	366 / 8,1	1,70	1,20-2,60	0,002	0,024
G	230 / 86,5	4172 / 91,9	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c12} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n: Anzahl der Allele.

Die Genotypen der Mykobakterienspezies *M. africanum* und *M. tuberculosis* wurden nach dem Vorkommen bestimmter typischer Deletionen (*regions of difference*; RDs) im mykobakteriellen Genom in sechs Genotypgruppen unterteilt (Abbildung 2) [Gagneux & Small, 2007]. Die für *M. canetti* und *M. bovis* charakteristischen RDs sind ebenfalls angegeben. Die Genotypgruppe *M. africanum* West-African 2 unterscheidet sich durch die Abwesenheit mehrerer Gensequenzen von den anderen Gruppen. Von *M. bovis* unterscheidet sich *M. africanum* West-African 2 dagegen lediglich in einem einzigen der untersuchten Polymorphismen (RD 702) (Abbildung 2).

Diese enge phylogenetische Verwandtschaft gestattete, die Allel- und Genotypverteilung von g.760G>A bei mit *M. africanum* West-African 2 oder *M. bovis* assoziierten Fällen und Kontrollen zu bestimmen. Das Vorkommen von „g.760A“ war dann in der Fallgruppe um den Faktor 1,85 erhöht (Tabelle 24).

Tabelle 24: Allelverteilung von g.760G>A bei mit *M. africanum* West-African 2 oder *M. bovis* assoziierten Fällen und Kontrollen

Allel	<i>M. africanum</i> West-African 2 oder <i>M. bovis</i> Fälle (n=286)	Kontrollen (n=4538)	<i>M. africanum</i> West-African 2 oder <i>M. bovis</i> Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c12}
A	40 / 14,0	366 / 8,1	1,85	1,27-2,65	5×10^{-4}	0,006
G	246 / 86,0	4172 / 91,9	1	0,99-1,39	0,065	

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c12} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n: Anzahl der Allele.

Beim Vergleich der Genotypverteilung der mit *M. africanum* West-African 2 oder mit *M. bovis* assoziierten Fälle mit den Kontrollen zeigte sich ein 7,3-mal erhöhtes Vorkommen des „A/A“-Genotyps in der Fallgruppe (Tabelle 25).

Tabelle 25: Genotypverteilung von g.760G>A bei mit *M. africanum* West-African 2 oder *M. bovis* assoziierten Fällen und Kontrollen

Genotyp	<i>M. africanum</i> West-African 2 und <i>M. bovis</i> Fälle (n=143)	Kontrollen (n=2269)	<i>M. africanum</i> West-African 2 oder <i>M. bovis</i> Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c12}
A/A	5 / 3,5	14 / 0,6	7,30	2,49-21,28	1×10^{-4}	0,001
A/G	30 / 21,0	238 / 14,9	1,63	1,06-2,49	0,026	n.s.
G/G	108 / 75,5	1917 / 84,5	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c12} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n: Anzahl der Individuen; n.s.: nicht signifikant.

3.2.3. Genotyp- und Allelverteilung von g.760G>A bei Fällen und der Kontrollgruppe nach Stratifizierung in Geschlecht und in mykobakterielle Genotypgruppen

Bei den vorangegangenen Berechnungen mittels logistischer Regression zeigte sich ein Einfluss des Geschlechts auf die Verteilung der Variante g.760G>A bei Fällen und Kontrollen. Der Vergleich der Verteilung der g.760G>A-Allele zwischen weiblichen Fällen und weiblichen Kontrollen zeigte keine signifikanten Unterschiede (OR = 1,24 / KI = 0,96 - 1,62 / P_{c24} = n.s.). Auch nach Stratifizierungen in mykobakterielle Genotypgruppen und Genotypen waren die Allele bei Frauen nicht unterschiedlich verteilt.

Bei männlichen Fällen und männlichen Kontrollen zeigte sich in der Gesamtpopulation auch keine signifikant unterschiedliche Verteilung der Allele (OR = 1,19 / KI = 0,98 - 1,44; P_{c24} = n.s.). Dagegen wurde bei einem Vergleich von mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen eine unterschiedliche Allelverteilung beobachtet. Das Allel „g.760A“ war bei männlichen Fällen 2,08-mal häufiger als bei männlichen Kontrollen (Tabelle 26).

Tabelle 26: Allelverteilung bei männlichen mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen

Allel	Männliche <i>M. africanum</i> West-African 2-Fälle (n=190)	Männliche Kontrollen (n=2662)	Männliche <i>M. africanum</i> West-African 2 Fälle vs. männliche Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c24}
A	30 / 15,8	220 / 8,3	2,08	1,33-3,17	4×10^{-4}	0,0096
G	160 / 84,2	2442 / 91,7	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c24} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten, 6 mykobakterielle Genotypgruppen und Geschlecht; n: Anzahl der Allele.

Der „A/G“-Genotyp fand sich im Vergleich zu männlichen Kontrollen 2,17-mal häufiger bei den männlichen Fällen.

Tabelle 27: Genotypverteilung bei männlichen mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen

Genotyp	Männliche <i>M. africanum</i> West-African 2-Fälle (n=95)	Männliche Kontrollen (n=1331)	Männliche <i>M. africanum</i> West-African 2 Fälle vs. männliche Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c24}
A/A	2 / 2,1	9 / 0,7	3,74	0,72-19,31	0,12	n.s.
A/G	26 / 27,4	202 / 15,2	2,17	1,33-3,54	0,002	0,048
G/G	67 / 70,5	1120 / 84,2	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c24} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen und Geschlecht; n: Anzahl der Individuen; n.s.: nicht signifikant.

3.2.4. Potentielle Kovariablen

Potentielle Kovariablen, die mit der Verteilung korrelieren könnten, waren die Reaktivität des PPD (*purified protein derivate*)-Tests, Medikamentenresistenzen, klinische Symptome einer Tuberkulose oder radiologische Befunde (Verschattungen, Kavernen, Pleuraverdickungen, Pleuraergüsse, Miliartuberkulose, Fibrosen, Lymphknotenschwellungen). Keine dieser Kovariablen korrelierte mit der Verteilung der g.760G>A-Allele und -Genotypen.

3.3. ALOX5-Promotor VNTR-Polymorphismus

3.3.1. Allel- und Genotypverteilung des VNTR-Polymorphismus bei Fällen und Kontrollen

Bei dem VNTR (*variable number of tandem repeats*)-Polymorphismus handelt es sich um eine Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle (GGGCGG) im ALOX5-Promotor, die in unterschiedlich vielen Kopien vorliegt. Die Bestimmung der Allel- und Genotypfrequenz dieser repetitiven ALOX5-Promotorvariante wurde in der gesamten Studiengruppe durch die multi-fluoreszierende Fragmentlängenbestimmung nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei 498 Individuen konnte wegen einer fehlerhaften PCR, meist aufgrund minderwertiger Qualität der DNA oder Überlagerungen der Fluoreszenzsignale keine eindeutige Bestimmung des Genotyps erfolgen. Die Auswertung der Genotypisierung von 1821 Fällen und 2065 Kontrollen wird im Folgenden dargestellt. Zur Überprüfung der Verlässlichkeit der Methode wurden pro Genotyp mindestens zwei Proben sequenziert.

Es wurden Varianten mit zwei Kopien („2“-Allel) bis zu sechs Kopien („6“-Allel) des Sp1-Bindungsmotivs identifiziert. In der Gesamtpopulation war das „3“-Allel mit 43,3 % vor dem „5“-Allel mit 36,5 % und dem „4“-Allel mit 18,8 % am häufigsten vertreten. Weitaus seltener traten das „6“-Allel mit 1,3 % und das „2“-Allel mit weniger als 0,2 % auf. Die Verteilung der Allele zwischen Fällen und Kontrollen war nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 28).

Tabelle 28: Allelverteilung des VNTR-Polymorphismus bei Fällen und Kontrollen

VNTR Allele	Fälle (n=3640)	Kontrollen (n=4126)	Gesamt (n=7766)	Fälle vs. Kontrollen		
	n / %	n / %	n / %	OR	KI	P_{c2}
2	2 / <0,1	6 / <0,2	8 / <0,2	0,38	0,04-2,11	n.s.
3	1584 / 43,5	1778 / 43,1	3362 / 43,3	1,02	0,93-1,11	n.s.
4	653 / 17,9	809 / 19,6	1462 / 18,8	0,90	0,80-1,00	n.s.
5	1352 / 37,1	1484 / 36,0	2836 / 36,5	1,05	0,96-1,15	n.s.
6	49 / 1,3	49 / 1,2	98 / 1,3	1,14	0,76-1,69	n.s.

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P : nomineller P-Wert; P_{c2} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten; n: Anzahl der Allele; n.s.: nicht signifikant.

Aus der Vielzahl an Allelen resultierten 13 unterschiedliche Genotypen. Darunter befanden sich auch die bisher noch nicht beschriebenen Genotypen „2/2“, „2/3“, „2/4“ und „3/6“. Der mit 28,9 % am häufigsten vorkommende Genotyp hatte ein Allel mit drei und ein Allel mit fünf

Kopien („3/5“-Genotyp). Danach folgten der „3/3“-Genotyp mit 23,4 % und der „5/5“-Genotyp mit 16,8 %. Die restlichen 30,9 % verteilten sich auf die Genotypen „3/4“ mit 9,9 %, „4/4“ mit 9,2 %, „4/5“ mit 9,0 % und acht weitere, jeweils bei weniger als 1,5 % der Individuen vorkommende Genotypen (Tabelle 29). Die Genotypverteilung dieser Variante zeigte in der Gesamtgruppe sowie jeweils in der Fall- und Kontrollgruppe keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Vielzahl an Genotypen lässt sich, wie erstmalig 1999 beschrieben, in drei Genotypgruppen zusammenfassen [Drazen *et al.*, 1999]. Die Einteilung basiert auf funktionellen Studien [In *et al.*, 1999] (vgl. 4.4) und fasst die Genotypen, deren Allele jeweils 5 Kopien aufweisen, als „5/5“-Genotypgruppe und die Genotypen, die auf einem Allel 5 Kopien und auf dem anderen weniger bzw. mehr als 5 Kopien haben (z.B. „3/5“ oder „5/6“), als „5/nicht-5“-Genotypgruppe zusammen. Genotypen, deren Allele keine 5 Kopien aufweisen (z.B. „3/3“) werden als „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe bezeichnet.

Tabelle 29: Genotyp und Genotypgruppenverteilung des VNTR-Polymorphismus bei Fällen und Kontrollen

VNTR Genotyp/ -gruppe	Fälle (n=1820)	Kontrollen (n=2063)	Gesamt (n=3883)	Fälle vs. Kontrollen		
	n / %	n / %	n / %	OR	95% KI	P_{c2}
nicht-5/nicht-5	762 / 41,9	939 / 45,6	1701 / 43,8	1		
2/2*	0 / 0	2 / <0,1	2 / <0,1			
2/3*	1 / <0,1	1 / <0,1	2 / <0,1			
2/4*	1 / <0,1	1 / <0,1	2 / <0,1			
3/3	419 / 23,0	492 / 23,8	911 / 23,5			
3/4	159 / 8,7	227 / 11,0	386 / 9,9			
3/6*	14 / <0,8	17 / <0,9	31 / <0,9			
4/4	165 / 9,1	193 / 9,4	358 / 9,2			
4/6	3 / <0,2	5 / <0,3	8 / <0,3			
6/6	0 / 0	1 / <0,1	1 / <0,1			
5/nicht-5	764 / 42,0	764 / 37,0	1528 / 39,4	1,19	1,04-1,37	0,026
3/5	572 / 31,4	549 / 26,6	1121 / 28,9			
4/5	160 / 8,8	190 / 9,2	350 / 9,0			
5/6	32 / 1,8	25 / 1,2	57 / 1,5			
5/5	294 / 16,1	360 / 17,4	654 / 16,8	0,99	0,82-1,19	n.s.

* erstmalig beschriebener Genotyp; OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P : nomineller P-Wert; P_{c2} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten; n: Anzahl der Individuen; n.s.: nicht signifikant.

Bei Anwendung dieser Einteilung zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Genotypgruppen zwischen Fällen und Kontrollen. So kamen Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe verglichen mit den Individuen der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe 1,19-mal häufiger in der Fallgruppe vor (Tabelle 29).

3.3.2. Verteilung der Genotypgruppen des VNTR-Polymorphismus bei Fällen und Kontrollen nach Stratifizierung in Mykobakterienspezies und mykobakterielle Genotypgruppen

Bei 1340 der genotypisierten Fälle lagen Informationen zur assoziierten Mykobakterienspezies und mykobakteriellen Genotypgruppe vor (Tabelle 30) (vgl. 3.2.2).

Tabelle 30: Genotyp- und Allelverteilung des VNTR-Polymorphismus bei Fällen differenziert nach Mykobakterienspezies und mykobakterieller Genotypgruppe

Mykobakterienspezies	Mykobakterielle Genotypgruppe	VNTR-Genotypen			Gesamt [n/%]
		nicht-5/nicht-5 [n/%]	5/nicht-5 [n/%]	5/5 [n/%]	
<i>M. africanum</i>		193/44,7	178/41,2	61/14,1	432/32,3
	West-African 1	142/46,1	119/38,3	48/15,6	308/71,3
	West-African 2	51/41,1	59/48,4	13/10,5	124/28,7
<i>M. tuberculosis</i>		363/40,4	386/42,9	150/16,7	899/67,0
	Euro-American	341/39,6	373/43,3	147/17,1	861/95,8
	East-Asian	12/60,0	6/30,0	2/10,0	20/2,2
	Indo-Oceanic	10/55,6	7/38,9	1/5,6	18/2,0
<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	7/77,8	2/22,2	0/0	9/0,7
Gesamt		563/42,0	566/42,2	211/15,8	1340

Die Zuteilung zu den Mykobakterien-Genotypgruppen erfolgte analog der Einteilung von Gagneux & Small, 2007. Die Typisierung in mykobakterielle Genotypen wurde durch das Forschungszentrum Borstel durchgeführt; n = Anzahl der Individuen.

3.3.2.1. Allel- und Genotypverteilung des VNTR-Polymorphismus bei Fällen und assoziierte mykobakterielle Genotypgruppen

Bei mit Erregern der mykobakteriellen Genotypgruppe East-Asian [Gagneux & Small, 2007] assoziierten Fällen kam das „4“-Allel im Vergleich zu den anderen Allelen 2,58-mal häufiger vor (Tabelle 31).

Tabelle 31: Allelverteilung des VNTR-Polymorphismus bei mit der *M. tuberculosis* East-Asian-Gruppe assoziierten Fällen und Fällen anderer assoziierter mykobakterieller Genotypgruppen

Allel	East Asian Fälle (n=40)	andere Fälle (n=2896)	East-Asian Fälle vs. andere Fälle			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P_{c12}
4	14 / 2,1	500 / 0,7	2,58	1,24-5,17	0,003	0,036
nicht-4	26 / 70,5	2396 / 84,2	1			

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c12} : P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n: Anzahl der Allele.

3.3.2.2. Verteilung der Allele und Genotypgruppen des VNTR-Polymorphismus bei mit einer bestimmten Mykobakterienspezies oder mykobakteriellen Genotypgruppe assoziierten Fällen und Kontrollen

Die Allelverteilung war bei Stratifizierungen in Mykobakterienspezies und mykobakterielle Genotypgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Bei Betrachtung der Genotypgruppenverteilung des VNTR-Polymorphismus bei mit *M. tuberculosis* Euro-American assoziierten Fällen und Kontrollen waren Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe im Vergleich zu Individuen der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe 1,32-fach häufiger bei den Fällen vertreten (Tabelle 32). Bei Stratifizierungen in die anderen mykobakteriellen Genotypgruppen lag keine signifikant unterschiedliche Verteilung vor.

Wenn man jedoch die „5/5“-Genotypgruppe als Basiskategorie wählte, zeigte sich ein um den Faktor 2,00 erhöhtes Vorkommen der Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe bei Fällen, die mit *M. africanum* West-African 2 assoziiert waren. Nach der Bonferroni-Korrektur war dieser Unterschied jedoch nicht mehr signifikant (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 32: Verteilung der Genotypgruppen des VNTR-Polymorphismus bei mit der *M. tuberculosis* Euro-American-Gruppe assoziierten Fällen und Kontrollen

Genotyp	Euro-American Fälle (n=899)	Kontrollen (n=2065)	Euro-American Fälle vs. Kontrollen			
	n / %	n / %	OR	KI	P	P _{c12}
nicht-5/nicht-5	363/38,1	941/45,6	1			
5/nicht-5	386/44,5	764/37,0	1,32	1,10-1,57	0,004	0,048
5/5	150/17,4	360/17,4	1,11	0,88-1,40	0,28	n.s.

OR: Odds Ratio; KI: 95%-Konfidenzintervall; P: nomineller P-Wert; P_{c12}: P-Wert korrigiert auf 2 getestete Varianten und 6 mykobakterielle Genotypen; n: Anzahl der Genotypen; n.s.: nicht signifikant.

Es wurden Berechnungen angestellt, die die phylogenetischen Verwandtschaftsgrade der Genotypen berücksichtigen [Gagneux & Small, 2007] und, analog 3.2.2.2, *M. bovis* oder *M. africanum* West-African 2 assoziierte Fälle mit den Kontrollen verglichen. Gegenüber Individuen der „5/5“-Genotypgruppe waren Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe dann 2,21-mal häufiger unter den Fällen vertreten. Nach der Korrektur auf multiples Testen waren die Unterschiede nicht mehr signifikant (Daten nicht gezeigt).

3.3.3. Potentielle Kovariablen

Keine der weiteren Kovariablen (vgl.3.2.4) korrelierte mit der Verteilung des VNTR-Polymorphismus.

3.3.4. Genotyp- und Allelverteilung des VNTR-Polymorphismus in einer Vergleichsgruppe

Für eine eventuelle *in vivo*-Bestimmung der mRNA-Menge und 5-LO-Aktivität wurde bei einer Gruppe von Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin (n = 18) ebenfalls mit Hilfe der multifluoreszierenden Fragmentlängenanalyse eine Genotypisierung des VNTR-Polymorphismus vorgenommen. Den Mitarbeitern wurde Blut entnommen und auf eine spezielle Membran übertragen. Aus dieser Membran wurde die DNA der Individuen isoliert.

Die höchste Frequenz zeigte der „5/5“-Genotyp mit 72,2 %, gefolgt vom „4/5“-Genotyp mit 16,7 %. Weiterhin wurde bei jeweils einem Individuum der „4/4“- und der „3/3“-Genotyp

entdeckt. Entsprechend waren fast ausschließlich das „5“-Allel mit 80,6 % und das „4“-Allel mit 13,9 % vertreten (Tabelle 33).

Tabelle 33: Genotyp- und Allelverteilung des VNTR-Polymorphismus in einer Vergleichsgruppe

Genotyp	Frequenz	Allel	Frequenz
5/5	72,2 %	5	80,6 %
4/5	16,7 %	4	13,9 %
4/4	5,6 %	3	5,5 %
3/3	5,6 %		

3.4. Interaktion und Haplotypen der g.760G>A-Variante und des VNTR-Polymorphismus

3.4.1. Interaktion der g.760G>A-Variante mit dem VNTR-Polymorphismus

Mittels logistischer Regression wurde überprüft, ob sich die Variante g.760G>A und der VNTR-Polymorphismus in ihrer Verteilung zwischen der Fall- und Kontrollgruppe gegenseitig beeinflussten. Es zeigte sich eine Interaktion bei der Verteilung des „5/5“- und „AA“-Genotyps.

3.4.2. Verteilung der Haplotypen bei Fällen und Kontrollen

Aus den Frequenzen der Variante g.760G>A und des VNTR-Polymorphismus wurde die wahrscheinliche Haplotypverteilung errechnet.

Die Verteilung der Haplotypen zwischen Fall- und Kontrollgruppe war unterschiedlich. Der „nicht-5/g.760A“-Haplotyp kam gegenüber dem „nicht-5/g.760G“-Haplotyp 1,50-mal häufiger bei den Fällen vor (Tabelle 34). Bei der Haplotypanalyse der einzelnen Promotorallele („2“-Allel bis „6“-Allel) wurden die sehr selten vorkommenden Haplotypen („2/g.760G“; „4/g.760A“; „6/g.760A“) nicht in die Berechnung mit einbezogen. Der „3/g.760A“-Haplotyp kam im Vergleich zum „3/g.760G“-Haplotyp um den Faktor 1,4 häufiger ($P = 0,013$) bei den Fällen vor.

Tabelle 34: ALOX5-Varianten-Haplotypverteilung bei Fällen und Kontrollen

Haplotyp	Fälle	Kontrollen	Fälle vs. Kontrollen	
	%	%	OR	P_{co}
nicht-5/g.760G	57,2	60,5	1	0,006
nicht-5/g.760A	5,3	3,8	1,50	0,003
5/g.760G	33,0	31,5	1,11	n.s.
5/g.760A	4,5	4,2	1,14	n.s.

OR: Odds Ratio; P_{co} : nicht korrigierter nomineller P-Wert; der globale P-Wert der Haplotyp-Berechnung betrug 0,004.

3.4.3. Verteilung der Haplotypen bei Fällen und Kontrollen nach Stratifizierung in Mykobakterienspezies und mykobakterielle Genotypgruppen

Nach einer Stratifizierung in mykobakterielle Genotypgruppen zeigte sich bei dem Vergleich *M. africanum* West-African 2 assoziierter Fälle mit den Kontrollen ein um den Faktor 2,20 erhöhtes Vorkommen des „nicht-5/g.760A“-Haplotyps gegenüber dem „nicht-5/g.760G“-Haplotyp in der Fallgruppe (Tabelle 35). Bei der Aufteilung der Promotorvariante in einzelne Allele war das Vorkommen des „3/g.760A“-Haplotyps bei Fällen gegenüber dem „3/g.760G“-Haplotyp 2,35-mal erhöht ($P_{c6} = 0,018$) (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 35: Verteilung der Haplotypen bei mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen

Haplotyp	<i>M. africanum</i> West-African 2 Fälle	Kontrollen	<i>M. africanum</i> West- African 2 Fälle vs. Kontrollen		
	%	%	OR	P	P_{c6}
nicht-5/g.760G	57,8	60,5	1	0,48	n.s.
nicht-5/g.760A	7,9	3,8	2,20	0,004	0,024
5/g.760G	28,5	31,5	0,95	0,24	n.s.
5/g.760G	5,8	4,2	1,44	0,10	n.s.

OR: Odds Ratio; P : nomineller P-Wert; P_{c6} : P-Wert korrigiert auf 6 mykobakterielle Genotypgruppen; n.s.: nicht signifikant; der globale P-Wert der Haplotyp-Berechnung betrug 0,025.

Bei Fällen, die mit *M. tuberculosis* Euro-American assoziiert waren, kam der „nicht-5/g.760G“-Haplotyp im Vergleich zum „5/g.760G“-Haplotyp 1,19-mal häufiger in der Fallgruppe vor (Tabelle 36).

Tabelle 36: Verteilung der Haplotypen bei mit *M. tuberculosis* Euro-American assoziierten Fällen und Kontrollen

Haplotyp	<i>M. tuberculosis</i> Euro-American Fälle	Kontrollen	<i>M. tuberculosis</i> Euro- American Fälle vs. Kontrollen		
	%	%	OR	P	P_{c6}
nicht-5/g.760G	55,7	60,5	1	0,007	0,042
nicht-5/g.760A	4,9	3,8	1,41	0,19	n.s.
5/g.760G	34,5	31,5	1,19	0,11	n.s.
5/g.760A	4,9	4,2	1,27	0,15	n.s.

OR: Odds Ratio; P: nomineller P-Wert; P_{c6} : P-Wert korrigiert auf 6 mykobakterielle Genotypen; n.s.: nicht signifikant; der globale P-Wert der Haplotyp-Berechnung betrug 0,035.

3.5. Funktionelle Untersuchungen zum Aminosäureaustausch p.Glu254Lys (g.760G>A)

3.5.1. Ortsgerichtete Mutagenese von 5-LO-Plasmiden und Restriktionsverdau

Bei den im vorangegangenen Teil beschriebenen molekulargenetischen Untersuchungen zur Variante g.760G>A zeigte sich ein erhöhtes Vorkommen von „g.760A“ in der Fallgruppe. Dieser Austausch von Guanin (G) gegen Adenin (A) an der cDNA-Position 760 im Exon 6 von *ALOX5* (g.760G>A) führt zu einer Substitution von Glutaminsäure mit Lysin (p.Glu254Lys) an der Aminosäureposition 254 der 5-Lipoxygenase (5-LO). Es war daher von Interesse, welche funktionellen Auswirkungen dieser Aminosäureaustausch auf die Aktivität der 5-LO haben könnte.

Die funktionellen Untersuchungen der beiden 5-LO-Formen wurden durch Expression des Wildtyp-Enzyms und des mutierten Enzyms in *Escherichia coli*- und HeLa-Zellen und anschließender Aktivitätsbestimmung unter variierenden Bedingungen durchgeführt.

Hierfür musste zuerst das mutierte Expressionsplasmid hergestellt werden. Dies erfolgte durch die ortsgerechte Mutagenese (*site directed mutagenesis*) eines 5-LO-Plasmids. Es wurde an der cDNA-Position 760 der 5-LO ein Austausch des Guanins mit Adenin vorgenommen. Für die Transformation in *E. coli* wurde das pT3-5LO-Plasmid, für die Transfektion in HeLa-Zellen das pcDNA3.1-5-LO-Plasmid verwendet. Zur Überprüfung des korrekten Austauschs der Nukleotide wurde bei beiden Plasmiden ein Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Ava*I durchgeführt. Die Fragmentmuster des Wildtyps und der Mutante wurden durch eine Auftrennung im Agarosegel und Visualisierung unter UV-Licht analysiert. Da der Basenaustausch in einer *Ava*I-Erkennungssequenz liegt, wurden für Wildtyp und Mutante unterschiedliche Fragmente erhalten. Während beim Wildtyp-Plasmid sechs Fragmente entstanden, wurden durch den Verlust einer *Ava*I-Erkennungssequenz bei der Mutante nur fünf Fragmente erhalten. Das Fragment der Mutante, bestehend aus 634 Basenpaaren (bp), wurde beim Verdau der Wildtyp-cDNA in ein 398 bp und ein 236 bp großes Fragment geschnitten. Die Anwesenheit der 634 bp-Bande im Agarosegel war daher ein Indiz für den korrekten Einbau der Mutation (Abbildung 15).

Eine Sequenzierung, durchgeführt von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) mit den Primern E254K_fseq und E254K_rseq bestätigte den korrekten Einbau der Mutation.

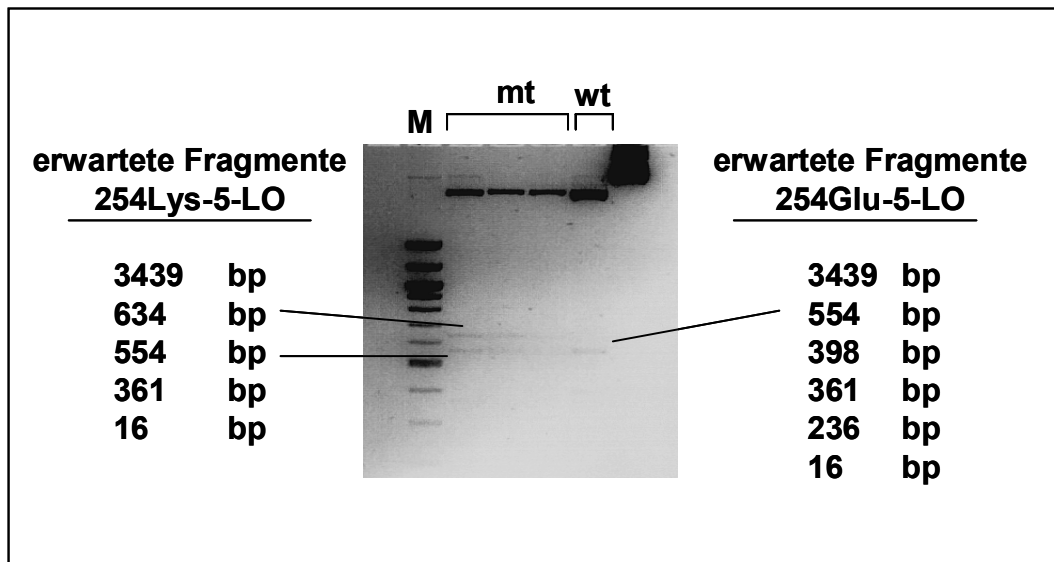


Abbildung 15: Abbild der Gelelektrophorese der 5-LO-Plasmid-Fragmente nach *Ava*I-Verdau

Die 554 bp-Bande war bei beiden 5-LO-Plasmiden vorhanden. Die für die 254Lys-5-LO charakteristische 634 bp-Bande wurde nicht beim Wildtyp-5-LO-Plasmid (254Glu-5-LO) identifiziert (254Lys-5-LO). Die anderen Fragmente konnten in diesem Gel nicht detektiert werden. M: Marker; mt: Mutante, 254Lys-5-LO; wt: Wildtyp, 254Glu-5-LO; bp: Basenpaare.

3.5.2. Aktivitätsbestimmung der 5-Lipoxygenase in *Escherichia coli*-Lysaten

Die Bestimmung der Aktivität der Wildtyp-5-LO (254Glu-5-LO) und der mutierten 5-LO (254Lys-5-LO) erfolgte im S40-Überstand (Zentrifugation mit $40.000 \times g$) von *E. coli*-Lysaten. Die Aktivierung der 5-LO wird durch mehrere Kofaktoren reguliert. Der im Weiteren als „Standardbedingungen“ definierte Reaktionsansatz enthielt neben einer 1:5-Verdünnung des S40-Überstands 1 mM ATP, 25 μ g/ml Phosphatidylcholin (PC), 2 mM Calcium (Ca^{++}) und 20 μ M Arachidonsäure (AA). Die zehnmünütige Inkubationszeit des Reaktionsgemischs wurde bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Danach wurde die Reaktion terminiert (Methanol; MeOH) und durch Ansäuerung (Salzsäure; HCl), Zugabe eines internen Standards (Prostaglandin B₁/B₂; PGB₁/B₂) und anschließender Festphasenextraktion für die Analyse mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) vorbereitet.

In einem Pilotversuch wurde überprüft, ob der Aminosäureaustausch von Glutaminsäure zu Lysin die Expression und Aktivität der 5-LO grundsätzlich beeinflusst hatte. Es zeigte sich, dass das mutierte Enzym sowohl exprimiert wurde, als auch zur Synthese von Leukotrienen (LT) und 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) aus AA befähigt war.

3.5.2.1. Aktivitätsbestimmung der 5-Lipoxygenase in Abhängigkeit der Arachidonsäure-Konzentration

Ein wichtiger Faktor einer optimalen 5-LO-Aktivität ist die Menge an zugegebener AA. Da im *E. coli*-Zelllysate keine freie AA vorliegt, ist deren Zugabe bei allen durchgeführten Versuchen obligat. Als ideal haben sich Konzentrationen zwischen 10 und 40 μM erwiesen. Bei der Inkubation wurden daher nach Vorbehandlung mit ATP, PC und der Ca^{++} -Stimulation AA-Konzentrationen von 2, 10, 20 und 40 μM eingesetzt.

Die 5-LO synthetisierte bei allen zugegebenen AA-Konzentrationen detektierbare Mengen an LTB_4 -Isomeren und 5-HETE. Je höher die AA-Konzentration war, desto größer war die Ausbeute an 5-HETE und LTB_4 -Isomeren. Beim Vergleich der Aktivität der 254Lys-5-LO und 254Glu-5-LO war jedoch bei keiner der AA-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 16). Die Kontrolle der gleichen Enzymmenge von Wildtyp und Mutante erfolgte für jeden Teilversuch ($n = 3$) mittels *Western Blot*-Analysen (Abbildung 17).

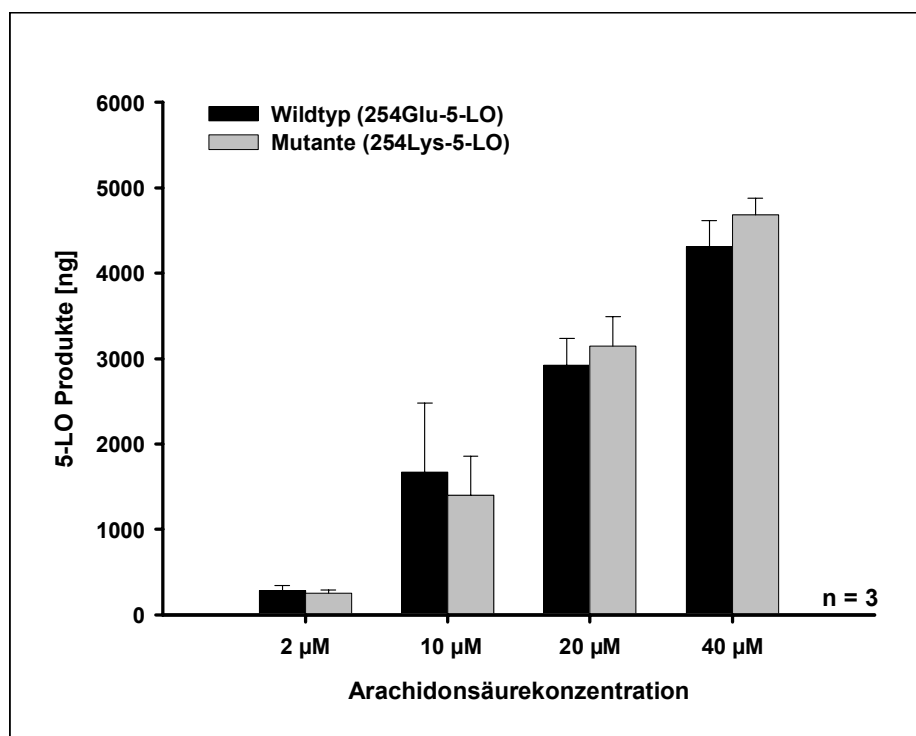


Abbildung 16: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der Arachidonsäure-Konzentration

Dargestellt ist jeweils die Menge an 5-LO-Produkten in der Einheit Nanogramm als Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchsreihen ($n = 3$). Eine Versuchsreihe setzte sich aus 10 Inkubationen zusammen; der S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) wurde je mit 0 (nicht dargestellt; Negativkontrolle), 2, 10, 20 und 40 μM Arachidonsäure inkubiert. Die anderen Faktoren wurden in den als Standardbedingungen definierten Konzentrationen eingesetzt. 5-LO: 5-Lipoxygenase.

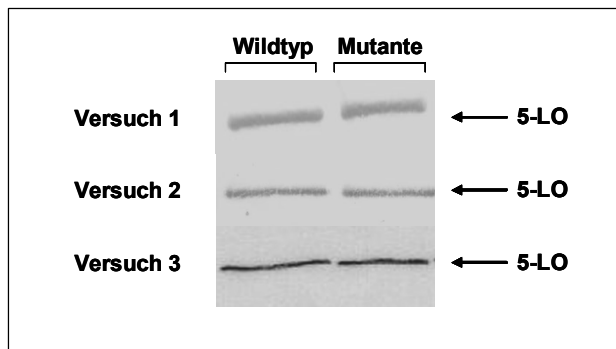


Abbildung 17: Western Blot-Analysen von *Escherichia coli*-Lysaten.

3.5.2.2. Aktivitätsbestimmung der 5-Lipoxygenase in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

Die aus den Kulturen gewonnenen S40-Überstände wurden vor der Inkubation in den meisten durchgeführten Versuchen im Verhältnis 1:5 mit PBS-Puffer verdünnt. Um den Einfluss variierender Enzymkonzentrationen auf die 5-LO-Aktivität zu untersuchen, wurde der S40-Überstand neben der 1:5-Verdünnung im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt und mit AA und den weiteren Kofaktoren inkubiert.

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der 5-LO-Aktivität von der Enzymkonzentration. Je niedriger die eingesetzte Konzentration war, desto geringer war die Aktivität der 5-LO. Bei der 1:5-Verdünnung war die Aktivität der 254Glu-5-LO leicht erhöht, während bei niedrigeren 5-LO-Konzentrationen die Aktivität der 254Lys-5-LO leicht erhöht war. Diese Unterschiede zwischen 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 18). Mittels *Western Blot*-Analysen wurde für jeden Teilversuch ($n = 8$) die gleiche Enzymmenge von Wildtyp und Mutante bestätigt (nicht gezeigt).

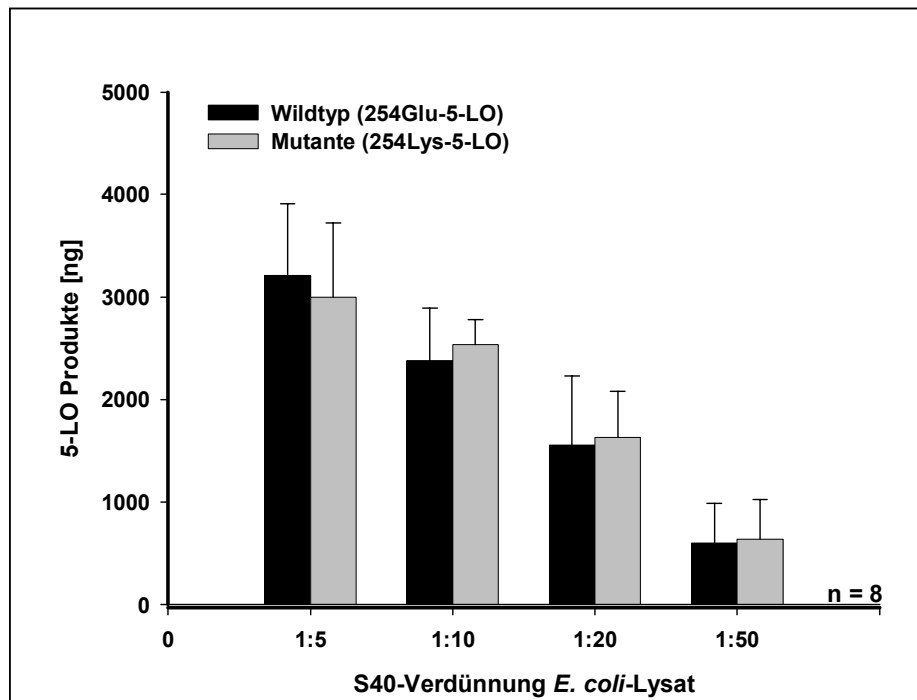


Abbildung 18: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

Dargestellt ist jeweils die Menge an 5-LO-Produkten in der Einheit Nanogramm als Mittelwert aus 8 unabhängigen Versuchsreihen ($n = 8$). Eine Versuchsreihe setzte sich aus 10 Inkubationen zusammen; der S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) wurde jeweils im Verhältnis 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50 verdünnt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle. Die anderen Faktoren wurden in den als Standardbedingungen definierten Konzentrationen eingesetzt.

3.5.2.3. Vergleich der Kinetik in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

Unter Standardbedingungen wurde die Aktivität der 5-LO über die Menge der nach zehn Minuten gebildeten Produkte bestimmt. Unmittelbar nach Zugabe von Ca^{++} ist die 5-LO aber bereits aktiv und setzt die zugegebene AA direkt in die entsprechenden 5-LO-Produkte um. Daher wurde im Folgenden die 5-LO-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 15, 30, 45, 60, 120, 180 und 600 Sekunden) bestimmt. Hierdurch erhält man Informationen über die Kinetik der Reaktion. Die Kinetikkurven wurden bei Verdünnungen von 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 des S40-*E. coli*-Zelllysats bestimmt. Die gleichen Enzymmengen der jeweiligen Teilversuche wurden mittels *Western Blot*-Analysen bestätigt (nicht gezeigt). Durch rechnerische Auswertung der Messwerte ließ sich der Zeitpunkt der halbmaximalen Aktivität ($t_{1/2\text{max}}$) der 5-LO bestimmen. Bei der höchsten eingesetzten Enzymkonzentration (1:5 Verdünnung) lag $t_{1/2\text{max}}$ für 254Glu-5-LO bei 12,0 Sekunden und für 254Lys-5-LO bei 10,6 Sekunden. Eine Erniedrigung der Enzymkonzentration bewirkte im Allgemeinen eine Verzögerung des $t_{1/2\text{max}}$. Ein Unterschied in der Reaktionskinetik der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO bestand nicht (Tabelle 37). Die 5-LO-Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO unterschied

sich bei der 1:20-Verdünnung zum Zeitpunkt 600 Sekunden signifikant voneinander. Bei der Verdünnung 1:50 wurden ebenfalls nach 180 und 600 Sekunden signifikante Unterschiede zwischen den beiden 5-LO-Formen beobachtet. An allen fünf Zeitpunkten war die 254Lys-5-LO stärker aktiv (Abbildung 19). Die Aktivitätssteigerung lag in einem Bereich von 27 % bis 36 %. Beim Vergleich der absoluten Zahlen [in ng] nach 600 Sekunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied (nicht gezeigt).

Tabelle 37: Zeitpunkt der halbmaximalen Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

	$t_{1/2}$ max. 1:5 [s]	$t_{1/2}$ max. 1:10 [s]	$t_{1/2}$ max. 1:20 [s]	$t_{1/2}$ max. 1:50 [s]
254Glu-5-LO	12,0	36,3	22,7	33,5
254Lys-5-LO	10,6	27,5	24,5	36,1

$t_{1/2}$ max: Zeitpunkt der halbmaximalen Aktivität; s: Sekunden.

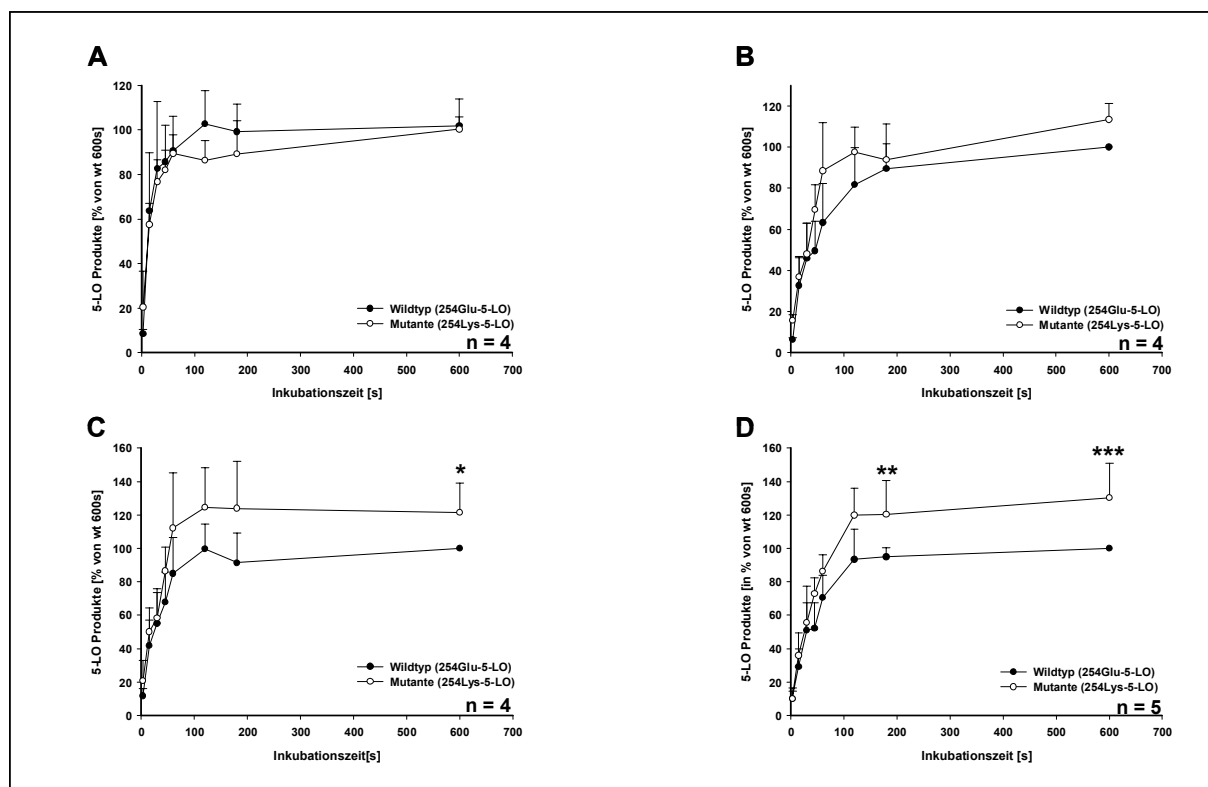


Abbildung 19: Kinetik der 5-Lipoxygenase-Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der Enzymkonzentration

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Aktivität aus vier/fünf voneinander unabhängigen Versuchsreihen ($n = 4$, $n = 5$). Die Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die Aktivität der 254Glu-5-LO nach 600 Sekunden (100 %), angegeben. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 18 Inkubationen zusammen. Die Aktivität wurde im S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) zu den Inkubationszeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 600 Sekunden bestimmt. Die kinetischen Untersuchungen wurden bei den S40-Verdünnungen **A**: 1:5; **B**:1:10; **C**:1:20; **D**:1:50 durchgeführt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle. *: P-Wert = 0,0286; **: P-Wert = 0,0317; ***: P-Wert = 0,0079.

3.5.2.4. Aktivitätsbestimmung der 5-Lipoxygenase in Abhängigkeit von Calcium

In diesem Versuchsansatz wurde ein Vergleich der Aktivität der beiden 5-LO-Formen in An- und Abwesenheit von Ca^{++} durchgeführt. In Abwesenheit von Ca^{++} erniedrigte sich die 5-LO-Aktivität im Vergleich zu einer Inkubation in Anwesenheit von Ca^{++} bei beiden 5-LO-Formen um etwa 90% (Abbildung 20). Eine entsprechende Enzymkonzentration der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO wurde durch *Western Blot*-Analysen bestätigt (nicht gezeigt).

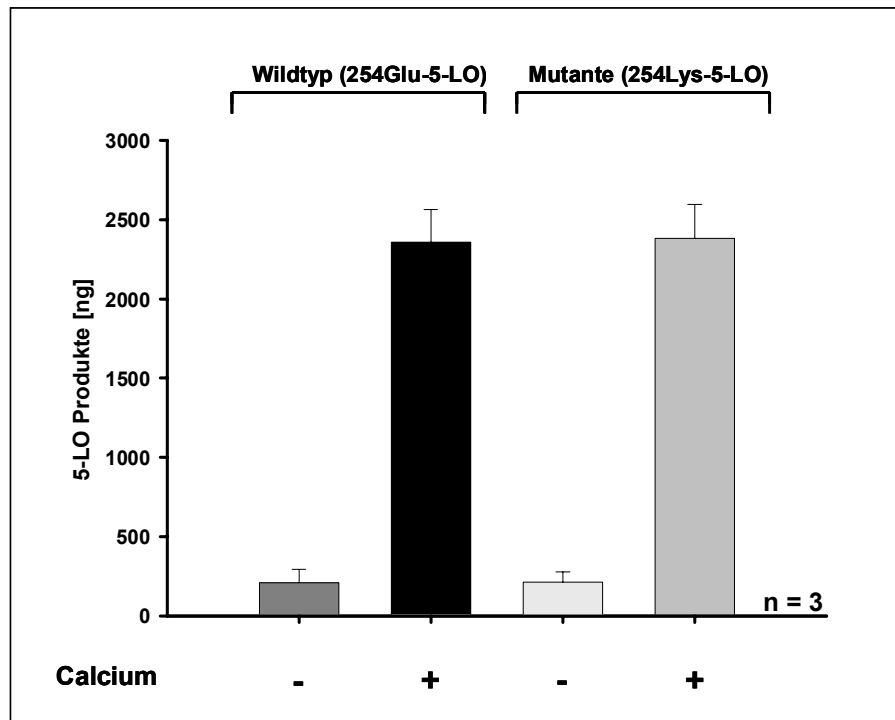


Abbildung 20: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit von Calcium

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert in Nanogramm drei voneinander unabhängiger Versuchsreihen ($n = 3$). Eine Versuchsreihe setzte sich aus 6 Inkubationen zusammen. Die Bestimmung der Aktivität aus dem S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) wurde in An- und Abwesenheit von Calcium durchgeführt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

3.5.2.5. Vergleich der Kinetik in Abhängigkeit von Calcium

Hier sollte untersucht werden, wie sich die Kinetik der Reaktion ohne Ca^{++} -Zugabe verhält und ob sich die Verläufe der Kinetikkurven von 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO unterscheiden. Dies sollte wiederum durch Vergleich des $t_{1/2\text{max}}$ erfolgen. Auf weitere Verdünnungen wurde verzichtet, da die 5-LO-Aktivität in Abwesenheit von Ca^{++} schon bei einer 1:5-Verdünnung des S40-Überstands des *E. coli*-Zelllysats sehr gering ausfällt (Abbildung 21).

Es zeigte sich, dass der $t_{1/2\text{max}}$ der 254Glu-5-LO bei 82,5 Sekunden und der der 254Lys-5-LO bei 91,2 Sekunden erreicht war. Wiederum wurden die gleichen Enzymmengen von Wildtyp und Mutante mittels eines *Western Blots* nachgewiesen (nicht gezeigt).

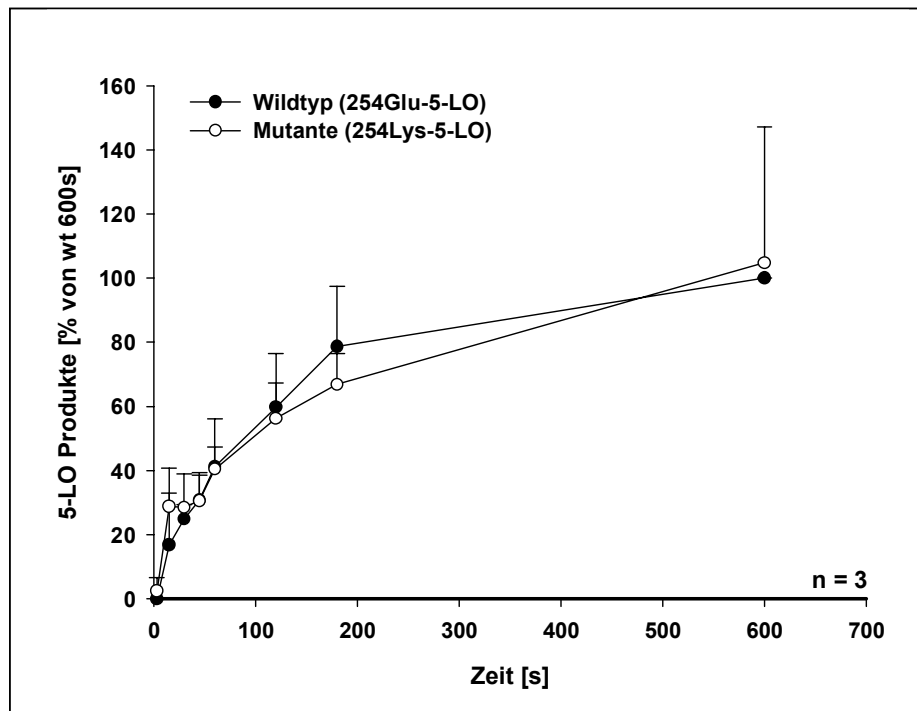


Abbildung 21: Kinetik der 5-Lipoxygenase-Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abwesenheit von Calcium

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Aktivität aus drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen ($n = 3$). Die Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die Aktivität der 254Glu-5-LO nach 600 Sekunden (100 %), angegeben. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 18 Inkubationen zusammen. Die Aktivität wurde im S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) zu den Inkubationszeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 600 Sekunden bestimmt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

3.5.2.6. Aktivität der 5-Lipoxygenase in Abhängigkeit von Phosphatidylcholin

Eine weitere Modifikation der Inkubationsbedingungen besteht in der Variation der PC-Konzentrationen. Die S40-Überstände wurden hierfür mit 20 μM AA, 1 mM ATP, 4 μM Ca^{++} und jeweils 0, 25, 50, 100 oder 200 $\mu\text{g/ml}$ PC inkubiert. Gleichzeitig wurde der Einfluss variierender PC-Konzentrationen in Abwesenheit von Ca^{++} ermittelt.

Die 5-LO-Aktivität war in Abwesenheit von Ca^{++} insgesamt stark erniedrigt. Durch Zugabe hoher PC-Konzentrationen (100 / 200 $\mu\text{g/ml}$) verstärkte sich die Aktivität leicht. In Anwesenheit von Ca^{++} war die 5-LO-Aktivität weitgehend unabhängig von der PC-Zugabe. Die optimalen Aktivitäten wurden mit 25 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ PC erzielt. Zwischen der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO zeigte sich kein Unterschied (Abbildung 22). Die gleiche 5-LO-Enzymkonzentration wurde für jeden Teilversuch ($n=3$) durch einen *Western Blot* bestätigt (nicht gezeigt).

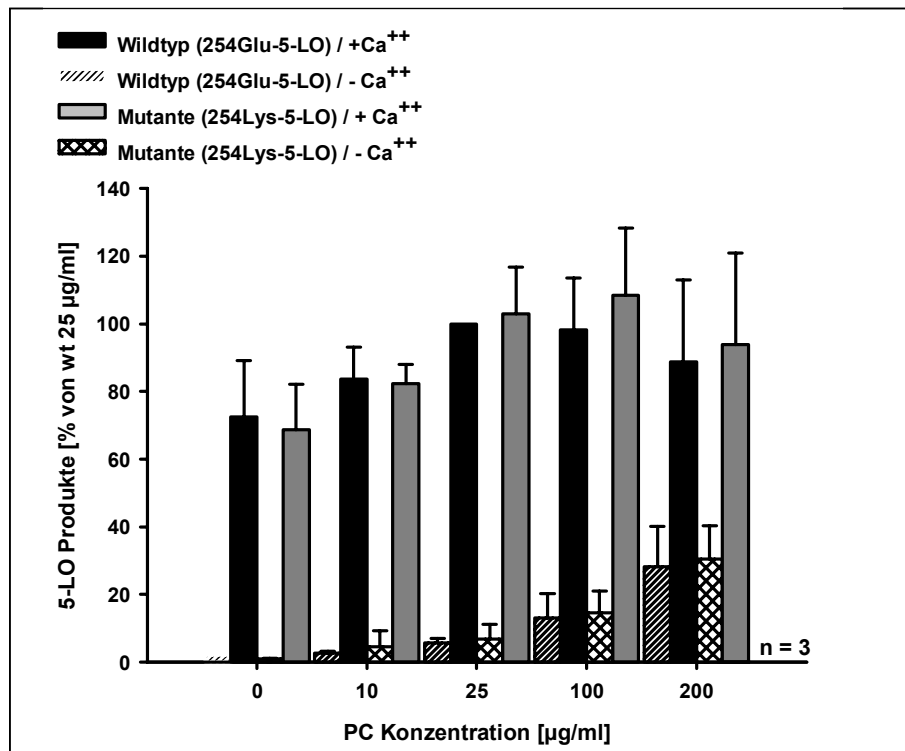


Abbildung 22: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit von Phosphatidylcholin

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen ($n = 3$). Die Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die Aktivität der 254Glu-5-LO bei einer Phosphatidylcholin-Konzentration von 25 µg/ml (100 %), angegeben. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 24 Inkubationen zusammen. Die Bestimmung der Aktivität aus dem S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) wurde bei PC-Konzentrationen von 0, 10, 25, 100 und 200 µg/ml jeweils in An- und Abwesenheit von Calcium durchgeführt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

3.5.2.7. Aktivität der 5-Lipoxygenase in Abhängigkeit vom Redoxstatus des katalytischen Eisens

Der Redoxstatus des zentralen Eisenions der 5-LO ist für deren Aktivität von besonderer Bedeutung. In der Zelle wird das Eisenion durch Lipidhydroperoxide (LOOH) oxidiert und die 5-LO aktiviert. Werden die LOOH reduziert, verlieren sie ihre Funktion als Oxidationsmittel des Eisens und die 5-LO kann nicht mehr aktiviert werden. In menschlichen Zellen ist Glutathion-Peroxidase (Gpx) ein solches Reduktionsmittel, welches sekundär die 5-LO-Aktivität erniedrigt. Mono Mac 6-Zellen (MM6) sind eine humane monozytäre Zelllinie mit hohen endogenen Gpx-Konzentrationen. Daher wurden Lysate aus 0, 0,3, 1, 2, 5 und 10 Millionen MM6-Zellen zu den Inkubationen hinzugegeben. Die Bestimmung der eingesetzten 5-LO-Enzymmengen in den Teilversuchen der jeweiligen Assays ($n = 3$) erfolgte mittels *Western Blot* (nicht gezeigt).

Die Inkubation erfolgte zwar unter Standardbedingungen ohne Ca^{++} -Zugabe. Je mehr MM6-Zellen eingesetzt wurden, desto weniger 5-LO Produkte wurden synthetisiert. Bei der Zugabe von 10 Millionen MM6-Zellen war keine Aktivität der 5-LO mehr nachweisbar. Die Erniedrigung der 5-LO-Aktivität mit steigender MM6-Menge verlief bei 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO nahezu parallel (Abbildung 23).

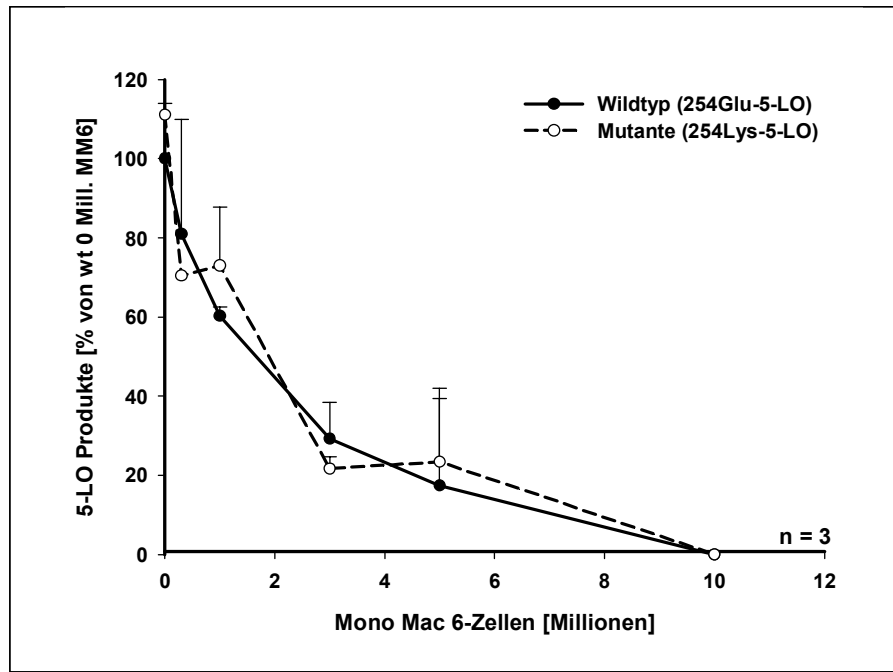


Abbildung 23: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der zugesetzten Menge Zelllysats von Mono Mac-6 Zellen ohne Calcium-Zugabe

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Aktivität aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Die Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die Aktivität der 254Glu-5-LO ohne MM6-Lysat (100 %), angegeben. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 14 Inkubationen zusammen. Die Aktivität wurde aus dem S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) nach einer Zugabe von Homogenat aus je 0/0,3/1/3/5/10 Millionen MM6-Zellen in Abwesenheit von Calcium bestimmt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

In einem weiteren Versuch wurde Ca^{++} in den unter den Standardbedingungen beschriebenen Konzentrationen zugegeben. Ca^{++} bewirkt neben einer verbesserten Membranbindung der 5-LO einen erhöhten Schutz gegenüber reduzierenden Agenzien. Ein Homogenat aus 0,3, 1, 2, 5, 10 Millionen MM6-Zellen wurde zugesetzt. Die Aktivität nahm mit steigender MM6-Zellzahl nur leicht ab. Bei der Zugabe von 10 Millionen MM6-Zellen lag die 5-LO-Aktivität bei 80 % der Ausgangsaktivität. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO (Abbildung 24).

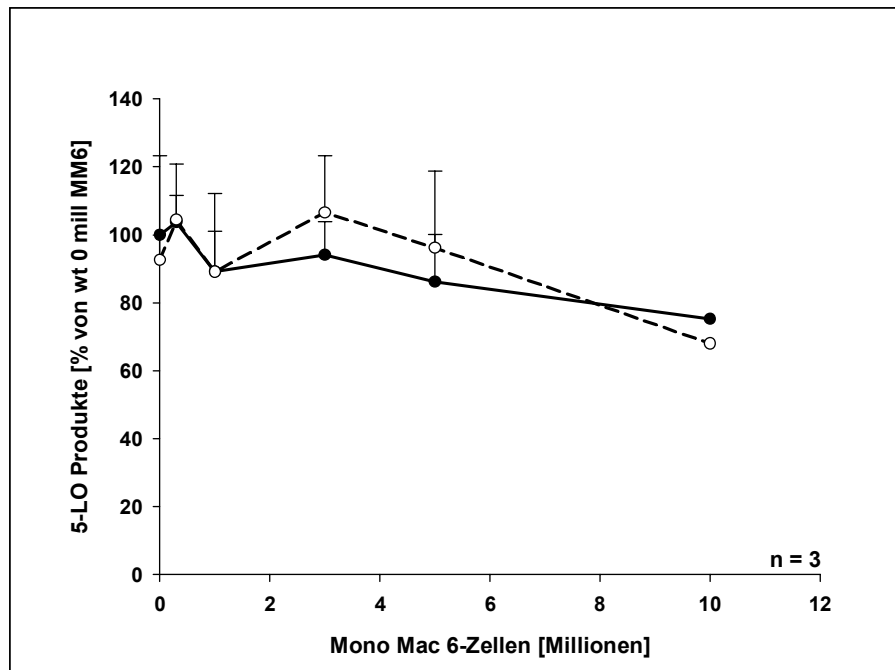


Abbildung 24: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in Abhängigkeit der zugesetzten Menge Zelllysate von Mono Mac-6 Zellen mit Calcium-Zugabe

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Aktivität aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 3$). Die Aktivität wird in Prozent, bezogen auf die Aktivität der 254Glu-5-LO ohne MM6-Lysat (100 %), angegeben. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 14 Inkubationen zusammen. Die Aktivität wurde aus dem S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) nach einer Zugabe von Homogenat aus 0/0,3/1/3/5/10 Millionen MM6-Zellen in Anwesenheit von Calcium bestimmt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

3.5.2.8. Oxygenaseaktivität und LTA₄-Synthaseaktivität der 5-Lipoxygenase

Die 5-LO setzt AA in einer zweistufigen Reaktion zu Leukotrien A₄ (LTA₄) um. Den ersten Reaktionsschritt, der zur Bildung von 5-H(p)ETE führt, bezeichnet man als Oxygenaseaktivität der 5-LO. Die weitere Umsetzung der 5-H(p)ETE durch 5-LO zu LTA₄ wird LTA₄-Synthaseaktivität genannt. Bei 5-H(p)ETE bzw. LTA₄ handelt es sich um instabile Zwischenprodukte, die rasch in 5-HETE bzw. LTB₄-Isomere zerfallen. Die Anteile dieser Produkte können in der HPLC quantitativ analysiert werden. Das 5-HETE:LTB₄-Isomeren-Verhältnis spiegelt somit das Verhältnis der beiden 5-LO-Aktivitäten wider. Dieses Verhältnis wird im Folgenden zu verschiedenen Zeitpunkten bei verschiedenen Enzymkonzentrationen dargestellt.

In der Startphase der Reaktion wurde nahezu ausschließlich 5-HETE gebildet. Je geringer die Enzymkonzentration war (1:10 bis 1:50), desto mehr war das Verhältnis zu Gunsten der 5-HETE Synthese bzw. der Oxygenase-Aktivität der 5-LO ausgeprägt. Unabhängig von der Enzymkonzentration erreichte das Verhältnis nach 100 bis 200 Sekunden ein Plateau, das im weiteren Verlauf der Reaktion relativ konstant blieb. Das Niveau des Plateaus des 5-HETE:LTB₄-Isomeren-Verhältnisses war bei den verschiedenen Verdünnungen unterschied-

lich. Während bei der 1:5 Verdünnung die 5-HETE-Konzentration nur drei- bis viermal höher als die der LTB₄-Isomeren war, betrug das Verhältnis bei der 1:50 Verdünnung etwa 10:1. Die Oxygenase- bzw. LTA₄-Hydrolyse-Aktivitäten waren zu jedem Zeitpunkt zwischen der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO nahezu identisch (Abbildung 25). Die Kontrolle auf gleiche Enzymkonzentration wurde wiederum mittels *Western Blot*-Analysen durchgeführt und bestätigt (nicht gezeigt).

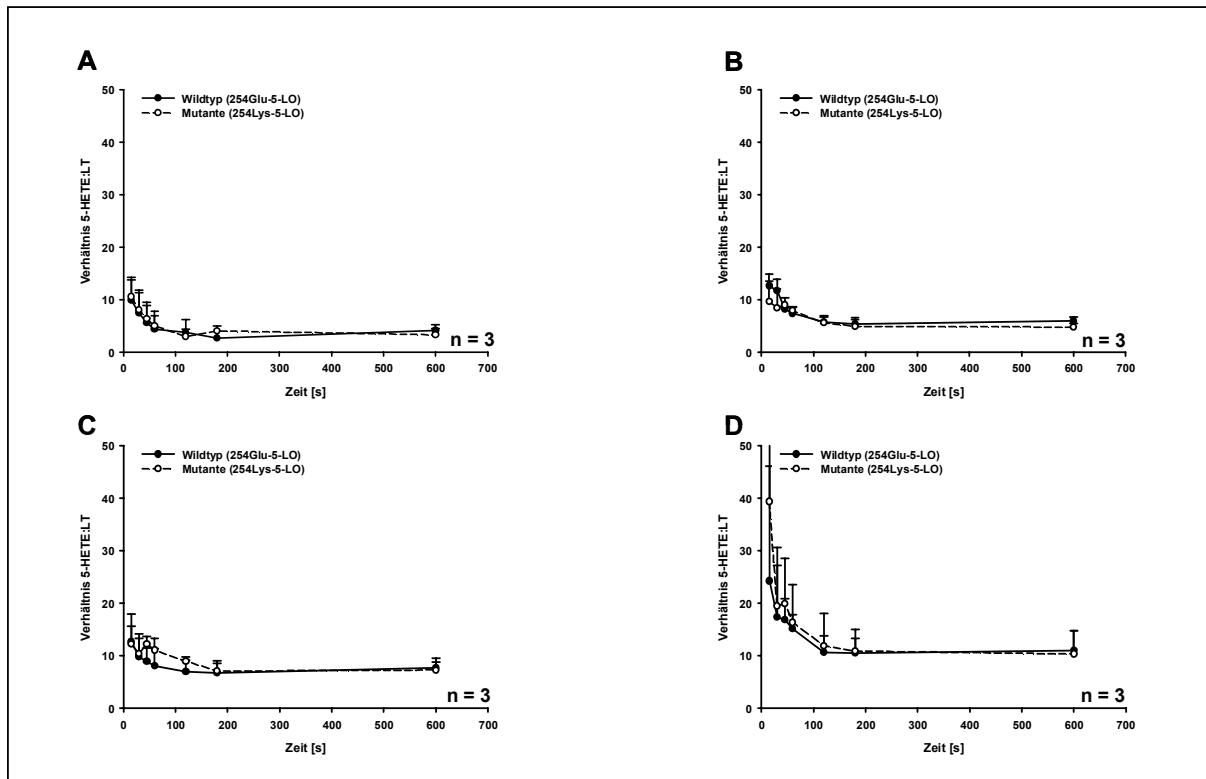


Abbildung 25: Oxygenase:LTA₄-Synthase-Verhältnis bei 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Verhältnisses der Produkte 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) zu Leukotrien (LT)-Isomeren aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n = 3). Eine Versuchsreihe setzte sich aus 18 Inkubationen zusammen. Das Verhältnis wurde aus dem S40-Überstand zweier homogenisierter *Escherichia coli*-Expressionskulturen (Wildtyp/Mutante) zu den Inkubationszeitpunkten 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 600 Sekunden bestimmt. Die Bestimmung wurde in den S40-Verdünnungen 1:5 **A**; 1:10 **B**; 1:20 **C**; 1:50 **D** bestimmt. Nicht dargestellt ist die Negativkontrolle.

3.5.3. Funktionelle Untersuchungen in HeLa Zellen

Die Aktivitäten der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO wurden in HeLa-Zellen verglichen. Diese Zelllinie stammt aus humanem Tumorgewebe und erlaubt eine Aktivitätsbestimmung in der intakten Zelle.

3.5.3.1. Aktivität der 5-Lipoxygenase in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen mit einer Konfluenz von 60-70 % wurden mit dem 254Glu-5-LO- bzw. 254Lys-5-LO-Plasmid transfiziert. Nach einem Mediumwechsel (16 Stunden nach Transfektion) und weiterem dreitägigen Wachstum wurden die HeLa-Zellen geerntet und in PBS-Glukose-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und eine Million Zellen pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Wasserbad für 10 Minuten. Als Stimulans wurde das Ca⁺⁺-Ionophor A23187 [5 µM] und als Substrat AA [10-40 µM] verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol abgestoppt. Vor der Vermessung in der HPLC wurden die Proben durch PGB₂ konditioniert, mit HCl angesäuert, durch Zentrifugation von festen Bestandteilen getrennt und über Festphasenextraktion angereichert. Ein Teil der HeLa-Zellen wurde einer Homogenisierung unterzogen und analog den Bedingungen der Versuche in *E. coli* inkubiert (3.5.2). Als Kontrolle wurden die 5-LO-, β-Actin- (interner Standard) und bei erfolgter Kotransfektion auch die FLAP-Enzymkonzentration bestimmt (*Western Blot*).

Die unterschiedlichen AA-Konzentrationen hatten nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität. Bei einer AA-Konzentration von 10 µM war die Aktivität der 254Glu-5-LO leicht erhöht. Ansonsten zeigten sich keinerlei Aktivitätsunterschiede zwischen 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO (Abbildung 26).

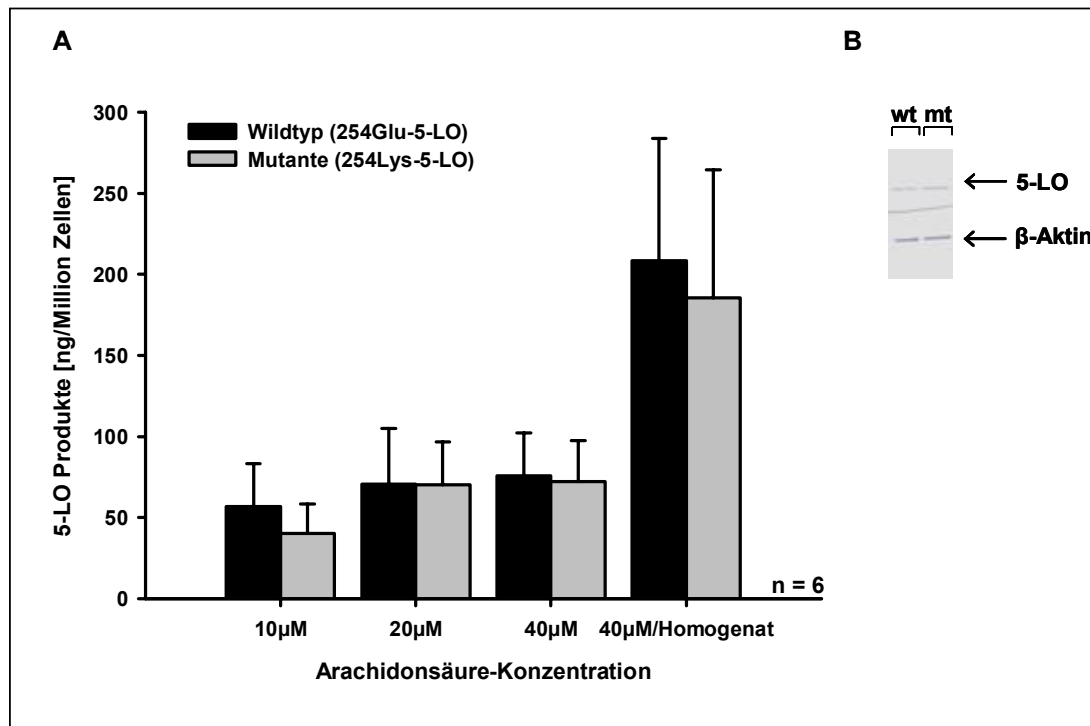


Abbildung 26: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in HeLa-Zellen

A: Dargestellt ist jeweils die Menge an 5-LO-Produkten in der Einheit Nanogramm als Mittelwert aus 6 unabhängigen Versuchsreihen ($n = 6$). Eine Versuchsreihe setzte sich aus 10 Inkubationen zusammen. Die in PBS/Glukose suspendierten HeLa-Zellen (Wildtyp/Mutante) wurden je mit 0 (nicht dargestellt; Negativkontrolle), 10, 20 und 40 μM Arachidonsäure inkubiert. Die anderen Faktoren wurden in den als Standardbedingungen definierten Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Aktivität von homogenisierten HeLa-Zellen bestimmt (vgl. Bedingungen 3.5.2). **B:** *Western Blot* einer Versuchsreihe, β -Actin: Füllkontrolle; 5-LO: 5-Lipoxygenase; wt: Wildtyp; mt: Mutante.

3.5.3.2. Aktivität der 5-Lipoxygenase in HeLa-Zellen nach Kotransfektion mit FLAP

Das Protein FLAP nimmt in der Umsetzung der AA durch die 5-LO eine wichtige Funktion ein. Da es in HeLa-Zellen endogen nicht vorliegt, wurde in dieser Versuchsreihe jeweils eine definierte Menge FLAP-Plasmid kotransfiziert. Die Aktivität beider 5-LO-Formen wurde wie unter 3.5.3.1 beschrieben bei drei unterschiedlichen AA-Konzentrationen sowie im HeLa-Homogenat bestimmt.

Die Steigerung der AA-Konzentration bewirkte eine erhöhte 5-HETE- und LTB_4 -Isomeren-Ausbeute. Die Aktivität der 254Lys-5-LO war bei 20 μM und 40 μM AA-Zugabe gegenüber der 254Glu-5-LO-Aktivität leicht erhöht. Die 5-LO-Aktivität des Homogenats war bei 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO nahezu identisch (Abbildung 27).

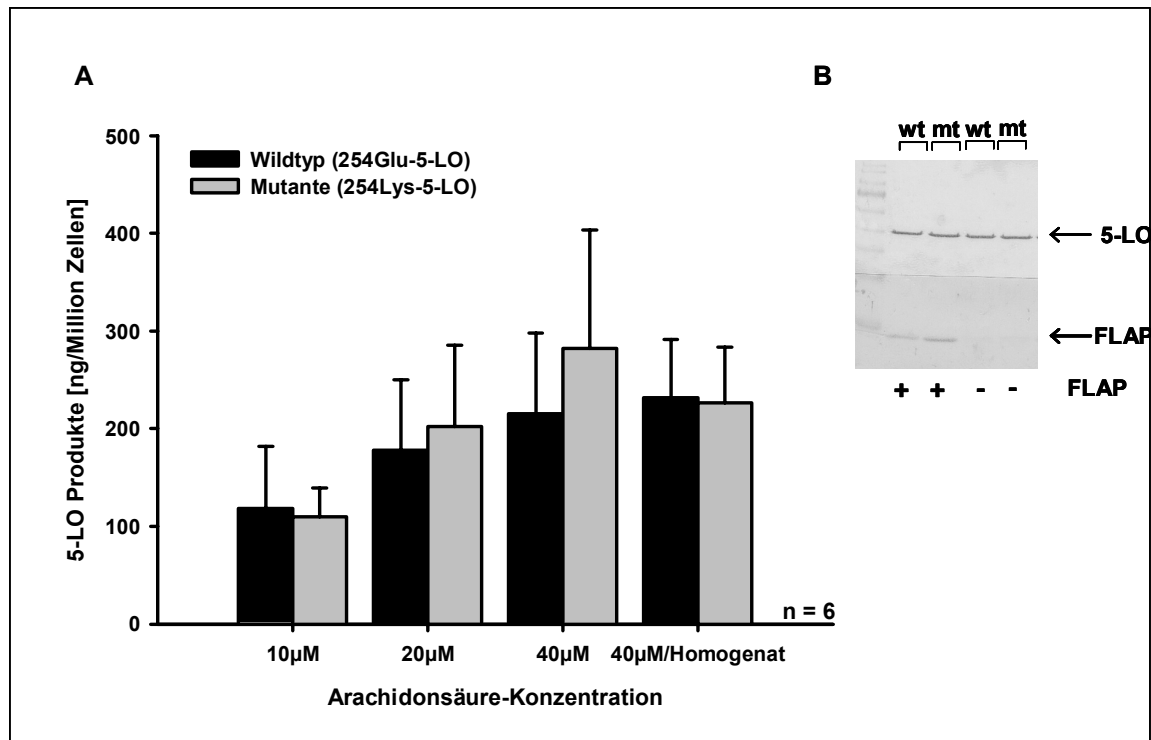


Abbildung 27: Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO in HeLa-Zellen in Anwesenheit von FLAP

A: Dargestellt ist jeweils die Menge an 5-LO-Produkten in der Einheit Nanogramm als Mittelwert aus sechs unabhängigen Versuchsreihen ($n = 6$). Den HeLa-Zellen wurde neben dem 5-LO-Plasmid, ein FLAP-Plasmid kotransfiziert. Eine Versuchsreihe setzte sich aus 10 Inkubationen zusammen. Die in PBS/Glukose suspendierten HeLa-Zellen (Wildtyp/Mutante) wurden je mit 0 (nicht dargestellt; Negativkontrolle), 10, 20 und 40 μM Arachidonsäure inkubiert. Die anderen Faktoren wurden in den als Standardbedingungen definierten Konzentrationen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Aktivität von homogenisierten HeLa-Zellen bestimmt (vgl. Bedingungen 3.5.2). **B:** *Western Blot* einer Versuchsreihe; 5-LO: 5-Lipoxygenase; wt: Wildtyp; mt: Mutante; FLAP: 5-lipoxygenase-activating protein.

3.5.3.3. Subzelluläre Lokalisation der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO

Im Ruhezustand der Zelle liegt die 5-LO überwiegend in den löslichen Fraktionen der Zelle vor. Eine Stimulation von HeLa-Zellen mit einem Ca^{++} -Ionophor bewirkt über eine Perforation der Zellmembran einen Einstrom von Ca^{++} und damit die Translokation der 5-LO an die Nukleusmembran. Durch Lyse und Homogenisation der HeLa-Zellen sowie entsprechende Zentrifugationsschritte gelingt es, die zytosolische von der membrangebundenen 5-LO-Fraktion zu trennen. Eine Quantifizierung der beiden Fraktionen mittels eines *Western Blots* erlaubt eine Aussage über eine eventuell veränderte Translokation zur Nukleusmembran. Die Trennung der Fraktionen erfolgte nach einer Inkubation mit/ohne Ca^{++} -Ionophor bei 37°C über 5 Minuten. Der Translokationsassay wurde sowohl nach Kotransfektion mit FLAP als auch ohne FLAP durchgeführt.

Die in der Membranfraktion identifizierten 5-LO-Banden waren weder zwischen mutierter und Wildtyp-5-LO, noch zwischen FLAP-positiven und FLAP-negativen Zellen unterschiedlich. Es

war anhand des *Western Blots* der Membranfraktion auch nicht möglich die stimulierten von den unstimulierten Zellen zu unterscheiden (Abbildung 28).

Eine unterschiedliche Intensität der Banden lag allerdings in der zytosolischen Fraktion vor. Dort zeigten sich stärkere 5-LO-Banden bei allen FLAP-negativen sowie bei nicht stimulierten Proben. Die β -Actin-Bande war bei allen acht Reaktionsansätzen vergleichbar (Abbildung 29). Die Gesamtmenge an 5-LO war in den FLAP-positiven Zellen etwas erhöht (Abbildung 30). Weitere analoge Versuche zeigten ebenfalls keine unterschiedliche Translokation zwischen 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO (Daten nicht gezeigt).

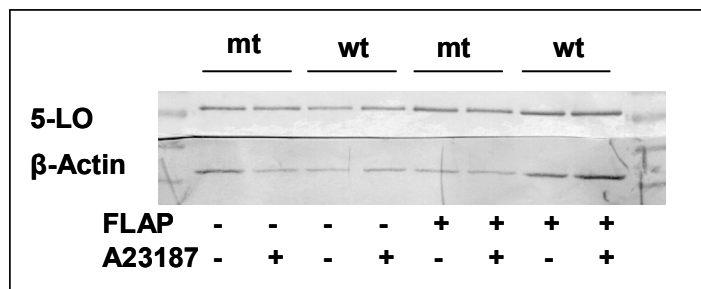


Abbildung 28: *Western Blot* der Membranfraktion der 5-Lipoxygenase

5-LO: 5-Lipoxygenase; wt: Wildtyp; mt: Mutante; FLAP: *5-lipoxygenase-activating protein*; A23187: Ca^{++} -Ionophor.

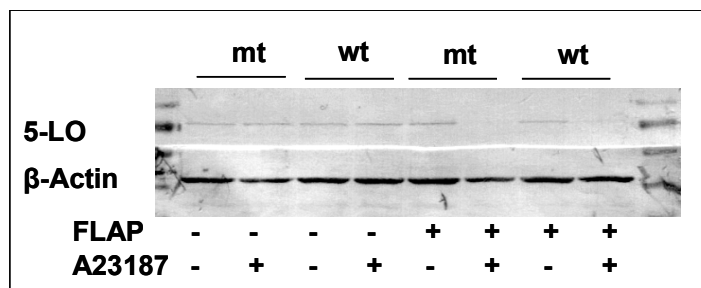


Abbildung 29: *Western Blot* der Zytosolfraktion der 5-Lipoxygenase

5-LO: 5-Lipoxygenase; wt: Wildtyp; mt: Mutante; FLAP: *5-lipoxygenase-activating protein*; A23187: Ca^{++} -Ionophor.

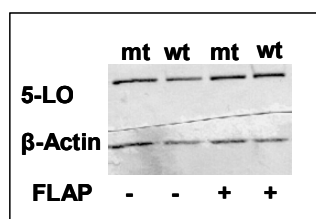


Abbildung 30: *Western Blot* der Gesamtproteinmenge der 5-Lipoxygenase

5-LO: 5-Lipoxygenase; wt: Wildtyp; mt: Mutante; FLAP: *5-lipoxygenase-activating protein*; A23187: Ca^{++} -Ionophor.

4. DISKUSSION

Im Folgenden wird erläutert, welche Anhalte für die Auswahl von *ALOX5* als Kandidatengen für eine Assoziationsstudie zum Risiko einer klinischen Tuberkulose dienen. Weiterhin werden die Ergebnisse aus den molekulargenetischen Untersuchungen im Zusammenhang mit den hier durchgeführten und den in der Literatur beschriebenen funktionellen Untersuchungen diskutiert.

4.1. Die mögliche Rolle von *ALOX5* in der Immunität gegenüber Erregern der Tuberkulose

Die Hypothese einer möglichen Assoziation von *ALOX5*-Varianten mit einer geringeren Empfänglichkeit für Tuberkulose basierte auf mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Beobachtungen und Experimenten mit Mäusen, die mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert worden waren. Hinweise ergeben sich bereits aus den Funktionen der 5-Lipoxygenase (5-LO)-Produkte. Leukotriene (LT) aktivieren polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) [Palmlblad *et al.*, 1981], Alveolarmakrophagen [Mancuso *et al.*, 1998] und natürliche Killerzellen [Bray & Brahma, 1986]. Lipoxine (LX) üben dagegen meist eine antagonistische Wirkung auf die Zellen der angeborenen Immunität aus. Eine Ausnahme bildet die durch LX stimulierte Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen. In Mäusen und Menschen werden durch LT proinflammatorische Mediatoren, wie Interleukin (IL)-12 und Interferon- γ (IFN- γ), freigesetzt, die die T-Zell-Differenzierung in Richtung einer Th1-Antwort lenken [Rola-Pleszczynski *et al.*, 1986]. LX modulieren die Immunantwort durch Stimulation der IL-4-Freisetzung und Hemmung der TNF- α -, IL-5-, IL-12- und IL-13-Sekretion [Bandeira-Melo *et al.*, 2000; Ariel *et al.*, 2003; Parkinson, 2007]. LT könnten somit wichtige Aufgaben in der Bekämpfung einer Infektion mit MTB-Komplex-Erregern zukommen, während die durch LX induzierten Reaktionen für das Überleben des Wirtsorganismus eher von Nachteil sind. Die bei manchen Erkrankungen erwünschte Auflösung der Entzündung durch LX [Serhan, 2007] spielt bei Infektionen mit Mykobakterien wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle.

Eine pharmakologische Hemmung von FLAP (*5-lipoxygenase-activating protein*) durch das Indol-Derivat MK886, die zu einer verminderten Synthese von 5-LO-Produkten führt, reduzierte die Abtötung von *M. bovis* durch PMN *in vitro*. Durch exogene Zugabe von Leukotrien B₄ (LTB₄) ließ sich der Effekt der FLAP-Blockade wieder aufheben und eine Verbesserung der Erregerabwehr erreichen [Coffey *et al.*, 2004]. Eine verminderte Erregerabwehr nach FLAP-Blockade durch MK886 wurde auch für mit *M. tuberculosis* infizierte PMN gezeigt [Riedel & Kaufmann, 1997]. Durch Inhibition der 5-LO bei entzündlichen Erkrankungen ist

außerdem die Bildung von Granulomen in der Lunge unterdrückt [Kunkel *et al.*, 1984]. Die Bedeutung der 5-LO wird weiter durch die erhöhten LT-Spiegel im Pleuraexsudat von Patienten mit Tuberkulose [Pace *et al.*, 2004] und die im Vergleich zu Blutmonozyten bis zu siebenfach höheren Enzymkonzentrationen von 5-LO und anderer an der LT- und LX-Synthese beteiligten Enzyme unterstrichen [Coffey *et al.*, 1994].

Starke Hinweise für eine potentielle Rolle der 5-LO in der Immunität gegenüber Tuberkulose ergaben sich aus tierexperimentellen Untersuchungen. Eine Deletion des *ALOX5*-Gens in der Maus führte zu einer Erhöhung einer Vielzahl von in der angeborenen Immunität und der Differenzierung von T-Lymphozyten wichtigen Mediatoren. So war die Expression von IL-12, IFN- γ und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) erhöht. Dies führte in *ALOX5-Knock-out*-Mäusen zu einer deutlichen Verbesserung vitaler Parameter [Bafica *et al.*, 2005].

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen hatten Mäuse, deren Synthese von 5-LO-Produkten durch MK886 reduziert war, eine verringerte Überlebenszeit nach einer *M. tuberculosis*-Infektion. Weiterhin waren die pulmonale Bakterienlast dieser Mäuse erhöht und die Spiegel von IL-12, IFN- γ und reaktiven Stickstoffspezies erniedrigt [Peres *et al.*, 2007].

Während die Beobachtungen in *ALOX5-Knock-out*-Mäusen auf eine Protektion durch niedrige LX-Spiegel deuten, schienen die Mäuse bei pharmakologischer Inhibition der 5-LO-Aktivität durch erniedrigte LT-Spiegel benachteiligt gewesen zu sein. In beiden Modellen waren aber sowohl die LT- als auch die LX-Konzentrationen erniedrigt. Unterschiede bestanden in dem Kompartiment der Konzentrationsbestimmung und in dem Verhältnis von LT zu LX. Während bei *Knock-out*-Mäusen die Konzentrationen im Blutplasma bestimmt worden waren und das Verhältnis LT/LX auf der Seite der LX lag, wurden bei mit MK886 behandelten Mäusen die Messungen im Lungenhomogenat vorgenommen und im Vergleich zur LX-Konzentration höhere LT-Konzentrationen gemessen. Offensichtlich überwiegt in dem einem Modell der positive Effekt erniedrigter LX-Spiegel [Bafica *et al.*, 2005], während sich im anderen Modell der negative Effekt der LT-Reduktion auf die vitalen Parameter der Mäuse auswirkt [Peres *et al.*, 2007].

Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Beobachtungen erklären sich am ehesten durch Störungen des 5-LO-abhängigen Gleichgewichts proinflammatorischer LT und antiinflammatorischer LX. Eine Einschätzung des LT/LX-Verhältnisses auf der Grundlage der 5-LO-Aktivität ist schwierig, da an der LX-Synthese weitere Enzyme (12-LO, 15-LO, COX-2) maßgeblich beteiligt sind [Maddox *et al.*, 1997], während die Produktion von LTB₄ weitgehend von 5-LO abhängig ist [Surette *et al.*, 1999]. Die Homöostase von LX und LT scheint somit das Kriterium für die Empfänglichkeit gegenüber einer manifesten Tuberkulose zu sein. Es ist auch denkbar, dass unterschiedliche Phasen der Erkrankung, also Infektion,

angeborene Immunabwehr, erworbene Immunabwehr und Granulombildung mit unterschiedlichen LT/LX-Verhältnissen assoziiert sind. LT und LX spielen auch bei anderen Erkrankungen eine entscheidende Rolle. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass der Verlauf einer Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* von der LT- oder LX-Konzentration abhing [Baillie *et al.*, 1996; Mancuso *et al.*, 2001; Karp *et al.*, 2004]. Die einzelnen Beobachtungen legen nahe, dass verschiedene Erreger für ihr Überleben und ihre Replikation verschiedene LT- und LX-Spiegel favorisieren.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit einiger Tuberkulostatika neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften in die Biosynthese der LT und LX einzugreifen. So hemmt para-Aminosalicylsäure (PAS) die 5-LO [Nielsen *et al.*, 1987; Tornhamre *et al.*, 1989]. Der 5-LO-inhibitorische Effekt der Aminosalicylsäuren wird auch als möglicher Wirkmechanismus des Sulfasalzins in der Behandlung des Morbus Crohn diskutiert [Peskar *et al.*, 1987]. Weiterhin sind Amidrazone potente LO-Inhibitoren. Einzelne Vertreter der Amidrazone wurden bereits als Wirkstoff gegen Mykobakterien getestet [Coleman *et al.*, 2001]. Das Hydrazid Isoniazid (INH) ist den Amidrazonen strukturell nahe verwandt. Die Fähigkeit des INH zur 5-LO-Inhibition wurde aber bisher nicht untersucht. INH verhindert jedoch den Metabolismus der LT und könnte somit deren Wirkdauer verlängern [Parthé & Haggmann, 1990]. Darüber hinaus ist unter Rifampicin-Therapie die Freisetzung von Arachidonsäure reduziert [Yugas *et al.*, 2007].

Aufgrund der tierexperimentellen Beobachtungen und den weiteren *in vivo*- und *in vitro*-Anhalten lag es nahe, die Rolle von *ALOX5* in der Entwicklung einer manifesten Tuberkulose beim Menschen zu untersuchen. Eine weiterführende Option war die Durchführung einer Assoziationsstudie zum Einfluss bestimmter humaner *ALOX5*-Genvarianten auf das Risiko für eine klinische Tuberkulose.

4.2. Assoziation der exonischen *ALOX5*-Variante mit dem Risiko einer Tuberkulose

Selektion und Infektionskrankheiten

In der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde eine Theorie entwickelt [Haldane, 1949], deren Inhalte noch heute die Sichtweise grundlegender Zusammenhänge von Krankheiten und Evolution beeinflussen [Weatherall, 1996; Lederberg, 1999]. Danach sind Infektionskrankheiten treibende Kraft natürlicher Selektion. Genetische Faktoren, die einen, wenn auch nur geringen, Schutz vor tödlichen Krankheiten verleihen und dadurch das Überleben der Art sichern, werden in Populationen fixiert. Somit könnte das Vorkommen bestimmter

„protektiver“ genetischer Varianten mit der Verbreitung bestimmter Infektionskrankheiten korrelieren. Andererseits gibt es unter diesen „protektiven“ Varianten auch solche, die ihrerseits Erkrankungen bedingen können. Dies wird an den Beispielen bestimmter Thalassämieformen und der Sichelzellanämie deutlich [Hill, 1992]; beide Erkrankungen verleihen einen relativen Schutz vor schweren Verlaufsformen der *Malaria tropica*. Mit Thalassämie assoziierte Allele finden sich besonders in ehemaligen und aktuellen Malariagebieten und die für die Sichelzellanämie verantwortliche Genmutation kommt besonders im Afrika südlich der Sahara vor [Wong *et al.*, 1986; Serjeant, 1989].

Tierexperimentelle Studien zum Verlauf von Infektionen mit Erregern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTB-Komplex) haben in der Vergangenheit zur Identifizierung von Genen geführt, die auch beim Menschen das Risiko einer Tuberkulose beeinflussen könnten [Skamene, 1994]. Auf der Grundlage der tierexperimentellen Beobachtungen in *ALOX5-Knock-out*-Mäusen und der Annahme einer Selektion schützender Genvarianten folgend, wurde die Verteilung natürlich vorkommender *ALOX5*-Mutationen in einem Studienkollektiv aus Ghana untersucht.

Das ausgewählte Studienkollektiv muss abhängig von der Häufigkeit der untersuchten Erkrankung und der Allelfrequenz der genotypisierten Variante eine bestimmte Mindestgröße aufweisen, um statistisch valide Ergebnisse zu erhalten. Diese Eigenschaft einer Studienpopulation wird als *Power* bezeichnet und in Prozent angegeben. In diesem Fall wurde für das Erkennen eines vorhandenen Effekts eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 90 % verlangt. Als Kriterien wurden hier ein potentielles relatives Risiko von 1,3, eine Tuberkuloseinzidenz von 0,004 und eine Allelfrequenz von mehr als 10 % angenommen.

Die Auswahl der *ALOX5*-Varianten, die zur Genotypisierung im Studienkollektiv verwendet werden sollten, erfolgte auf der Basis der in Literatur [1.2.7] und Datenbanken [National Center for Biotechnology Information; NCBI] (www.ncbi.nlm.nih.gov) verfügbaren Informationen. Die Varianten wurden *a priori* nach grundsätzlichen Kriterien eingegrenzt. Dabei waren solche Varianten von primärem Interesse, die für nicht-synonyme Aminosäureaustausche kodieren und solche, die in Bereichen bekannter Spleißstellen oder Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen liegen und somit die Homöostase der Lipidmediatoren beeinflussen könnten. Von Relevanz waren ebenfalls Genvarianten, die mit Krankheiten assoziiert sind, einen bekannten Einfluss auf die Expression oder Aktivität des Gens haben oder ein ethnospezifisches Verteilungsmuster aufweisen. Auf die beiden in dieser Arbeit typisierten Varianten trafen diese Kriterien in unterschiedlichem Maße zu.

Verteilung der exonischen ALOX5-Variante

Die ALOX5-Variante g.760G>A führt in der 5-LO zu einem Austausch saurer Glutaminsäure mit basischem Lysin. Außerdem ist die Variante bei verschiedenen Populationen auffallend unterschiedlich verteilt. Bei 172 Kaukasiern, die auf den Zusammenhang dieser Variante mit dem Risiko eines kolorektalen Karzinoms untersucht worden waren, hatten 170 den „G/G“-Genotyp und nur zwei den „A/G“-Genotyp [Goodman *et al.*, 2004]. Weitere Daten zu den Häufigkeiten von g.760G>A sind in der Online-Datenbank des NCBI verfügbar. Dort sind Ergebnisse von Genotypisierungen bei vier verschiedenen kaukasischen Populationen zugänglich. Die vom Whitehead Institute for Biomedical Research, Cancer Genome Anatomy Project (www.wi.mit.edu) und dem International HapMap Project (www.hapmap.org) durchgeführten Untersuchungen konnten bei keinem der Individuen das „g.760A“-Allel identifizieren.

Im Rahmen der genannten Projekte liegen auch Daten bezüglich des Vorkommens der Variante bei drei afroamerikanischen Kollektiven vor. Während „g.760A“ bei Kaukasiern nur in einer Arbeit identifiziert werden konnte, kommt dieses bei den untersuchten Afroamerikanern mit einem Anteil von bis zu 8 % vor. Der „A/A“-Genotyp wurde wiederum bei keinem Individuum identifiziert. Im International HapMap Project sind weiterhin Häufigkeitsverteilungen bei Angehörigen der Ethnie der Yoruba (Nigeria) verfügbar; „g.760A“ hat hier einen Anteil von etwa 14 %. Der „G/G“-Genotyp kommt bei 76,3 %, der „A/G“-Genotyp bei 16,7 % und der erstmalig im International HapMap Project beschriebene „A/A“-Genotyp bei 5,1 % der Individuen vor.

Die bisher vorliegenden Häufigkeitsdaten wurden durch die Genotypisierung der ALOX5-Variante g.760G>A in unserem Kollektiv bestätigt. Hier betrug die Frequenz von „g.760G“ 91,2 % und die von „g.760A“ 8,8 %. Am häufigsten war der „G/G“-Genotyp mit 83,3 %, gefolgt vom „A/G“-Genotyp mit 15,8 %. Der „A/A“-Genotyp wurde lediglich bei 0,9 % der Individuen gefunden. Das im Vergleich zu Kaukasiern deutlich erhöhte Vorkommen des „g.760A“-Allels bei Afrikanern und Afroamerikanern legt, in Anlehnung an den erwähnten möglichen Zusammenhang von genetischen Faktoren mit dem Vorkommen von Infektionskrankheiten, eine besondere Bedeutung dieser Variante nahe. Bei einem das relative Risiko für eine Tuberkulose erhöhenden Allel würde man somit dessen vermehrtes Vorkommen bei den Fällen erwarten.

Grundsätzlich muss in Erwägung gezogen werden, dass möglicherweise eine andere tödliche Krankheit als Selektionsfaktor für die Verteilung dieser Variante von Bedeutung war. Eine Beeinflussung der Allelverteilung durch die in Afrika bedeutendste und im Kindesalter häufig tödlich verlaufende Infektionskrankheit, die Malaria, ist daher nicht vollkommen

auszuschließen. Es existieren schwache Anhalte, dass Produkte der 5-LO die Pathogenese der Malaria beeinflussen könnten [Schwarzer *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 1999].

Assoziation der exonischen ALOX5-Variante mit Tuberkulose

Beim Vergleich der Allelfrequenzen von g.760G>A bei Fällen und Kontrollen zeigte sich eine um den Faktor 1,21 erhöhte Häufigkeit von „g.760A“ in der Fallgruppe; entsprechend kam „g.760G“ vermehrt in der Gruppe der Kontrollen vor. Die Häufigkeit ist gleichbedeutend mit der Odds Ratio der entsprechenden Berechnung. Da das „g.760G“-Allel möglicherweise einen relativen Schutz vor Tuberkulose verleiht, würde man dessen stärkste Verbreitung in Gebieten mit endemisch auftretender Tuberkulose vermuten. In den westlichen Ländern, wo die Inzidenzen in den letzten Jahrzehnten rückläufige Tendenzen aufweisen [Kunitz *et al.*, 2007], ist nahezu ausschließlich das „g.760G“-Allel vertreten. Dies könnte darin begründet liegen, dass Tuberkulose bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts eine der Haupttodesursachen in Europa darstellte [Stead, 1997] und somit über Jahrhunderte einen Selektionsdruck ausgeübt hatte, der zur Zurückdrängung des Allels „g.760A“ bei Kaukasiern geführt haben könnte.

Die Frage, warum das „g.760A“-Allel in Afrika noch bei etwa 10 % der Individuen vorkommt, könnte möglicherweise durch einen Blick auf die Entwicklung und Geschichte der Tuberkulose in Afrika diskutiert werden. Auch wenn nur wenige historische Quellen existieren, ging man lange davon aus, die Tuberkulose habe sich erst im 20. Jahrhundert in Afrika ausgebreitet [Bates & Stead, 1993; Stead, 1997]. Dagegen spricht jedoch zum einen der Nachweis von DNA des Erregers *M. africanum* in ägyptischen Mumien [Zink *et al.*, 2003], zum anderen die phylogenetisch besonders alten mykobakteriellen Genotypen in Isolaten afrikanischer Patienten. Sequenzanalysen des auf Ostafrika beschränkten Erregers *M. canettii* legen den Verdacht nahe, dass diese Spezies phylogenetisch besonders nahe mit *M. protubercolosis*, dem Vorfahren der Erreger des MTB-Komplexes, verwandt ist [Fabre *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2005]. Zusammenfassend gibt es für die letzten Jahrhunderte wenig Anhalte für eine hohe Prävalenz der Tuberkulose in Afrika, aber klare Beweise für das Vorkommen der Erreger [Brosch *et al.*, 2002].

Auffallend ist das große Risiko afrikanischer und afroamerikanischer Ethnien für eine Infektion und Erkrankung an Tuberkulose und die damit verbundene hohe Mortalitätsrate. Deutlich wurde dies beim gemeinsamen Militäreinsatz senegalesischer und französischer Soldaten im 1. Weltkrieg und sudanesischer und ägyptischer Soldaten während der britisch-ägyptischen Besatzung des Sudans; sowohl die Senegalesen in der französischen Armee als auch die Sudanesen in der Armee der Nordafrikaner starben auffallend häufig an Tuberkulose [Cummins, 1908; Borel, 1920]. Unterschiede zwischen Weißen und Schwarzen

wurden auch in nordamerikanischen Gefängnissen und Obdachlosenheimen beobachtet. Dort waren unter gleichen sozio-ökonomischen Bedingungen Afroamerikaner gegenüber Kaukasiern häufiger von Infektionen mit Erregern des MTB-Komplexes betroffen [Stead *et al.*, 1990]. Ein gleiches Phänomen zeigte sich auch bei kleineren Tuberkuloseepidemien in den USA, wo die afroamerikanische Durchschnittsbevölkerung häufiger von Infektionen betroffen war als kaukasisches Pflegepersonal [Stead, 2001].

Die Selektion bestimmter Individuen einer Population, die eine Teilimmunität gegenüber speziellen Erregern aufweisen, erfolgt bei dauerhafter Erregerexposition und einer hohen Mortalitätsrate vor der Fortpflanzung [Stead, 1997]. Während die meisten Todesfälle durch Tuberkulose erst im höheren Alter auftreten, sind in asiatischen und afrikanischen Ländern eine Vielzahl von Menschen Erregern des MTB-Komplexes ausgesetzt. Varianten, die einen Schutz gegenüber dem Erreger vermitteln, werden immer erst im Laufe vieler Generationen ihre Frequenz in der exponierten Population erhöhen [Dean *et al.*, 2002].

Das bei Afrikanern häufiger vorkommende „g.760A“-Allel könnte somit einen gewissen Anteil an deren mutmaßlich erhöhter Suszeptibilität haben. Schutz vor oder Empfänglichkeit für Infektionskrankheiten werden wahrscheinlich nicht durch eine einzige Genvariante vermittelt werden, sondern durch das komplexe Zusammenspiel mehrerer Wirtsfaktoren geprägt sein. Tuberkulose wird als eine solche polygene Erkrankung angesehen. Dies zeigt sich an den zur Empfänglichkeit für Tuberkulose durchgeführten Fall-Kontroll-Studien und deren jeweils nur geringen genetischen Assoziationen [Bellamy, 2005].

Differenzierung der Mykobakterien und Verteilung der exonischen ALOX5-Variante

Bei 1617 Mykobakterien-Isolaten des ghanaischen Studienkollektivs wurde am Forschungszentrum Borstel eine Differenzierung der Mykobakterienspezies und der mykobakteriellen Genotypen durchgeführt. Bei einer Klassifizierung der Fälle dieser Arbeit nach den typisierten Mykobakterienspezies und mykobakteriellen Genotypgruppen zeigte bei dem Vergleich von mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen mit Kontrollen ein gegenüber der Verteilung in der Gesamtpopulation auf den Faktor 1,70 erhöhtes Vorkommen des „g.760A“-Allels in der Fallgruppe. Dagegen war die Verteilung von g.760A>G bei Fällen mit anderen assoziierten Genotypgruppen und den Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich.

Genotypen der *M. africanum* West-African-2-Gruppe kommen nahezu ausschließlich in Afrika vor. Auch das „g.760A“-Allel wurde fast nur bei Afrikanern identifiziert. Bei der Betrachtung von Fällen und ihren assoziierten Mykobakterien zeigte sich dann auch eine Korrelation von „g.760A“ mit Erregern der mykobakteriellen Genotypgruppe West-African 2. Dies war jedoch nach der Korrektur auf multiples Testen nicht mehr signifikant.

Es ist bekannt, dass mykobakterielle Genotypen meist eine charakteristische geographische Verteilung aufweisen [Hirsh *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2005; Gagneux & Small, 2007]. Dies ist unter anderem auf eine meist regional eingeschränkte Verbreitung von Tuberkulose-epidemien zurückzuführen. Daneben scheinen aber weitere Faktoren das Vorkommen bestimmter mykobakterieller Genotypen zu beeinflussen. Die weite Verbreitung des *M. tuberculosis* Beijing-Genotyps wurde mit dessen möglicher Resistenz gegenüber der Bacillus-Calmette-Guérin-Impfung, der Entwicklung einer Unempfindlichkeit gegenüber Pharmaka und der gesteigerten Vermehrung in Makrophagen des Wirtsorganismus begründet [Malik *et al.*, 2005]. Die 99,9 %ige Sequenzhomologie unter den mykobakteriellen Genotypen und die im Vergleich zu anderen Bakterien geringe genetische Variabilität hatten lange Zeit zu einer Unterschätzung der phänotypischen Charakteristika der verschiedenen Genotypen geführt. Die Differenzierung des mykobakteriellen Genoms orientiert sich jedoch nicht nur an äußeren Einflüssen, sondern offenbar auch an Eigenschaften des Wirts.

So zeigten phylogenetische Vergleiche von Isolaten nordamerikanischer Kaukasier mit denen europäischer Kaukasier eine höhere Übereinstimmung als andere transkontinentale Vergleiche. In San Francisco, USA, wurden von 1990 bis 2002 Mykobakterien-Isolate gesammelt und typisiert. Dabei wurde beobachtet, dass die mykobakteriellen Genotypen häufig mit dem Herkunftsland des Patienten korrelierten, auch wenn dieser in den USA ansässig war [Hirsh *et al.*, 2004]. Trotz der Möglichkeit einer epidemiologischen und soziologischen Erklärung dieses Phänomens ist dies ein weiteres starkes Argument für die Vermutung, dass genetische Wirtsfaktoren bei einer Erkrankung an Tuberkulose durch bestimmte mykobakterielle Genotypen eine entscheidende Rolle spielen [Malik *et al.*, 2005; Gagneux *et al.*, 2006].

Das „g.760A“-Allel könnte ein solcher Wirtsfaktor sein, an dessen Spezifität sich insbesondere Genotypen der *M. africanum* West-African-2-Gruppe adaptiert haben könnten. Das um den Faktor 1,70 erhöhte Vorkommen des „g.760A“-Allels bei Fällen, die mit *M. africanum* West-African 2 assoziiert sind, könnte auf eine besonders starke Anfälligkeit der „g.760A“-Träger gegenüber diesem mykobakteriellen Genotyp weisen.

Zur Aufklärung einer möglichen Wechselwirkung kann die Untersuchung der Virulenz, Pathogenität und Infektiosität der verschiedenen mykobakteriellen Genotypen beitragen. Von besonderem Interesse ist die phänotypische Ausprägung der zur phylogenetischen Einteilung verwendeten Deletionen (*region of differences*; RDs) im mykobakteriellen Genom [Ernst *et al.*, 2007]. In ersten Ansätzen wurden die durch die Deletionen verloren gegangenen kodierenden Bereiche identifiziert und mögliche phänotypische Konsequenzen diskutiert. So könnten z.B. bestimmte mykobakterielle Genotypen die Immunabwehr des Wirts umgehen oder eine höhere Virulenz bedingen [Tsolaki *et al.*, 2004]. Ebenso wichtig ist

aber auch ein Verständnis der Vorgänge in der Wirtszelle nach der Infektion oder während der Persistenz eines bestimmten mykobakteriellen Genotyps [Nau *et al.*, 2002; Dubnau *et al.*, 2002; Ernst *et al.*, 2007]. Die Lipidzusammensetzung der Zellwand von Mykobakterien kann immunologische Prozesse in der Wirtszelle beeinflussen [Mendelson M *et al.*, 2005]. So induzierten Lipide des *M. tuberculosis*-CDC1551-Genotyps eine Th1-spezifische Immunreaktion, während durch Lipide des *M. tuberculosis*-HN878-Genotyps ein Th1-spezifisches Zytokinprofil unterdrückt wird [Manca *et al.*, 2004]. Demnach könnten Erreger der West-African-2-Gruppe oder deren Zellbestandteile charakteristische immunologische Prozesse in der Wirtszelle induzieren. An diesen Prozessen könnten die 5-LO oder andere Enzyme beteiligt sein und genetisch bedingte Veränderungen der 5-LO den Verlauf der Krankheit beeinflussen. Denkbar ist auch, dass bestimmte mykobakterielle Genotypen, ähnlich wie *K. pneumoniae* und *T. gondii*, über endogene Lipoxygenasen verfügen und die LX- und LT-Synthese des Wirts und damit dessen Anfälligkeit gegenüber Infektionen beeinflussen [Baillie *et al.*, 1996; Aliberti *et al.*, 2002b].

Bei mit *M. bovis* assoziierten Infektionen kamen „A/A“-Genotypen 71,4-mal häufiger vor (Abbildung 9) als bei den Kontrollen. Obwohl die Ergebnisse statistische Signifikanz aufwiesen, ist die Anzahl von zehn Individuen in der Gruppe der mit *M. bovis* assoziierten Fälle nicht ausreichend, um eine valide Aussage zu treffen. Gleichwohl scheint die Verteilung der humanen Genotypen bei Infektionen mit *M. bovis* ähnlich derjenigen zu sein, die bei mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen beobachtet wird.

Aufgrund ihrer biochemischen Charakteristika wurde der Spezies *M. africanum* schon vor Einführung genetischer Marker eine taxonomische Stellung zwischen *M. tuberculosis* und *M. bovis* zugeteilt [Mostowy *et al.*, 2004]. Dies wurde durch einen Vergleich unterschiedlicher phylogenetischer Stammbäume bestätigt [Gagneux & Small, 2007]. Der hier verwendete und allgemein akzeptierte Stammbaum [Gagneux *et al.*, 2006] basiert auf dem Vorkommen bestimmter RDs im mykobakteriellen Genom. Die Genotypgruppe *M. africanum* West-African 2 unterscheidet sich nur durch das Fehlen der RD 702 von der Spezies *M. bovis*. Die anderen mykobakteriellen Genotypgruppen haben dagegen ein stark unterschiedliches Deletionen-Muster. Die nächst verwandte Genotypgruppe von *M. africanum* West-African 2, *M. africanum* West-African 1, weist bereits drei unterschiedliche RDs (RD 7, RD 8, RD 10) auf (vgl. Abbildung 2). Dies führte zu Spekulationen, wonach *M. africanum* ähnlichen evolutionären Einflüssen wie *M. bovis* ausgesetzt gewesen sein könnte und demnach nicht primär humanpathogene Eigenschaften aufgewiesen haben könnte [Smith *et al.*, 2006]. Die enge Verwandtschaft von *M. bovis* und *M. africanum* West-African 2 legte eine Zusammenfassung dieser beiden mykobakteriellen Genotypgruppen nahe.

In dieser Arbeit zeigte sich nach der Zusammenfassung der beiden mykobakteriellen Genotypgruppen, dass „g.760A“ 1,85-mal häufiger bei Individuen der mit *M. bovis* oder *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fallgruppe als in der Kontrollgruppe vertreten war. Damit ist das Risiko gegenüber dem 1,70-mal erhöhten Vorkommen des „g.760A“-Allels beim Vergleich der West-African-2-Gruppe mit Kontrollen leicht erhöht. Der Anstieg des Risikos wurde deutlicher, wenn man den Vergleich nicht auf Allel-, sondern auf Genotypebene anstellte. Während sich bei den bislang durchgeführten Vergleichen keine signifikant erhöhte Empfänglichkeit für Individuen eines bestimmten Genotyps zeigte, war bei einer Infektion mit *M. bovis* oder mit Erregern der West-African-2-Gruppe das relative Risiko des „AA“-Genotyp für ein Vorkommen in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 7,30 erhöht. Dies unterstützt die These einer von Deletionen im Wirtsgenom abhängigen immunologischen Reaktion und der nahen Verwandtschaft der Spezies *M. bovis* mit der Gruppe der West-African-2-Erreger.

Es ist bekannt, dass die Tuberkuloseinzidenz bei Männern höher als bei Frauen ist [Jimenez-Corona *et al.*, 2006]. Es ist allerdings umstritten, ob die Gründe hierfür in einer erhöhten Exposition gegenüber Erregern, dem Einfluss bestimmter sozio-ökonomischer Faktoren oder in einer genetischen Prädisposition liegen [Bellamy *et al.*, 2000; Lienhardt, 2001]. Bei der Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen der g.760G>A-Variante mittels logistischer Regression bei Fällen, die mit *M. africanum* West-African 2 assoziiert sind, und bei Kontrollen zeigte sich ein Einfluss des Geschlechts der Studienteilnehmer auf die Verteilung. Während die Allel-Verteilung zwischen Fällen und Kontrollen bei Frauen keine Unterschiede mehr aufwies, war bei Männern das Risiko der „g.760A“-Träger stärker ausgeprägt als in der Gesamtgruppe. Das Allel „g.760A“ kam 2,08-mal häufiger bei männlichen mit West-African 2 assoziierten Fällen als bei Kontrollen vor.

Das Männer/Frauen-Verhältnis des Studienkollektivs war etwa 2:1. Dennoch hatte das Kollektiv der Frauen eine ausreichende Größe, um eine unterschiedliche Verteilung erkennen zu lassen. Es ist daher theoretisch denkbar, dass der Geschlechtsunterschied bei der Verteilung des „g.760A“-Allels bei Infektionen mit *M. africanum* West-African 2 einen Beitrag zum generell erhöhten Tuberkuloserisiko von Männern beiträgt. Naheliegender ist jedoch eine geschlechtsspezifische Regulation der 5-LO. Da *ALOX5* auf Chromosom 10 und nicht auf einem Geschlechtschromosom liegt, wäre aber nur eine Regulation der Genexpression durch geschlechtstypische Mediatoren möglich. Hierzu liegen bisher keine Daten vor.

Es ist vorstellbar, dass die Verteilung der humanen Genotypen durch andere Faktoren beeinflusst gewesen sein könnte. Die klinischen Parameter und Medikamentenresistenzen,

die im Rahmen eines Fragebogens und durch Untersuchungen bestimmt worden waren, korrelierten jedoch nicht mit der Verteilung der Genotypen.

Zusammenfassend begünstigt das Allel „g.760A“ das Risiko einer klinisch relevanten Tuberkulose. Dieses Risiko ist bei Infektionen mit Erregern der *M. africanum* West-African-2-Gruppe oder *M. bovis* stark erhöht. Die genetischen Ergebnisse legten eine Untersuchung der funktionellen Auswirkungen des durch g.760G>A kodierten Austauschs von Glutaminsäure mit Lysin an der Aminosäureposition 254 (p.Glu254Lys) der 5-LO nahe.

4.3. Funktionelle Untersuchung des Aminosäureaustauschs p.Glu254Lys der 5-Lipoxygenase

Der Einfluss des Aminosäureaustauschs p.Glu254Lys auf die Aktivität der 5-LO wurde bisher noch nicht untersucht. Daher wurden die Expression der mutierten 5-LO in geeigneten Zellkulturen und eine nachfolgende Aktivitätsbestimmung sowie eine Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zu bereits bekannten funktionell wichtigen Aminosäuren durchgeführt.

5-Lipoxygenase-Aktivität in *Escherichia coli*-Zellen

Escherichia coli-Bakterien sind bei einfachen Kultivierungsbedingungen und guter Transformierbarkeit hervorragend zur Expression von Enzymen geeignet. Bei Experimenten mit in *E. coli* exprimierten Enzymen handelt es sich jedoch um ein artifizielles *in vitro*-System, in welchem in der Regel die Aktivitätsbestimmung nicht in intakten Zellen, sondern in aufgereinigten Lysaten erfolgt. Ein solcher Ansatz stellt eine Methode dar, bei der sich *in vivo*-Bedingungen nur unzureichend simulieren lassen, da die 5-LO dann nicht den regulatorischen Prozessen in der Zelle unterworfen ist und als überexprimiertes Enzym vorliegt. Aufgrund der einfachen Durchführung wurden dennoch *E. coli*-Zellen mit dem Wildtyp-5-LO-Plasmid (254Glu-5-LO) und dem durch ortsgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*) modifizierten 5-LO-Plasmid (254Lys-5-LO) transformiert.

Die Bestimmung der 5-LO-Aktivität erfolgte nach Inkubation des *E. coli*-Zelllysats mit dem Substrat Arachidonsäure sowie den zusätzlichen Faktoren Calcium (Ca^{++}), Adenosin-triphosphat (ATP) und Phosphatidylcholin, die normalerweise zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*)-basierter Quantifizierung der durch die 5-LO unter diesen Bedingungen synthetisierten Produkte trans-Leukotrien B_4 (trans-LTB $_4$), epi-trans-Leukotrien B_4 (epi-trans-LTB $_4$) und 5(S)-Hydroxy-6-trans-8,11,14-cis-Eicosatetraensäure (5-HETE) wurde auf die Aktivität der 5-LO geschlossen. Es wurden die

Auswirkungen der Inkubationszeit, Substrat- und Enzymkonzentration sowie der Menge an zugegebenem Ca^{++} , ATP und Phosphatidylcholin auf die Synthese der 5-LO-Produkte untersucht.

Der Aminosäureaustausch an Position 254 liegt sterisch in der Peripherie des katalytischen Zentrums (vgl. Abbildung 5). Die Aminosäuren His367, His372, His550, Asn554 und Ile673 wurden als die Liganden des koordinativ im katalytischen Zentrum gebundenen Eisens charakterisiert [Zhang *et al.*, 1993; Hammarberg *et al.*, 1995; Rådmark *et al.*, 2007]. Daher erschien es zunächst unwahrscheinlich, dass sich die Aktivität der beiden 5-LO-Formen unter optimalen Bedingungen unterscheiden würde. Dies zeigte sich auch bei ersten Versuchen, bei welchen die Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO nahezu identisch waren. Da aber bei der Aktivierung der 5-LO weitere Faktoren (s.o.) eine Rolle spielen, könnten durch Veränderung ihrer Konzentration oder der Inkubationszeit Unterschiede zwischen der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO besser erkennbar werden.

Eine Bestimmung der 5-LO-Aktivität im *E. coli*-Lysat erfordert die Zugabe von Arachidonsäure, da in *E. coli*-Zellen keine endogenen Stoffwechselwege für deren Bereitstellung existieren [Chiou *et al.*, 2004]. Ausgehend von theoretischen Überlegungen erschien es zunächst denkbar, dass die bislang eingesetzten Arachidonsäure-Konzentrationen zu einer Substratsättigung der 5-LO geführt haben könnten. Zur Abschätzung einer möglichen Beeinflussung der Substratbindung und des Einflusses der oben erwähnten zugegebenen Faktoren wurde die sterische Position des Basenaustauschs p.Glu254Lys mit den jeweils anderen relevanten Aminosäurepositionen anhand eines Modells der 5-LO-Tertiärstruktur verglichen (vgl. Abbildung 5). Die Lokalisation der Arachidonsäure-Bindungsstellen im 3-dimensionalen-Modell der 5-LO ist bisher jedoch nicht gelungen. In Analogie zur 15-LO werden jeweils eine Bindungsstelle im katalytischen Teil sowie eine weitere im N-terminalen Teil der 5-LO vermutet [Romanov *et al.*, 2006]. Denkbar war, dass eine durch den Basenaustausch p.Glu254Lys verursachte Konformationsänderung des Enzyms zu einer modifizierten Substratbindungskapazität geführt haben könnte. Der Einsatz variierender suboptimaler Arachidonsäure-Konzentrationen sollte weiteren Aufschluss bringen. Es zeigte sich jedoch, dass die 5-LO-Aktivitäten des Wildtyps und der Mutante in gleichem Maße bei steigender oder sinkender Arachidonsäure-Konzentration zu- oder abnahmen.

In eine ähnliche Richtung zielten die Experimente der 5-LO-Aktivitätsbestimmung bei verminderter Enzymkonzentration. Eine mögliche Überdeckung von Aktivitätsunterschieden durch eine zu große 5-LO-Menge sollte durch bis zu zehnfache Verdünnungen der unter optimalen Bedingungen verwendeten Konzentrationen untersucht werden. Während bei der höchsten 5-LO-Konzentration die Aktivität der 254Glu-5-LO höher war, zeigte sich bei

geringeren Enzymkonzentrationen eine leicht erhöhte Aktivität der 254Lys-5-LO. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Ein großer Teil der Arachidonsäure-Umsetzung erfolgt unter den definierten Standard-Reaktionsbedingungen (3.5.2) während der ersten drei Minuten der Inkubation. Daher war es denkbar, dass die beiden 5-LO-Formen eine unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen könnten. Zur Untersuchung der Kinetik der 5-LO-Reaktion wurden zu acht Reaktionszeitpunkten die synthetisierten 5-LO-Produkte quantifiziert. Zusätzlich wurde die Bestimmung bei vier verschiedenen 5-LO-Konzentrationen durchgeführt. Als diskriminierende Messgröße diente der aus der Menge der synthetisierten 5-LO-Produkte errechnete Zeitpunkt der halbmaximalen 5-LO-Aktivität. Es bestätigte sich, dass in den ersten Minuten bereits der größte Anteil der Arachidonsäure umgesetzt wird, da die halbmaximale Aktivität unabhängig von Enzymkonzentration und 5-LO-Form spätestens nach 40 Sekunden erreicht war. Erwartungsgemäß war bei einer hohen Enzymkonzentration die Umsetzung beschleunigt. 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO unterschieden sich hinsichtlich des Zeitpunkts der halbmaximalen Aktivität nicht signifikant voneinander. Allerdings zeigte sich bei den beiden niedrigsten Verdünnungsstufen nach Erreichen der maximalen Menge an 5-LO-Produkten eine signifikant höhere 5-LO-Aktivität der Mutante gegenüber der Aktivität des Wildtyps. Dies widerspricht auf den ersten Blick den Ergebnissen der Versuche bei variierenden 5-LO-Konzentrationen, da auch bei niedrigen Enzymkonzentrationen keine signifikant höhere Aktivität der Mutante gegenüber der des Wildtyps vorlag. Im Unterschied zu der Darstellung bei variierenden Enzymkonzentrationen wurden die Messwerte im Kinetik-Versuch jedoch nicht absolut in der Einheit Nanogramm, sondern als relativer Anteil der Aktivität der 254Glu-5-LO zum Endzeitpunkt der Messung angegeben. Hierdurch wurden die doch erheblichen Schwankungen der absoluten Zahlen zwischen den einzelnen Versuchsreihen nivelliert. Die teilweise stark unterschiedlichen Aktivitäten zwischen den unter identischen Bedingungen durchgeführten Versuchsreihen lassen sich zum einen durch die Instabilität der 5-LO und den damit verbundenen Aktivitätsverlust während weniger Stunden, zum anderen durch die mäßige Reproduzierbarkeit der *E. coli*-Transformation und 5-LO-Enzymproduktion erklären. Bei allen weiteren Versuchen wurde neben den absoluten Werten in Nanogramm auch immer die relative Aktivität berechnet. Die um etwa 20 % erhöhte Aktivität der 254Lys-5-LO gegenüber der 254Glu-5-LO spiegelt nicht zwangsläufig die Situation in der intakten Zelle oder die Bedingungen *in vivo* wieder. Vielmehr mussten weitere Versuche durchgeführt werden, um diese ersten Anhalte für eine gesteigerte Aktivität der 254Lys-5-LO zu bestätigen.

Daher wurde die 5-LO-Aktivität in Abwesenheit von Ca^{++} untersucht. Calcium-Ionen sind entscheidend an der Aktivierung der 5-LO beteiligt [Puustinen *et al.*, 1988]. Durch die Bindung an 5-LO neutralisiert Ca^{++} in der intakten Zelle die stark negativ geladene C2-

Region und erhöht dadurch den hydrophoben Charakter des Enzyms und damit dessen Fähigkeit zur Membranassoziation [Kulkarni *et al.*, 2002]. Im zellfreien System wird durch Ca^{++} , vermutlich über eine Konformationsänderung der verantwortlichen Seitenketten, die Bindung an exogen zugeführtem Phosphatidylcholin verbessert [Kulkarni *et al.*, 2002]. Ca^{++} ist damit, unabhängig von dem verwendeten Testsystem, ein wichtiger, dabei jedoch kein essentieller Faktor der 5-LO-Aktivierung. Die Bindung von Ca^{++} erfolgt in der N-terminalen Region der 5-LO über die Aminosäurepositionen Asn34, Asp44 und Glu46 [Hammarberg & Rådmark, 1999; Hammarberg *et al.*, 2000]. Aufgrund der räumlichen Distanz zwischen dem Aminosäureaustausch p.Glu254Lys und den Zielstrukturen der Calcium-Ionen war eine Beeinflussung des Ca^{++} -Bindungsverhaltens bereits im Vorfeld unwahrscheinlich (vgl. Abbildung 5). Dennoch war es theoretisch möglich, dass eine der beiden 5-LO-Formen die Abwesenheit von Ca^{++} besser kompensieren könnte. Durch den Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure durch das positiv geladene Lysin könnte die für die Membranassoziation notwendige Neutralisierung der Ladung des Enzyms weniger stark ins Gewicht fallen. Während sich jedoch die wichtige Rolle von Ca^{++} durch um 90 % erniedrigte 5-LO-Aktivitäten bei dessen Abwesenheit bestätigte, war die Abnahme bei beiden 5-LO-Formen im gleichen Maße ausgeprägt. Eine Beeinflussung des Ca^{++} -Bindungsverhaltens oder eine durch Ladungsänderung verbesserte Kompensierung eines Ca^{++} -Mangels durch 254Lys-5-LO lag demnach offensichtlich nicht vor.

Die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Ca^{++} zeigte sich bei Aufzeichnung der Kinetikkurven in Abwesenheit von Ca^{++} . Der Zeitpunkt der halbmaximalen Aktivität war beim Wildtyp erst nach 82,5 Sekunden und bei der Mutante nach 91,2 Sekunden erreicht. Die benötigte Zeitspanne war damit 3- bis 8-mal länger als bei Inkubationen in Anwesenheit von Ca^{++} . Es waren aber weder signifikante Unterschiede hinsichtlich des kinetischen Reaktionsverlaufs noch Aktivitätsunterschiede zwischen 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO erkennbar.

Der C2-Region mit den dort lokalisierten Ca^{++} -Bindungsschleifen kommt in der Zelle eine Schlüsselstellung in der bei endogener Arachidonsäure-Bereitstellung notwendigen Translokation an die Nukleusmembran zu. Diese Translokation scheint über in diesem Bereich lokalisierte Tryptophanseitenketten, in Mutationsstudien als Trp13, Trp75 und Trp102 charakterisiert, spezifisch an Phosphatidylcholin-Moleküle zu erfolgen [Kulkarni *et al.*, 2002]. In zellfreien Assays kann Phosphatidylcholin exogen zugeführt und die Bindung an die 5-LO simuliert werden [Skorey & Gresser, 1988]. Trotz der räumlichen Distanz der Aminosäureposition 254 vom N-terminalen Ende mit der C2-Domäne wurde eine mögliche Beeinflussung durch Inkubationen bei unterschiedlichen Phosphatidylcholin-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Ca^{++} untersucht. Die 5-LO-Aktivität war in Abwesenheit von Ca^{++} stärker

von der Phosphatidylcholin-Konzentration abhängig als in dessen Anwesenheit. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante trat jedoch nicht auf.

Der Redox-Status des Eisens im katalytischen Zentrum hat für die Aktivität der 5-LO eine große Bedeutung. Die Oxidation von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) durch Lipidhydroperoxide ist essentiell für die Aktivierung der 5-LO [Hammarberg *et al.*, 2001]. Eine durch den Aminosäureaustausch induzierte sterische Veränderung der Struktur des katalytischen Teils der 5-LO und ein damit einhergehender verbesserter oder verschlechterter Angriffspunkt für Oxidationsmittel war aufgrund der bereits erwähnten Lokalisation des Aminosäureaustauschs unwahrscheinlich. Dagegen war aber die Möglichkeit einer Beeinflussung der noch nicht identifizierten Bindungsstellen für Lipidhydroperoxide nicht auszuschließen. Durch die Zugabe von Glutathion-Peroxidase (Gpx) werden Lipidhydroperoxide reduziert. Dies führt zu einer verminderten Fe^{2+} -Oxidation und damit zu einer reduzierten 5-LO-Aktivität [Bürkert *et al.*, 2003]. Ziel war es, durch Reduktion der Lipidstrukturen mittels Gpx eventuelle LOOH-Bindungsstellen einer der beiden 5-LO-Formen aufdecken zu können. Daher wurden Experimente mit unterschiedlichen Mengen Gpx-haltiger MM6-Zellysate in Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt. Es zeigte sich aber, dass die Aktivität beider 5-LO-Formen im gleichen Maße abnahm.

Die primär durchgeführten Experimente zum Einfluss der Gpx wurden ohne Ca^{2+} durchgeführt, da dieses bis zu einem gewissen Grad den hemmenden Einfluss der Gpx auf die 5-LO-Aktivität verhindert. Der Mechanismus des Ca^{2+} -vermittelten Schutzes ist noch nicht geklärt. Es wurde aber beobachtet, dass 5-LO-Konstrukte ohne N-terminale Ca^{2+} -Bindungsstelle anfälliger gegenüber Gpx waren. Somit könnte dieser Region eine wichtige Funktion beim Schutz vor Gpx zukommen. Möglicherweise wird über Ca^{2+} -Bindung und die damit verbundene Erhöhung der Hydrophobizität die Bindung an LOOH verbessert, wodurch eine Oxidation des katalytischen Eisens auch bei suboptimalen LOOH-Konzentrationen gewährleistet sein könnte [Bürkert *et al.*, 2003]. Obwohl eine Interaktion der Aminosäureposition 254 mit dieser Region durch vorangegangene Experimente und die bereits erwähnte deutliche sterische Distanz unwahrscheinlich war, wurden auch in Anwesenheit von Ca^{2+} Versuche durchgeführt. Die Abnahme der Aktivität der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO war jedoch auch in Anwesenheit von Ca^{2+} sowie bei verschiedenen Gpx-Konzentrationen nahezu identisch.

Die Umsetzung der Arachidonsäure zu LTA_4 durch 5-LO ist eine zweistufige Reaktion und verläuft über das Zwischenprodukt 5-H(p)ETE. LTA_4 und 5-H(p)ETE sind äußerst instabil und werden im verwendeten Zellsystem unmittelbar in LTB_4 -Isomere und 5-HETE umgesetzt, die in der HPLC quantifiziert werden können. Daher lässt sich anhand des Verhältnisses von 5-HETE zu trans-LTB_4 und epi-trans-LTB_4 eine möglicherweise unterschiedliche Ausprägung

dieser beiden enzymatischen Syntheseschritte bei Wildtyp und Mutante überprüfen. Es ist bislang nicht bekannt, welche Faktoren diese Verteilung beeinflussen könnten. Hier zeigte sich, dass bei kurzen Inkubationszeiten oder niedrigen Enzymkonzentrationen überwiegend 5-HETE gebildet wurde. Erst bei höheren 5-LO-Konzentrationen oder einer langen Inkubationsdauer kam es zur Bildung der LTB₄-Isomere. Zu jedem Zeitpunkt und bei jeder Verdünnungsstufe waren die 5-HETE-Konzentrationen höher als die der LTB₄-Isomere. Der Grund hierfür könnte die schnell einsetzende irreversible Umwandlung der 5-H(p)ETE zu 5-HETE sein. Beide 5-LO-Formen zeigten jedoch ein identisches Oxygenase/LTA₄-Synthase Verhältnis.

Die Versuche in *E. coli*-Zellen haben gezeigt, dass 254Lys-5-LO bei niedrigen Enzymkonzentrationen 20 % bis 30 % stärker aktiv ist als 254Glu-5-LO. Diese Unterschiede sind aber nur dann signifikant, wenn die Aktivität in jedem Teilversuch ins Verhältnis zur Aktivität des Wildtyps gesetzt wird und nicht, wenn diese absolut in Nanogramm angegeben werden. Die Detektion kleiner funktioneller Unterschiede bei großen Fehlerschwankungen ist das wesentliche Problem biologischer Zellsysteme. Möglicherweise könnten sich die wahrscheinlich gering vorhandenen Unterschiede in intakten Zellsystemen stärker ausprägen, da die 5-LO dort den regulatorischen Prozessen in der Zelle unterworfen ist. Daher wurden zur weiteren Aufklärung Versuche in HeLa-Zellen durchgeführt.

5-Lipoxygenase-Aktivität in HeLa-Zellen

Versuche in HeLa-Zellen sind dazu geeignet, sich *in vitro* den physiologischen Bedingungen im Menschen anzunähern. In HeLa-Zell-basierten Assays ist eine Stimulierung der 5-LO in der intakten Zelle möglich. HeLa-Zellen verfügen, im Gegensatz zu *E. coli*, über endogene Arachidonsäure, Enzym-Glykosilierungen, Phosphorylierungskaskaden und über eine Enzym-Translokation an Membranen. Somit könnten sich Auswirkungen des Aminosäureaustauschs p.Glu254Lys auf die bei 5-LO-Aktivierung wichtigen Prozesse der Membranlokalisation und Phosphorylierung in einer modifizierten 5-LO-Aktivität widerspiegeln. Eine Beeinflussung der 5-LO-Phosphorylierung lag deshalb nahe, da der Aminosäureaustausch in unmittelbarer Nähe der Phosphorylierungsstellen Ser271 [Werz *et al.*, 2002b] und sterisch nicht weit entfernt von einer weiteren Phosphorylierungsstelle, Ser523 [Luo *et al.*, 2004], lokalisiert ist (vgl. Abbildung 5). Die Aktivierung der 5-LO in HeLa-Zellen erfolgte über die Stimulation mit einem Ca⁺⁺-Ionophor. Durch die Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran und den Influx von Calcium-Ionen kommt es zur Initialisierung von Phosphorylierungskaskaden (*mitogen-activated protein kinases*; MAPK, *extracellular signal-regulated kinases*; ERK) und zur Translokation der 5-LO an die Zellmembran. Eine mögliche endogene Arachidonsäure-Bereitstellung durch Phospholipase A₂ (PLA₂) wurde durch exogen

zugeführte Arachidonsäure ersetzt. Somit war die 5-LO-Aktivität unabhängig von der PLA₂-Aktivität.

Die Stimulation der mit dem jeweiligen 5-LO-Plasmid transfizierten HeLa-Zellen mit einem Calcium-Ionophor führte bei allen eingesetzten Arachidonsäure-Konzentrationen zu einer Aktivierung, die jedoch gering ausgeprägt war. Eine signifikant unterschiedliche Aktivität der beiden 5-LO-Formen wurde nicht beobachtet. Grundsätzlich musste für alle Versuche gewährleistet sein, dass sich die 5-LO-Konzentrationen der beiden 5-LO-Formen nicht unterschieden. Daher wurde immer exakt der gleichen Anzahl Zellen die gleiche Menge Plasmid-DNA im gleichen Zeitraum zugegeben. Dies wurde durch *Western-Blot*-Analysen überprüft. Eine weitere Kontrolle war die Aktivitätsbestimmung der HeLa-Zellhomogenate von Wildtyp und Mutante. Eine signifikant nicht unterschiedliche Aktivität war ein Hinweis auf eine gleiche 5-LO-Enzymmenge von 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO, da im zellfreien System die Aktivitäten der beiden 5-LO-Formen unter fast allen Bedingungen identisch waren.

Für die relativ niedrige 5-LO-Aktivität in intakten HeLa-Zellen könnte das Fehlen des in HeLa-Zellen nicht exprimierten FLAP verantwortlich sein. Daher wurde eine Kotransfektion eines FLAP-Plasmids mit den 5-LO-Plasmiden vorgenommen. Dies führte zu einer etwa zwei- bis sechsfach erhöhten 5-LO-Aktivität in der intakten Zelle. Bei der Kotransfektion waren die Unterschiede bei den verschiedenen Arachidonsäure-Konzentrationen deutlicher. Die genaue Funktion von FLAP ist aber ebenso wenig aufgeklärt wie die Wechselwirkung zwischen FLAP und 5-LO. Es wird vermutet, dass FLAP als Transferprotein in der Nukleusmembran die abgespaltene Arachidonsäure der 5-LO zuführt [Mancini *et al.*, 1993]. Eine Beeinflussung der Funktion von FLAP durch den Aminosäureaustausch p.Glu254Lys war demnach vorstellbar. Außerdem zeigte 254Lys-5-LO bei hohen Arachidonsäure-Konzentrationen eine leicht erhöhte Aktivität gegenüber 254Glu-5-LO. Die Fehlerschwankungen zwischen unterschiedlichen Versuchsreihen waren jedoch zu groß, so dass hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp-5-LO und der mutierten 5-LO vorlag. Analog zu den Versuchen in *E. coli* wurden auch hier die Werte der sechs Einzelversuche jeweils auf die Aktivität der 254Glu-5-LO bezogen und der Mittelwert berechnet. Hier zeigte sich ein Trend ($P = 0,065$) für eine 20 %ige Steigerung der Aktivität der 254Lys-5-LO gegenüber der 254Glu-5-LO. Unter bestimmten Umständen stimmen also die Befunde in HeLa-Zellen mit denen aus dem *E. coli*-System überein.

Ein weiterer wichtiger Schritt der 5-LO-Aktivierung in der intakten Zelle ist die Translokation der 5-LO an die Nukleusmembran. Die Translokation findet auch in HeLa-Zellen nach erfolgreicher Stimulierung mit einem Ca⁺⁺-Ionophor statt. Nach der Auftrennung der Zellkompartimente in die Zytosol- und Membranfraktion wurden die in der jeweiligen Fraktion enthaltenen 5-LO-Mengen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Banden in der Membran-

fraktion unabhängig der Ca^{++} -Ionophor-Aktivierung und der Kotransfektion mit FLAP in etwa die gleiche Intensität aufwiesen. Die Banden der zytosolischen Fraktion waren wesentlich schwächer ausgeprägt. Bei alleiniger 5-LO-Transfektion zeigte sich sowohl ohne Ionophor-Zugabe als auch nach Stimulation eine schwache Bande im Zytosol. Gleiches galt auch für FLAP-positive Transfektionen, die nicht mit einem Ionophor stimuliert worden waren. Im Gegensatz dazu wurde nach Stimulation mit einem Ionophor und der Kotransfektion von FLAP keine sichtbare Bande in der zytosolischen Fraktion erhalten. Demnach wurde die 5-LO nur dann vollständig an die Membran transloziert, wenn zum einen mit einem Ionophor stimuliert und zum anderen FLAP kotransfiziert wurde. Durch die getrennte Entwicklung der *Western-Blot*-Membranen der zytosolischen und der membranösen Fraktion war eine Angabe zum Anteil der an die Membran translozierten Menge nicht möglich. Das primäre Ziel des Versuchs war es jedoch, eine möglicherweise unterschiedliche Verteilung der beiden 5-LO-Formen nachzuweisen. Hier zeigte sich aber, dass das Ausmaß der Translokation der 254Glu-5-LO und 254Lys-5-LO nicht unterschiedlich war.

Unter allen durchgeführten Bedingungen waren damit in HeLa-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen der 254Glu-5-LO und der 254Lys-5-LO zu erkennen. Ein Trend für eine leicht erhöhte Aktivität der 254Lys-5-LO zeigte sich nach Kotransfektion von FLAP bei hohen Arachidonsäure-Konzentrationen. Die Beobachtung einer leicht erhöhten Aktivität der 254Lys-5-LO entspricht den Versuchen in *E. coli* bei niedrigen Enzymkonzentrationen. Da „g.760A“-Allel-Träger in der Fallgruppe häufiger vorkommen als bei den Kontrollen, könnte dies bedeuten, dass eine erhöhte 5-LO-Aktivität die Entwicklung einer klinischen Tuberkulose begünstigt. Die Steigerung der 5-LO-Aktivität könnte bei den betroffenen Individuen zu einer Erhöhung der LX-Spiegel und einer daraus resultierenden Hemmung der Zellen der angeborenen Immunität sowie zu einer Blockierung der die Th1-Differenzierung induzierenden Zytokine führen.

Der Trend einer erhöhten Aktivität der 254Lys-5-LO ist zwar bei den meisten Versuchen zu erkennen, dennoch hätten die Unterschiede bei allen Versuchsbedingungen, insbesondere im intakten Zellsystem, eindeutiger ausfallen müssen. Möglicherweise sind solche kleinen Unterschiede in den verwendeten Zellsystemen nicht eindeutig darzustellen.

4.4. Assoziation des VNTR-Polymorphismus mit dem Risiko einer Tuberkulose

Verteilung des VNTR-Polymorphismus

Bei der zweiten genotypisierten Variante handelt es sich um Insertionen oder Deletionen eines Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotivs (GGGCGG) im Promotor von *ALOX5* (ab -144 Basenpaare, bp, stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts). Die Variante wurde im Rahmen zahlreicher Assoziationsstudien innerhalb verschiedener Ethnien genotypisiert [vgl. 1.2.7]. Das Motiv wurde in anderen Populationen bisher mit zwei bis acht aufeinander folgenden Kopien gefunden. Außerdem liegen zu dieser repetitiven Promotorvariante bereits funktionelle *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen vor [In *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998; Kalayci *et al.*, 2006]. Assoziationen der Anzahl der Kopien mit anderen lungenspezifischen Phänomenen wie z.B. dem Schweregrad des Analgetika-Asthmas oder dem Ansprechen auf eine Asthmamedikation, aber auch mit Arteriosklerose wurden beschrieben [vgl.1.2.7]. Die ethnische Abstammung der Individuen korreliert mit der Frequenz der verschiedenen Allele und Genotypen.

Bei Kaukasiern kamen Allele mit 5 Kopien („5“-Allel) des Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotivs bei etwa 75 % der Individuen vor. Das „4“-Allel kam bei ca. 25 % vor. In geringer Anzahl trat das „6“-Allel auf. In Einzelfällen wurden auch das „2“-, „3“-, „7“- und „8“-Allel identifiziert. Der mit bis zu 77 % häufigste Genotyp hatte auf beiden Allelen fünf Kopien („5/5“-Genotyp) [Drazen *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2002; Sayers *et al.*, 2003; Dwyer *et al.*, 2004; Kalayci *et al.*, 2006; Poole *et al.*, 2006]. Auch bei Asiaten war das „5“-Allel am häufigsten vertreten. Es wurde jedoch nur noch bei der Hälfte der Individuen gefunden. Dagegen hatten sich bei Asiaten die Frequenzen des „4“-Allels und „6“-Allels erhöht. Der „5/5“-Genotyp kam bei einem Drittel der Individuen vor und war damit häufigster Genotyp [Kim *et al.*, 2005a]. Unter Afroamerikanern ist das „5“-Allel ebenfalls am häufigsten, doch ist dort das Vorkommen des „3“-Allels im Vergleich zu den anderen Ethnien stark erhöht. Entsprechend hat dort der „3/5“-Genotyp die höchste Frequenz [Lima *et al.*, 2005].

In der vorliegenden Arbeit kam das „3“-Allel am häufigsten vor. Das „5“-Allel war nur noch am zweithäufigsten, gefolgt vom „4“-, „6“- und „2“-Allel. Häufigste Genotypen waren der „3/5“- und der „3/3“-Genotyp. Die „2/2“-, „2/3“-, „2/4“- und „3/6“-Genotypen wurden in dieser Population zum ersten Mal beschrieben.

Auffällig ist die Abnahme der Anzahl der Sp1-Bindungsstellen von Kaukasiern über Asiaten und Afroamerikaner bis zu der ghanaischen Population. Die Ergebnisse der Genotypisierung der repetitiven Promotorvariante in einem überwiegend kaukasischen Kollektiv

des Bernhard-Nocht-Instituts in Hamburg waren kongruent mit dem bisher beschriebenen Verteilungsmuster in verschiedenen Ethnien. Das „5“-Allel und der „5/5“-Genotyp waren am häufigsten. Bei jeweils einem Individuum wurden der „3/3“- bzw. „4/4“-Genotyp identifiziert. Der Träger des „3/3“-Genotyps war der einzige nordafrikanische und der Träger des „4/4“-Genotyps der einzige asiatische Teilnehmer der Studie. Die Größe der Gruppe war aber sehr gering, da die Genotypisierung in erster Linie zur Identifizierung von heterozygoten Individuen für mögliche *in vivo* Expressions- und Aktivitätsuntersuchungen durchgeführt wurde.

Der VNTR-Polymorphismus weist damit, so wie die exonische g.760G>A-Variante, ein ethno-spezifisches Verteilungsmuster der Allele und Genotypen auf. Dies könnten wiederum analog zu den Überlegungen bei der Verteilung der exonischen *ALOX5*-Variante Anzeichen für Selektion in Richtung eines bestimmten Allels in einer von einer bestimmten Krankheit stark betroffenen Population sein.

Assoziation des VNTR-Polymorphismus mit Tuberkulose

Die Verteilung der Allele in der Gruppe der Patienten mit Lungentuberkulose und der Gruppe der gesunden Kontrollen war nicht signifikant unterschiedlich. Die 13 identifizierten Genotypen ließen sich in Bezug auf ihre Verteilung zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe statistisch kaum auswerten. Das Problem der hohen Anzahl unterschiedlicher Genotypen hatte sich auch schon in vorangegangenen Assoziationsstudien zu dieser Variante gestellt. Eine auf funktionellen Untersuchungen basierende Zusammenfassung der Genotypen erleichtert jedoch die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. In HeLa-Zellen wurde die veränderte Expression eines Reportergens (*Chloramphenicol-Acetyl-Transferase*) in Abhängigkeit der Anzahl der Sp1-Bindungsstellen eines in einen Vektor klonierten cDNA-Fragments des *ALOX5*-Promotors untersucht [In *et al.*, 1997]. Es wurden *ALOX5*-Promotor-Fragmente mit drei, vier, fünf und sechs Kopien untersucht. Das Konstrukt mit fünf Kopien zeigte im Vergleich zu den Vektoren mit drei, vier und sechs Kopien die effektivste Expression des Reportergens. Bei letzteren war die Expression signifikant um 20 bis 35 % erniedrigt. Unterschiede zwischen dem „3“-, „4“- und „6“-Allel waren dagegen nicht signifikant [In *et al.*, 1997]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Bindungskapazität für Sp1- und Egr-1-Transkriptionsfaktoren, die *ALOX5*-mRNA-Mengen sowie die Sekretion von Leukotrien C₄ bei Individuen, die homozygot fünf Kopien aufwiesen, gegenüber Individuen mit mindestens einem „nicht-5“-Allel erhöht waren [Kalayci *et al.*, 2006]. Daher wurden alle Allele, die nicht fünf Kopien des Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsmotivs zwischen den Positionen -176 und -144 bp aufwiesen, als „nicht-5“-Allel bezeichnet. Hieraus ergaben sich drei Genotypgruppen: die „5/5“-Genotypgruppe mit fünf Kopien auf beiden Allelen, die „5/nicht-5“-

Genotypgruppe mit einem „5“- und einem „nicht-5“-Allel und die „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe mit zwei „nicht-5“-Allelen. Diese Einteilung wurde erstmalig bei Untersuchungen einer möglichen Assoziation des VNTR-Polymorphismus mit dem Schweregrad des Asthma bronchiale bzw. dem Ansprechen auf die Therapie angewendet [Drazen *et al.*, 1999] und hat sich in den vergangenen Jahren als die gängige Einteilung durchgesetzt. Reporterassays bezüglich des Einflusses des VNTR-Polymorphismus wurden auch in Schneider-Zellen durchgeführt. In diesen Zellen war die Expression bei sechs Kopien des Sp1-Bindungsmotivs am höchsten, während sie bei einer Verringerung der Kopienzahl proportional abnahm [Silverman *et al.*, 1998]. Diese Ergebnisse wurden jedoch bislang nicht als Grundlage der Einteilung der Genotypgruppen verwendet. Im Übrigen wäre die damit verbundene Änderung hier nur minimal, da das „6“-Allel in der vorliegenden Arbeit nur mit einem Anteil von 1,2 % vorkam.

In den bisher durchgeführten Assoziationsstudien zum Einfluss des VNTR-Polymorphismus auf bestimmte Erkrankungsrisiken und Therapieerfolge wurde die „5/5“-Genotypgruppe als Wildtyp bezeichnet und war gleichzeitig die Basiskategorie bei der Auswertung der statistischen Verteilung. Diese Einteilung gründete zum einen auf den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen, zum anderen darauf, dass das „5“-Allel in allen untersuchten Populationen am häufigsten vertreten war. In der vorliegenden Arbeit war jedoch ein „nicht-5“-Allel, das „3“-Allel, am häufigsten vertreten. Die „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe war somit mit 43,8 % die größte Genotypgruppe, gefolgt von der „5/nicht-5“-Genotypgruppe mit 39,4 % und der „5/5“-Genotypgruppe mit 16,8 %. Daher werden die Ergebnisse der Genotypisierungen mit der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe als Basiskategorie diskutiert.

Danach hatten Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe gegenüber Individuen der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe ein um den Faktor 1,19 erhöhtes Risiko, in der Fallgruppe vertreten zu sein. Analog den Beobachtungen bei der Verteilung der exonischen *ALOX5*-Variante hätte man jedoch auch für die Promotorvariante ein erhöhtes Vorkommen der „nicht-kaukasischen“ „nicht-5“-Allele bei den Fällen erwartet.

Differenzierung der Mykobakterien und Verteilung des VNTR-Polymorphismus

Bei ausschließlicher Betrachtung von Fällen und den assoziierten mykobakteriellen Genotypgruppen wurde eine Korrelation des „4“-Allels mit Infektionen von Erregern der *M. tuberculosis* East-Asian-Gruppe beobachtet. Das Vorkommen des „4“-Allels war in dieser Gruppe um den Faktor 2,58 erhöht. Das „4“-Allel kommt verhältnismäßig häufig bei Asiaten vor [Kim *et al.*, 2005a] und könnte somit für die in Asien häufig vertretenen Genotypen der *M. tuberculosis* East-Asian-Gruppe [Gagneux & Small, 2007] prädisponieren. Da die Fallzahl beim Vergleich des Vorkommens des „4“-Allels bei mykobakteriellen Genotypen der East-

Asian-Gruppe sehr gering war, bedarf es zur Verifizierung des Ergebnisses weiterer Untersuchungen.

Individuen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe waren sowohl bei dem Vergleich von *M. tuberculosis* Euro-American-Fällen mit Kontrollen als auch beim Vergleich *M. africanum* West-African 2 infizierter Individuen mit Kontrollen häufiger in der Fallgruppe vertreten. Bei Infektionen mit Erregern der *M. tuberculosis* Euro-American-Gruppe erhöhte sich das relative Risiko gegenüber der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe von 1,19 in der Gesamtgruppe auf 1,32. Bei Infektionen mit *M. africanum* West-African 2 war jedoch kein signifikanter Vorteil der „nicht-5/nicht-5“-Genotypen gegenüber den „5/nicht-5“-Genotypen mehr vorhanden. Stattdessen bestand ein Trend für einen Schutz der Individuen der „5/5“-Genotypgruppe gegenüber der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe.

Es fällt auf, dass sich bei Individuen der in Afrika vorherrschenden *ALOX5*-VNTR-Genotypgruppe „nicht-5/nicht-5“ der relative Schutz gegenüber der „5/nicht-5“-Gruppe bei Fokussierung auf die ebenfalls für Afrika typischen Vertretern der mykobakteriellen West-African-2-Genotypgruppe verlor. Diese Beobachtung verhält sich analog zu dem erhöhten Risiko der „g.760A“-Träger der exonischen *ALOX5*-Variante gegenüber Erregern der West-African-2-Genotypgruppe. Auf der anderen Seite verliert sich der Trend für einen Schutz der „5/5“-Genotypgruppe beim Vergleich von mit *M. tuberculosis* Euro-American infizierten Fällen und Kontrollen.

Funktionelle Auswirkungen des VNTR-Polymorphismus

Die Reporterassays zum Einfluss des VNTR-Polymorphismus in HeLa- und Schneider-Zellen sowie die Bestimmung der 5-LO-mRNA bei Individuen unterschiedlichen VNTR-Genotyps legen eine erniedrigte *ALOX5*-Expression und eine damit ebenfalls reduzierte 5-LO-Aktivität für „nicht-5/nicht-5“-Genotypen nahe. Diese Gruppe mit mutmaßlich geringerer *ALOX5*-Expression hatte in der hier durchgeführten Assoziationsstudie eine erniedrigte Empfänglichkeit für Tuberkulose gegenüber den „5/nicht-5“-Genotypen. Das „5“-Allel könnte in der Gruppe der „5/nicht-5“-Genotypen die geringere Expression des „nicht-5“-Allels kompensieren. Damit wären die Ergebnisse im Einklang mit denen der exonischen Variante, bei welcher eine möglicherweise erhöhte 5-LO-Aktivität ebenfalls mit einem größeren Risiko einer manifesten Tuberkulose assoziiert war. Auffällig ist jedoch, dass die „5/5“-Genotypgruppe, die die höchste *ALOX5*-Expression zeigen sollte, nicht mit einem erhöhten Risiko für Tuberkulose assoziiert war.

Die funktionellen *in vitro*-Untersuchungen stellen ein artifizielles Testsystem dar, das nicht zwangsläufig die Vorgänge beim Menschen widerspiegeln muss. Darüber hinaus sind auch

die Ergebnisse der Reporterassays in verschiedenen Zellsystemen uneinheitlich [In *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998]. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine komplette Deletion der Sp1-Bindungsmotive im Promotor von *ALOX5* zu einer vergleichsweise geringen Reduktion der Expression von 42 bis 47 % geführt hatte [Schnur *et al.*, 2007]. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Assoziation des Koronararterien-Durchmessers mit dem *ALOX5*-VNTR-Polymorphismus lassen dagegen auf eine verminderte Genexpression bei „nicht-5“-Allelen schließen [Dwyer *et al.*, 2004]. Die Reporterassays wurden in Zellen durchgeführt, die keine endogene 5-LO exprimieren und reflektieren somit nur unzureichend die *in vivo*-Situation [In *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998]. Daher bedarf es zur sicheren Abschätzung des Ausmaßes der Expression weiterer mRNA- und LT-/LX-Spiegel-Bestimmungen im Blut von Patienten mit unterschiedlichen VNTR-Genotypen [Kalayci *et al.*, 2006].

Möglicherweise ist nicht grundsätzlich eine Erniedrigung der 5-LO-Expression bzw. der 5-LO-Aktivität für eine erhöhte Empfänglichkeit für Tuberkulose ausschlaggebend, sondern eine Störung des LT/LX-Gleichgewichts. Diese Störung kann durch höhere oder niedrigere 5-LO-Aktivität bedingt sein. Außerdem hängt die LT/LX-Homöostase von der Regulierung und Aktivität weiterer Enzyme und Zellen ab. LX entstehen in der Regel durch Interaktion 5-LO-positiver Zellen mit der in Thrombozyten exprimierten 12-LO sowie der Verstoffwechslung von LTA_4 mit der in Epithelzellen vorliegenden 15-LO [Maddox *et al.*, 1997]. Bei Alveolarmakrophagen wurde aber bereits deren Fähigkeit zur endogenen LX-Synthese aus Arachidonsäure nachgewiesen [Chavis *et al.*, 1992].

Die Ernährung übt einen weiteren Einfluss auf die Synthese von 5-LO-Produkten aus. Eine n-3-fettsäurenreiche Ernährung führt zu einer verminderten LT-Synthese [Gibson *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1985; Dwyer *et al.*, 2004]. Ein typischer Vertreter dieser Stoffklasse, die Eicosapentaensäure, stellt auf enzymatischer Ebene einen Antagonisten der Arachidonsäure dar und kommt vorwiegend in Fischen vor. Anhand von epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass auch das Tuberkuloserisiko durch die Ernährung beeinflusst sein könnte. Inuit, die sich überwiegend von Fischen ernähren, haben beispielsweise ein besonders hohes Tuberkuloserisiko [Schneider, 2005]. Der direkte Zusammenhang der Ernährung mit dem Risiko einer Tuberkulose und der 5-LO-Aktivität wurde in Meeresschweinchen gezeigt. Diese hatten bei erhöhter n-3-Fettsäuren-Zufuhr sowohl erniedrigte LT-Spiegel als auch eine erhöhte Mykobakterienlast in der Milz [Mayatepek *et al.*, 1994].

Der VNTR-Polymorphismus hat also einen Einfluss auf die Expression von *ALOX5*. Außerdem scheinen bestimmte Genotypen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Tuberkulose assoziiert zu sein. Noch unklar ist allerdings, in welchem Maße die einzelnen Allele insbesondere bei heterozygoten Individuen *in vivo* die Expression beeinflussen und welche Rolle andere Enzyme und nutritive Faktoren hierbei spielen.

4.5. Interaktion und Verteilung der Haplotypen

Interaktion der Varianten und Haplotypen

Mittels logistischer Regression wurde berechnet, dass sich die Variante g.760G>A und der VNTR-Polymorphismus in ihrer Verteilung bei Fällen und Kontrollen gegenseitig beeinflussten. Dies konnte jedoch vernachlässigt werden, da eine Interaktion ausschließlich beim „A/A“-Genotyp und „5/5“-Genotyp auftrat und insgesamt nur zehn Individuen diese Kombination aufwiesen.

Dennoch zeigte sich bei der Verteilung der errechneten Haplotypen bei Fällen und Kontrollen ein um den Faktor 1,50 erhöhtes Risiko des „nicht-5/g.760G“-Haplotyps gegenüber dem „nicht-5/g.760A“-Haplotyp. Dies ist ein Hinweis auf einen stärkeren Einfluss des „760G“-Allels. Analog zeigte die Auftrennung der VNTR-Genotypgruppen in einzelne Allele ein erhöhtes relatives Risiko des „3/g.760A“-Haplotyps gegenüber dem „3/g.760G“-Haplotyp für eine klinische Tuberkulose.

Die Differenzierung in mykobakterielle Genotypgruppen zeigte eine ähnliche Tendenz wie beim VNTR-Polymorphismus. So war beim Vergleich von mit *M. africanum* West-African 2 assoziierten Fällen und Kontrollen der „nicht-5/g.760A“-Haplotyp weiterhin mit einem erhöhten relativen Risiko für Tuberkulose assoziiert, während bei Infektionen mit Erregern der Euro-American-Gruppe der „5/g.760G“-Haplotyp gegenüber dem „nicht-5/g.760G“-Haplotyp ein leicht erhöhtes Risiko aufwies. Dies unterstützt die bereits diskutierte These einer erhöhten Empfänglichkeit der in Afrika verhältnismäßig häufigen Allele („nicht-5“, „g.760A“) für die Entwicklung einer manifesten Tuberkulose bei Infektionen mit Mykobakterien der West-African-2-Gruppe und einer möglichen Assoziation der bei Kaukasiern häufigen Allele („5“, „g.760G“) mit Erregern der Euro-American-Gruppe.

4.6. Ausblick

Die genetischen Befunde der vorliegenden Arbeit zeigten ein erhöhtes Risiko einer manifesten Tuberkulose für Träger des „g.760A“-Allels der *ALOX5*-Variante g.760G>A. Gleichwohl konnten in *in vitro*-Modellen keine konsistenten signifikanten Veränderungen der 5-LO-Aktivität durch die Variante g.760G>A beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch ein starker Trend für eine erhöhte Aktivität der 254Lys-5-LO. Somit wäre durch den Basenaustausch eine Veränderung der LT/LX-Homöostase in Richtung erhöhter LX-Spiegel vorstellbar. Weiterhin kamen die mit einer niedrigen *ALOX5*-Expression assoziierten Genotypen des VNTR-Polymorphismus häufiger bei den Kontrollen vor. Die gefundenen Assoziationen waren außerdem abhängig vom dem die Infektion verursachenden mykobakteriellen Genotyp. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der durchgeführten Experimente starke Indizien für eine entscheidende Rolle der 5-LO in der Abwehr einer Infektion mit Erregern des MTB-Komplexes.

Die Ergebnisse bedürfen weiterführender Untersuchungen. Auf molekularbiologischer Ebene ergeben sich folgende Schwerpunkte:

- Genotypisierung weiterer *ALOX5*-Varianten und Berechnung ihrer Verteilung bei Fällen und Kontrollen
- Genotypisierung weiterer Genvarianten von Enzymen des 5-LO-Stoffwechselwegs (PLA₂, FLAP, 12-LO, 15-LO)

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen zu den genotypisierten Varianten führen zu folgenden weiteren Ansätzen:

- *In vitro*-Assays zum Einfluss von Phosphorylierungen auf die 5-LO-Aktivität
- Bestimmungen der *ALOX5*-Expression, 5-LO-Aktivität und LT/LX-Verhältnisse im Blut von Studienteilnehmern aus Ghana
- Untersuchung des Einflusses verschiedener mykobakterieller Genotypen auf die Aktivität der 5-LO *in vitro*
- Bestimmung der 5-LO-Aktivität in PMN nach Inkubation mit Tuberkulostatika

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Verteilung von zwei *ALOX5*-Genvarianten in einer Gruppe an Lungentuberkulose erkrankter Patienten (n = 2004) im Vergleich mit derjenigen in einer aus gesunden Individuen bestehenden Kontrollgruppe (n = 2366) in Ghana. Weiterhin sollten durch zellbiologische Verfahren die möglichen Einflüsse der Varianten auf die Funktion der durch *ALOX5* kodierten 5-Lipoxygenase (5-LO) bestimmt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die exonische *ALOX5*-Variante g.760G>A eine unterschiedliche Verteilung bei Fällen und Kontrollen aufwies. Es zeigte sich, dass das „g.760A“-Allel signifikant häufiger in der Gruppe der Tuberkulosefälle vertreten war. Diese unterschiedliche Verteilung von „g.760A“ wurde insbesondere beim Vergleich von mit Mykobakterien der Gruppe *Mycobacterium africanum* West-African 2 assoziierten Fällen mit Kontrollen deutlich.

Des Weiteren wurde die Verteilung des *variable number of tandem repeats* (VNTR)-Polymorphismus (zwischen den Basenpaarpositionen -147 und -158/-182) im *ALOX5*-Promotor bestimmt. Bei diesem *repeat* handelt es sich um eine putative Sp1-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle, deren Bindungsmotiv hier in zwei bis sechs Kopien vorlag. Keines der fünf Allele wies eine signifikant unterschiedliche Verteilung bei Fällen und Kontrollen auf. Die Genotypen wurden nach einer auf funktionellen Kriterien basierenden Einteilung in den drei Gruppen der „5/5“-Genotypen, „5/nicht-5“-Genotypen und „nicht-5/nicht-5“-Genotypen zusammengefasst. Auf der Grundlage dieser Einteilung zeigte sich bei Fällen ein erhöhtes Vorkommen der „5/nicht-5“-Genotypgruppe gegenüber der „nicht-5/nicht-5“-Genotypgruppe. Haplotypen, die sich aus der exonischen Variante g.760G>A und dem VNTR-Polymorphismus ergaben, wurden ebenfalls auf ihre Verteilung in der Studiengruppe untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Frequenz des „nicht-5/g.760A“-Haplotyps gegenüber dem „nicht-5/g.760G“-Haplotyp in der Fallgruppe.

Im zweiten Teil wurden die Auswirkungen des aus der Variante g.760G>A resultierenden Austauschs von Glutaminsäure mit Lysin an der Aminosäureposition 254 (p.Glu254Lys) der 5-LO untersucht. Mögliche Unterschiede zwischen der Wildtyp-5-LO („g.760G“, 254Glu-5-LO) und der mutierten 5-LO („g.760A“, 254Lys-5-LO) wurden nach Expression der beiden 5-LO-Formen in *Escherichia coli* und HeLa-Zellen durch nachfolgende 5-LO-Aktivitätsassays unter verschiedenen Bedingungen untersucht. In einzelnen Fällen zeigte sich eine Signifikanz oder ein starker Trend für eine leicht erhöhte Aktivität der 254Lys-5-LO.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der durchgeführten Experimente starke Indizien für eine entscheidende Rolle der 5-LO in der Abwehr einer Infektion mit Erregern des *M. tuberculosis*-Komplex.

5. SUMMARY

The object of the present study was to determine the distribution of two *ALOX5* variants in a group of patients (n = 2004) with pulmonary tuberculosis and in exposed, apparently healthy controls (n = 2366) in Ghana. In addition, functional experiments were performed to define the influence of the exonic variant on amount and activity of *ALOX5*-encoded 5-lipoxygenase (5-LO).

First, genotype frequencies of the exonic *ALOX5* variant g.760G>A were compared between cases and controls. The allele "g.760A" was significantly associated with a higher incidence of tuberculosis. Stratification by mycobacterial lineages revealed that the allelic association was largely due to the occurrence of "g.760A" among cases associated with the lineage *Mycobacterium africanum* West-African 2.

Furthermore, frequencies of polymorphisms of a variable number of tandem repeats (VNTR; located between base pair position -147 to -158/-182 base pairs) of the *ALOX5* promoter were analyzed. The repeats are targets for binding of the transcription factor Sp1. Insertions or deletions of the Sp1-binding motif resulted in variant alleles of two to six copies. No significant differences were found when comparing frequencies of alleles between cases and controls. Based on functional criteria, genotypes were combined for further analyses in groups of the genotypes "5/5", "5/non-5" and "non-5/non-5". In the combined analysis, the genotype group "5/non-5" occurred significantly more frequently among cases than among controls. When frequencies of estimated haplotypes comprising the exonic alleles "g.760G" and "g.760A" and the grouped VNTR alleles "non-5" and "5" were analyzed, the "non-5/g.760A" haplotype was significantly more frequent among cases than the "non-5/g.760G" haplotype.

Second, functional implications of the resulting base exchange of glutamic acid and lysin at position 254 (p.Glu254Lys) of 5-LO were determined. Wildtype 5-LO ("g.760G"; 254Glu-5-LO) and mutant 5-LO ("g.760A"; 254Lys-5-LO) were expressed in *Escherichia coli* and HeLa cells and 5-LO activity was measured under various experimental conditions in both systems. In part, a significance or a strong trend for a higher activity of the 254Lys-5-LO were observed.

In summary the observations contribute evidence of the importance of 5-lipoxygenase to the regulation of immune responses to agents of the *M. tuberculosis*-complex.

6. LITERATUR

Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ (1993) 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem*, **215**,105-11.

Adam O (2004) Einfluss von n-3-Fettsäuren auf den normalen und pathologischen Immunstatus des Menschen. *Aktuel Ernaehr Med*, **29**, 178-82.

Aharony D, Stein RL (1986) Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*, **261**, 11512-9.

Akahoshi M, Nakashima H, Miyake K, Inoue Y, Shimizu S, Tanaka Y, Okada K, Otsuka T, Harada M (2003) Influence of interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum Genet*, **112**, 237-43.

Algood HM, Lin PL, Flynn JL (2005) Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis*, **41**, 189-93.

Aliberti J., Hieny, S., Reis e Sousa, C., Serhan, C.N., Sher, A. (2002a) Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat. Immunol.*, **3**, 76-82.

Aliberti J, Serhan C, Sher A (2002b) Parasite-induced lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med*, **196**, 1253-62.

Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN (2003) Aspirin-triggered lipoxin A₄ and B₄ analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF- α secretion from human T cells. *J Immunol*, **170**, 6266-72.

Awomoyi AA, Nejentsev S, Richardson A, Hull J, Koch O, Podinovskaia M, Todd JA, McAdam KP, Blackwell JM, Kwiatkowski D *et al.* (2004) No association between interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism and pulmonary tuberculosis in a Gambian population sample. *Thorax*, **59**, 291-4.

Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, Aliberti J (2005) Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest*, **115**,1601-6.

- Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M (1996) Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol*, **157**, 5221-4.
- Baker L, Brown T, Maiden MC, Drobniewski F (2004) Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*, **10**, 1568-77.
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., Diaz, B.L., Cordeiro, R.S., Jose, P.J., Martins, M.A., Serhan, C.N. (2000) Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. *J Immunol*, **164**, 2267-2271.
- Barksdale L, Kim KS (1977) *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev*, **41**, 217-372.
- Bates JH, Stead WW (1993) The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am*, **77**, 1205-17.
- Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, Ruwende C, Gie R, Samaai P, Bester D, Meyer M, Corrah T, Collin M *et al.* (2000) Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 8005-8009.
- Bellamy R (2005) Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chest Med*, **26**, 233-46.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 513-23.
- Borrel A (1920) Pneumonie et tuberculose chez les troupes noires. *Annals des Institut Pasteur*, **34**, 105-15.
- Borgeat P, Samuelsson B (1979) Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 2148-52.
- Brändli O (1998) The clinical presentation of tuberculosis. *Respiration*, **65**, 97-105.
- Bray RA, Brahmi Z (1986) Role of lipooxygenation in human natural killer cell activation. *J Immunol*, **136**, 1783-90.
- Brill KJ, Li Q, Larkin R, Canaday DH, Kaplan DR, Boom WH, Silver RF (2001) Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect Immun*, **69**, 1755-65.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K *et al.* (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 3684-9.
- Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR (1987) Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, **156**, 985-9.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V *et al.* (2006) BMC Microbiol. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, **6**, 23.

Brungs M, Rådmark O, Samuelsson B, Steinhilber D (1995) Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 107-11.

Bürkert E, Arnold C, Hammarberg T, Rådmark O, Steinhilber D, Werz O (2003) The C2-like beta-barrel domain mediates the Ca²⁺ dependent resistance of 5-lipoxygenase activity against inhibition by glutathione peroxidase-1. *J Biol Chem*, **278**, 42846-53.

Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA (1969) Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ*, **41**, 21-43.

Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P (1999) The Nramp1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc Assoc Am Physicians*, **111**, 283-9.

Casaova JL, Abel L (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*, **20**, 581-620.

Clish CB, O'Brian JA, Gronert K, Stahl GL, Petasis NA, Serhan CN (1999) Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 8247-52.

Chan J, Flynn JL (2004) The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol*, **110**, 2-12.

Chavis C, Godard P, Crastes de Paulet A, Damon M (1992) Formation of lipoxins and leukotrienes by human alveolar macrophages incubated with 15(S)-HETE: a model for cellular cooperation between macrophages and airway epithelial cells. *Eicosanoids*, **5**, 203-11.

Chen XS, Funk CD (2001) The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem*, **276**, 811-8.

Chiou RY, Phillips RD, Zhao P, Doyle MP, Beuchat LR (2004) Ethanol-mediated variations in cellular fatty acid composition and protein profiles of two genotypically different strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 2204-10.

Choi JH, Park HS, Oh HB, Lee JH, Suh YJ, Park CS, Shin HD (2004) Leukotriene-related gene polymorphisms in ASA-intolerant asthma: an association with a haplotype of 5-lipoxygenase. *Hum Genet*, **114**, 337-44.

Clarkson MR, McGinty A, Godson C, Brady HR (1998) Leukotrienes and lipoxins: lipoxygenase-derived modulators of leukocyte recruitment and vascular tone in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, **13**, 3043-51.

Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M (2004) Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **71**, 185-90.

Coleman MD, Rathbone DL, Chima R, Lambert PA, Billington DC (2001) Preliminary in vitro toxicological evaluation of a series of 2-pyridylcarboxamidrazone candidate anti-tuberculosis compounds III. *Environ Toxicol Pharmacol*, **9**, 99-102.

Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, Delp-Archer C, Madara JL (1993) Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*, **92**, 75-82.

Comstock GW (1978) Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit survey. *Am Rev Respir Dis*, **117**, 621-4.

Cook-Moreau JM, El-Makhour-Hojeij J, Barriere G, Rabinovitch-Chable HC, Faucher KS, Sturtz FG, Rigaud MA (2007) Expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in T lymphocytes. *Immunology*, **122**, 157-66.

Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM (1995) The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, **84**, 423-32.

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM (2002) Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol*, **168**, 1322-7.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N *et al.* (2003) Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**, 1305-14.

Cummins SL (1908) Tuberculosis in the Egyptian Army. *Br J Tuberc*, **2**, 35.

Dahlen SE, Björk J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarström S, Lindgren JA, Samuelsson B (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 3887-91.

Damato JJ, Collins MT, McClatchy JK (1984) Niacin, nitrate and pyrazinamide studies using Middlebrook 7H10 Broth. *Eur J Clin Microbiol*, **3**, 546-9

Damon M, Chavis C, Daures JP, Crastes de Paulet A, Michel FB, Godard P (1989) Increased generation of the arachidonic metabolites LTB₄ and 5-HETE by human alveolar macrophages in patients with asthma: effect in vitro of nedocromil sodium. *Eur Respir J*, **2**, 202-9.

Davies PDO (1985) A possible link between vitamin D deficiency and impaired host defence to Mycobacterium tuberculosis. *Tubercle*, **66**, 301-6.

Dean M, Carrington M, O'Brian SJ (2002) Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human diseases. *5. Annu Rev Genomics Hum Genet*, **3**, 263-92.

Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C (1988) A one tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9878.

Denis M (1991) Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol*, **84**, 200-6.

Diehl K (1933) Erbuntersuchungen an Tuberkulösen Zwillingen. *Am Rev Tuberc*, **28**, 6.

Drazen JM, Yandava CN, Dubé L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, Israel E, Schork N, Silverman ES, Katz DA, Drajesk J (1999) Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet*, **22**, 168-70.

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ; Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Frémont C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B (2004) Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Pathol*, **164**, 49-57.

Dubnau E, Fontán P, Manganelli R, Soares-Appel S, Smith I (2002) Mycobacterium tuberculosis genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun*, **70**, 2787-95.

Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M (2004) Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, **350**, 29-37.

Dye C (2006) Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, **367**, 938-40.

Ernst JD, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N (2007) Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest*, **117**, 1738-45.

Fabre M, Koeck JL, LE Fleche P, Simon F, Herve V, Vergnaud G, Pourcel C (2004) High Genetic Diversity Revealed by Variable-Number Tandem Repeat Genotyping and Analysis of *hsp65* Gene Polymorphism in a Large Collection of “*Mycobacterium canettii*” Strains Indicates that the *M. tuberculosis* Complex Is a Recently Emerged Clone of “*M. canettii*”. *J Clin Microbiol*, **42**, 3248-55.

Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, Young HA, Wynn TA, Sher A (2006) NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate immune resistance and neutrophil response in T-cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, **177**, 7086-93.

Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Fyfe J, García-García L, Rastogi N, Sola C *et al.* (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol*, **188**, 759-72.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Malema S, Crampin AC, Fine PE, Hill AV (2004) Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, **71**, 341-9.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR (1993) An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*, **178**, 2249-54.

Flynn JL, Chan J (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, **19**, 93-129.

Flynn JL, Chan J (2003) Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol*, **15**, 450-5.

Förster TH (1948) Zwischennmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phy*, **2**, 55-75.

Fowler SJ, Hall IP, Wilson AM, Wheatley AP, Lipworth BJ (2002) 5-Lipoxygenase polymorphism and in-vivo response to leukotriene receptor antagonists. *Eur J Clin Pharmacol*, **58**, 187-90.

Fraser DA, Bulat-Kardum L, Knezevic J, Babarovic P, Matakovic-Mileusnic N, Dellacasagrande J, Matanic D, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z (2003) Interferon-gamma receptor-1 gene polymorphism in tuberculosis patients from Croatia. *Scand J Immunol*, **57**, 480-4.

Funk CD, Hoshiko S, Matsumoto T, Rådmark O, Samuelsson B (1989) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 2587-91.

Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC *et al.* (2006) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 2869-73.

Gagneux S, Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*, **7**, 328-37.

Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M, Gaskell SJ, Bonewald LF (1993) 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J Biol Chem*, **268**, 10087-94.

Ghosh J, Myers CE (1998) Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 13182-7.

Gibson RA, Neumann MA, James J, Hawkes JS, Hall C, Cleland (1992) Effect of n-3 and n-6 Dietary Fats on Lipoxygenase Products from Stimulated Rat Neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **46**, 87-91.

Gijon MA, Spencer DM, Siddiqi AR, Bonventre JV, Leslie CC (2000) Cytosolic phospholipase A2 is required for macrophage arachidonic acid release by agonists that Do and Do not mobilize Ca⁺⁺. Novel role of mitogen-activated protein kinase pathways in cytosolic phospholipase A2 regulation. *J Biol Chem*, **275**, 20146-56.

Gillmor SA, Villaseñor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF (1997) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol*, **4**, 1003-9.

Goh J, Godson C, Brady HR, Macmathuna P (2003) Lipoxins: pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation. *Gastroenterology*, **124**, 1043-54.

Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, Bozon MV, Uglialoro AM, Turbay D, Cohen C, Yunis EJ (1998) Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. *JAMA*, **279**, 226-8.

Gong Z, Hebert JR, Bostick RM, Deng Z, Hurley TG, Dixon DA, Nitcheva D, Xie D (2007) Common polymorphisms in 5-lipoxygenase and 12-lipoxygenase genes and the risk of incident, sporadic colorectal adenoma. *Cancer*, **109**, 849-57.

González P, Reguero JR, Lozano I, Morís C, Coto E (2007) A functional Sp1/Egr1-tandem repeat polymorphism in the 5-lipoxygenase gene is not associated with myocardial infarction. *Int J Immunogenet*, **34**, 127-30.

Goodman JE, Bowman ED, Chanock SJ, Alberg AJ, Harris CC (2004) Arachidonate lipoxygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk. *Carcinogenesis*, **25**, 2467-72.

Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F (2005) Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Infect Dis*, **11**, 1242-8.

Griffith DE (1997) Nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med*, **3**, 139-45.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V (2005), Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis, *PLoS Pathog*, **1**, e5.

Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA, Serhan CN (1999) Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J Exp Med*, **189**, 1923-30.

Haldane JBS (1949) Disease and evolution. *Ric Sci Suppl A*, **19**, 68-76.

Hammarberg T, Zhang YY, Lind B, Rådmark O, Samuelsson B (1995) Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem*, **230**, 401-7.

Hammarberg T, Rådmark O (1999) 5-lipoxygenase binds Ca⁺⁺. *Biochemistry*, **38**, 4441-7.

Hammarberg T, Provost P, Persson B, Rådmark O (2000) The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds Ca⁺⁺ and mediates Ca⁺⁺ stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem*, **275**, 38787-93.

Hammarberg T, Kuprin S, Rådmark O, Holgren A (2001) EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide. *Biochemistry*, **40**, 6371-8.

Hemak J, Gale D, Brock TG (2002) Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme. *J Mol Model*, **8**, 102-112.

Heym B, Alzari PM, Honoré N, Cole ST (1995) Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*, **15**, 235-45.

Hill AV (1992) Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **86**, 225-6.

Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM (2004) Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 4871-6.

Hoshiko, S., Rådmarck, O., Samuelsson, B. (1990) Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 9073-77.

In KH, Asano K, Beier D, Grobholz J, Finn PW, Silverman EK, Silverman ES, Collins T, Fischer AR, Keith TP *et al.* (1997) Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription, *J Clin Invest*, **99**, 1130-7.

Janssen-Timmen U, Vickers PJ, Wittig U, Lehmann WD, Stark HJ, Fusenig NE, Rosenbach T, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ (1995) Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 6966-70.

Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J *et al.* (2006) Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax*, **61**, 348-53.

Kalayci O, Birben E, Sackesen C, Keskin O, Tahan F, Wechsler ME, Civelek E, Soyer OU, Adalioglu G, Tuncer A *et al.* (2006) ALOX5 promoter genotype, asthma severity and LTC production by eosinophils. *Allergy*, **61**, 97-103.

Kallman FJ, Reisner D (1943) Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am Rev Tuberc*, **47**, 549.

Kang BK, Schlesinger LS (1998) Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Infect Immun*, **66**, 2769-77.

Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, Yang R, Uddin J, Guggino WB, Atabani SF *et al.* (2004) Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol*, **5**, 388-92.

Kato-Maeda M, Bifani PJ, Kreiswirth BN, Small PM (2001) The nature and consequence of genetic variability within Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Invest*, **107**, 533-7.

Kettaneh A, Seng L, Tiev KP, Tolédano C, Fabre B, Cabane J (2006) Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis of case-control studies. *Int J Tuberc Lung Dis*, **10**, 717-25.

Kim SH, Bae JS, Suh CH, Nahm DH, Holloway JW, Park HS (2005a) Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: a positive association with airway hyperresponsiveness. *Allergy*, **60**, 760-5.

Kim SH, Choi JH, Holloway JW, Suh CH, Nahm DH, Ha EH, Park CS, Park HS (2005b) Leukotriene-related gene polymorphisms in patients with aspirin-intolerant urticaria and aspirin-intolerant asthma: differing contributions of ALOX5 polymorphism in Korean population. *J Korean Med Sci*, **20**, 926-31.

Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L (2002) Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils. *Infect Immun*, **70**, 4591-9.

Klan N, Seuter S, Schnur N, Jung M, Steinhilber D (2003) Trichostatin A and structurally related histone deacetylase inhibitors induce 5-lipoxygenase promoter activity. *Biol Chem*, **384**, 777-85.

Koshino T, Takano S, Houjo T, Sano Y, Kudo K, Kihara H, Kitani S, Takaishi T, Hirai K, Ito K *et al.* (1998) Expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein mRNAs in the peripheral blood leukocytes of asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 510-3.

Kulkarni S, Das S, Funk CD, Murray D, Cho W (2002) Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*, **277**, 13167-74.

Kunitz F, Brodhun B, Hauer B, Haas W, Loddenkemper R (2007) Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland und weltweit. *Pneumologie*, **61**, 467-77.

Kunkel SL, Chensue SW, Mouton C (1984) Role of Lipoxygenase Products in Murine Pulmonary Granuloma Formation. *J Clin Invest*, **74**, 514-24.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.

Lange B (1930) Untersuchungen zur Klärung der Ursachen der im Anschluss an die Calmette-Impfung augetretenen Säuglingserkrankungen in Lübeck. *Zeitschr Tuberkulose*, **59**, 1-18.

Lange C, Schaberg T, Diel R, Greinert U (2006) Aktueller Stand der Tuberkulosedagnostik. *Dtsch Med Wochenschr*, **131**, 341-347.

Lederberg J (1999) J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. *Genetics*, **153**, 1-3.

Lee TH, Austen KF, Leitch AG, Israel E, Robinson DR, Lewis RA, Corey EJ, Drazen JM (1985) The effects of a fish-oil-enriched diet on pulmonary mechanics during anaphylaxis. *Am Rev Respir Dis*, **132**, 1204-1209.

Lee TH, Horton CE, Kyan-Aung U, Haskard D, Crea AE, Spur BW (1989) Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin Sci*, **77**, 195-203.

Lee TH, Crea AE, Gant V, Spur BW, Marron BE, Nicolaou KC, Reardon E, Brezinski M, Serhan CN (1990) Identification of lipoxin A4 and its relationship to the sulfidopeptide leukotrienes C4, D4, and E4 in the bronchoalveolar lavage fluids obtained from patients with selected pulmonary diseases. *Am Rev Respir Dis*, **141**, 1453-8.

Levy BD, Fokin VV, Clark JM, Wakelam MJ, Petasis NA, Serhan CN (1999) Polyisoprenyl phosphate (PIPP) signaling regulates phospholipase D activity: a 'stop' signaling switch for aspirin-triggered lipoxin A4. *FASEB J*, **13**, 903-11.

Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR, Kim E, Ackerman K, Schmidt BA, Szczeklik W, Drazen JM, Serhan CN (2002) Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat Med*, **8**, 1018-23.

Lewis RA, Austen KF (1984) The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest*, **73**, 889-97.

Lewis RA, Austen F, Soberman RJ (1990) Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med*, **323**, 645-55.

Li HT, Zhang TT, Zhou YQ, Huang QH, Huang J (2006) SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, **10**, 3-12.

Lienhardt C (2001) From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis. *Epidemiol Rev*, **23**, 288-301.

Lienhardt C, Fielding K, Sillah JS, Bah B, Gustafson P, Warndorff D, Palayew M, Lisse I, Donkor S, Diallo S *et al.* (2005) Investigation of the risk factors for tuberculosis: a case-control study in three countries in West Africa. *Int J Epidemiol*, **34**, 914-23.

Lima JJ, Zhang S, Grant A, Shao L, Tantisira KG, Allayee H, Wang J, Sylvester J, Holbrook J, Wise R *et al.* (2005) Influence of Leukotriene Pathway Polymorphisms on Response to Montelukast in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **173**, 379-85.

Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C (2002) Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet*, **29**, 371-4.

Luo M, Jones SM, Phare SM, Coffey MJ, Peters-Golden M, Brock TG (2004) Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem*, **279**, 41512-20.

Lurie MB (1941) Hereditary, constitution and tuberculosis. An experimental study. *Am Rev Tuberc*, **44**, 1-125.

Ma X, Reich RA, Gonzalez O, Pan X, Fothergill AK, Starke JR, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA (2003) No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*, **188**, 116-8.

Macini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wang Z, Prasit P, Vickers PJ (1993) 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett*, **318**, 277-81.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF (1997) Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 5243-8.

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN (1997) Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem*, **272**, 6972-8.

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. Bovis*. *J Bacteriol*, **178**, 1274-82.

Malik AN, Godfrey-Faussett P (2005) Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis*, **5**, 174-83.

Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE 3rd, Kaplan G (2004) Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun*, **72**, 5511-4.

Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M (1998) 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, **66**, 5140-6.

Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M (2001) Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, **69**, 2011-6.

Matsumoto T, Funk CD, Rådmark O, Höög JO, Jörnvall H, Samuelsson B (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 26-30.

Mayatepek E, Paul K, Leichsenring M, Pfisterer M, Wagner D, Domann M, Sonntag HG, Bremer HJ (1994) Influence of dietary (n-3)-polyunsaturated fatty acids on leukotriene B4 and prostaglandin E2 synthesis and course of experimental tuberculosis in guinea pigs. *Infection*, **22**, 106-112.

McGill KA, Busse WW (1996) Zileuton. *Lancet*, **348**, 519-24.

Mendelson M, Walters S, Smith I, Kaplan G (2005) Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, **85**, 407-13.

Meyer CG, May J, Stark K (1998) Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. *Trends Microbiol*, **6**, 148-54.

Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, Niemann S, Kremer K, Desmond EP, Kato-Maeda M, Behr M (2004) Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol*, **42**, 3594-9.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263-71.

Nagel RL, Fleming AF (1992) Genetic epidemiology of the beta s gene. *Baillieres Clin Haematol*, **5**, 331-65.

Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 1503-8.

Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J *et al.* (1996) Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*, **183**, 2293-302.

Nielsen OH, Bukhave K, Elmgreen J, Ahnfelt-Rønne I (1987) Inhibition of 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in human neutrophils by sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid. *Dig Dis Sci*, **32**, 577-82.

Niemann S, Harmsen D, Rüsç-Gerdes S, Richter E (2000) Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*, **38**, 3231-4.

Noguchi M, Miyano M, Matsumoto T, Noma M (1994) Human 5-lipoxygenase associates with phosphatidylcholine liposomes and modulates LTA4 synthetase activity. *Biochim Biophys Acta*, **1215**, 300-6.

Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL (1998) Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*, **19**, 491-4.

Pace E, Profita M, Melis M, Bonanno A, Paterno A, Mody CH, Spatafora M, Ferraro M, Siena L, Vignola AM *et al.* (2004) LTB₄ is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space. *Clin Exp Immunol*, **135**, 519-27.

Palmblad J, Malmsten CL, Uden AM, Rådmark O, Engstedt L, Samuelsson B (1981) Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*, **58**, 658-61.

Papayianni A, Serhan CN, Brady HR (1996) Lipoxin A₄ and B₄ inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol*, **156**, 2264-72.

Parkinson, J.F. (2006) Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets*, **5**, 91-106.

Parthé S, Hagmann W (1990) Inhibition of leukotriene omega-oxidation by isonicotinic acid hydrazide (isoniazid). *Eur J Biochem*, **187**, 119-24.

Percival MD, Denis D, Riendeau D, Gresser MJ (1992) Investigation of the mechanism of non-turnover-dependent inactivation of purified human 5-lipoxygenase. Inactivation by H₂O₂ and inhibition by metal ions. *Eur J Biochem*, **210**, 109-17.

Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, Sorgi CA, Soares EG, Carlos D, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH (2007) Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*, **9**, 483-9.

Peskar BM, Dreyling KW, May B, Schaarschmidt K, Goebell H (1987) Possible mode of action of 5-aminosalicylic acid. *Dig Dis Sci*, **32**, 51S-56S.

Peters-Golden M, McNish RW (1993) Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 147-53.

Peters-Golden M, Brock TG (2003) 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **69**, 99-109.

Pitrak DL, Bak PM, DeMarais P, Novak RM, Andersen BR (1993) Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest*, **167**, 1406-10.

Poole EM, Bigler J, Whitton J, Sibert JG, Potter JD, Ulrich CM (2006) Prostacyclin synthase and arachidonate 5-lipoxygenase polymorphisms and risk of colorectal polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **15**, 502-8.

Pouliot M, McDonald PP, Krump E, Mancini JA, McColl SR, Weech PK, Borgeat P (1996) Colocalization of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase, and 5-lipoxygenase-activating protein at the nuclear membrane of A23187-stimulated human neutrophils. *Eur J Biochem*, **238**, 250-8.

Puustinen T, Scheffer MM, Samuelsson B (1988) Regulation of the human leukocyte 5-lipoxygenase: stimulation by micromolar Ca²⁺ levels and phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **960**, 261-7.

Qu T, Manev R, Manev H (2001) 5-Lipoxygenase (5-LOX) promoter polymorphism in patients with early-onset and late-onset Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **13**, 304-5.

Rådmark O, Samuelsson B (2005) Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 102-10.

Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B (2007) 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci*, **32**, 332-41.

Raja A (2004) Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, **120**, 213-32.

Rajalingam R, Mehra NK, Jain RC, Myneedu VP, Pande JN (1996) Polymerase chain reaction-based sequence-specific oligonucleotide hybridization analysis of HLA class II antigens in pulmonary tuberculosis: relevance to chemotherapy and disease severity. *J Infect Dis*, **173**, 669-76.

Ramstedt U, Serhan CN, Nicolaou KC, Webber SE, Wigzell H, Samuelsson B (1987) Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action. *J Immunol*, **138**, 266-70.

Ratledge C (1976) The physiology of the mycobacteria. *Adv Microb Physiol*, **13**, 115-244.

Resendes KK, Rosmarin AG (2004) Sp1 control of gene expression in myeloid cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **14**, 171-81.

Riedel DD, Kaufmann SH (1997) Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with Mycobacterium tuberculosis and lipoarabinomannan. *Infect Immun*, **65**, 4620-3.

- Rieder HL (2003) Die Abklärung der Lübecker Säuglingstuberkulose. *Pneumologie*, **57**, 402-5.
- Riendeau D, Denis D, Choo LY, Nathaniel DJ (1989) Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation. *Biochem J*, **263**, 565-72.
- Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun*, **66**, 5314-21.
- Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF (1999) TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *J Immunol*, **162**, 6122-31.
- Rola-Pleszczynski M, Chavaillaz PA, Lemaire I (1986) Stimulation of interleukin 2 and interferon gamma production by leukotriene B₄ in human lymphocyte cultures. *Prostaglandins Leukot Med*, **23**, 207-10.
- Romanov S, Wiesner R, Myagkova G, Kuhn H, Ivanov I (2006) Affinity labeling of the rabbit 12/15-lipoxygenase using azido derivatives of arachidonic acid. *Biochemistry*, **45**, 3554-62.
- Rook GA (2007) Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med*, **7**, 327-37.
- Rouzer CA, Samuelsson B (1985) On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzyme purification and requirement for multiple stimulatory factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 6040-4.
- Rouzer CA, Samuelsson B (1986) The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. *FEBS Lett*, **204**, 293-6.
- Rouzer CA, Samuelsson B (1987) Reversible, Ca⁺⁺-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 7393-7.
- Rouzer CA, Kargman S (1998) Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem*, **263**, 10980-8.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-7.
- Saunders BM, Britton WJ (2007) Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*, **85**, 103-11.

Sayers I, Barton S, Rorke S, Sawyer J, Peng Q, Beghe B, Ye S, Keith T, Clough JB, Holloway JW *et al.* (2003) Promoter polymorphism in the 5-lipoxygenase (ALOX5) and 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) genes and asthma susceptibility in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy*, **33**, 1103-10.

Schaberg T, Forssbohm M, Hauer B, Kirsten D, Kropp R, Loddenkemper R, Magdorf K, Rieder H, Sagebiel D, Urbanczik R (2001) [Guidelines for drug treatment of tuberculosis in adults and childhood][Article in German]. *Pneumologie*, **55**, 494-511.

Schluger NW, Rom WN (1998) The Host Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **157**, 679-691.

Schneider E (2005) Tuberculosis among American Indians and Alaska Natives in the United States, 1993-2002. *Am J Public Health*, **95**, 873-880.

Schnur N, Seuter S, Katryniok C, Rådmark O, Steinhilber D (2007) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 1271-1282.

Schraufnagel DE (1999) Tuberculosis treatment for the beginning of the next century. *Int J Tuberc Lung Dis*, **3**, 651-62.

Schwarzer E, Ludwig P, Valente E, Arese P (1999) 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. *Parasitologia*, **41**, 199-202.

Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S *et al.* (2007) Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, **45**, 179-92.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, Colgan SP, Madara JL (1995) Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*, **34**, 9475-9.

Serhan CN (2007) Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, **25**, 101-137.

Serjeant GR (1989) Geography and the clinical picture of sickle cell disease. An overview. *Ann NY Acad Sci*, **565**, 109-19.

Shinnick TM, Good RC (1994) *Mycobacterium tuberculosis* taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **13**, 884-901.

Silverman ES, Du J, De Sanctis GT, Rådmark O, Samuelsson B, Drazen JM, Collins T (1998) Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **19**, 316-323.

Skamene E (1994) The Bcg gene story. *Immunobiology*, **191**, 451-60.

Skorey KI, Gresser MJ (1988) Calcium is not required for 5-lipoxygenase activity at high phosphatidyl choline vesicle concentrations. *Biochemistry*, **37**, 8027-34.

Smith NH, Gordon SV, de la Rúa-Domenech R, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG (2006) Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 670-81.

Sorg BL, Klan N, Seuter S, Dishart D, Rådmark O, Habenicht A, Carlberg C, Werz O, Steinhilber D (2006) Analysis of the 5-lipoxygenase promoter and characterization of a vitamin D receptor binding site. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 686-97.

Spanbroek R, Stark HJ, Janssen-Timmen U, Kraft S, Hildner M, Andl T, Bosch FX, Fusenig NE, Bieber T, Rådmark O *et al.* (1998) 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 663-8.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM (1997) Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 9869-74.

Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M (2006) Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, **6**, 570-81.

Steinhilber D (1994) 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm Acta Helv*, **69**, 3-14.

Steinhilber, D., Brungs, M., Werz, O., Wiesenberg, I., Danielsson, C., Kahlen, J.-P., Nayeri, S., Schröder, M., and Carlberg, C. (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem*, **270**, 7037-40.

Stenger S, Modlin RL (1999) T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 89-93.

Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP (1990) Racial differences in susceptibility to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med*, **322**, 422-7.

Stead WW (1997) The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med*, **18**, 65-77.

Stead WW (2001) Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics? *J Tuberc Lung Dis*, **5**, 983.

Sud D, Bigbee C, Flynn JL, Kirschner DR (2006) Contribution of CD8+ T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, **176**, 4296-314.

Surette ME, Krump E, Picard S, Borgeat P (1999) Activation of leukotriene synthesis in human neutrophils by exogenous arachidonic acid: inhibition by adenosine A(2a) receptor agonists and crucial role of autocrine activation by leukotriene B(4). *Mol Pharmacol*, **56**, 1055-62.

Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*, **197**, 121-7.

Tornhamre S, Edenius C, Smedegard G, Sjöquist B, Lindgren JA (1989) Effects of sulfasalazine and sulfasalazine analogue on the formation of lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Eur J Pharmacol*, **169**, 225-34.

Tso HW, Lau YL, Tam CM, Wong HS, Chiang AK (2004) Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *J Infect Dis*, **190**, 913-9.

Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, Goguet de la Salmoniere YO, Aman K, Kato-Maeda M *et al.* (2004) Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 4865-70.

Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere YO, Kreiswirth BN, van Soolingen D, Small PM (2005) Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, **43**, 3185-91.

Türk EE (2006) Tuberkulose. *Rechtsmedizin*, **3**, 143-150.

Tufariello JM, Chan J, Flynn JL (2003) Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*, **3**, 578-90.

Uhl J, Klan N, Rose M, Entian KD, Werz O, Steinhilber D (2002) The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem*, **277**, 4374-9.

Ulrichs T, Kaufmann SH (2003) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*, **208**, 261-9.

Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, Chanez P (2005) Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J Allergy Clin Immunol*, **115**, 55-60.

Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J *et al.* (1997) A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, **47**, 1236-45.

Van Soolingen D (2001) Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med*, **249**, 1-26.

Van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*, **4**, 739-49.

Van Dyke TE, Serhan CN (2003) Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, **82**, 82-90.

Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P (1995) The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disrupting the Nramp1 gene. *J Exp Med*, **182**, 655-66.

Weatherall DJ (1996) Host genetic and infectious disease. *Parasitology*, **112**, 23-9.

Wedi B, Kapp A (2001) Pathophysiological role of leukotrienes in dermatological diseases: potential therapeutic implications. *BioDrugs*, **15**, 729-43.

Weinblatt ME, Kremer JM, Coblyn JS, Helfgott S, Maier AL, Petrillo G, Henson B, Rubin P, Sperling R (1992) Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, **19**, 1537-41.

Weitkamp LR (1981) HLA and disease: predictions for HLA haplotype sharing in families. *Am J Hum Genet*, **33**, 776-84.

Werz O, Bürkert E, Samuelsson B, Rådmark O, Steinhilber D (2002a) Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is Ca⁺⁺ independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, **99**, 1044-52.

Werz O, Burkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Rådmark O, Steinhilber D (2002b) Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J*, **16**, 1441-3.

Werz O, Steinhilber D (2006) Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther*, **112**, 701-18.

Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE (2001) Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol*, **121**, 40-8.

WHO (2003) Treatment of Tuberculosis: Guidelines for National Programmes.

WHO (2007a) Tuberculosis Fact Sheet N°104.

WHO (2007b) Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing.

WHO (2007c) The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007-2008.

Wong C, Antonarakis SE, Goff SC, Orkin SH, Boehm CD, Kazazian HH Jr (1986) On the origin and spread of beta-thalassemia: recurrent observation of four mutations in different ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 6529-32.

Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA (1999) Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **60**, 668-73.

Yuhas Y, Azoulay-Alfaguter I, Berent E, Ashkenazi S (2007) Rifampin inhibits prostaglandin e2 production and arachidonic Acid release in human alveolar epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 4225-30.

Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich AG (2003) Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol*, **41**, 359-67.

Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes P (1995) T-Cell Cytokine Responses in Human Infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, **63**, 3231-34.

Zhang YY, Lind B, Rådmark O, Samuelsson B (1993) Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues. *J Biol Chem*, **268**, 2535-41.

Zouboulis ChC, Saborowski A, Boschnakow A (2005) Zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor, directly reduces sebum production. *Dermatology*, **210**, 36-8.

7. ANHANG

R- und S-Sätze

Chemiealien:

Chemikalie	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbol
Acrylamid	45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45	T
APS	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37	O, Xn
Arachidonsäure	-	4/25	-
BCIP	20/21/22	53-9-20-36/37/39-45-60	Xn
Coomassie Brilliant Blue	-	22-24/25	-
CTAB	22-37/38-41-50	26-36-61	Xn, N
DDT	22	36/38	Xn
Dextran Blue	-	7/8	-
DMF	61-20/21-36	53-45	T
EDTA	36-52/53	61	Xi
Ethanol	11	(2-)7-16	F
Ethidiumbromid	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45	T+
Essigsäure	10-35	(1/2-)23-26-45	C
FeSO ₄	22	22	Xn
Formamid	61	53-45	T
HCl	23-35	(1/2-)9-26-36/37/39-45	T, C
Hi-Di [®] Formamid	61	53-45	T
IPTG	20/21/22-36/37/38	9-22-26-36/37-60	Xn
Natriumdodecylsulfat	11-21/22-36/37/38	26-36/37	F, Xn
NaOH	35	(1/2-)26-37/39-45	C
NBT	61-20/21-36	53-9-20-36/37/39-45-60	T
Nonidet P40	22-41	24-26-39	Xn
Mercaptoethanol	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61	T, N
Methanol	11-23/24/25-39/23/24/25	(1/2-)7-16-36/37-45	T, F
Natriumazid	28-32-50/53	(1/2-)28-45-60-61	T+, N
Oxalacetat	34	26-36/37/39-45	C
PMSF	23/24/25-34-40	26-36/37/39-45	T
Ponceau S	20/21/22-36/37/38	24-25-26-36-45	Xn
TEMED	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45	C, F
TFA	20-35-52/53	9-26-27-28-45-61	C
Tris	36/38	26	Xi
Triton X-100	22-41	24-26-39	Xn
Trypanblau	45-61-20/21/22-36/37/38	45-26-36/37/39	-

R-Sätze:

- R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen; explosionsgefährlich.
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen; besonders explosionsgefährlich.
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig.
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- R 7 Kann Brand verursachen.
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
- R 10 Entzündlich.
- R 11 Leichtentzündlich.
- R 12 Hochentzündlich.
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser.
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung leicht entzündlicher Gase.
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft.
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger /leicht-entzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R 23 Giftig beim Einatmen.
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut.
- R 25 Giftig beim Verschlucken.
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken.
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden.
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen.
- R 34 Verursacht Verätzungen.
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen.
- R 36 Reizt die Atmungsorgane.
- R 38 Reizt die Haut.
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
- R 40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden.

-
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
 - R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
 - R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
 - R 45 Kann Krebs erzeugen.
 - R 46 Kann vererbare Schäden verursachen.
 - R 47 Kann Missbildungen verursachen.
 - R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
 - R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
 - R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen.
 - R 51 Giftig für Wasserorganismen.
 - R 52 Schädlich für Wasserorganismen.
 - R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
 - R 54 Giftig für Pflanzen.
 - R 55 Giftig für Tiere.
 - R 56 Giftig für Bodenorganismen.
 - R 57 Giftig für Bienen.
 - R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
 - R 59 Gefährlich für die Ozonschicht.
 - R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
 - R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen
 - R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
 - R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
 - R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
 - R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
 - R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
 - R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
 - R 68 I irreversibler Schaden möglich.

S-Sätze:

- S 1 Unter Verschluss aufbewahren.
- S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S 3 Kühl aufbewahren.
- S 4 Von Wohnplätzen fernhalten.
- S 5 Unter ... aufbewahren. (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
- S 5.1 Unter Wasser aufbewahren.
- S 5.2 Unter Petroleum aufbewahren.
- S 5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren.
- S 6 Unter ... aufbewahren. (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
- S 6.1 Unter Stickstoff aufbewahren.

-
- S 6.2 Unter Argon aufbewahren.
 - S 7 Behälter dicht geschlossen halten.
 - S 8 Behälter trocken halten.
 - S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
 - S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen.
 - S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
 - S 14 Von ... fernhalten. (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben)
 - S 14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten.
 - S 14.2 Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen fernhalten.
 - S 14.3 Von Eisen fernhalten.
 - S 14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten.
 - S 14.5 Von Säuren fernhalten.
 - S 14.6 Von Laugen fernhalten.
 - S 14.7 Von Metallen fernhalten.
 - S 14.8 Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten.
 - S 14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten.
 - S 14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten.
 - S 14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten
 - S 15 Vor Hitze schützen
 - S 16 Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen.
 - S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
 - S 18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
 - S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
 - S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen.
 - S 22 Staub nicht einatmen.
 - S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
 - S 23.1 Gas nicht einatmen.
 - S 23.2 Dampf nicht einatmen.
 - S 23.3 Aerosol nicht einatmen.
 - S 23.4 Rauch nicht einatmen.
 - S 23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen.
 - S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.
 - S 25 Berührung mit den Augen vermeiden.
 - S 26 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
 - S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
 - S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
 - S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
 - S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife.
 - S 28.3 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400.

- S 28.4 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 300 und Ethanol (2:1) und anschließend mit viel Wasser und Seife.
- S 28.5 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400.
- S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
- S 28.7 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife.
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S 30 Niemals Wasser hinzu gießen.
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
- S 34 Schlag und Reibung vermeiden.
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen. (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 40.1 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen.
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen.
- S 43 Zum Löschen ... verwenden. (vom Hersteller anzugeben)
- S 43.1 Zum Löschen Wasser verwenden.
- S 43.2 Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden.
- S 43.3 Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.
- S 43.4 Zum Löschen Kohlendioxid kein Wasser verwenden.
- S 43.6 Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden.
- S 43.7 Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden.
- S 43.8 Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.
- S 44 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ...°C aufbewahren. (vom Hersteller anzugeben)
- S 47.1 Nicht bei Temperaturen über 25°C aufbewahren.
- S 48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 48.1 Feucht halten mit Wasser.
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 50.1 Nicht mischen mit Säuren.
- S 50.2 Nicht mischen mit Laugen.
- S 50.3 Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen.
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.

- S 52 Nicht großflächig für Wohn- u. Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59 Information zur Wiederverwendung/ Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (Nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist).

Gefahrensymbole:

C	Ätzend	
E	Explosiv	
F	Leichtentzündlich	
F+	Hochentzündlich	
N	Umweltgefährlich	
O	Brandfördernd	
T	Giftig	
T+	Sehr Giftig	
Xn	Gesundheitsschädlich	
Xi	Reizend	

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Prof. Dr. Christian Meyer, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die wertvollen Anregungen und die exzellente Betreuung bedanken.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. Horstmann, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, für die Ermöglichung der Mitarbeit in seiner Abteilung „Tropenmedizinische Grundlagenforschung“.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dartsch, Institut für Pharmazie der Universität Hamburg, für die formale Betreuung dieser Arbeit, für ihr ausgesprochenes Interesse und die konstruktive Kritik bedanken.

Zu sehr großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Werz, Institut für Pharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen, für die Beratung, die Einweisung in Techniken und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen, verpflichtet. Die Monate in Tübingen und die anregenden Diskussionen waren wichtige Meilensteine meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter der Sektion Tropenmedizinische Grundlagenforschung, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, und an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Analytische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen.

Mein Dank gilt auch meiner Freundin Meike Menge, die geduldig die Monate der Fertigstellung dieser Arbeit miterlebt und sich um alles, was nicht diese Arbeit anging, gekümmert hat.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	<u>Florian Herb</u>
Geburtsdatum	9. Oktober 1976
Geburtsort	Heidelberg
Familienstand	ledig

Schulbildung

August 1983 bis Juni 1987	Geschwister Scholl Grundschule St. Ilgen
August 1987 bis Juni 1996	Gymnasium Sandhausen
25. Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

 Wintersemester 1997/98 bis Wintersemester 2001/2002

Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

1. Staatsexamen 17. März 2000 in Heidelberg
2. Staatsexamen 8. April 2002 in Heidelberg
3. Staatsexamen 2. Juni 2003 in Stuttgart

Promotion

April 2004 bis Dezember 2007	Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
------------------------------	--