

Aus der Medizinischen Poliklinik IV - Campus Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke)



Relevanz posttranslationaler Modifikation der
Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) in der Signaltransduktion sowie
Identifizierung genetischer Polymorphismen der humanen
GPX4 zur präferenziellen Ausbildung einer
delayed graft function (DGF)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Michael Seibt
aus München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Fischereeder

Mitberichterstatter: PD Dr. Andreas Baur

Prof. Dr. Paolo Brenner

PD. Dr. Gerald Denk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Mitbetreuung: Dr. Marcus Conrad

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2015

1. Einleitung	1
1.1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	1
1.2. Die Glutathionperoxidasen	3
1.2.1. Der katalytische Mechanismus	3
1.2.2. Evolution der Glutathionperoxidasen	4
1.2.3. Der Mechanismus des Selenocysteineinbaus	5
1.2.4. Die Glutathionperoxidasen 1 – 8	6
1.2.5. Die Glutathionperoxidase 4	8
1.2.5.1. Genetik	8
1.2.5.2. Das nukleäre Isoenzym der Gpx4 (nGpx4)	10
1.2.5.3. Die mitochondriale Form der Gpx4 (mGpx4)	10
1.2.5.4. Die zytosolische Variante der Gpx4 (cGpx4)	11
1.3. Die Pathophysiologie der Ischämie & Reperfusion	12
1.4. ROS & Zelltod	15
1.5. ROS – <i>Signaling</i>	19
2. Fragestellung	22
3. Material	23
4. Methoden	33
4.1. Zellkultur	33
4.1.1. Zellhaltung	33
4.1.2. Zellzahlbestimmung	33
4.1.3. Kryokonservierung & Auftauen	33
4.2. GPX4-Sequenzierung	34
4.3. Klonierung	35
4.3.1. PCR-Mutagenese	35
4.3.2. Hitzeschocktransformation von Bakterien	36
4.3.3. DNA-Präparation	37
4.3.4. Isolation der DNA	37

Inhaltsverzeichnis

4.3.5. DNA-Ligation	38
4.4. Virusproduktion	38
4.5. Western Blot	39
4.6. Immunzytochemie	40
4.7. Semi-quantitative Aktivitätsbestimmung der Gpx4	41
4.8. <i>Colony Formation Assay</i>	41
4.9. Vitalitätsmessung mittels AquaBluer	42
5. Ergebnisse	43
5.1. GPX4 – Sequenzierung	43
5.2. Gpx4 – Phosphorylierung	46
5.2.1. Etablierung von Zelllinien mit rekonstituierter Gpx4-Expression	46
5.2.2. Subzelluläre Lokalisation diverser <i>Gpx4</i> -Varianten	49
5.2.3. Proliferationsverhalten der verschiedenen <i>Gpx4</i> -Mutationen	51
5.2.4. Resistenz der Zelllinien gegenüber lipophilen Hydroperoxiden	51
5.2.5. Modulation der GSH-Konzentration	53
5.2.6. Partieller <i>Rescue</i> des BSO-induzierten Zelltods durch NAc	55
5.2.7. Keine toxischen Effekte unter NAc, DTT und β -ME	56
5.2.8. α -Tocopherol, β -ME, Necrostatin-1 & Ferrostatin-1 mildern die GSH-Toxizität	57
5.2.9. Sensitivität der Zelllinien gegenüber Erastin	58
6. Diskussion	59
6.1. Die Polymorphismen der GPX4	59
6.2. Die putative Phosphorylierung der Gpx4	61
7. Ausblick	70
8. Literaturverzeichnis	71
9. Zusammenfassung	84

10. Curriculum vitae	86
-----------------------------	-----------

11. Danksagung	88
-----------------------	-----------

12. Ehrenwörtliche Erklärung	89
-------------------------------------	-----------

1. Einleitung

1.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Der Fachterminus „reaktive Sauerstoffspezies“ (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) bezeichnet unvollständig reduzierte Sauerstoffmoleküle, wobei das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), ebenso wie Superoxidanionen (O_2^-) oder Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) hochrelevant für die Funktion intrazellulärer Signalkaskaden sind. Sie entstehen vornehmlich im Rahmen der Atmungskette (Poyton et al. 2009), infolge einer Toxinexposition sowie ionisierender Strahlung (Finkel and Holbrook 2000), oder werden in diversen metabolischen Prozessen als Nebenprodukte generiert (e.g. Dopamin-Oxidation, Xanthinoxidase). Ferner erzeugen endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthasen (Xia 2007) und NADPH-Oxidasen das Superoxidanion. Letzteres wird in hohen Mengen von neutrophilen Granulozyten zur Immunabwehr gebildet, wohingegen niedrige Konzentrationen bei der intrazellulären Signaltransduktion nach der Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) durch Wachstumsfaktoren entstehen (Lambeth 2004). Das Superoxidanion kann entweder spontan zerfallen oder wird enzymatisch durch Superoxiddismutasen zu H_2O_2 umgewandelt (Lubos et al. 2011). Bei Wasserstoffperoxid handelt es sich um ein mildes Oxidationsmittel, dessen Reduktion H_2O ergibt (Abbildung 1). Allerdings erweist sich H_2O_2 unter bestimmten zellulären Konditionen als reaktionsfreudig gegenüber Cysteinresten, wodurch entsprechende Thiole transient oder irreversibel oxidiert und folglich tiefgreifende Effekte im Rahmen der Signaltransduktion hervorgerufen werden können (D'Autreaux and Toledano 2007). Das hochreaktive Hydroxylradikal, welches in einer Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion aus Wasserstoffperoxid entsteht, hat ein weitaus destruktiveres Potential. Aufgrund seiner hohen Reaktivität vermag es strukturelle Schädigungen in der DNA, in Proteinen sowie Membranlipiden zu induzieren, welche mit schweren degenerativen Erkrankungen wie Arteriosklerose (Singh and Jialal 2006), Herzinsuffizienz (Giordano 2005), oder Parkinson assoziiert werden (Henchcliffe and Beal 2008). Andererseits sind ROS gleichermaßen wichtiger Bestandteil der zellulären Homöostase und entstehen als Reaktion auf Proliferationsreize durch RTK oder aufgrund veränderter Umgebungsbedingungen wie Energiemangel, respektive Hypoxie (Sena and Chandel 2012). In niedrigen Konzentrationen entfaltet sich ihre regulatorische Wirkung sowohl auf Transkriptions- (D'Autreaux and Toledano 2007) als auch Proteinebene (Rhee 1999). Die Stimulation der Transkription des *hypoxia inducible factor 1* (HIF1) ist beispielsweise die Konsequenz der Freisetzung mitochondrialer ROS unter hypoxischen Bedingungen (Chandel et al. 1998). Analog konnte die Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK1), oder aber die Stabilisierung der

Einleitung

Proteinstruktur des Tumorsuppressors p53 durch Hypoxie-induzierte, mitochondriale ROS nachgewiesen werden (Chandel et al. 2000; Nemoto et al. 2000). Aufgrund der Bedeutung für diese Dissertation soll jenes im Folgenden gesondert diskutiert werden.

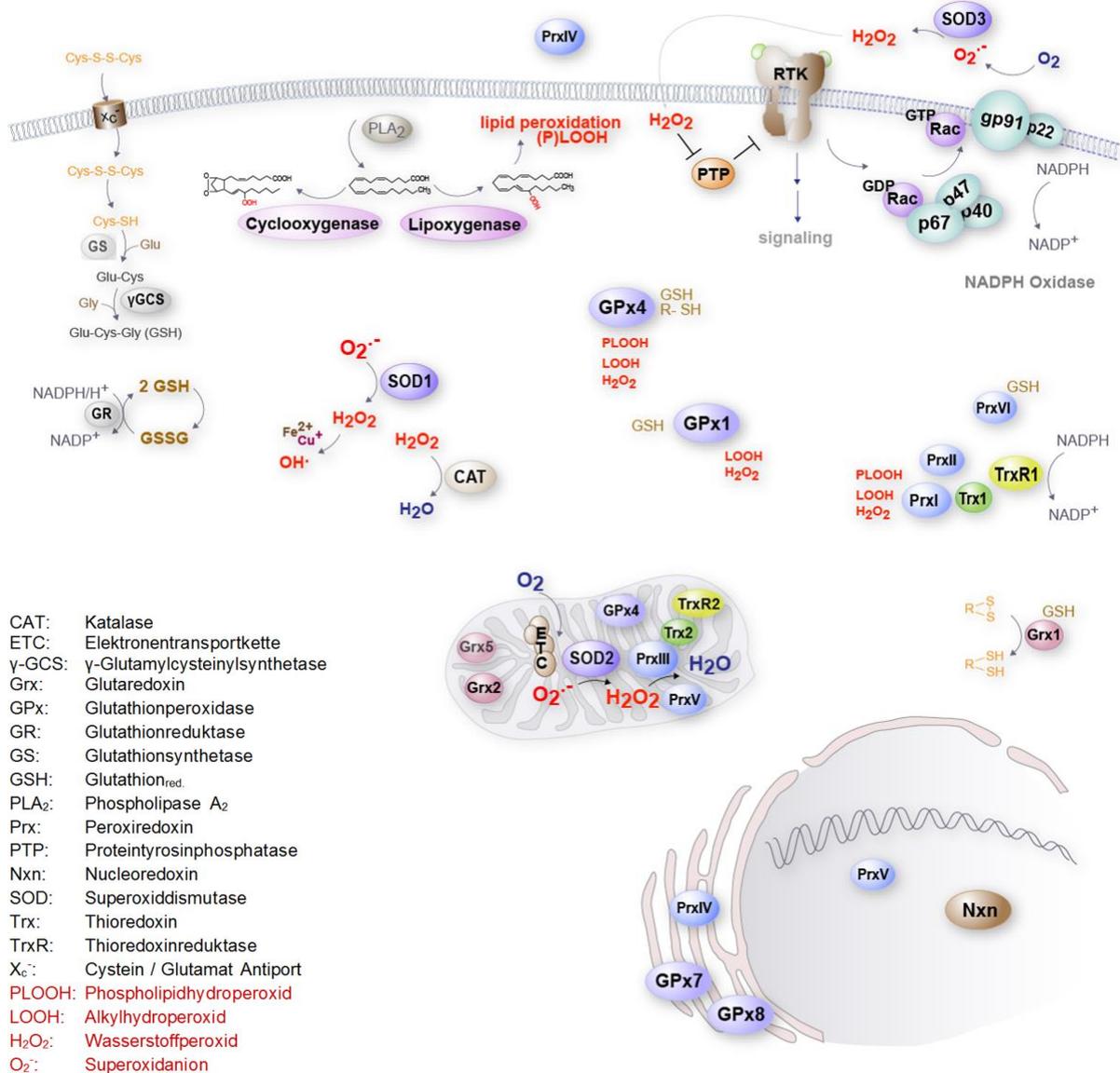


Abbildung 1: Übersicht antioxidativer System in Säugetieren. ROS entstehen vorwiegend im Rahmen der Atmungskette und werden über eine komplexe Verkettung enzymatischer sowie nichtenzymatischer Schritte reduziert, wobei dem Glutathion-System, Peroxiredoxinen sowie Thioredoxinen eine tragende Rolle zukommt. Modifiziert nach (Conrad et al. 2013).

Neben den bereits erwähnten ROS-entgiftenden Superoxiddismutasen exprimieren und verwenden Säugetierzellen ein komplexes Netzwerk enzymatischer und nichtenzymatischer Systeme, um physiologische, balancierte Mengen an ROS zu gewährleisten. Zu deren wichtigsten Vertretern gehören die Peroxiredoxine, Thioredoxine und das Glutathion-System, bestehend aus dem Tripeptid Glutathion (GSH), den Glutathionperoxidasen (Gpx), der Glutathionreduktase einschließlich der Glutathion-S-Transferase. Die Peroxiredoxine sind ubiquitär exprimierte Redoxenzyme, deren sechs Isoformen ein oder zwei reaktive Cysteine im aktiven Zentrum tragen (Rhee et al. 2005a). Ihre Hauptaufgaben bestehen in der

Reduktion von H_2O_2 (Rhee et al. 2005b) sowie weiteren Alkylhydroperoxiden, wobei vorwiegend reduzierte Thioredoxine Elektronen für deren Reaktionsmechanismus zur Verfügung stellen (Rhee et al. 2001). Die monomeren Thioredoxine sind in jedem Organismus anzutreffen (Gronenborn et al. 1999). Neben ihren antioxidativen Eigenschaften dienen sie den bereits erwähnten Peroxiredoxinen als Kofaktoren sowie Ribonukleotid-reduktasen während der DNA-Synthese (Moore et al. 1964), ferner wird ihnen eine wichtige Bedeutung bei Wachstumsprozessen und dem programmiertem Zelltod zugesprochen (Arner and Holmgren 2000). Das katalytische Zentrum setzt sich aus einer hochkonservierten Abfolge der Aminosäuren Cystein-Glycin-Prolin-Cystein zusammen, welches auch *als kanonisches Motiv CGPC* bezeichnet wird (Collet and Messens 2010). Oxidiertes Thioredoxin wird durch die Thioredoxinreduktasen und NADPH/H^+ wieder in seinen Grundzustand überführt. Auf die Glutathionperoxidasen wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2. Die Glutathionperoxidasen

1.2.1. Der katalytische Mechanismus

Die Familie der Säugetier-Glutathionperoxidasen (Gpx) besteht aus acht Isoenzymen, deren Vertreter entweder ein Cystein (Cys) oder Selenocystein (Sec) als Teil ihrer katalytischen Tetrade aufweisen (Toppo et al. 2008). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies wie H_2O_2 oder anderer Alkylhydroperoxide. Hierbei wird zunächst das katalytisch aktive Thiol oder Selenothiol durch das Peroxid zur korrespondierenden Sulfen- bzw. Selenensäure oxidiert und anschließend mittels 2 Molekülen GSH unter Ausbildung

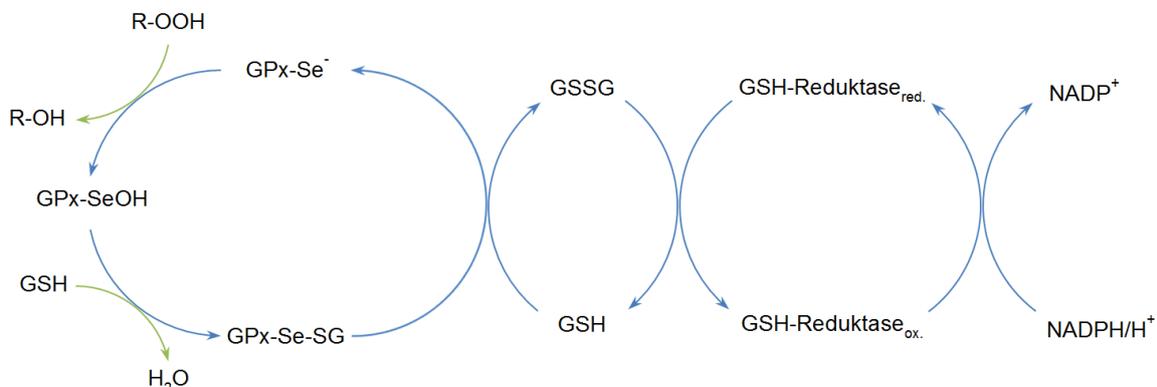


Abbildung 2: Der Reaktionszyklus der Glutathionperoxidase mit Selenocystein im aktiven Zentrum. Alkylhydroperoxide oxidieren die Selenolgruppe zur korrespondierenden Säure, worauf eine intermediiäre Brücke nach Anlagerung eines GSH-Moleküls unter Abspaltung von H_2O gebildet wird. Durch ein weiteres GSH-Molekül erfolgt die Reduktion der Gpx in ihren Ausgangszustand (Ping-Pong-Mechanismus). GSH wird durch GSH-Reduktasen unter Verbrauch von NADPH/H^+ reduziert.

gemischter Disulfide bzw. Selenylsulfide in seinen Grundzustand zurückversetzt (Abbildung 2). Gemeinhin wird das Selenothiol als reaktionsfreudiger erachtet, zumal es unter physiologischem pH leichter deprotoniert wird (Gromer et al. 2003) und folglich schneller mit dem Peroxid reagieren kann (Flohe et al. 2011). Die Glutathionreduktasen reduzieren das entstandene Glutathion-Disulfid unter Verbrauch von NADPH/H⁺ zu monomerem Glutathion.

1.2.2. Evolution der Glutathionperoxidasen

Die Gen-Verdopplung, deren Verlust sowie lateraler Gentransfer gelten als wesentliche Instrumente molekularer Evolution (Taylor and Raes 2004). Um die Herkunft der jeweiligen Glutathionperoxidasen näher zu charakterisieren, wurden etwa 700 bekannte Isoenzyme unterschiedlicher Spezies miteinander verglichen. Anhand der Homologie ihrer Aminosäuresequenz lassen sich jene phylogenetisch in grundsätzlich drei große Gruppierungen unterteilen (Margis et al. 2008; Toppo et al. 2008):

- **I. Wirbeltiere – Würmer – Gliederfüßer**
- **II. Pilze – Bakterien**
- **III. Pflanzen**

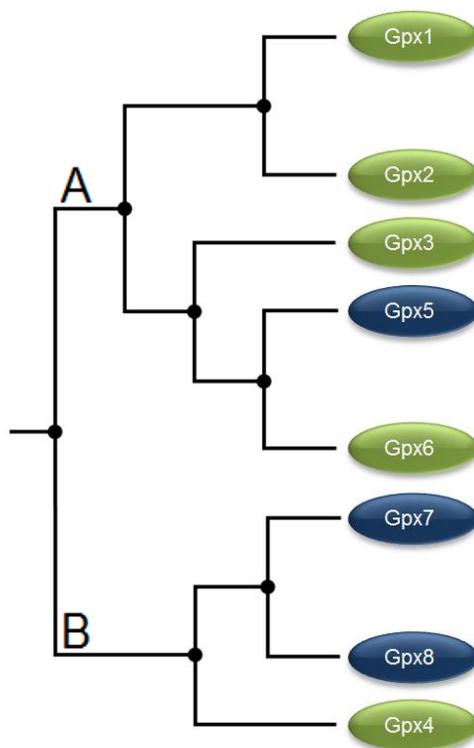


Abbildung 3: Evolution der Gpx. Die Selenoenzyme sind grün hervorgehoben.

Nachfolgend soll auf die Untergruppe der, in Vertebraten vorkommenden, Glutathionperoxidasen eingegangen werden. Hinsichtlich ihrer Existenz, Phylogenese und Homologie lassen sich deren Isoformen via Kladogramm weiterhin untergliedern (Abbildung 3). Hierbei gilt ihr gegenwärtig jüngster Vertreter, die Gpx8, einzig für den Menschen als ¹gesichert. Außerdem sollte betont werden, dass sich die Bezeichnung *Glutathionperoxidase* im Grunde als irreführend erweist, zumal lediglich für eine ²Minderheit der Enzyme, mit Selenocystein im aktiven Zentrum (grün), eine Präferenz für Glutathion als Reduktanz besteht (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). Indessen bevorzugen die Cysteinvarianten der Peroxidasen Reduktionsmittel mit einem *CxxC Motiv*, allen voran Thioredoxine (Herbette et al. 2007). Die

¹ Analog *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

² Bezugnehmend auf die Gesamtheit der beschriebenen Glutathionperoxidasen aller Spezies.

erste Aufzweigung beinhaltet jene Enzyme, die als Homotetramere agieren und bis auf Gpx5 ein Selenocystein im aktiven Zentrum besitzen. Gpx1/2 scheinen hierbei einen gemeinsamen Ursprung zu haben, da sich neben Säugetieren, auch homologe Proteine beider Formen in Vögeln aufzeigen lassen (Margis et al. 2008). Vermutlich unterscheidet sie dies evolutiv von Gpx3/5/6, denen ausschließlich eine einzige aviäre Isoform zugeordnet werden konnte. Obgleich die Gpx3 die größte Ähnlichkeit zur Gpx1/2 besitzt, fehlen ihr außerdem zwei der vier Arginine, denen eine wichtige Bedeutung bei der Interaktion mit GSH zukommt (Aumann et al. 1997). Im Gegensatz zur humanen Variante der Gpx6 wird in Mäusen und Ratten, ebenso wie in Bakterien, eine cysteinhaltige Gpx6 exprimiert (Kryukov et al. 2003). Nachdem die Gpx5 ebenfalls ein Cystein im aktiven Zentrum trägt und beide Isoformen evolutionär offenkundigere Parallelen gegenüber der Gpx3 aufweisen, wird für die Gpx5/6 gegenüber der Gpx3 ein individueller Vorläufer postuliert (Margis et al. 2008), obwohl die Primärstrukturen der Gpx5 und Gpx3 präziser übereinstimmen. Der zweite Ast beinhaltet die Gruppierung der monomeren Gpx4/7/8. Hierin sind Gpx4 sowie Gpx7 durch hochkonservierte Aminosäureabfolgen charakterisiert und können in zahlreichen Wirbeltieren nachgewiesen werden. Obwohl Gpx8, ebenso wie Gpx7, ein cysteinhaltiges Isoenzym darstellt, weist sie nur eine geringe Übereinstimmung mit jener auf. Folglich wird es allenfalls als Schwesterenzym der Gpx7 angesehen (Toppo et al. 2008), nicht zuletzt angesichts unzureichender Kenntnisse bezüglich ihrer Funktion (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013).

1.2.3. Der Mechanismus des Selenocysteineinbaus

Bei Selenocystein handelt es sich um die 21. proteinogene Aminosäure, welche durch das *opal-Stopcodon* (UGA) kodiert wird. Da die Proteinsynthese regelhaft durch das UGA-Codon beendet wird, bedarf es für dessen Dekodierung als Sec-Codon diverser, sowohl in cis als auch in trans agierender Faktoren. Zunächst wird eine komplexe sekundäre Haarnadelstruktur der 3'-UTR benötigt (Abbildung 4), welche als SECIS-Element (SECIS = *selenocysteine insertion sequence*) bezeichnet wird. Diese rekrutiert zunächst das *SECIS binding protein* (SBP2) und nachfolgend den *selenocystein specific elongation factor* (EF_{Sec}) samt tRNA^{Sec} (Berry 2005). Weitere Faktoren sind das eukaryotische ribosomale Protein (L30), die Selenophosphat-Synthetase 1 (SPS1), das *tRNA selenocysteine 1 associated protein 1* (SECp43) sowie das *soluble liver antigen* (SLA) (Chavatte et al. 2005; Hoffmann et al. 2007; Xu et al. 2005), deren Funktion allerdings noch nicht detailliert verstanden wurde. Die Sec-spezifische tRNA mit dem Anticodon UCA wird zunächst mit Serin beladen und in einem zweistufigen Prozess durch die Selenocystein-Synthasen zur tRNA^{Sec} konvertiert.

Anschließend interagiert der Komplex mit dem Ribosom, wobei die $tRNA^{Sec}$ unter GTP-Hydrolyse schließlich freigesetzt wird. Hierbei ist das eukaryotische ribosomale Protein L30 in den Einbau des Selenocysteins in die naszierende Polypeptidkette involviert (Chavatte et al. 2005) und erleichtert nachfolgend dessen Entbindung aus der tRNA unter Verdrängung des SBP2. Gemessen an dem Einbau weiterer Aminosäuren, wie etwa Cystein, erweist sich dieser Mechanismus jedoch als äußerst ineffizient und rangiert für bakterielle Formiatdehydrogenasen bei 4% (Suppmann et al. 1999). Verglichen mit ihren cysteinhaltigen Homologen wird gegenwärtig die Hypothese vertreten, dass die grundsätzlich reduzierte Expression der Selenoproteine durch eine entsprechend gesteigerte Enzymaktivität kompensiert wird. Bezüglich der Reduktion aliphatischer Hydroperoxide ergaben *in vitro* Experimente hinsichtlich der Gpx4 eine um den Faktor 1000 gesteigerte Aktivität, relativ zu ihrem cysteinhaltigen Pendant (Maiorino et al. 1995; Mannes et al. 2011).

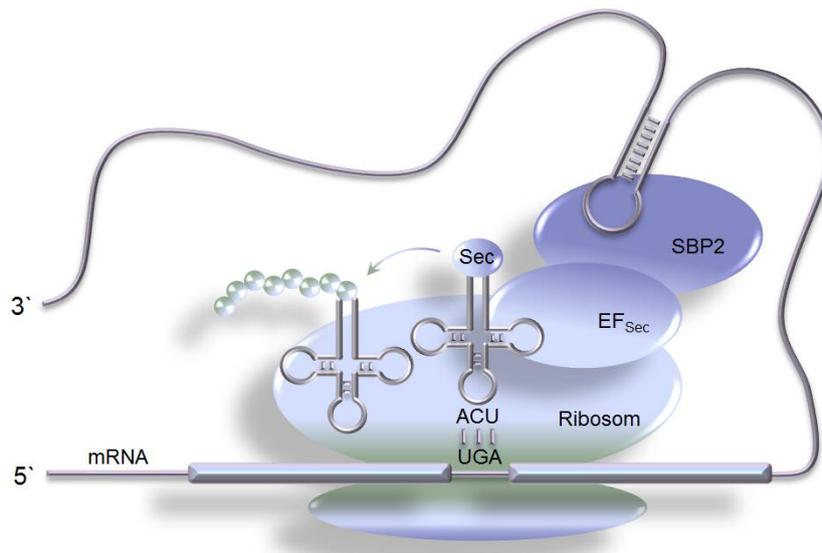


Abbildung 4: Die schematische Darstellung des kotranslationalen Selenocysteineinbaus in die reifende Peptidkette. Das SECIS-Element der 3'-UTR rekrutiert den SBP2, EF_{Sec} sowie $tRNA^{Sec}$. Der Komplex assoziiert zum Ribosom, worauf das Stoppcodon als Sec dekodiert wird. Modifiziert nach (Berry 2005).

1.2.4. Die Glutathionperoxidasen 1 – 8

GPX1 wurde als erstes Isoenzym von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen im Jahre 1973 beschrieben (Flohe et al. 1973; Rotruck et al. 1973) und ist zugleich das erste der 25 identifizierten humanen Selenoproteine. Die GPX1 wird ubiquitär exprimiert und reduziert vornehmlich Hydroperoxide wie H_2O_2 . Verglichen mit Katalasen zeigt sie diesbezüglich eine höhere Affinität zu ihrem Substrat (Antunes et al. 2002). Ebenso vermag sie aliphatische (Alkyl-) Hydroperoxide zu reduzieren, möglicherweise auch membranständige Mono-, nicht hingegen Bi- oder Triacylglycerolhydroperoxide (Marinho et al. 1997). In Mäusen führt der

Knockout der Gpx1 zu keinen embryonalen Entwicklungsdefiziten (Fu et al. 1999), während die bereits 3 Wochen postpartum frühzeitig einsetzende Linsentrübung ein wesentliches pathologisches Korrelat darstellt (Muller et al. 2007; Reddy et al. 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass der Knockout keinen Einfluss auf die Expression weiterer Glutathionperoxidasen hat (Cheng et al. 1997). Andererseits bewirkt ein pharmakologisch herbeigeführter, oxidativer Stress in hoher Dosierung (intraperitoneal verabreichtes Paraquat $\geq 50\text{mg/Kg}$) ein vorzeitiges Absterben der Versuchstiere (Cheng et al. 1998). Weiterhin reagieren *Gpx1*-Knockout Mäuse wesentlich sensitiver auf ein Ischämie/Reperfusionereignis, beispielsweise infolge eines zerebralarteriellen Okklusionsmodells (Conrad and Schweizer 2010).

Die mit der Gpx1 verwandte Gpx2 wird aufgrund ihres Expressionsmusters in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (GI) gleichermaßen als GI-Gpx bezeichnet. Infolgedessen wird ihr Bedeutung bei der Elimination alimentärer Hydroperoxide zugesprochen (Chu et al. 1993). Dieses vermeintliche Charakteristikum wird hingegen kontrovers diskutiert, nachdem die höchste GI-Gpx-Expression an der Basis intestinaler Krypten nachgewiesen wurden (Florian et al. 2001), welche nicht vordergründig an Absorptionsvorgängen beteiligt sind (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). Innerhalb der selenocysteinhaltigen Glutathionperoxidasen zeigt sie unter Selenrestriktion eine relativ beständige Expression, welche nach Wiedereinsetzender Supplementation zügig ansteigt. Gemessen an ihren Isoenzymen rangiert die Gpx2, analog dieser theoretischen Kriterien, ganz oben in der Hierarchie der Selenoprotein-Expression ($\text{Gpx2} > \text{Gpx4} > \text{Gpx3} - \text{Gpx1}$) (Wingler et al. 1999). Anhand der unterschiedlichen Dynamik der Expression von Selenoproteinen unter Mangel- bzw. Repletionsbedingungen wurde eben diese hypothetische Hierarchie postuliert, welche zugleich Rückschlüsse auf deren biologische Relevanz zulassen sollte (Brigelius-Flohe 1999). Allerdings ließ sich in den folgenden Jahren im Rahmen von Knockout-Studien in der Maus zeigen, dass diese Korrelation nicht zwangsläufig zutrifft. Denn die Deletion der Gpx2 resultiert unter physiologischen Bedingungen in keinem offensichtlichen pathologischen Phänotyp, welcher der suggerierten Wertigkeit entspräche. Andererseits entwickeln Mäuse mit *Gpx1/Gpx2*-Doppelknockout spontane Ileokolitiden (Esworthy et al. 2001; Esworthy et al. 2005).

Basierend auf ihrer Expression sowie intrazellulären Lokalisation wird das dritte Isoenzym, Gpx3, auch als plasmatische Gpx (pGpx) bezeichnet. Jene wird in der Niere synthetisiert und anschließend in das Blutplasma sezerniert (Whitin et al. 2002). Darüber hinaus lässt sie sich an Basalmembranen des Intestinums, des Epididymis sowie der Lungen eruieren (Burk et al. 2011), wobei der *Gpx3*-Knockout mit keiner Pathologie in den entsprechenden Mauslinien einhergeht (Olson et al. 2010). Ihre katalytische Aktivität samt Substratspezifität

ist vergleichbar mit der Gpx1, indem sie wasserlösliche sowie aliphatische Peroxide reduziert, jedoch kaum Aktivität gegenüber Phospholipidhydroperoxiden erkennen lässt (Takebe et al. 2002). Neben GSH kann sie ebenfalls durch Thioredoxine reduziert werden (Bjornstedt et al. 1994). Trotz der scheinbar unterschiedlichen Vorläufer ist ihre Strukturhomologie der Gpx5 am nächsten. Gemeinsam repräsentieren sie die Hauptformen der Glutathionperoxidasen im Nebenhoden. Gegenwärtig ist über die Funktionalität der Gpx5 allerdings wenig bekannt, möglicherweise balanciert sie die Rate reaktiver Sauerstoffspezies und unterstützt somit die snGpx4 (siehe unten) hinsichtlich seminaler Kernkondensation (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). Gleichermaßen limitiert ist das Wissen um die physiologische Funktion der Gpx6, deren Expression bisweilen in Embryonen sowie dem olfaktorischen System nachgewiesen wurde (Kryukov et al. 2003).

Zumal der Fokus dieser Dissertation auf der Gpx4 liegt, soll zunächst auf die übrigen Vertreter der monomeren Glutathionperoxidasen eingegangen werden. Sowohl die Gpx7 als auch die Gpx8 beinhalten ein Cystein als Teil ihrer katalytischen Tetrade. Aufgrund ihrer Strukturhomologie wird die Gpx7 auch als nicht-selenocysteinhaltige Gpx4 bezeichnet (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). Ursprünglich ließ sich die Gpx7 in Brustkrebszellen, später, wie die Gpx8, im endoplasmatischen Retikulum (ER) identifizieren. Über deren potentielle, regulatorische Aktivität während der Faltung von Proteinen im ER wird gegenwärtig spekuliert. Im Zuge der Proteinreifung entstandenes Wasserstoffperoxid soll hierbei via Gpx7/Gpx8 in H₂O überführt, wodurch die Peroxidasen selber oxidiert werden (Nguyen et al. 2011). Ferner wurde für die Gpx7 eine Funktion als Redoxsensor zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beschrieben (Wei et al. 2012). Die Oxidation der Gpx7 durch Peroxide führt zu einer transienten Disulfidbrückenbildung mit dem *glucose-regulated protein 78* (GRP78), steigert dadurch dessen Chaperon-Aktivität und erleichtert insofern die Proteinfaltung unter Stressbedingungen.

1.2.5. Die Glutathionperoxidase 4

1.2.5.1. Genetik

Erstmals wurde die Gpx4 im Jahre 1982 aus Schweinelebern extrahiert und als Enzym charakterisiert, welches Biomembranen vor Lipidperoxidation unter Verbrauch von GSH zu schützen vermochte (Ursini et al. 1982). Neben aliphatischen Hydroperoxiden und H₂O₂ ist unter den Glutathionperoxidasen lediglich die Gpx4 dazu fähig komplexe, membran-

gebundene Phospholipid- oder Cholesterolhydroperoxide zu reduzieren (Thomas et al. 1990). Außerdem besitzt sie ein breites Substratspektrum und kann neben GSH auch proteingebundene Sulfhydrylgruppen sowie Thioredoxine als Reduktionsmittel heranziehen. Diese Eigenschaft wird insbesondere dann relevant, sollte das zur Verfügung stehende GSH erheblich limitiert sein, was physiologischerweise in reifenden Spermatisiden vorliegt (siehe unten). Die genomische DNA-Sequenz umfasst sieben reguläre Exons sowie ein alternatives Exon (Ea), welche zusammen drei individuelle Isoenzyme erzeugen (Abbildung 5). Exon 1 kodiert hierbei für die sogenannte *kurze/zytosolische* sowie *lange/mitochondriale* Variante, die sich lediglich in deren mitochondrialer Zielsequenz unterscheiden (und nach Eintritt in die Mitochondrien abgespalten wird). Die Transkription des *nukleären* Isoenzym unterliegt einem eigenen Promotor und wird ausschließlich in fortgeschrittenen Reifestadien der Spermatogenese exprimiert (Pfeifer et al. 2001). Die kodierende Region des alternativen Exons beinhaltet ein Kernlokalisierungssignal sowie mehrere Cluster, welche sich aus basischen Aminosäuren wie Argininen und Lysin zusammensetzen, vergleichbar den Protaminen. Vermutlich ermöglicht dies die Bindung der Gpx4 an die DNA der Spermatisiden. Einzig die zytosolische Gpx4 ist die lebensnotwendige Isoform der Gpx4 (Ho et al. 1997), deren Homologie gegenüber anderen selenocysteinhaltigen Glutathionperoxidasen weniger als 40% beträgt. Verglichen mit der Gpx1 (201 Aminosäuren) fehlen der Gpx4 (170 Aminosäuren) beispielsweise vier Arginine (R57, R103, R184, R185), welche speziell für die Interaktion mit GSH verantwortlich sind und infolgedessen ihr breites Substratspektrum erklären könnten (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013; Flohe et al. 2011). Hingegen teilt die Gpx4 auch konservierte Motive, wie die katalytische Tetrade, bestehend aus Sec (Cys), Gln, Trp sowie Asn (Tosatto et al. 2008). Hierbei wird das katalytisch aktive Selenocystein (Cystein) durch Gln und Trp über Wasserstoffbrückenbindungen aktiviert sowie stabilisiert (Aumann et al. 1997). Asn kommt erhebliche Bedeutung für den initialen Oxidationsschritt zu, nachdem entsprechende Aminosäuremutationen zu His, Ala oder aber Asp in deutlichen Aktivitätseinbußen resultieren (Tosatto et al. 2008).

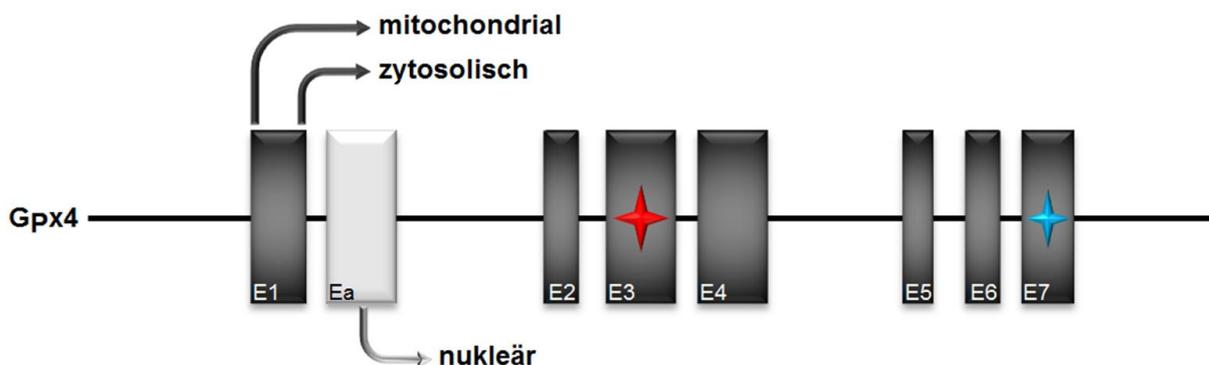


Abbildung 5: Übersicht über die genomische Gpx4-Sequenz. Die Gpx4 besteht aus 7 regulären Exons sowie einem alternativen Exon. Die Startcodons der zytosolischen und mitochondrialen Isoform werden durch Exon 1 kodiert, die nukleäre Variante über das alternative Exon. Das Selenocystein befindet sich auf Exon 3 (rot) für dessen Einbau das SECIS-Element benötigt wird (blau).

1.2.5.2. Das nukleäre Isoenzym der Gpx4 (snGpx4)

Während der Spermatidenreifung kondensiert der haploide Chromosomensatz auf etwa ein Zehntel seiner ursprünglichen Größe, wobei Protaminen hierbei große Bedeutung zukommt. Sie stellen eine heterogene Gruppe kleiner, basischer Proteine dar, die im Rahmen der Kernkondensation 90% die Histone ersetzen (Braun 2001). Neben Argininen besitzen sie zahlreiche Cysteine, die über die Ausbildung von Disulfidbrücken (Balhorn 2007) das Erbgut gegenüber Nukleohistonen zehnfach dichter packen und somit auf ein Minimum reduzieren können (Miller et al. 2010). Diesbezüglich werden ihnen auch protektive Effekte unter Einfluss chemischer oder physikalischer Noxen zugeschrieben (Braun 2001). Die nukleäre Isoform der Gpx4 wird ausschließlich in den Zellkernen heranreifender Spermatiden exprimiert. Der N-terminus kodiert für eine Kernlokalisierungssequenz, gefolgt von Motiven, welche in ihrer Abfolge den Protaminen ähneln und worüber die nukleäre Gpx4 vermutlich an die DNA bindet. Aufgrund ihrer *in vivo* Thiolperoxidase-Aktivität vermag sie Disulfidbrücken in die cysteinreichen Protamine einzufügen, wodurch das männliche Genom zusätzlich stabilisiert wird (Conrad et al. 2005; Pfeifer et al. 2001). Allerdings fand man bei Mäusen mit spezifischer Deletion der nukleären Gpx4 lediglich eine verzögerte Reifung der Spermatozoen, welche sich jedoch nicht negativ auf die männliche Fertilität auswirkte (Conrad et al. 2005). Nachdem die Rate an Hydroperoxiden im Epididymis mitunter durch die Gpx5 reguliert wird und sich deren Expression ausschließlich in den hiesigen Epithelzellen nachweisen ließ, wurde über einen kompensatorischen Effekt der Gpx5 bei Deletion der snGpx4 spekuliert (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013). Allerdings zeigen Doppelknockout-Studien in Mäusen (snGpx4 & Gpx5) ebenfalls keine eingeschränkte Fertilität (Noblanc et al. 2012). Möglicherweise wird der Verlust der nukleären Isoform in den Knockout-Mäusen folglich durch die zytosolische Gpx4 kompensiert, welche dort ebenso exprimiert wird und klein genug ist, um die Kernporen ungehindert zu durchdringen.

1.2.5.3. Die mitochondriale Form der Gpx4 (mGpx4)

Selen ist ein essentielles Spurenelement sowie unabdingbarer Bestandteil männlicher Fertilität. Chronische Mangelzustände korrelieren mit verminderter Motilität sowie Aberrationen des Kopfes und Mittelstücks der Spermatiden (Watanabe and Endo 1991). Neben der nukleären Form wird ebenso das mitochondriale Isoenzym der Gpx4 vorwiegend in Testes nachgewiesen. Während der Spermatidenreifung wird die Glutathionkonzentration physiologischerweise bis zum Eintritt in die Cauda epididymidis auf ein Viertel reduziert (Shalgi et al. 1989). In den Mitochondrien der Spermatiden katalysiert die mitochondriale

Gpx4 mitunter die Oxidation sowie Polymerisation des *sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein* (SMCP) und dient selbst als strukturelles Hüllprotein (~50%) (Maiorino et al. 2005; Ursini et al. 1999). Aufgrund der reduzierten Glutathionspiegel zieht sie vornehmlich proteingebundene Sulfhydrylgruppen als Reduktionsmittel heran, wobei sie ihre eigene katalytische Aktivität unter Ausbildung kovalenter Bindungen (-S-S- & -Se-S-) zu eben jenen Peptiden verliert (Mauri et al. 2003). In Mäusen führt die spezifische Deletion der mitochondrialen Isoform zu männlicher Infertilität. Morphologisch entspricht hierbei der Phänotyp exakt einer chronischen Selenrestriktion (Schneider et al. 2009), infolgedessen die essenzielle Bedeutung der mGpx4 als Selenoprotein im Rahmen der Spermatogenese unterstrichen wird.

1.2.5.4. Die zytosolische Variante der Gpx4 (cGpx4)

In Säugetieren gehört Glutathion zu den wesentlichen Antioxidantien und ist ein Tripeptid, bestehend aus Cystein, Glutamat sowie Glycin. In somatischen Zellen kommt GSH in Konzentrationen bis zu 10 mM vor und wird intrazellulär in einem zweistufigen Prozess via γ -Glutamylcysteinyl-Synthetasen (γ -GCS) sowie Glutathion-Synthasen unter ATP-Verbrauch gebildet. Die γ -GCS ist das ratenlimitierende Enzym der *de novo* Synthese von GSH, wobei der Knockout dessen katalytischer Untereinheit zum Absterben betroffener Mausembryonen bereits nach der Gastrulation führt (Shi et al. 2000). Exakt dieser letale Phänotyp wird zudem durch die spezifische Inaktivierung des *Gpx4*-Gens in Mäusen hervorgerufen (Yant et al. 2003), dessen Kausalität allerdings noch weitgehend ungeklärt ist. So wird einerseits die zytosolische als die essentielle Variante erachtet (Liang et al. 2009), andererseits existieren in der gängigen Literatur Hinweise auf die Bedeutung der temporären Expression der nukleären und mitochondrialen Isoform während der zentralnervösen Entwicklung sowie kardiovaskulären Organogenese (Borchert et al. 2006). Um folglich die Auswirkungen des *Gpx4*-Genverlusts in heranwachsenden Mäusen *in vivo* zu studieren, wurden konditionale Knockout-Linien etabliert, deren loxP-flankierte *Gpx4*-Allele gewebespezifisch induzierbar deletiert werden können (Seiler et al. 2008). Obwohl die neuronenspezifische Deletion des *Gpx4*-Gens das Überleben der Versuchstiere ermöglichte, fielen jene nach bereits 14 Tagen durch eine Gewichtsreduktion, Immobilität, Ataxien sowie epileptische Anfälle auf und mussten infolgedessen abgetötet werden (Seiler et al. 2008; Wirth et al. 2010). Weiterhin ist die Gpx4 bei dem Reifungsprozess von Photorezeptorzellen relevant, zumal eine retinale Überexpression protektive Effekte gegenüber oxidativem Stress zeigt (Lu et al. 2009; Ueta et al. 2012). Aufgrund der subzellulären Lokalisation wurde hierbei über die Partizipation der mitochondrialen Gpx4 spekuliert. Allerdings sollte betont werden, dass die zytosolische

Variante (ohne Zielsequenz) gleichermaßen in die Mitochondrien somatischen Gewebes, nicht hingegen in die Mitochondrien der Keimzellen, translozieren kann (Liang et al. 2009). Ferner resultiert der gewebespezifische Knockout der Gpx4 in Keratinozyten in einer Differenzierungsstörung, in epidermaler Hyperplasie, Alopezie, entzündlichen Infiltraten der Dermis sowie dysmorphen Haarfollikeln (Sengupta et al. 2013). Darüber hinaus führt der *in vivo* Gpx4-Knockout in vaskulären Endothelzellen (unter Restriktion des lipophilen Antioxidans Vitamin E) zur Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran, der konsekutiven Ausbildung von Thromben sowie multiplen Mikroinfarkten (Wortmann et al. 2013). Unpublizierte Daten aus unserem Labor zeigen, dass ein globaler (außer ZNS), konditionaler Knockout *in vivo* zum Absterben der Versuchstiere nach etwa 14 Tagen führt. Als visceropathologisches Korrelat ließ sich ein partieller Leberzelluntergang sowie massive, renale Tubuluszellnekrosen (Abbildung 6) dokumentieren, wobei sich das akute Nierenversagen als todesursächlich herausstellte (Angeli et al. *submitted*).

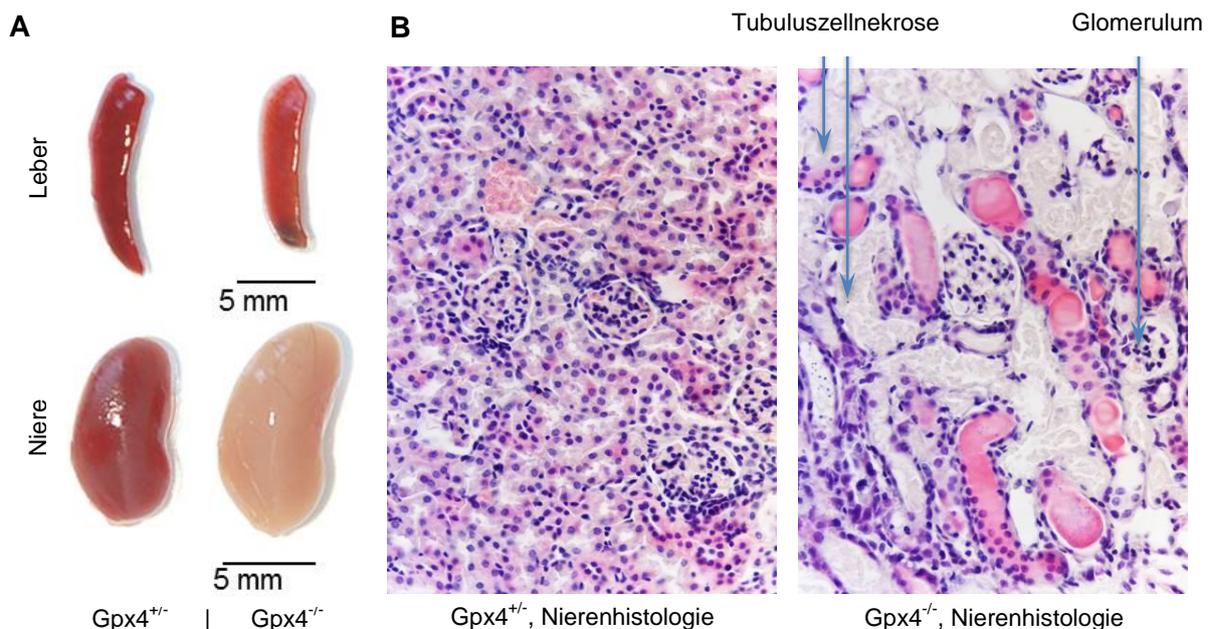


Abbildung 6: Organbeteiligung bei induziertem Gpx4-Knockout. (A) Makroskopisch zeigten sich geschrumpfte Lebern sowie geschwollene, blasse Nieren. (B) Histologisch konnten im Vergleich zur Kontrolle (Gpx4^{+/+}) zahlreiche Tubuluszellnekrosen bei intakten Glomeruli dokumentiert werden. Modifiziert nach (Angeli et al. *submitted*).

1.3. Die Pathophysiologie der Ischämie & Reperfusion

Delayed Graft Function charakterisiert die (gewöhnlich) transiente Funktionseinschränkung der Niere nach Transplantation. Diese erstreckt sich klinisch von marginalen Defiziten bis hin zu anurischem Nierenversagen, welches histopathologisch mit akuter Tubuluszellnekrose einhergeht (Perico et al. 2004). Gegenwärtig wird dieser Terminus indes als Notwendigkeit

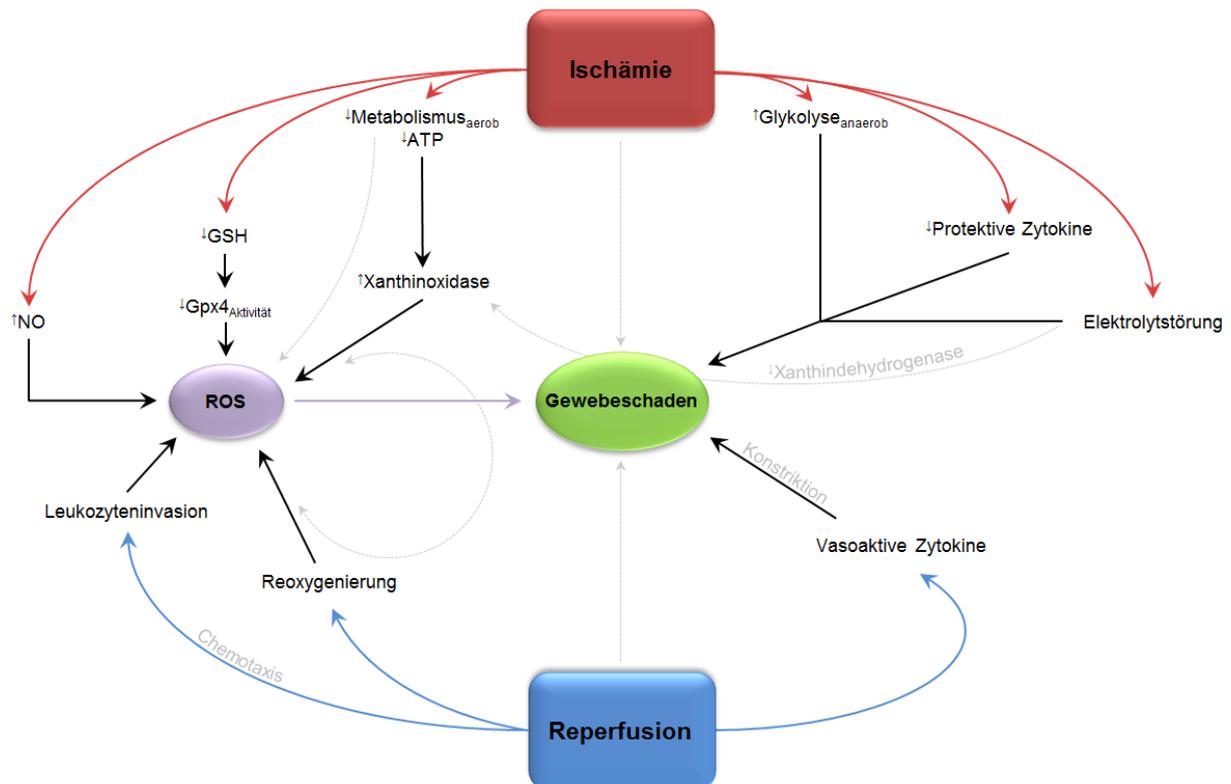


Abbildung 7: Die Schematische Darstellung wesentlicher Komponenten des Ischämie & Reperfusionsschadens. Anfallende Stoffwechselprodukte, reduzierte Glutathionspiegel, gestörter Energie- und Elektrolythaushalt während der Ischämie führen in Zusammenspiel mit der Reperfusion zu gesteigerter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und folglich zu Gewebeschäden.

zumindest einer Dialysebehandlung binnen sieben Tagen nach erfolgter Operation definiert (Halloran and Hunsicker 2001). Neben wesentlichen Parametern des Empfängers wie Alter, metabolischem Syndrom oder ethnischer Herkunft verkörpert die kurze kalte Ischämiezeit (CIT) den zentralen Risikofaktor (Halloran and Hunsicker 2001; Lebranchu et al. 2005; Ojo et al. 2000). So lässt sich die relative Risikoerhöhung einer *Delayed Graft Function* nach sechsständiger CIT auf 23% beziffern, zudem es periodisch im entsprechenden linearen Intervall ansteigt (Ojo et al. 1997). Auf zellulärer Ebene führt eine Ischämie zum Umbruch vornehmlich aerober Stoffwechselforgänge in den anaeroben Bereich mit anschließend unzureichenden Adenosintriphosphatspiegeln (Abbildung 7). Die anfallenden Metaboliten bedingen einen unphysiologisch erniedrigten pH, welcher mitunter die Bindung von Übergangsmetallen an ihre Trägerproteinen verhindert (Haugen and Nath 1999). Wie eingangs aufgeführt, katalysieren freie Eisenionen die Umwandlung von H_2O_2 und O_2^- in hochreaktive Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion, Haber-Weiss-Reaktion) sowie letztlich Stickstoffmonoxid (NO). Gewöhnlich sollte NO aufgrund der vasodilatatorischen Eigenschaft hypoxische Nierenschäden mildern. Allerdings vermag jenes auch Endothelzellverbindungen zu lösen und bedingt folglich eine Obstruktionen des proximalen Tubulus (Shoskes et al. 1997). Während der Ischämie resultiert die unausgewogene Kalziumhomöostase ferner in einem Wandel der Xanthindehydrogenase in die entsprechende Oxidase (Siedlecki et al.

2011). Das innerhalb der Hypoxie entstandene Hypoxanthin wird somit im Rahmen der Reperfusion unter Bildung von Superoxidanionen zu Xanthin metabolisiert. Die Superoxidanionen können mit Stickstoffmonoxid zu hochreaktivem Peroxynitrit reagieren (Edelstein et al. 1997), einem starken Oxidans sowie äußerst wirksamen Inhibitor der Komplexe I und III der Atmungskette (Szabo et al. 2007). Weiterhin resultiert die Ischämie & Reperfusion in der Ausschüttung von Chemokinen, wie Interleukin 12. Jenes stimuliert die Produktion des Tumornekrosefaktors-Alpha (TNF- α) und führt konsekutiv zur Aktivierung von Interferon- γ (IFN- γ) (Daemen et al. 1999; Koken et al. 2004; Tripp et al. 1993). Anschließend rekrutiert (IFN- γ) antigenpräsentierende Immunzellen vom Typ MHC I & II, welche die Invasion neutrophiler Granulozyten, Monozyten, natürlicher Killerzellen sowie T-Zellen induzieren und infolgedessen die Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies inmitten der Inflammation und Phagozytose durch den *oxidativen Burst* weiter potenziert werden (DeVries et al. 2003; Perico et al. 2004). Schließlich mündet die Kombination aus Ischämie & Reperfusion in einem enormen Aufkommen freier Radikale, unkontrollierter oxidativer Degradation von Lipiden (Haugen and Nath 1999) und letztlich in programmiertem Zelltod (Castaneda et al. 2003). In den Nieren stehen Lipoxygenasen mit eben jener Lipidperoxidation in kausalem Zusammenhang, allen voran die 5-Lipoxygenase. Durch die pharmakologische Inhibition der 5-Lipoxygenase mittels Zileuton konnte die renale Dysfunktion in Mäusen im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionsschadens signifikant reduziert werden. (Patel et al. 2004). Ferner konnte sowohl die pharmakologische Inhibition als auch die genomische Deletion der 12/15-Lipoxygenase, als weiterem Isoenzym der Lipoxygenasen, das Infarktvolume eines murinen zerebralarteriellen Okklusionsmodells nach Revaskularisierung annähernd halbieren (van Leyen et al. 2006). Übereinstimmende Ergebnisse konnten auch für die Endothelzellen des Gefäßsystems erhoben werden (Jin et al. 2008). Die Lipoxygenasen oxidieren Arachidonsäuren an entsprechender Position unter Bildung von Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETE). Zur Entfaltung ihrer Aktivität bedürfen jene Enzyme eines Grundtonus intrazellulärer Peroxide, um die Wandlung ihres katalytisch essenziellen Fe²⁺ in die dreiwertige Form zu gewährleisten (Ivanov et al. 2005). HPETE isomerisieren zu Hepoxilinen und vermitteln gemeinsam(?) die Freisetzung des *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) aus den Mitochondrien, was letztendlich den programmierten Zelltod zur Folge hat (Loscalzo 2008). Die Gpx4 stellt ein zentrales, Lipoxygenasen-kontrollierendes Enzym dar (Conrad et al. 2007). Nicht nur reguliert die Gpx4 die intrazelluläre Peroxidkonzentration und damit indirekt die Lipoxygenasen in ihrer Funktion, sondern reduziert auch HPETE zu Hydroeicosatetraensäuren (HETE) und sichert hierdurch das Zellüberleben. In adulten Ratten geht die Ischämie & Reperfusion mit erniedrigten GSH-Konzentrationen und konsekutiver Inaktivierung der Gpx4 durch Substratmangel einher, wobei die Gewebeschädigung durch Vitamin E (lipophiles

Antioxidans) nahezu gänzlich verhindert werden konnte (Fleck et al. 1997). Die Inaktivierung der Gpx4 führt zu erhöhter Lipidperoxidation sowie mitochondrialer Induktion des Caspase-unabhängigen, nicht apoptotischen Zelltods (Seiler et al. 2008). Dieser letale Phänotyp ließ sich durch entsprechende pharmakologische Inhibition der 5-Lipoxygenase (Zileuton) (Angeli et al. *submitted*), der 12/15-Lipoxygenase (PD146176), durch Vitamin E sowie Knockdown des *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) verhindern (Seiler et al. 2008). Außerdem weisen erste Indizien aus unserem Labor auf eine Herabregulierung der Gpx4 im Zuge eines Ischämie/Reperfusionsschadens hin, dessen Histopathologie interessanterweise exakt der Deletion der endogenen Gpx4 entspricht (Patschan et al. 2012). Infolgedessen bedarf die potentielle Relation zwischen der Gpx4 und der Ausbildung einer *Delayed Graft Function* im Rahmen einer Nierentransplantation Aufklärung.

ROS & Zelltod

Kontrollierte Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies sind essenzieller Bestandteil der zellulären Homöostase, deren regionale Akkumulation an der Signaltransduktion von Rezeptor-tyrosinkinasen (RTK) partizipiert (siehe unten). Weiterhin werden mitochondriale ROS als Reaktion auf alternierende Umweltbedingungen, wie Hypoxie oder Energiemangel, vermehrt gebildet (Sena and Chandel 2012). Hierbei wird infolgedessen die Transkription des *hypoxia inducible factor 1* (HIF1) stimuliert, welcher die Adaptation der Zelle an ihre veränderte Umgebung unterstützt (Chandel et al. 1998). Hingegen resultieren exzessive Konzentrationen gebildeter ROS in zellulären Schädigungen und folglich in der Induktion des Zelltods (Abbildung 8). Insofern wird die Entstehung sowie Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies im Kontext zu diversen Zelltodmechanismen diskutiert. Hierzu gehört

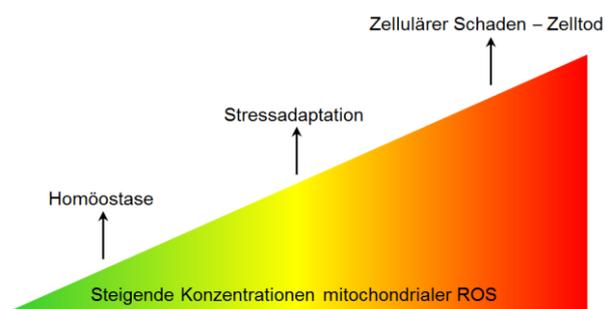


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Wirkung mitochondrialer ROS. Niedrige Spiegel sind essenziell für die zelluläre Homöostase, erhöhte treten im Rahmen der Stressadaptation auf, exzessive führen zu zellulären Schäden und Zelltod. Modifiziert nach (Sena and Chandel 2012).

mitunter der sogenannte *Autophagic Cell Death*, welcher durch massive zytoplasmatische Vakuolisierung charakterisiert ist (Galluzzi et al. 2012). Generell ermöglicht die Autophagie sowohl das Recycling intrazellulärer Moleküle unter Deprivation energiereicher Triphosphate als auch den Abbau dysfunktioneller Proteine oder Organellen, wodurch sie zusätzlich eine Art Qualitätskontrolle für Organellen darstellt (Sena and Chandel 2012). Die

Inhibition der Autophagie erhöht die Rate der dysfunktionellen Mitochondrien und resultiert folglich in einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (Tal et al. 2009). Der protektive Effekt der Autophagie spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese der renalen Tubuluszellschädigung im Rahmen einer Ischämie & Reperfusion (Jiang et al. 2012), nachdem Mäuse mit einem Knockout des *Autophagy protein 5* (ATG5^{-/-} – keine Autophagie möglich) wesentlich sensitiver gegenüber Ischämien reagierten (Liu et al. 2012). Allerdings bleibt der *Switch* zwischen Autophagie und *Autophagic Cell Death* offen. Möglicherweise wird er durch den *high turnover* reaktiver Sauerstoffspezies initiiert (Suzuki et al. 2008). Letztlich führt der *Autophagic Cell Death* zur selektiven Inaktivierung der Katalase, welche in der Akkumulation von H₂O₂ sowie in der (vermutlich) unspezifischen, oxidativen Degradation von Proteinen resultiert (Yu et al. 2006). Eine weitere Form des Zelltods ist die Apoptose, welche durch die Freisetzung mitochondrialer ROS gekennzeichnet ist und morphologisch mit zellulärer Involution (Pyknose), Chromatinkondensation sowie Fragmentation der DNA und Kernstrukturen (Karyorrhesis) einhergeht (Galluzzi et al. 2007). Es wird sowohl zwischen der intrinsischen/extrinsischen als auch der Caspase-abhängigen/unabhängigen Apoptose unterschieden. Hierbei entstehen ROS vornehmlich im Rahmen der intrinsischen Apoptose, beispielsweise als Reaktion auf Schädigungen der DNA oder exzessive intrazelluläre Kalziumkonzentrationen. Der apoptotische Zelltod wird definiert als Dissipation des mitochondrialen Membranpotentials, Sistieren der ATP-Synthese sowie Entkopplung der Atmungskette, wodurch sowohl die Produktion exzessiver ROS als auch die Freisetzung Zelltod-initiiender Signalmoleküle aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol begünstigt wird (Galluzzi et al. 2012). Je nachdem, ob sich der Zelltod durch pharmakologische oder aber genomische Deletion der Caspasen verhindern lässt wird zwischen Caspase-abhängiger bzw. unabhängiger Apoptose unterschieden.

Die Deletion der Gpx4 führt zu Caspase-unabhängigem, nicht-apoptotischem Zelltod, welcher folglich weder zur Aktivierung der Caspase-3 führt noch durch den irreversiblen Breitspektrum-Caspase-Inhibitor, Z-VAD(OMe)-FMK, verhindert werden kann (Seiler et al. 2008). Das zelluläre Überleben ließ sich einzig mittels Vitamin E, via Inhibitoren diverser Lipoxygenasen oder dem Knockdown von AIF sicherstellen (siehe oben).

Zu Beginn des Jahrhunderts erschienen die ersten experimentellen Arbeiten bezüglich der regulierten Nekrose (Nekroptose) (Chan et al. 2003; Zong et al. 2004), worauf sich jene als wissenschaftlich anerkannte Form des Zelltods etablieren konnte (Galluzzi et al. 2012). Ursprünglich wurde die Nekrose als unregulierte Form des Zelltods definiert, welcher sich histologisch von den Kriterien der Autophagie sowie Apoptose unterscheidet. Die Charakteristika der Nekroptose sind mitunter ultrastrukturelle Kernmodifikationen, osmotisch

aufgequollene Organellen sowie die Zunahme des intrazellulären Volumens, was letztendlich den Verlust der Zellintegrität hervorruft (Kroemer et al. 2009).

Die für diese Dissertation wesentlichen molekularen Mechanismen der Nekroptose werden im Folgenden beschrieben. Die Bindung eines Liganden (e.g. TNF- α) an den *tumor necrosis factor receptor 1* (TNFR1) führt zu dessen Trimerisierung (Chan et al. 2000), wodurch die Rekrutierung diverser Proteine, einschließlich der *TNFR-associated death domain* (TRADD), der Serin/Threoninkinase *receptor-interacting protein kinase 1* (RIP1), der *cellular inhibitor of apoptosis proteins* (cIAPs) sowie der *TNFR-associated factor 2 & 5* (TRAF2/TRAF5) initiiert und infolgedessen als *Complex I* bezeichnet wird (Abbildung 9) (Galluzzi et al. 2011; Micheau and Tschopp 2003). Anschließend wird RIP1 durch cIAPs ubiquitiniert, wodurch der *Survival Pathway* NF- κ B eingeleitet wird. Die Deubiquitinierung von RIP1 durch die *Ubiquitin-specific-processing* protease (CYLD) führt zur Veränderung der konstitutionellen Zusammensetzung des *Complex I*, welcher anschließend als *Complex II* (DISC) bezeichnet wird. Mitunter wird hierbei die Caspase-8 aktiviert, zu deren Substraten RIP1 sowie RIP3 zählen. Konsekutiv wird durch die Spaltung von RIP1 die reguläre, Caspase-abhängige Apoptose eingeleitet (Feng et al. 2007). Die pharmakologische (Z-VAD(OMe)-FMK) oder virale (CrmA) Inhibition der Caspase 8 führt zur Interaktion zwischen RIP1 und RIP3 sowie zur komplementären Phosphorylierung ihrer Serinreste (Cho et al. 2009). Der hierdurch generierte, supramolekulare Komplex wird auch als Nekrosom bezeichnet (Vandenabeele et al. 2010), welcher über multiple pronekrotische Signale die Produktion exzessiver ROS stimuliert. Die Aktivierung von Calpainen und Sphingomyelinasen (SMases) vermittelt sowohl die Permeabilisierung sowie Freisetzung lysosomaler Hydrolasen als auch die Manipulation intrazellulärer Eisenspeicher über JNK-Signalkaskaden (Galluzzi et al. 2012). Das frei gewordene Fe²⁺ katalysiert die nichtenzymatische Umwandlung von anfallendem H₂O₂ zu OH⁻, welches vornehmlich membrangebundene Lipide oxidiert (Vanlangenakker et al. 2008). Die ROS-Akkumulation führt zur irreversiblen Schädigung der DNA, von Proteinen sowie Lipiden und schließlich zum Zelltod. Ferner weist die sogenannte Ferroptose enge Parallelen zur Nekroptose auf. Sie kann in Tumorzelllinien (erfordert die Präsenz von onkogenem RAS) durch Erastin induziert werden und geht zudem mit einer gesteigerten Lipidperoxidation einher (Degterev and Yuan 2008; Dixon et al. 2012). Kontextbezogen werden die letalen Auswirkungen des Erastins nicht der Manipulation des *voltage dependent anion channel* (VDAC) zugeschrieben, sondern vornehmlich der Inhibition des Glu/(Cys)₂-Antiporters X_C⁻, welcher die Aufnahme von Cystin (Cys)₂ im Austausch gegen Glutamat initiiert (Dixon et al. 2012). Intrazellulär wird jenes zu Cystein reduziert und dient vielfältigen biologischen Prozessen, ebenso der *de novo* Synthese von Glutathion (Bannai 1986). Nachdem sich die Induktion der Ferroptose durch den Eisenchelator Deferoxamin inhibieren lässt, wird der

Eisen-katalysierten Generierung hochreaktiver ROS diesbezüglich eine fundamentale Bedeutung zugeschrieben. Weiterhin kann sowohl die Nekroptose als auch Ferroptose durch deren spezifische Inhibitoren Necrostatin-1, respektive Ferrostatin-1, verhindert werden. Erstaunlicherweise wird die Expression der Gpx4 nach Zugabe von TNF- α deutlich reduziert (Latchoumycandane et al. 2012). Außerdem lässt sich der Zelltod nach Gpx4-Knockout via Necrostatin-1 oder Ferrostatin-1 nahezu gänzlich, durch Deferoxamin zumindest partiell abwenden (Angeli, persönliche Mitteilung). Ferner wird die, während der Ischämie & Reperfusion aufkommende, Tubuluszellnekrose gleichermaßen mit erhöhten Eisenkonzentrationen in Zusammenhang gebracht (Martines et al. 2013), wobei glomerulär filtrierbare Eisenchelatoren das Auftreten postischämischer Nierenschäden selektiv unterdrücken konnten (Paller and Hedlund 1994).

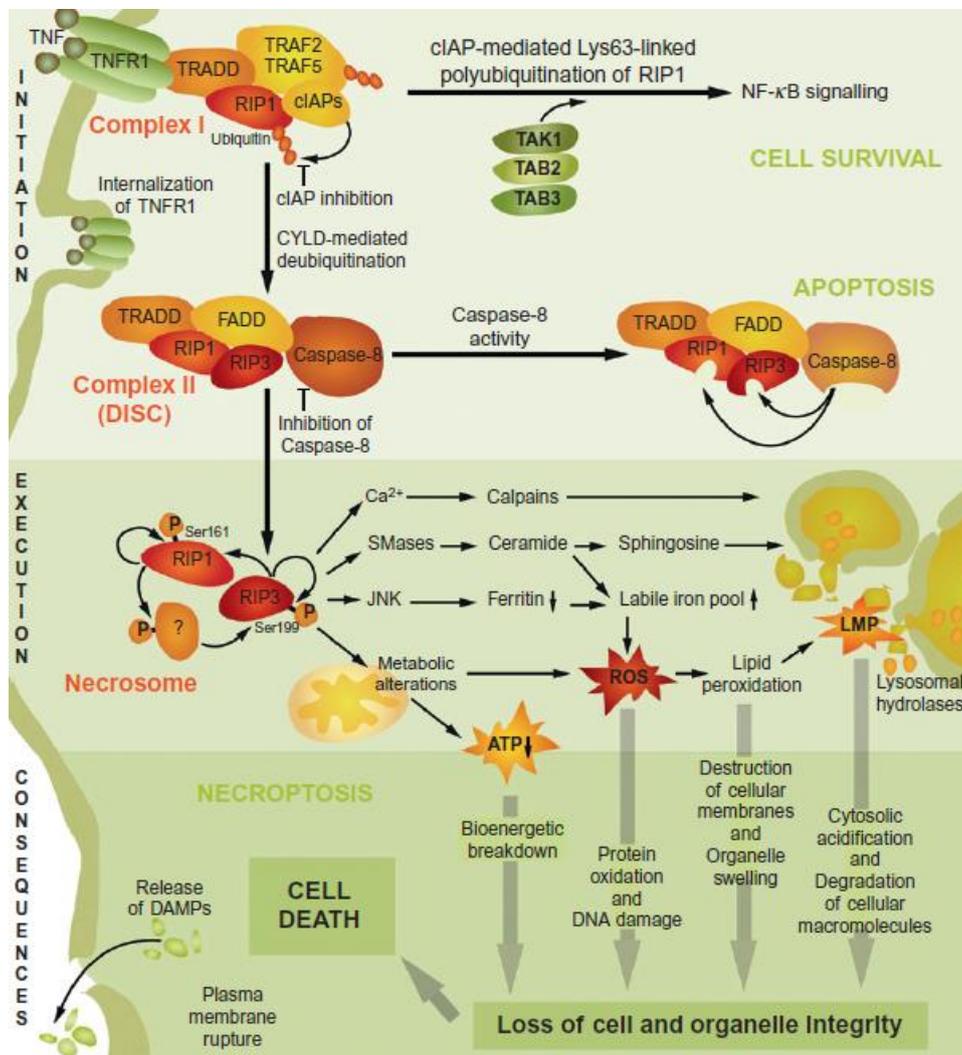


Abbildung 9: Übersicht über die Induktion der Nekroptose. Die Bindung von TNF- α bewirkt die Trimerisierung des TNFR1 sowie die Ausbildung des *Complex I*. cIAPs führen zur Ubiquitinierung von RIP1, worauf der *Survival Pathway* NF- κ B aktiviert wird. Die Deubiquitinierung von RIP1 durch CYLD mündet in der Ausbildung des *Complex II* (DISC). Wird zudem die Caspase-8 inhibiert, interagiert RIP1 mit RIP3 (Nekrosom). Anschließend bedingen diverse Signalwege die Produktion hochreaktiver ROS und letztlich den Zelltod. Modifiziert nach (Galluzzi et al. 2012).

1.4. ROS – Signaling

Die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) stellen eine heterogene Gruppe von Proteinkinasen dar, welche die Übertragung einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung) an ihr Zielprotein katalysieren. Nach Stimulation der extrazellulären Domäne des Rezeptors durch seinen Liganden sowie Dimerisierung erfolgt die alternierende Phosphorylierung ihrer Tyrosinseitenketten, wobei jene schließlich für Proteine mit SH2- sowie *Phosphotyrosine-binding domain* (PTB) zugänglich werden (Lemmon and Schlessinger 2010), beispielsweise die Phospholipase C oder die Tyrosinkinase Src. Kontextbezogen ließ sich im Redoxmetabolismus eine regulatorische posttranslationale Phosphorylierung sowohl für Gpx1 (Cao et al. 2003) als auch Peroxiredoxin 1 (Prx1) im Rahmen der Wundheilung erheben (Woo et al. 2010). Die regionale Inhibition von Prx1 via Phosphorylierung ermöglicht die lokale Aggregation reaktiver Sauerstoffspezies und mündet in entsprechender Persistenz der Proliferation. Die durch die Phosphorylierung regional eingeschränkte katalytische Aktivität von Prx1 verhält sich hierbei umgekehrt proportional zu der aktuellen Wasserstoffperoxidkonzentration, so dass deren potentieller Exzess die unmittelbare Reaktivierung betroffener Peroxiredoxine zur Folge hat. Indessen verbleibt die Mehrzahl der antioxidativen Moleküle nativ und weiterhin reaktionsfähig im Zytosol (Toledano et al. 2010).

Die RTK werden ihrerseits über Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) negativ reguliert. Während der Signaltransduktion führt die transiente Akkumulation von ROS zur reversiblen Inaktivierung der PTP (Ostman et al. 2011) und schließlich zu einem Anstieg des RTK-

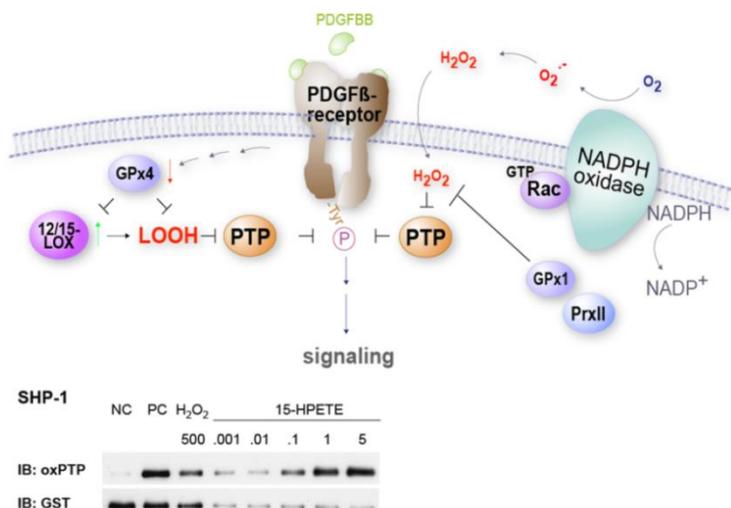


Abbildung 10: Die Schematische Übersicht der Signaltransduktion von Wachstumsfaktorrezeptoren. Die ROS inhibieren die PTP und erhalten den Wachstumsreiz aufrecht. HPETE vermögen in nanomolaren Konzentrationen PTP (SHP-1) zu oxidieren, H₂O₂ hingegen im mikromolaren Bereich; GST = Tag der SHP-1. Modifiziert nach (Conrad et al. 2010).

Signals. Die PTP besitzen ein katalytisches Cystein im aktiven Zentrum und sind durch das *Motiv Cys(X)5Arg* charakterisiert (Denu and Dixon 1998). Hierbei wird die Oxidation des Cysteins (Thiolats) durch dessen niedrigen pKa-Wert erleichtert. Allerdings oxidieren die ROS das katalytische aktive Thiolat (R-S⁻) weder zur Sulfen- (R-O⁻), noch Sulfin- (R-O₂⁻) oder Sulfonsäure (R-O₃⁻), zumal dies in der irreversiblen Inaktivierung des Enzyms resultieren würde (Yang

et al. 2007). Indes führt die Oxidation via H_2O_2 zur Ausbildung eines intermediären zyklischen Sulphenylamids zwischen dem nukleophilen Cystein und einem angrenzenden Amid, wodurch dessen katalytische Aktivität durch Ausbildung der kovalenten Bindung blockiert wird (Salmeen et al. 2003; Yang et al. 2007). Durch ROS werden beispielsweise die Phosphatasen PTP1B, PTEN sowie MAPK entsprechend reguliert (Tonks 2005). Sowohl die Signaltransduktion der RTK als auch die exogene Zugabe von H_2O_2 resultiert in der temporären Inaktivierung der PTP sowie der Phosphorylierung diverser Tyrosine (Finkel 1998). Hierbei aktivieren die sogenannten *Rho-like small GTPases* Rac 1 & 2 membranständige NADPH-Oxidasen (Hordijk 2006; ten Klooster and Hordijk 2007) (Abbildung 10), welche die (extrazelluläre) Produktion von Superoxidanionen aus O_2 katalysieren. Aufgrund seiner negativen Ladung muss O_2^- zunächst via Superoxiddismutasen (oder spontan) zu relativ stabilem H_2O_2 metabolisiert werden, um die Zellmembran passieren

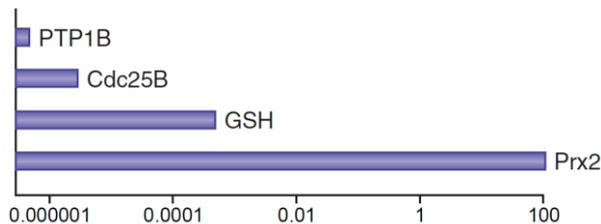


Abbildung 11: Relative Selektivität von H_2O_2 gegenüber PTP1B, GSH sowie Prx2 (und Cdc25B - Cyclin dependant kinase 2 aktivierende Phosphatase). Verglichen mit Prx2 ist die Affinität von H_2O_2 zu PTP1B deutlich niedriger (log. Skala). Modifiziert nach (Winterbourn 2008).

und als Signalmolekül agieren zu können. Intrazellulär vermag das gebildete H_2O_2 das katalytische aktive Cystein der PTP zu oxidieren bzw. zu inaktivieren. Allerdings erweist sich das Wasserstoffperoxid als verhältnismäßig reaktionsträges Oxidans, welches, im Gegensatz zu PTP1B, eine relativ hohe Affinität zu Peroxiredoxin 2 (Prx2) oder GSH aufweist (Winterbourn 2008) (Abbildung 11). Insofern wirkt mitunter Prx2 einer transienten Inaktivierung der Phosphotyrosinphosphatasen durch H_2O_2 entgegen (D'Autreaux and Toledano 2007; Woo et al. 2010). Kontextbezogen wurde die balancierte Oxidation katalytischer Cysteine im Rahmen zellulärer Wachstumsprozesse inzwischen für Prx2 nachgewiesen (Woo et al. 2010). Weiterhin sollte hervorgehoben werden, dass die Reaktivität von H_2O_2 gegenüber enzymatischen Cysteinen unter entsprechenden zellulären Konditionen prinzipiell immens ansteigen kann (D'Autreaux and Toledano 2007). Im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid vermögen aliphatische Peroxide (HPETE) das katalytische Cystein im aktiven Zentrum der Phosphatasen (SHP-1) in bereits nanomolaren (H_2O_2 in mikromolaren) Konzentrationen effektiv zu oxidieren, respektive zu inhibieren (Conrad et al. 2010) (Abbildung 10). Jene sind Produkte der 12/15-Lipoxygenase, deren Reduktion charakteristischerweise der Gpx4 obliegt. Die Gpx4 wurde bekanntlich als Enzyme identifiziert, welches Biomembranen vor Lipidperoxidation schützt (Ursini et al. 1982). Nachdem jenes Enzym vorwiegend an der Zellmembran agiert, wäre sie für die regulatorische Einflussnahme im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion prädestiniert. Durch die Reduktion lipophiler Peroxide könnte demzufolge die Oxidation der Phosphotyrosinphosphatasen weitgehend unterbleiben,

Einleitung

wodurch ein verstärkter bzw. unkontrollierter Proliferationsreiz verhindert wird. Inwiefern nun die Gpx4 (wie Gpx1 oder Prx1) über eine Phosphorylierung an einem oder mehreren ihrer sieben hochkonservierten Tyrosinreste (Abbildung 12) reguliert wird, war ebenfalls ein zentraler Bestandteil dieser Dissertation.

	Y32	Y53	Y63	Y96	
Mus musculus	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDI	DGHMVCLDKYRGFVCIVTNVASUGKTDVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN	97		
Rattus nor.	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDI	DGHMVCLDKYRGFVCIVTNVASUGKTDVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN	97		
Sus scrofa	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDI	DGRMVNLDKYRGHVCIVTNVASUGKTDVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSN--EEIKEFAAG-YN	97		
Bos taurus	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDI	DGHMVNLDKYRGFVCIVTNVASUGKTEVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSN--EEIKEFAAG-YN	97		
Homo sapiens	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDI	DGHMVNLDKYRGFVCIVTNVASUGKTEVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGSN--EEIKEFAAG-YN	97		
Gallus gallus	MCAQADEWRSATSIYDFHARDIDGRDVSLEQYRGFVCII	TNVASKUGKTAVNYTQLVLDLHARYAECGLRILAFPCNQFGRQEPGDD--AQIKAFAG-YG	97		
Dro. melano.	MSAN-GDYKNAASIEFTVKDTHGNDVSLKYGKGVV	LVNIVASKCGLTKNMYEKLTLKDYGERGLVILNFPNCQFGRQEPGDD--EETIQPCQLNYG	87		
Sac. cerev.	-----MSEFYKLAPVDKKGQPFPPDQLKGVV	LVNIVASKCGLTKNMYEKLTLKDYGERGLVILNFPNCQFGRQEPGDD--EETIQPCQLNYG	87		
	Y103	Y153	Y169		
Mus musculus	VKFDMSKICVNGDDAHPLWKWMKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPQVIEKDLPCYL----	170			
Rattus nor.	VRFDMYSKICVNGDDAHPLWKWMKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPQVIEKDLPCYL----	170			
Sus scrofa	VKFDMSKICVNGDDAHPLWKWMKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPQVIEKDLPCYL----	170			
Bos taurus	VKFDLFSKICVNGDDAHPLWKWMKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPLVIEKDLPCYL----	170			
Homo sapiens	VKFDMSKICVNGDDAHPLWKWMKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPLVIEKDLPCYL----	170			
Gallus gallus	VKFDMSKIEVNGDDAHPLWKWLKEQPKGRGTLGN-AIKWNFTKFLINREGQVVKRYSPMEDPYVIEKDLPCYL----	170			
Dro melano.	DIGEVFAKVDVNGDNAAPLYKYLKAKQTG--TLGS-GIKWNFTKFLVNKEGVPINRYAPTTPMDIAKDIEKLL----	169			
Sac cerev.	VTFFPIMKKIDVNGGNEPVPYKFLKSKQSG--MLGLRGIKWNFEKFLVDKKGKGVYERYSSLTKPSLSLSETIEELLKEVE	163			

Abbildung 12: Proteinalignment der Gpx4 aus verschiedenen Organismen. Da die Tyrosinreste von zentraler Bedeutung für diese Arbeit sind, wurden jene türkis markiert.

2. Fragestellung

Im Rahmen prolongierter Ischämie zeigt die Histopathologie der Nierentransplantate das Bild einer akuten Tubuluszellnekrose bei intakten Glomeruli. Analog führt der konditionale Knockout der Gpx4 in adulten Mäusen zu einem entsprechenden Phänotyp. Folglich gründet der erste Abschnitt dieser Dissertation auf der Frage:

- Können genetische Polymorphismen der humanen GPX4 in einem ausgewählten Kollektiv identifiziert werden, welche auf die Ausbildung einer *Delayed Graft Function*, respektive auf das letztendliche *Outcome* einer Nierentransplantation, Einfluss ausüben?

Die Aktivitäten der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) werden strikt über die Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) reguliert, da eine konstitutive Aktivierung der RTK zu unkontrollierter Proliferation sowie Neoplasien führen kann. Um jedoch ein transientes Signal der RTK zu erlauben, werden die PTP temporär durch ROS (H_2O_2 & LOOH) oxidiert und folglich reversibel inaktiviert. Da die Gpx4 die Konzentrationen von Alkylhydroperoxiden effizient kontrolliert, stellt sich die Frage, inwiefern die Gpx4 posttranslational modifiziert wird, beispielsweise über eine Phosphorylierung ihrer Tyrosine. Das zweite wichtige Themengebiet dieser Arbeit besteht folglich in der:

- Identifikation regulatorischer Tyrosinseitenreste der Gpx4, denen selektive Bedeutung im Rahmen der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen zukommt.

3. Material

Antikörper	Hersteller	Best.-Nr.
anti-HA High Affinity, Klon 3F10	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	11867423 001
anti-PHGpx mGpx4 1B4 (Ratte)	Elisabeth Kremmer, GSF, München, Deutschland	
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rat IgG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A-11006
anti- β -Aktin (Maus)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A5441
anti-Ratte-HRP-Konjugat (Ziege)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	112-035-062
anti-Maus-HRP-Konjugat (Ziege)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	2031

Bakterien	Hersteller
DH5 α , Escherichia Coli	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Chemikalien	Hersteller	Best.-Nr.
0.05% Trypsin EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	25300054
4-Hydroxytamoxifen (Tam)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	H7904
α -Tocopherol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T3251
β -Mercaptoethanol (2-ME)	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	4227.1
Acrylamid 30%	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3037.1
Agarose, low melting point	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	R0801
Albumin Fraktion V	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	8076.2
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A3678
Ampicillin-Natriumsalz	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	HP62.1
Agencourt Ampure XP Beads	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	A63881
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	840004
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B6131
Buthioninsulfoximin (BSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	B2640
Chloroquin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C6628
CleanSEQ-Beads	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	000136
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D9779
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	41966
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	D2650
dNTP Set	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	10297-01
DPBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	14040
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	E9884
Erastin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	E7781
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.00983.2500
Ethidiumbromid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	2218.1
Ferrostatin-1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	SML0583
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich	A15-043
Gene Ruler DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	SM1331
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	G6013

Material

Glutathionethylester (GSH-EE)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	G1404
Glutarialdehyd	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	3778.1
HEPES 1M Solution	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	15630056
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09634.2511
Kalziumchlorid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	C1016
Kristallviolett	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	C3886
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	25030
Milchpulver	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T145.2
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A9165
Natriumazetat	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	S1429
Natriumchlorid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	9265.2
Natriumhydrogenphosphat	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	P030.1
Natriumhydroxid	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	6771.1
Necrostatin-1	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	N9037
Oligonukleotide	Metabion AD, Martinsried, Deutschland	(M)
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	(SA)
Oligonukleotide	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland	(T)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	0335.3
Page Ruler Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland	SM0671
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	15140-122
Phenol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P1037
Phenol/Chlorof./Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	A156.2
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	1 697 498
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P7255
Qiagen Q-Solution	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	1005485
Rotenon	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	R8875
TEMED	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	2367.3
tert-Butylhydroperoxid (tBOOH)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	458139
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.08382
Triton X-100	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	17-1315-01
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	T8154
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	P5927
SDS ultra pure	Roth Carl GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	2326.2
VECTASHIELD Mounting M.	Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom	H-1200
WGA Alexa Fluor 594 Konjugat	Invitrogen, Karlsruhe, Germany	W11262

Enzyme	Hersteller	Best.-Nr.
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	R0136S
<i>Eco</i> RI-HF	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	R3101S
Long Amp Taq 2x Master Mix	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	M0287S
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	11708-013
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	M0202S
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	18038-026
<i>Xba</i> I	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	R0145S

Material

Kits / Sonstiges	Hersteller	Best.-Nr.
AGFA Medical X-Ray	Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien	EC84A
Amersham Hybond ECL	GE Healthcare, Freiburg, Germany	RPN303D
Amersham ECL Plus Reagenz	Healthcare, Freiburg, Germany	RPN2132
AquaBluer Solution	MultiTarget Pharmaceuticals	6015
Big Dye Terminator v3.1 cycle	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland	4337454
Fluorodish Cell Culture Dish	World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA	FD35-100
JETstar Plasmid p. system	Genomed GmbH, Löhne, Germany	220020
PCR Cloning Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	231122
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	12163
Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	12123
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany	28104
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland	23227

Equipment	Hersteller
3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
AGFA Curix 60	Siemens AG, Erlangen, Deutschland
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland
Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland
Benchtop UV Transilluminator	UVP, Upland, USA
Binder CO2 Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Bio-Vision 1000 Transilluminator	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Centrifuge 4-15	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CleanSEQ Magnet	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Dynal MPC-9600 Magnet	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese Power Supply	Consort, Parklaan, Belgien
Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Hettich Universal 320	Hettich, Newport Pagnell, England
inoLab Labor pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
LSM 510 Meta Konfokalmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, Deutschland
Multifuge 3 SR	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
New Brunswick Inova Incubator / Shaker	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
OTD Combi Ultrazentrifuge	Sorvall, Langensfeld, Deutschland
Photometer Bio	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spectra Max M5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Thermoheater	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UZ-PA-38,5-1 Tubes für Ultrazentrifugen	Kisker GbR, Steinfurt, Germany

Gpx4 – Sequenzierung

Ausgangssequenz

Im Folgenden ist die (über <http://genome.ucsc.edu/> abrufbare) genomische Sequenz des humanen Chromosoms 19 im Bereich der Basenpaare 1101273 – 1107729 abgebildet. Die zu untersuchende Region wurde bis auf etwa 2000 Basenpaare stromaufwärts erweitert, um Polymorphismen sowohl in angrenzenden Promotorregionen als auch Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu erfassen. Zur besseren Übersicht wurden die identifizierten Polymorphismen bereits hier gelblich hinterlegt. Als weitere Orientierung sind die 5'-UTR sowie 3'-UTR grün, die mitochondriale Zielsequenz blau und die Exons 1-7 in ihrer Reihenfolge rot hervorgehoben. Vorkommende Längenpolymorphismen innerhalb eines Individuums wurden unterstrichen.

Chromosom 19

AGATCTTAAAAAAGAAATGAAGCCACAGGACAGCCCCTCCCAGTCCTTCTGAGCCAGGGGCTGCTCTA
GAAAGATATGTGGCAACACAGCTTCTGCAGGGACACTCAAGAACTCCGCCCTCACAGGGCTGGAGCCTT
GAGAGGTCCCCGAGACTCCATTTCCCGTTCGTGAAATGGGACACTCTGGGAAAAGCTGTGAAGCCCCCA
GCACAAATCTCTCCAGAGCCTGGGGCCCCGTTCTCAGATCCGAGGTCGCGACCCCGTGTTCCTCCACTT
CTGACTTTATCACAATTGGCAGGAAGTCAGGAATGGGATCAAGTCTCTCCGCGGAGCTGTGGGTGCTGAGC
TGTTTTCTGGCAACCCTGAAATAAACTCCCATTTCAGTGCACATGTTTGCAACAACTTAAGGAAAACAACAC
CGGCAAAATTGCGAACAGCTGAGCCTTCGCAAGGGCAAGAACAGAGTCACCAGTGTGGCCCTGTCAACCCGG
CACTGCCAGGGCGGGAGGAAATGGGGGGGTTTCTGAGAAGTCAGACAATGGGAGTTGACTCCAAGAAGCTC
AGCCTCTAGGGGCTGGGCGGGAGCAAAGCCATGTGAACAGACTTATGCAAGACCAGGATTCGGCCAGCCCT
GCTCAGGGATCCTTGCTTCACTGCCTCTGCCACCAACCATCCATGACGCCTCTGTGCTGCATCTGGCAGGC
CTGAGTCGGGGGCGAGTGSCGGGGGCGAGGCTCATAGCAACCCCAAGTCAACCCGGCCCTGAGTCTGTCTC
TGAAGAAATACCTCAGTGCAGGGTCAGAAAAGGTTAAGAAGCTTGAGGACAACATACAAATCCCAAGCACCTAG
GCGGGGTAGAGTGGCTCACACTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCGGATCACCTGAGGT
CGGGAGTTCGAGACCAAGCTGACCAACATGGTGAAAGCCCGTATCTACTAAAAACACAAAATAGCTGGGC
GTGGTAGCACATGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGACTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGAAAGC
GGAGTTGCAGTGAGCTGCGATGGAGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGACCAAGACTCCTCAAAAAA
AAAAAAAAAATCCAAACCCCTGCCTGTACAGGGTCAAAGTCCAATCACGGTGACTCAGTTCCCAAGTATG
AGATGAGTGTCTGTTGCCACATGTCCAAGCCACGAAGTGAAAAACAGAGTTGGAAGCCAAGATGTGGGGC
AGTATGGGCTCGGGTGTGCCATACCTTGTAAATGTTAGAAGTGTAAGAAAACCCCTCAGACTTGTGTTTTATT
TCTGAGCACATAACGCGCGTCCCTGCGTGGGCAGCTGCCCTGGGGTGGGAGCCAGGAAACTCCAGGT
TCTCAGTTAAGTGGTAACTGTCTTGATGACTCTCAGGTCTCAGTGCCACATTATACAAGCGGCTCAGCAACC
AGACCCAGGATGGGAGTCACTGACCCCTGCGCCATGGCAGGGGTGAGGGTAGGGACACCCCCATAAG
ATGGAGCTGTGATGAGAAGCAAACCAACTCAGTTTGGTTTCATTTACATTAATAAGGCAAATCCCTTGGCCG
GATGCGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTCTGGGAGGCCTAGGCGGGCAGATCACCTGAGGTCAGG
AGTTCGAGATCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCTGGGTGT
GGTGGCTCGCTCGTGTAAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGTCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGGCTG
GGTGGAGTTGCAGTGAGCTGAGATAGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAAAAGAGCAAAAAAAGTGTGT
CTCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCAATCCCGGCCGAGCCTTTGGCTCACGCATGTGATCCAGCACTTT
TGGGAAGCTGAGGCTGGAGGATCACTTGAAGTCAGAGTTTGAAGACCAGCCTAGGCAACATAGCGAGACCC
CCATGTCTACAAAACAATAATTAGCCAGGAATGGTGGATGAGCCTGTTGTCCAGCTACTCGGGAAGCAGAG
ACGGGAGGTTTCGCTTGAGCCTGGGAGGTCGAGGCTGCAGTGTGCCCTGATCGTGCCACTGCACGTTAGCCT

Material

GGGCAACACAGCAAGACCCCTGTGTCTTAAAAAAAAAAGGTAAATAAGAGTTGGGGACACTTTTCTGCGAGT
TGGAGAAACCAACCCCTCGACGAGTCTTAAGTAGTATTCTCAGGTTGTCTGGCCTGCGGCCGCGCTGCT
GTCAACCAGCCGATAACTGCGCTGCCTCCCGACGCGCCGACCCAGGACACGGCCTCCTAGACACAAG
CGAGCATGCGCAGTCGCCAACAAAGTCCGCACGTCCGGTCCCGCCCCCTTCCCCGCCTTCTTCCCAC
TCCGGCCTCCCATTGGCTGACGTGCGCGGAGCGCTCAACACCGACGCGTCTGACCAATGAGCGCTCTGG
AGGGCGTGGCCGTGGGAAAGGAGGCGCGGAAAGCCGACGCGCGTCCATTGGTGGCTGGACGAGGGGAG
GAGCCGCTGGCTCCAGCCCCGCGCGATGAGCCTCGGCCGCTTTGCCGCTACTGAAGCCGCGCTGC
TCTGTGGGGCTCTGGCCGCGCCTGGCCTGGCCGGGACCATGAGTGTAGCTAGCGCCGCGGCCGTTGCCGGC
CCGGTGACCGTTGGGGCGGGCGCGCATCCCTGCCTCCGCTCGCCGGCCTGGGGAAACCCTCAGGCTCCA
GTGACCTTGGTGGGGGGCTCTGGGGCTCCCCCTCCCCACCCCGCCGGGCACGGACGCGGGTGACC
GTACTGCGACGCGCTCCGCGGCCCTCCAGCCGTTGTAGGCGCGCGGGCTGGGGTGGGGAAAGGGGAAG
GGGTTGTTCCACGCGCGGGTCTGTGGTGGGGAAGGGGCCGTCCAGGCCGTTGCAGGCGCGCGTGCCG
GGGCCGGCTCCGGGGTCCAAGCTTGCAGGGGGCGGGGTCCGGGACGGCTGGGGCGGAGCTGGACCG
TTGAGGGCCACGGCGGGCGTCTCCGGGCCGAGCGGGGCTGCTGCGCCCCGAGCGGTTGGGGGCGCGGA
GGGCTGAAATCCCGATCACGCGCCCCGGGCGCCGCCGCCGCCCGCACCTTGGCCTAGCGCGGTGG
CGTCACAGTCGCGAGTCTGACTACGGCCTCCGGGCCCTTTGTCCCCGCTAGCGGCGCTCGGGGTGGGG
GAGCCAGGAGGGGCGGGAGACGGGCGGGTATGGGCCGCGCGGGCGCAGGCTCCCCGGGCGCCGACAG
CAGCGGTGCCAGAGCCGGGGCAGGCGGGCGGCCGCGAGCCCTCGGGCGCGGAAGGCCCCAGCGTGACG
GCGCAGGAGGGCGGGCGCCGGCGGAAGAAGCCCTGTCCCCGACGTTGCGACCGGAGATCCACGAATG
TCCCAAGTCCCAGGACCCGGTGCAGCGGGGGCCCCACACCGGCTAATGTGGCACATTTTGGGGTTGGAA
CCCTCTCCCGCCTCCGGGTCTCCGGTAAAACCGGACCAGAAGTACAAGGGGGCGTGTGCGTTAAAGGAG
GAGGAGCGTTCAGTCTTCAGGGCCGAGGGCCTCGGTGTCCCCGCCACCGACCCGCTCCCGATCCCTTC
CTGCCTCAGGTTCCCGGCTCAGCCTCCCGTCCAGCTCCCTGCTCAGTTCCTTTGCCTTGACGTGCGCG
TCCCGGGACGACTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAGTTTTCCGCCAAGGACATCGACGGGCACATGG
TTAACCTGGACAAGTACCGGTGGGCGCTCGCCTGGGTGGGGCGCGGGTTCGGGCCCTGGGAGGGGGCC
GTGTTCTTCTGCGTGACGCCGCGATCCTCGCAGGGGCTTCGTGTGCATCGTACCAACGTGGCCTCCCA
GTGAGGCAAGACCGAAGTAACTACACTCAGCTCGTGCACCTGCACGCCGATACGCTGAGTGTGGTTTGC
GGATCCTGGCCTTCCCGTGAACCAAGTTCGGGAAGCAGGTGGGCTGCTGCGTCCCGGGGCCCGCAGAGG
CGGGTGGGTGGGGTTCGGGTGGGCTCCAGCCTGGAGAGGGCCTGGGAGTGTGCAGGGGGCCCGGACT
GAGGGGTGCCAGCCCCGACTCACTCACACACCTTGCCCGCCACAGGAGCCAGGGAGTAACGAAGAGAT
CAAAGAGTTCGCCGCGGGCTACAACGTCAAATTCGATATGTTACGAAGATCTGCGTGAACGGGGACGACG
CCCACCCGCTGTGGAAGTGGATGAAGATCCAACCCAAGGGCAAGGGCATCCTGGGAAAGTGCCTGACCTCT
GGGGACAGTACGGCTGCTGGGGTGGGGTGGGGGGGCTGCTGGGATGCTCACACCTCCCTGGGGCAGAA
TGGCTCATGGCTCGGGGGCGGTTCCGGWAGGTGCTGGGACTCTCACATCGCGTGGCCTCCTGGGGG
TAAGATGGCTCAGGGGGACATAGAGGGCTGTGGAGGCAGGCAGGGATGCCACACCTTTGTACCTCCTG
GGGACAGGATGGCTCGGGGGCCTGTGGGGGGCTGTTGGGACTCTCACACTGCATGGCCTCCTGGGGTAAG
ATGGCTCTGGGGGGCTTGGGGGCACTGTGGCTGTGGAGGCAGCCGGGGAAGCTCACACCTTGTGGCCT
CCTGGAGACAGGACAGCTTGGGGACTGTGGGGGGCTGCTGGGGACGCTCACGTCCATGTGCTTCTTTCCA
GTGCCATCAAGTGGAACTTACCAAGGTAAGGGGGCTGTGGGGGTAGGGGACCAGCTTCCCCTGGCCAC
AGCCGTGCCCAGATGGGCAGCGGACAGGAAGGGCAGCCTCAGCCCCTTGACAGGGGTGGCCCCACAGTTT
GGACACCGTCTCTCCACAGTTCCTCATCGACAAGAACGGCTGCGTGGTGAAGCGCTACGGACCCATGGAGG
AGCCCTGTGGTCCCTCTCTAGGACCCCGCTTGAGGCTCGGGGGCTTGGGAGGTAGCTGCCCTAACCC
AGCTTCTCCTCCCGACAGGTGATAGAGAAGGACCTGCCCACTATTTCTAGTCCACAAGTGTGTGGCCCCG
CCCGAGCCCCTGCCACGCCCTCGGAGCCTTCCACCAGCACTCATGACGGCCTGCCTGCAAACCTGCTGG
TGGGGCAGACCCGAAAATCCAGCGTGACCCCCCGGAGGAAGGTCCCATGGCCTGCTGGGGCTTGGCTCG

Material

GCGCCCCACCCCTGGCTACCTTGTGGGAATAAACAGACAAATTAGCCTGCTGGATCTTTCTGCGTAGGGG
 CTTGGGGGGCCCTTTGCCAGGGGCCCTCCATGTCAGGGCTAGTTGCCGTCAGCTGCCAGGCTGGGGGT
 GCCATGGAGGTGGCGTGTGTTGCCCCCTCTTCTCCAGGCTCGGGGGGCTGTGCTGGCTGCAGTGCTGG
 GGTGCAGTGAGATCTGGGCCCGTTGGACACCCAGCCCTGGCTCTTAATCCGTGCAGCCCCACCTGCTGTGC
 ACAGGCAGGGCCTGGTGTAGGCCGAGTCTTGAGGAGATAATTCTAAGTGGCTGTGCTTCTGGCCCCGG
 GCCTTAAGTGTAGGAGGTGGCTACTGGGGCCTCCCCTGGCCAGGAAGCAGAAGTGCAGAGGCCCGAGGA
 ACAGCGTGGCCCTGGTGCTGGGGATGGGTTGGGCACCCACACCGGCCCTTGGGGCCTCACCTGGCTGGG
 GGGTGTGGGGGTGGCTGGGTGGTACTGTTTGCACAGAGTCCCTCCGTGAGGGCTGGGGATGGACAGGCC
 AGGAGGGCTGGTAGAGCAGTACCAAGCCACCGTTCATGGGCCCGGGGGCTGTCTGGACACGGCCTGGCT
 GCCACCTGCACAGCTAGAGGGACTGCAGCCTGCCAGGGTGGCTGATCCAGCTGCCCCACCTGGGGGTC
 TGTGGNATGGACGGTCCATGGCACCTGCCCCAGACACTGGGTTGAGAAGTCTGTCTCTCCAGCCCTCGTCC
 CCTCTCAT

Spendermaterial

Zur Sequenzierung der GPX4 wurden von Herrn Prof. Fischereder (Leiter Nephrologie, Universitätsklinikum München Großhadern) freundlicherweise DNA-Proben von 32 verstorbenen Nierentransplantat Spendern zur Verfügung gestellt und in drei Gruppen eingeteilt. Diese erfolgte anhand der kurzen kalten Ischämiezeit (CIT) als wichtigstem Risikofaktor einer *Delayed Graft Function* (Ojo et al. 2000), sowie definitionsgemäß mindestens einer Dialysebehandlung in den ersten sieben postoperativen Tagen (Halloran and Hunsicker 2001). 23 Spender der Kategorie *unerwartet schlechtes Outcome* werden als zu untersuchendes Kollektiv den Kontrollgruppen *erwartet gutes Outcome* sowie *unerwartet gutes Outcome* entsprechend ihrer Risikoparameter gegenübergestellt:

<i>Outcome</i>	CIT	Dialysebehandlung(en)	Zusatz
unerwartet schlecht n = 23	8,8h ± 1,5h Ø RF _[OR=1] ^a	8,5 ± 8,5 1 ^b ≤	9 Spender beider Nieren mit konkordant schlechtem <i>Outcome</i>
erwartet gut n = 3	18,2h ± 2,6h RF _[OR] = 1,38 ^a 13 - 24h	Ø Dialysebehandlung ^b	3 Spender beider Nieren mit konkordant gutem <i>Outcome</i>
unerwartet gut n = 6	30,2h ± 8,5h RF _[OR] = 2,28 ^a ≤ 36h RF _[OR] = 3,48 ^a ≥ 36h	Ø Dialysebehandlung ^b	5 Spender beider Nieren mit konkordant gutem <i>Outcome</i>

Tabelle 1: Übersicht über die zur Verfügung stehenden DNA-Proben und deren Gruppeneinteilung.

^a (Ojo et al. 1997); Relative Risikoerhöhung mit ≤ 12h als Referenzgruppe OR = 1

^b (Halloran and Hunsicker 2001)

Oligonukleotide

Alle für die GPX4-Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo Scientific (T), Schwerte, Deutschland erworben.

Amplifikationsprimer

Bezeichnung

Sequenz

5` - 97

5` - GAAAGATATGTGGCAACACAGCTTC - 3`

(T)

Material

3`- 1463	5`- GCTTGTATAATGTGGGCACTGAGACC - 3`	(T)
5`- 1372	5`- CTTGTGTTTATTTTCTGAGCACATACCG - 3`	(T)
3`- 2251	5`- GAAAAGTGCCCCAACTCTTATTACC - 3`	(T)
5`- 2053	5`- CAGAAGTTTGAGACCAGCCTAGG - 3`	(T)
3`- 3525	5`- GTCCTGGGACTTGGGACATTCG - 3`	(T)
5`- 3208	5`- GGCTGGAAATCCCGGATCACG - 3`	(T)
3`- 4565	5`- CATCTTACCCCCAGGAGGCCACG - 3`	(T)
5`- 4364	5`- AGCAAGATCTGCGTGAACG - 3`	(T)
3`- 6068	5`- ACAGACTTCTCAACCCAGTGTCTGG - 3`	(T)

Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz	
5`- 200	5`- GGACACTCTGGGAAAAGC - 3`	(T)
3`- 627	5`- GCAGGGCTGGCCGAATCC - 3`	(T)
3`- 1001	5`- TTACAGGCATGTGCTACC - 3`	(T)
5`- 1042	5`- CTA CTCAGGAGACTGAGG - 3`	(T)
5`- 1425	5`- AGCCCAGGAACTCCAGG - 3`	(T)
3`- 1425	5`- ACCACTTAACTGAGAACC - 3`	(T)
3`- 1792	5`- AGTAGCTGGGATTACACG - 3`	(T)
5`- 2053	5`- 5`- CAGAAGTTTGAGACCAGCCTAGG - 3`	(T)
3`- 2186	5`- TGCAGTGGCACGATCAGG - 3`	(T)
5`- 2620	5`- ACGCGCGTCCATTGGTCCG - 3`	(T)
3`- 2826	5`- CTGGAGCCTGAGGGTTCC - 3`	(T)
5`- 2994	5`- GGAAGGGGTTGTTCCACG - 3`	(T)
5`- 3208	5`- GAGGGCTGGAAATCCCGGATCACG - 3`	(T)
3`- 3243	5`- TGACGCCACCGCGCTAGG - 3`	(T)
5`- 3410	5`- GCAGCGGTGCCAGAGCCG - 3`	(T)
3`- 3515	5`- CCCGTTACGCAGATCTTGC - 3`	(T)
5`- 3960	5`- TGTTCTTCTGCGCTGACG - 3`	(T)
5`- 4364	5`- AGCAAGATCTGCGTGAACG - 3`	(T)
3`- 4485	5`- CAGGGAGGTGTGAGCATCC - 3`	(T)
5`- 4779	5`- GAGGCAGCCGGGAAGCT - 3`	(T)
3`- 5155	5`- CCTTCTCTATCACCTGTCCG - 3`	(T)
5`- 5203	5`- CTATTTCTAGCTCCACAAG - 3`	(T)
3`- 5606	5`- GCTGCACGGATTAAGAGC - 3`	(T)
5`- 5616	5`- CTATTTCTAGCTCCACAAG - 3`	(T)
3`- 6072	5`- TCTGGGGCAGGTGCCATGG - 3`	(T)

Klonierung

Murine Gpx4-cDNA

Im Folgenden ist die cDNA der murinen *Gpx4* abgebildet. Die mitochondriale Zielsequenz ist blau, die 3`-UTR grün, die für Tyrosine kodierenden Triplets rot hervorgehoben:

Material

ATGAGCTGGGGCCGTCTGAGCCGCTTACTTAAGCCAGCACTGCTGTGCGGGGCTCTGGCTGCGCCTGGTCT
GGCAGGCACCATGTGTGCATCCCGCGATGATTGGCGCTGTGCGCGCTCCATGCACGAATTCTCAGCCAAGG
ACATCGACGGGCACATGGTCTGCCTGGATAAGTACAGGGGTTTCGTGTGCATCGTCACCAACGTGGCCTCG
CAATGAGGCCAAAACCTGACGTAAACTACTCAGCTAGTCGATCTGCATGCCCGATATGCTGAGTGTGGTTTA
CGAATCCTGGCCTTCCCCTGCAACCAGTTTGGGAGGCAGGAGCCAGGAAGTAATCAAGAAATCAAGGAGTT
TGCAGCCGGCTACAACGTCAAGTTTGACATGTACAGCAAGATCTGTGTAAATGGGGACGATGCCACCCACT
GTGGAAATGGATGAAAGTCCAGCCCAAGGGCAGGGGCATGCTGGGAAATGCCATCAAATGGAACCTTTACCA
AGTTTCTCATTGATAAGAACGGCTGCGTGGTGAAGCGCTATGGTCCCATGGAGGAGCCCCAGGTGATAGAG
AAGGACCTGCCGTGCTATCTCTAGGCTAGCCCTACAAGTGTGTGCCCTACACCGAGCCCCCTGCCCTGT
GACCCCTGGAGCCTTCCACCCCGGCACTCATGAAGGTCTGCCTGAAAACCAGCCTGCTGGTGGGGCAGTCC
TGAGGACCTGGCGTGCATCCCTGCCGGAGGAAGGTCCAGAGGCCTGTGGCCCTGGGCTCGAGCTTCACCC
TGGCTGCC

Oligonukleotide der PCR-Mutagenese

Die aufgeführten Oligonukleotide beinhalten Basenpaaränderungen, entsprechend der obigen Referenzsequenz. Abhängig von den, in Klammern stehenden, Buchstaben wurden sie entweder bei Metabion AD, Martinsried, Deutschland (M) oder Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland (SA) erworben. Die hervorgehobenen Triplets stellen die gewünschten Mutationen der Aminosäuren E / F (Glutamat / Phenylalanin) dar, wobei Y für die Ausgangsaminosäure Tyrosin und die Zahlen, beispielsweise 32, für die Position in der Peptidkette steht:

Bezeichnung	Sequenz	
SP6	5`- ATTTAGGTGACACTATAGAA - 3`	(SA)
T7	5`- TAATACGACTCACTATAGGG - 3`	(SA)
Y32E for	5`- GGTCTGCCTGGATAAGGAAAGGGGTTTCG - 3`	(M)
Y32E rev	5`- CGAAACCCCTTTCCTTATCCAGGCAGACC - 3`	(M)
Y53E for	5`- CTGACGTAAACGAAACTCAGCTAGTCGATCTG - 3`	(M)
Y53E rev	5`- CAGATCGACTAGCTGAGTTTCGTTTACGTCAG - 3`	(M)
Y63E for	5`- GCATGCCCGAGAAGCTGAGTGTGGTTTACG - 3`	(M)
Y63E rev	5`- CGTAAACCACACTCAGCTTCTCGGGCATGC - 3`	(M)
Y96E for	5`- GTTTGCAGCCGGCGAAAACGTCAAGTTTG - 3`	(M)
Y96E rev	5`- CAAACTTGACGTTTTCGCCGGCTGCAAAC - 3`	(M)
Y103E for	5`- CAACGTCAAGTTTGACATGGAAAGCAAGATCTGTG - 3`	(M)
Y103E rev	5`- CACAGATCTTGCTTTCATGTCAAACCTGACGTTG - 3`	(M)
Y153E for	5`- GTGAAGCGCGAAGGTCCCATGGAGGAG - 3`	(M)
Y153E rev	5`- CTCCTCCATGGGACCTTCGCGCTTCAC - 3`	(M)
Y169E for	5`- GGACCTGCCGTGCGAACTCTAGCTAGC - 3`	(M)
Y169E rev	5`- GCTAGCTAGAGTTCGCACGGCAGGTCC - 3`	(M)
Y32F for	5`- GGTCTGCCTGGATAAGTTCAGGGGTTTCG - 3`	(M)
Y32F rev	5`- CGAAACCCCTGAACTTATCCAGGCAGACC - 3`	(M)
Y53F for	5`- CTGACGTAAACTTTCACTCAGCTAGTCGATCTG - 3`	(M)
Y53F rev	5`- CAGATCGACTAGCTGAGTGAAGTTTACGTCAG - 3`	(M)
Y63F for	5`- GCATGCCCGATTTGCTGAGTGTGGTTTACG - 3`	(M)
Y63F rev	5`- CGTAAACCACACTCAGCAAATCGGGCATGC - 3`	(M)
Y96F for	5`- GCAGCCGGCTTCAACGTCAAGTTTGACATG - 3`	(M)

Material

Y96F rev	5` - CATGTCAAACCTTGACGTTGAA GCCGGCTGC - 3`	(M)
Y103F for	5` - CAAGTTTGACATGTT CAGCAAGATCTGTGTAATGGG - 3`	(M)
Y103F rev	5` - CCCATTTACACAGATCTTGCTGAACATGTCAAACCTTG - 3`	(M)
Y153F for	5` - GTGAAGCGCTTTGGTCCCATGGAGGAG - 3`	(M)
Y153F rev	5` - CTCCTCCATGGGACC AAAGCGCTTCAC - 3`	(M)
Y169F for	5` - GACCTGCCGTGCTTTCTCTAGCTAGCC - 3`	(M)
Y169F rev	5` - GGCTAGCTAGAG AAAGCACGGCAGGTC - 3`	(M)
Y153A for	5` - GTGAAGCGCGCTGGTCCCATGGAGG - 3`	(M)
Y153A rev	5` - CCTCCATGGGACC AGCGCTTCAC - 3`	(M)
Y153W for	5` - GTGGTGAAGCGCTGGGGTCCCATGGAGGA - 3`	(SA)
Y153W rev	5` - TCCTCCATGGGACC CCAAGCGCTTCACCAC - 3`	(SA)

Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz	
Bac1	5` - ACCATCTCGCAAATAAATAAG - 3`	
Bac2	5` - ACAACGCACAGAATCTAGCG - 3`	
Lenti vor <i>Bam</i> HI	5` - CAGTCTCCGACAGACTGAGTC - 3`	(SA)

Zelllinien

PFa1^(flox/flox): Immortalisierte Mausembryofibroblasten mit homozygot geflochten *Gpx4*-Allelen (E 5 - 7), die nachträglich mit dem pCAG-3SIP-MCM-Plasmid stabil transfiziert wurden (Seiler et al. 2008). Das Plasmid kodiert für eine Cre-Rekombinase, die beidseits an mutierte Östrogenrezeptorbindungsstellen fusioniert wurde (Verrou et al. 1999). Durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen wird die Cre-Rekombinase aus ihrem Komplex entlassen (Abbildung 13), transloziert in den Zellkern und deletiert die Exons 5 - 7 des endogenen *Gpx4*-Allels an deren flankierenden loxP-Schnittstellen. Folglich wird das SECIS-Element entfernt, welches essenziell

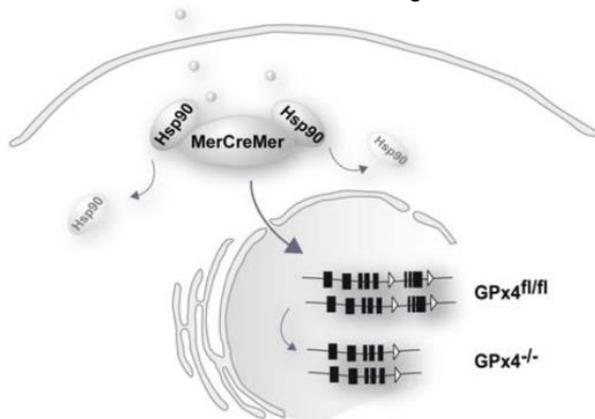


Abbildung 13: Durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen transloziert die Cre-Rekombinase in den Zellkern und deletiert die letzten drei Exons. Nach (Mannes et al. 2011)

für den Selenocystein einbau ist. Die für den MerCreMer-Komplex kodierende Region wird in einer gemeinsamen mRNA (*bicistronic*) mit dem *Puromycin-N-Acetyltransferase*-Gen transkribiert. Puromycin wirkt als Selektionsmarker und wird durch N-Acetylierung inaktiviert (Perez-Gonzalez et al. 1985), wodurch eine stabile Expression erreicht wird. Die individuelle Translation wird durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gewährleistet.

HEK293: Die HEK293-Zelllinie (menschliche embryonale Nierenzelllinie) wurde zur Produktion und Vermehrung von Viruspartikeln verwendet. Diese basieren auf dem lentiviralen Expressionsvektor der dritten Generation: p442-PL1.

Expressionsvektoren

pDrive

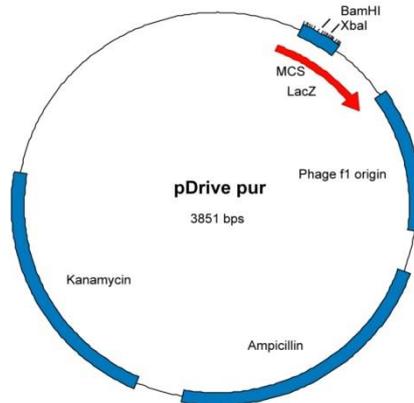


Abbildung 14: Übersicht über die pDrive-Vektorkarte (Qiagen, Hilden). Von den zahlreichen Restriktionsenzymschnittstellen sind nur die, für die Klonierung, relevanten Enzyme *BamHI* und *XbaI* eingezeichnet, nicht aber die *EcoRI*-Schnittstelle für die Kontrollrestriktion. Des Weiteren ist ein Resistenzgen gegen Ampicillin (β -Laktamase) sowie Kanamycin (*Kanamycinkinase*) enthalten.

p442-PL1

Das lentivirale Expressionsplasmid der dritten Generation, p442-PL1, wurde freundlicherweise von Dr. Timm Schröder (Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Hierdurch wird der stabile Gentransfer in die Mausembryofibroblasten ermöglicht. Die eingebrachten FSH-Gpx4-Mutationen liegen im Bereich der Restriktionsenzymschnittstellen *BamHI* und *XbaI*. Der SFFV-Promotor reguliert die Expression. Eine simultane Translation der FSH-Gpx4-Mutation und des VENUSnucmem-Reporterproteins wird durch ein IRES-Element erreicht.

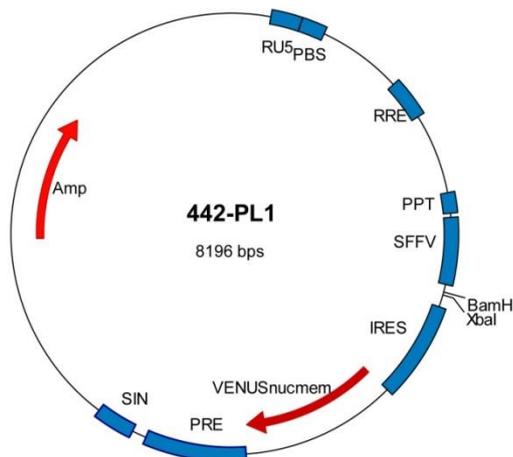


Abbildung 15: Übersicht über die Vektorkarte des lentiviralen Expressionsplasmid p441-PL1. RU5 (RU5 LTR), PBS (Primerbindestelle), RRE (rev responsives Element), PPT (Polypurintrakt), SFFV (Spleen Focus Forming Virus Promoter), IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle), VENUSnucmem (Fluoreszenzprotein mit nukleärem Membrananker), PRE (post regulatory element), SIN (selbstinaktivierende 3' LTR), Amp (Ampicillinresistenzgen). Analog sind lediglich die, für die Klonierung, relevanten Enzymschnittstellen *BamHI* und *XbaI* eingezeichnet.

4. Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Zellhaltung

Sowohl die Mausembryofibroblasten als auch die HEK293-Zelllinie wurden mit Standard-DMEM-Kulturmedium unter 20% O₂ und 5% CO₂ Atmosphärenbedingung gehalten. Abhängig von deren Wachstumsverhalten wurden sie alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:10 oder 1:20 vereinzelt.

Standard-DMEM: DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

PBS: 80,0 g NaCl, 2,0 g KCL, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

4.1.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden mittels Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst und das Trypsin durch die Zugabe der zweifachen Menge Standard-DMEM inaktiviert. 30 µl der Zellsuspension wurden mit der äquivalenten Menge Trypanblau 0,4% vermischt und die Zellzahl mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer quantitativ bestimmt. Lebende Zellen nehmen kein Trypanblau auf und lassen sich damit nicht anfärben.

Standard-DMEM: DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

4.1.3. Kryokonservierung & Auftauen

Die hier verwendeten Zelllinien waren alle vorrätig und wurden bei -160°C im Stickstoffgastank gelagert. Die zu etwa 80-90% konfluent gewachsenen Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und gezählt. 1 Million Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% Standard-DMEM und 10% DMSO, aufgenommen, unmittelbar bei -80°C für 24 Std. tiefgefroren und anschließend im Stickstoffgastank gelagert. Bei Bedarf wurden sie bei 37°C im Wasserbad erwärmt, umgehend in 5 ml Standard-DMEM verdünnt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10 ml frischem Standard-DMEM homogenisiert und auf 10cm Zellkulturplatten ausgebreitet.

Standard-DMEM: DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

4.2. Gpx4-Sequenzierung

Die genomische Ausgangssequenz wurde zur Amplifikation in 5 Abschnitte eingeteilt. Tabelle 2 zeigt die einzelnen Oligonukleotidpaarungen:

Paarungen	Part I	Part II	Part III	Part IV	Part V
5'- Primer	5'- 97	5'- 1372	5'- 2053	5'- 3208	5'- 4364
3'- Primer	3'- 1463	3'- 2251	3'- 3525	3'- 4565	3'- 6068

Tabelle 2: Übersicht über die jeweiligen Primerpaarungen.

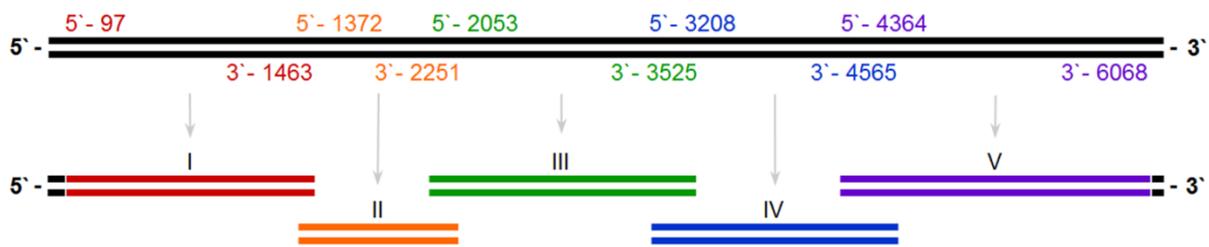


Abbildung 16: Die schematische Darstellung der initialen Teilamplifikation der GPX4.

Zur Durchführung wurde ein 20 µl-Ansatz gewählt. Die GC-reichen Teilabschnitte der GPX4 erforderten den Zusatz stabilisierender Reagenzien (Qiagen-Q-Solution), sowie initial erhöhte Annealingtemperaturen, um ein *Mismatching* der Primer zu minimieren. Der anschließende Aufreinigungsschritt der PCR-Amplifikate erfolgte zunächst durch die Zugabe von 30 µl Ampure XP-Beads und zehnmütiger Inkubation auf einer Magnetplatte. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl 70% Ethanol trockneten die Amplifikate bei 40°C für 10 Min. und wurden danach in 50 µl reinem Wasser reeluiert. Die so gereinigten Genomabschnitte unterliefen einer weiteren Amplifikation, welche im Folgenden als Sequenzierungsansatz bezeichnet wird. Die entsprechenden Oligonukleotidzuordnungen können aus Tabelle 3 entnommen werden:

Part I	Part II	Part III	Part IV	Part V
5'-97 - 3'-1463	5'-1371 - 3'-2251	5'-2053 - 3'-3525	5'-3208 - 3'-4565	5'-4363 - 3'-6068
5'- 200	5'- 1425	5'- 2053	5'- 3208	5'- 4363
3'- 627	3'- 1792	5'- 2620	5'- 3410	5'- 4779
3'- 1001	3'- 2186	3'- 2826	3'- 3515	3'- 5155
5'- 1042	-	5'- 2994	5'- 3960	5'- 5203
3'- 1425	-	3'- 3243	3'- 4485	3'- 5606
-	-	-	-	5'- 5616
-	-	-	-	3'- 6072

Tabelle 3: Übersicht über den Sequenzierungsansatz. Für jeden Ansatz wurde jeweils nur ein forward oder reverse Primer verwendet.

Der für die Sequenzierung gewählte 10 µl Ansatz unterzog sich anschließend einem weiteren Aufbereitungsschritt. Hierbei wurde jeder Ansatz mit einer Suspension aus 10 µl CleanSEQ-Beads und 42 µl 85% Ethanol versetzt und für 5 Min. auf einer Magnetplatte inkubiert. Der Überstand wurde im weiteren Verlauf entfernt und die Ansätze zweimalig mit 100 µl 85% Ethanol gewaschen und für 15 Min. bei Raumtemperatur zum Trocknen belassen. Die Magnetplatte wurde anschließend entfernt, die DNA in 80 µl H₂O eluiert und mit 20 µl Öl abgedichtet. Die Analyse erfolgte durch den *3130xl Genetic Analyzer*, deren Auswertung mittels *MT Sequence Navigator PPC* von PE - Applied Biosystems.

4.3. Klonierung

4.3.1. PCR-Mutagenese

Das Einbringen der einzelnen Mutationen erfolgte mittels *Overlap-Extension-PCR* in einem zweiteiligen Schritt: Für jede Mutation wurden zunächst zwei 50 µl Ansätze mit dem pDrive-Flag-Strep-HA-Gpx4-Vektor als Ausgangsplasmid pipettiert. Der pDrive-Vektor hat stromaufwärts eine Bindungsstelle für den T7-, stromabwärts für den SP6-Standardprimer. Durch die entsprechende Kombination der Standardprimer mit den mutationstragenden, *Gpx4*-spezifischen Oligonukleotiden entstehen Amplifikate, welche sich in ihrer Primersequenz überlappen. Abbildung 17 illustriert das Konzept der *Extension*:

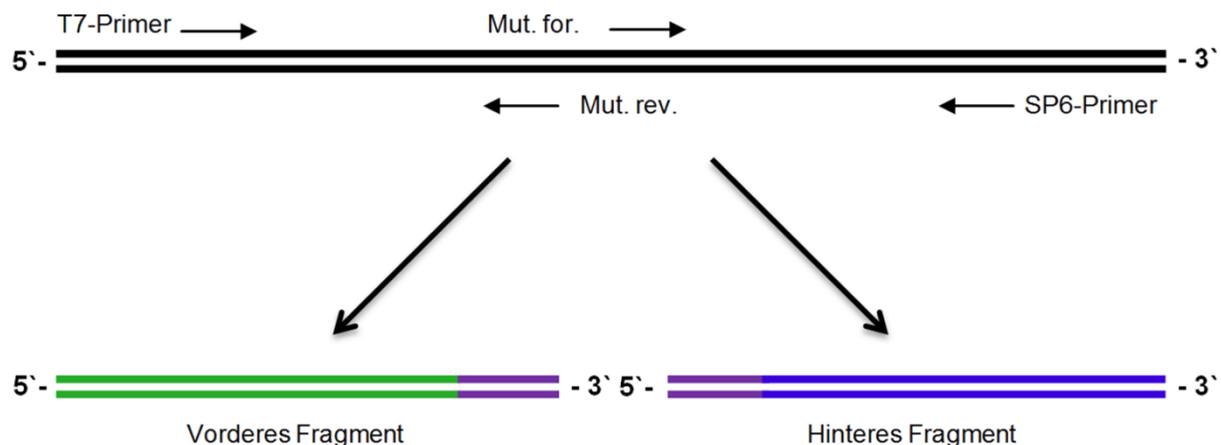


Abbildung 17: Darstellung der *Extension*. Die verwendeten Primer sind dem Materialteil zu entnehmen. Der Bereich, in welchem sich beide Abschnitte überlappen, ist violett hervorgehoben.

Die einzelnen Amplifikate wurden im Anschluss mittels *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Der *Overlap* wurde nun in einem 50 µl Ansatz durchgeführt, der DNA sowohl des vorderen als auch hinteren Teilabschnittes enthält:

Methoden

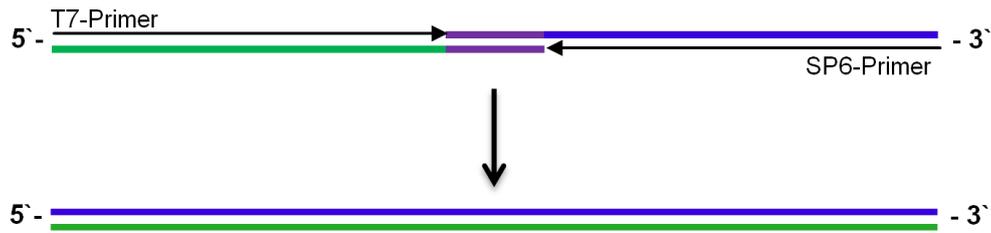


Abbildung 18: Durch den Überlappungsbereich wird die Amplifikation eines Produkts erreicht.

Nach dieser Methode sind die in Tabelle 4 dargestellten Mutationen der Gpx4 entstanden:

Bezeichnung	Mutation	Bezeichnung	Mutation	Bezeichnung	Mutation
Gpx4 ^{Y32E}	TAC → GAA	^a Gpx4 ^{Y32F}	TAC → TTC	-	-
Gpx4 ^{Y53E}	TAC → GAA	^a Gpx4 ^{Y53F}	TAC → TTC	-	-
Gpx4 ^{Y63E}	TAT → GAA	^a Gpx4 ^{Y63F}	TAT → TTT	-	-
Gpx4 ^{Y96E}	TAC → GAA	Gpx4 ^{Y96F}	TAC → TTC	-	-
Gpx4 ^{Y103E}	TAC → GAA	Gpx4 ^{Y103F}	TAC → TTC	-	-
Gpx4 ^{Y153E}	TAT → GAA	^a Gpx4 ^{Y153F}	TAT → TTT	Gpx4 ^{Y153A}	TAT → GCT
Gpx4 ^{Y169E}	TAT → GAA	Gpx4 ^{Y169F}	TAT → TTT	Gpx4 ^{Y153W}	TAT → TGG

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Dissertation hergestellten Mutationen. Die Codons wurden gemäß der höchsten ³Gebrauchswahrscheinlichkeit (*Codon Usage*) im murinen Organismus ausgewählt. Bei annähernder Übereinstimmung wurde das Triplet gewählt, welches der Ursprungssequenz am nächsten war.
^a Virusüberstände der gekennzeichneten Mutationen wurden von Alexander Mannes freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.

Die einzelnen PCR-Produkte wurden nach abermaliger Aufreinigung entsprechend der Herstellerangaben in den pDrive-Vektor kloniert (QIAGEN PCR-Cloning Kit).

4.3.2. Hitzeschocktransformation von Bakterien

Pro Ansatz wurden 100 µl tiefgefrorener kompetenter Zellen verwendet und zunächst schonend innerhalb von 10 Min. auf Eis aufgetaut. Je nach Bedarf wurden daraufhin 10 µl eines Ligationsansatzes oder 10-100ng aufgereinigten DNA-Plasmids zugegeben und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42°C für 2 Min. durchgeführt und die Zellen unmittelbar danach für weitere 2 Min. bei 4°C gekühlt. Nach Zugabe von 750 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37°C für 45 Min. moderat geschüttelt, anschließend bei 3.200 x g für 5 Min. zentrifugiert, um überschüssiges LB-Medium zu entfernen. 100 µl der Bakterien-suspension wurden auf einer LB-Agarplatte verteilt und für 12-20 Std. bei 37°C, bis einzelne

³ Entnommen aus der *Codon Usage Database*, ihrerseits beziehend auf *NCBI-GenBank*.

Kolonien sichtbar wurden, inkubiert. Die in dieser Arbeit zur Herstellung der einzelnen Enzymmutationen verwendeten Plasmide enthalten ein Resistenzgen gegenüber Ampicillin, so dass dieses als Selektionsmarker in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt wurde.

4.3.3. DNA-Präparation

Nach DNA-Transformation in kompetente Zellen wurden einzelne, isoliert liegende Kolonien gepickt und für 12-20 Std. in 2 ml ampicillinhaltigem (100µg/ml) LB-Medium inkubiert. Anschließend wurden sie für 1 Min. bei 10.000 x g zentrifugiert und in 200 µl E1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl E2-Puffer kommt es zur Denaturierung des Zellmaterials, welche nach 5 Min. mittels 200 µl E3-Puffer gestoppt wurde. Im Folgenden wurde die Zellsuspension für 10 Min. bei 10.000 x g zentrifugiert, 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben und abermals für 8 Min. unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde zur DNA-Fällung in Isopropanol im Verhältnis 1:0,8 überführt und bei 4°C für 15 Min. und 10.000 x g zentrifugiert. Letztlich wird das DNA-Pellet in 70% Ethanol gewaschen, bei 40°C für 10 Min. getrocknet, in TE gelöst und bei -20°C gelagert.

E1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0

E2: 200 mM NaOH, 1,0 % w/v SDS

E3: 3,1 M Kaliumazetat, eingestellt auf einen pH 5,5 mittels Essigsäure

TE: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA

Die DNA wurde mit *EcoRI-HF* in einem Restriktionsansatz von 20 µl, analog der Herstellerempfehlung (New England Biolabs GmbH), verdaut und durch Gelelektrophorese in einem 2% Agarosegel in TAE bei 120 V aufgetrennt. Die in die *Gpx4* eingebrachte Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland). Entsprechend der Position der Aminosäure in der Peptidkette wurden hierfür die Standardprimer Bac1 oder Bac2 gewählt.

TAE (50x): 2 M Trisazetat (2 M Tris-base und 5,71 % (v/v) Essigsäure), 50 mM EDTA/NaOH pH 8,0

4.3.4. Isolation der DNA

Die mutierten DNA-Fragmente wurden in einem Restriktionsverdau mittels der Endonukleasen *BamHI* und *XbaI* (New England Biolabs GmbH) aus dem pDrive-Vektor herausgeschnitten und in einem *low melting point* Agarosegel (0,8%) in TAE unter 60 V

anliegender Spannung separiert. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und unter Zugabe von 400 µl sterilem Wasser bei 68°C innerhalb von 10 Min. aus dem Gel gelöst. Das geschmolzene Gel wurde mit 400 µl Phenol versetzt und für 8 Min. bei 10.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 3 M Natriumazetatlösung versetzt, wobei eine Endkonzentration von 0,3-0,5 M angestrebt wurde. Durch die Zugabe der zweieinhalbfachen Menge eiskalten Ethanol wurde die DNA gefällt und für 15 Min. bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert und bei 40°C für 10 Min. getrocknet. Letztlich wurde die DNA in TE gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

TAE (50x): 2 M Trisazetat (2 M Tris-base und 5,71 % (v/v) Essigsäure), 50 mM EDTA/NaOH pH 8,0

TE: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA

4.3.5. DNA-Ligation

Die Ligation der isolierten DNA-Abschnitte in das lentivirale Expressionsplasmid p442-PL1 wurde in einem 20 µl Ansatz mithilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs GmbH) ermöglicht. Zur Ligation wurden etwa 50 ng des Vektors sowie etwa 150 ng *Insert* verwendet und bei 16°C für 60 Min. inkubiert.

Die anschließende Transformation und DNA-Isolation erfolgte wie oben beschrieben. Die transferierten DNA-Abschnitte wurden erneut zur Bestätigung der Mutation sequenziert (Primer: Lenti vor BamHI, GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland).

4.4. Virusproduktion

Die lentivirale Infektion stellt eine effiziente und sichere Methode zur Transfektion und stabilen Expression exogener DNA/RNA-Abschnitte in Mausembryofibroblasten dar. Die Produktion und Vermehrung der Viruspartikel wurde mithilfe der HEK293 als *packaging* Zelllinie ermöglicht. Das lentivirale Verpackungssystem der dritten Generation beinhaltet vier verschiedene Vektoren, die in die HEK293-Zellen eingebracht werden müssen. Neben dem mutationstragenden p442-PL1-FSH-Gpx4-Plasmid werden die notwendigen viralen Strukturproteine durch drei weitere Vektoren kodiert:

Methoden

- pEcoEnv-IRES-puro: Enthält das Glykoprotein Env
- pMDLg_pRRE: Beinhaltet das Strukturprotein Gag sowie den Enzymcluster P
- pRSV_Rev: Kodiert für den Expressionsregulator Rev

5 Millionen HEK293-Zellen wurden am Vorabend auf einer 10 cm Zellkulturplatte ausgebreitet und über Nacht inkubiert, um eine Zelldichte von 60-70% zu erreichen. Je Ansatz wurde ein Plasmidgemisch (bestehend aus 2µg pEcoEnv-IRES-puro, 5µg pMDLg_pRRE, 10µg pRSV_Rev und 5µg Zielvektor) in 500 µl 12,5 mM Kalziumchlorid gelöst und via *air bubbling* mit 500 µl HBS vermengt. Das Kulturmedium wurde anschließend durch Transformationsmedium ersetzt. Um die Kalziumphosphattransfektion zu ermöglichen, wurde das Plasmidgemisch gevortext und dem Transformationsmedium zugegeben. Zur Steigerung der Virusproduktion erfolgte die Zugabe von Chloroquin in einer Endkonzentration von 25 µM. Die Zellkulturplatten wurden für 8-12 Std. inkubiert, das Transformationsmedium durch frisches ersetzt und erneut für 36 Std. im Brutschrank belassen. Das infektiöse Medium wurde mittels 0,22 µM-Filter sterilisiert und für 4 Std. bei 22.000 x g ultrazentrifugiert. Das infektiöse Pellet wurde in 200 µl Standard-DMEM gelöst und bei -80°C gelagert. Zur Infektion von 3×10^5 Mausembryofibroblasten wurden diese auf 3,5 cm Zellkulturplatten ausgebreitet und 50 µl konzentrierter Virusüberstand zugegeben. Der Erfolg der Infektion wurde mittels Nachweis des VENUSnucmem-Reporterproteins im Fluoreszenzmikroskop, die Expression der Gpx4-Mutation per Western Blot bestätigt. Nach Tamoxifen-induzierter Deletion der endogenen Gpx4 sterben $\geq 99,9\%$ der nativen Zellen, welche die transfizierte Mutation nicht stabil exprimieren, ab.

Chloroquin (1000x): 25 mM Chloroquin in PBS

HBS (2x): 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, auf pH 7,05 mit NaOH eingestellt

PBS: 80,0 g NaCl, 2,0 g KCL, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

Standard-DMEM: DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

TF-Medium: Standard DMEM, 20 mM HEPES

4.5. Western Blot

Die Zellpellets der einzelnen Mutanten wurden in LCW-Puffer, welcher den Protease Inhibitor Cocktail enthält, lysiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Das überschüssige Zellmaterial wurde durch 15 Min. Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4°C entfernt. Die Proteinmenge wurde mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* analog der Herstellerangaben bestimmt. 30 µg Protein wurden zusammen mit Laemmlipuffer für 7 Min. bei 95°C denaturiert und anschließend in einer *Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell* mit einem 12 % Acrylamidgel durch *SDS-PAGE*

Methoden

der Größe nach aufgetrennt. Hierbei wurden die Proteine zunächst bei 80 V gesammelt und weiterhin bei 120 V separiert. Im Folgenden wurden die Proteine in 90 Min. auf eine Hybond ECL-Nitrozellulosemembran bei 100 V und 450 mA transferiert. Schließlich wurden die Membranen in 5% Milchpulver in TBS-T geblockt, zweimalig gewaschen und für mindestens 12 Std. mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal gewaschen und für 60 Min. mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten noch zwei Waschschriffe mit TBS-T und die Chemielumineszenzen der Proteine wurden letztlich auf einem *AGFA Medical X-Ray film* sichtbar gemacht. Das *Strippen* der Membranen erfolgte mit 0,4 M Natronlauge für 10 Minuten. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet und im Weiteren so verfahren, wie es oben bereits beschrieben ist.

LCW Lysepuffer : 0,5 % TritonX-100, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 150 mM NaCl, 20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 30 mM Natriumpyrophosphat, pH 7,5

Ladepuffer (6 x): 375 mM TrisHCl pH 6,8, 9% SDS, 50% Glycerol, 0,03% Bromophenolblau, 9% 2-ME

5% Sammelgel: 1,4 ml H₂O, 330 μ l 30% Acrylamid, 250 μ l 1 M Tris HCl pH 6,8, 20 μ l 10% SDS, 20 μ l Ammoniumpersulfat, 2 μ l TEMED

12% Trenngel: 3,3 ml H₂O, 4 ml 30% Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8, 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% Ammoniumpersulfat, 4 μ l TEMED

Laufpuffer (10x): 250 mM TRIS-Base, 1 % SDS, 2,5 M Glycin

Transferpuffer: 10 % Laufpuffer (10x) , 20 % Methanol

TBS-T: 25 mM TRIS, 125 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, pH 8,0

Stripplösung: 0,4 M NaOH in H₂O

4.6. Immunzytochemie

Zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation der diversen Gpx4-Mutanten wurden 3000 Zellen auf einem *Fluorodish* ausgebreitet und über Nacht belassen. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium abgenommen, die Platten mit PBS gewaschen und für 10 Min. in 4% Paraformaldehyd fixiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang, bevor die Zellen durch Zugabe von Triton X-100 permeabilisiert wurden. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit 1% BSA in PBS für 1 Std. geblockt. Im Weiteren wurden sie mit dem anti-HA-Antikörper lichtgeschützt für 2 Std. bei 4°C inkubiert, abermals gewaschen und gemäß den Herstellerangaben für 1 weitere Std. mit dem Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rat IgG-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde das WGA Alexa Fluor 594-Konjugat entsprechend den Herstellerempfehlungen für 10 Min. zugegeben, welches selektiv an N-Acetylglucosaminen sowie Sialinsäuren bindet und damit einen Nachweis für Biomembranen darstellt. Abschließend wurden die Platten mit einem Tropfen VECTASHIELD Mounting Medium

versetzt, nach 2 Min. mit PBS gespült und mit dem LSM 510 Meta Konfokalmikroskop analysiert.

anti-HA (Klon 3F10): 1/10 Verdünnung in 5% FCS/PBS

Triton X-100-Lösung: 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS

PFA-Lösung: 4% (w/v) PFA in PBS, pH 7,4 eingestellt mit HCl

PBS: 80,0 g NaCl, 2,0 g KCL, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rat IgG-Lösung: 10 µg/ml in 5% FCS/PBS

WGA Alexa Fluor 594-Lösung: 10µg/ml in 5% FCS/PBS

4.7. Semi-quantitative Aktivitätsbestimmung des Gpx4

Um eine Abschätzung über die tatsächliche Enzymaktivität zu bekommen, wurden die von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Matilde Maiorino (Padua, Italien) ermittelten Gpx4-spezifischen Aktivitäten mittels *ImageJ* in Relation zu ihren Chemielumineszenzsignalen gesetzt und auf ihre zugehörige Ladekontrolle normalisiert.

4.8. Colony Formation Assay

Der *Clonogenic Assay* dient der Beurteilung des Wachstums sowie der Fähigkeit einzelner Zellen sich beliebig häufig zu teilen und Kolonien zu bilden. Eine Kolonie wird als Nachweis von mindestens 50 entstandenen Zellen definiert (Franken et al. 2006). Dazu wurden 100 Zellen auf einer 3,5 cm Mikrotiterplatte verteilt und für 96 Std. inkubiert. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Platten mit PBS gewaschen und zur Fixierung und Färbung schließlich eine Lösung aus 6% Glutaraldehyd und 0,5% Kristallviolett in PBS für 30 Min. zugegeben. Anschließend wurden die Platten vorsichtig mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur zum Trocknen belassen. Die Koloniezahl wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops bestimmt.

Standard-DMEM: DMEM, 10 % FCS, 1 % Glutamin, 50 U/ml Penicillin G, 50 µg/ml Streptomycin

PBS: 80,0 g NaCl, 2,0 g KCL, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ in 1 l H₂O, pH 7,4

4.9. Vitalitätsmessung mittels AquaBluer

AquaBluer ist ein farbmischer sowie fluoreszierender Redoxsensor, der in den Mitochondrien vitaler Zellen aus seiner oxidierten (nichtfluoreszierend, blau) in die reduzierte Form (fluoreszierend, rot) überführt wird, ohne dabei selber toxisch zu wirken. Hierbei nimmt die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Zellzahl zu. Für die Ansätze wurden in Triplets jeweils 1000 Zellen pro *Well* auf 96-Mikrotiterplatten ausplattiert und (\pm Stressbedingungen) für 72 Std. inkubiert. Anschließend wurde AquaBluer in einer Endverdünnung von 1:100 zugegeben und nach 4 Std. die Extinktion bei 540 nm sowie die Emission bei 590 nm via *Spectra Max M5* gemessen.

5. Ergebnisse

5.1. GPX4 – Sequenzierung

In adulten Mäusen verursacht der konditionale Knockout der Gpx4 (94% identische, 98% konservierte Aminosäuren zur humanen Isoform) nach 14 Tagen ein akutes Nierenversagen mit der Histopathologie einer Tubuluszellnekrose beider Nieren (Angeli et al. *submitted*). Dies entspricht dem morphologischen Korrelat eines Ischämie/Reperfusionsschadens nach Nierentransplantation (Patschan et al. 2012), wobei die kurze kalte Ischämiezeit (CIT) zu den wichtigsten Risikofaktor einer *Delayed Graft Function* (DGF) zählt (Halloran and Hunsicker 2001). Um diesbezüglich genetische Prädispositionen im *GPX4*-Gen als möglicherweise ursächlich zu identifizieren, wurden insgesamt 32 verstorbene humane Transplantatpender hinsichtlich genetischer Polymorphismen der *GPX4* sequenziert. Entsprechend ihres Risikoprofils und letztendlichen *Outcomes* wurden diese in die folgenden drei Gruppen eingeteilt (für weitere Einzelheiten zur Einteilung sei auf den Materialteil verwiesen):

- *unerwartet schlechtes Outcome* (kurze CIT und DGF, n = 23)
- *erwartet gutes Outcome* (normale CIT ohne DGF, n = 3)
- *unerwartet gutes Outcome* (lange CIT ohne DGF, n = 6)

Hierbei gelten Ischämiezeiten ≥ 6 Std. als gesondert risikobehaftet und erhöhen jenes periodisch um 23% im linearen sechsstündigen Intervall. Bei Definition der Referenzgruppe_{CIT \leq 12h} steigt der relative Risikofaktor von [OR = 1]_{CIT \leq 12h} über [OR = 1,38]_{CIT 13 – 24h} sowie [OR = 2,28]_{CIT 25 – 36h} auf bis zu [OR = 3,48]_{CIT > 36h} an (Ojo et al. 1997). Die Analyse der definierten 6135 Basenpaare ergab die, in Abbildung 19 angegebenen, *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP). Es ließen sich in den kodierenden Bereichen zwei stumme Mutationen sowie in der 3'-UTR zwei weitere identifizieren. Die blau hinterlegte Position 2698 repräsentiert eine stumme Mutation der mitochondrialen Zielsequenz (CCG_{Prolin} → CCA_{Prolin}, ⁴*Codon Usage*: 6,9 → 16,9), in Exon 4 wurde ein einmalig mutiertes Allel in Position 4343 rötlich hervorgehoben (TTC_{Phenylalanin} → TTT_{Phenylalanin}, ⁴*Codon Usage*: 15,0 → 19,7). Zwei weitere (5237 & 5251), grün markierte Bereiche zeigen Aberrationen im Bereich der 3'-UTR sowie graue in nichtkodierenden Regionen. In der Zielgruppe ließen sich keine repräsentativen SNP nachweisen, welche nicht auch in den Kontrollgruppen anzutreffen waren. Infolgedessen konnten in dieser Pilotstudie keine genetischen Alterationen der *GPX4* für das *Outcome* der jeweiligen Transplantatnieren verantwortlich gemacht werden.

⁴ Entnommen aus der *Codon Usage Database*, ihrerseits beziehend auf *NCBI-GenBank*.

Ergebnisse

	Position	612	734	751	759	795	823	831	876	943	946	1850	1853	2034	2085	2142	2388	2405	2698	2942	3058	3062		
	Referenz	A	G	A	A	C	C	A	A	G	T	G	C	A	A	A	A	C	G	A	C	C		
Identifizierung	Doppeltspende																							
	ja	-	-	-	-	-	T/T	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	C/C	G/G	G/G	T/T	-	-	G/G	C/C	A/T	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	G/G	A/A	-	G/C	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	G/G	A/A	-	-	-	G/G	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G
	nein	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	G/G	A/A	-	-	-	A/G	A/G	A/G	G/G	-	-	G/A	G/G	G/G	G/G	
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G	
	nein	-	C/C	G/G	-	T/T	-	-	G/G	A/A	-	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	-	-	A/A	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G	
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	A/A	-	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	G/G	A/A	-	A/G	G/C	A/G	A/G	G/G	T/T	T/T	-	G/G	-	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
Identifizierung																								
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
Identifizierung																								
	nein	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	-	-	-	A/G	G/C	-	-	G/G	T/T	T/T	-	G/G	C/G	G/G		
	nein	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	G/G	G/G	A/A	-	-	-	-	G/G	G/G	-	-	G/A	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	A/G	-	-	G/A	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	G/C	A/G	A/G	G/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		
	nein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/G	-	-	-	G/G	G/G	G/G		

Abbildung 19a: Die erste Hälfte der Sequenzierungsergebnisse. Die oberste Zeile gibt die Position, die darunter liegende violette die Base der Referenzsequenz an. Die Gruppeneinteilung folgt von oben nach unten: *unerwartet schlecht* – *erwartet gut* – *unerwartet gut*, jeweils durch einen grauen Balken getrennt. Farbhinterlegung der Positionen: Blau: Mitochondriale Zielsequenz; Grau: Nichtkodierend.

Ergebnisse

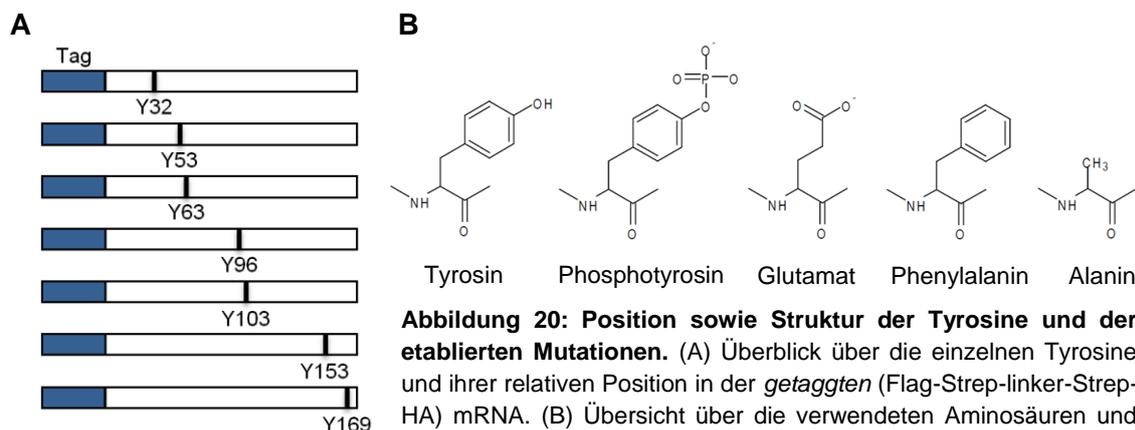
	Position	3071	3495	3821	4146	4343	4537	4624	4642	4643	4729	4938	5083	5099	5237	5251	5441	5467	5657	5782	5957
	Referenz	A	C	G	A	C	C	G	A	C	G	G	G	C	C	G	T	T	G	C	G
Identifizierung	Doppeltspende																				
99858	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	T/T	-	-	C/C	G/T	-	A/A
98861	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A
98915	ja	G/G	-	-	C/C	C/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/T	-	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-
174229	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	T/T	-	-	C/C	T	-	A/A
174248	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-
174257	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	T/T	-	A/A
174268	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	T/T	-	A/A
174272	ja	G/G	-	-	C/C	-	-	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A
174275	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	-	G/A	-	T/C	-	C/T	-
174286	nein	G/G	-	-	-	-	-	C/C	G/G	G/G	-	G/A	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	-	-	-
174307	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	-	-	C/T	G/A
174320	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	T/T	-	A/A	-	-	-	-	-	-	-	-
174322	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/C	C/T	-	-	T/C	G/T	-	-
174339	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	-	T/T	-	-	-	-	-	-
174356	nein	G/G	-	G/A	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A
174380	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A
174396	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	-	-	-	C/C	G/T	C/T	G/A
174415	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	G/T	-	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A
174423	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	T/T	-	-	C/C	G/T	C/T	G/A
174495	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	-	-	-	T/C	-	C/T	-
174509	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	G/T	C/T	G/A
201968	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	T/T	-	A/A
201969	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	T	-	A/A
Identifizierung																					
100589	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102616	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	G/T	-	G/A
106069	ja	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	T/T	-	A/A
Identifizierung																					
98244	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	-	-	-	T/C	-	C/T	-
98405	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	C/G	-	-	-	T/C	-	C/T	-
106454	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	G/T	C/T	-
106769	nein	G/G	C/T	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	G/T	-	A/A	-	-	-	T/C	-	-	-	-
114952	nein	G/G	C/T	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	-	-	A/A	G/G	C/T	-	-	C/C	G/T	C/T	G/A
115257	nein	G/G	-	-	C/C	-	G/G	C/C	G/G	G/G	G/T	-	A/A	C/G	C/T	-	-	T/C	G/T	-	G/A

Abbildung 19b: Die zweite Hälfte der Sequenzierungsergebnisse. Die oberste Zeile gibt die Position, die darunter liegende violette die Base der Referenzsequenz an. Die Gruppeneinteilung folgt von oben nach unten: *unerwartet schlecht* – *erwartet gut* – *unerwartet gut*, jeweils durch einen grauen Balken getrennt. Farbhinterlegung der Positionen: Rot: Enzymbereich; Grün: 3'-UTR; Grau: Nichtkodierend.

5.2. Gpx4 – Phosphorylierung

5.2.1. Etablierung von Zelllinien mit rekonstituierter Gpx4-Expression

In zahlreichen Proteinen unterlaufen Tyrosinseitenketten einer Phosphorylierung als regulatorische Komponente postranslationaler Modifizierung (Nishi et al. 2011; Olsen et al. 2006). Auf diese Weise erfährt die Peptidkette eine Variation ihrer Konformation, welche in veränderter Reaktionsfähigkeit (Johnson 2009) oder Zugänglichkeit für Bindungspartner resultiert (Bae et al. 2009). Hierbei scheinen elektrostatische Wechselwirkungen durch Einbringung negativer Ladungen in das Protein von zentraler Bedeutung zu sein (Johnson and Lewis 2001; Ptacek and Snyder 2006). Im Redoxmetabolismus wurde eine transiente, regulatorische Inaktivierung von Prx1 via Phosphorylierung bereits beschrieben (Woo et al. 2010). Die Gpx4 hat in ihrer Polypeptidkette sieben Tyrosinreste, welche an ihrer Hydroxylgruppe phosphoryliert werden könnten. Als *Proxy* für einen simulierten, phosphorylierten Zustand wurden sämtliche Tyrosine individuell zu Glutamat abgeändert. Dies führte zur Einbringung einer zusätzlichen negativen Ladung unter Verlust der phenolischen Struktur des Tyrosins. Ferner wurden entsprechende Tyrosine zu Phenylalanin sowie gegebenenfalls zu Alanin mutiert. Aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe kann Phenylalanin nicht phosphoryliert werden und ist somit zwar das strukturell verwandte, aber unphosphorylierbare Pendant zu Tyrosin. Bei Auffälligkeiten hinsichtlich des Enzymverhaltens wurde die Alaninvariante als zusätzliche Kontrolle etabliert, um sterische Effekte durch den Verlust des Benzolrings zu untersuchen. Das cysteinhaltige Isoenzym der Gpx4, Gpx7, wird aufgrund seiner Homologie zutreffenderweise auch als nicht-selenocysteinhaltige Gpx4 bezeichnet (Brigelius-Flohe and Maiorino 2013) und beinhaltet an Position Y153 anstelle des Tyrosins ein Tryptophan. Unter Vorwegnahme der Bedeutung von Y153 wurde eben genannte Aminosäure zusätzlich als Sonderform eingeführt. Einen Überblick über die einzelnen Tyrosine und die korrespondierenden, strukturelevanten Vorüberlegungen liefert Abbildung 20.



Ergebnisse

Die entsprechenden Mutationen der zytosolischen Isoform der Gpx4 wurden via *Overlap-Extension-PCR* generiert, wobei das Ausgangsplasmid (pDrive-Flag-Strep-HA-Gpx4-Vektor) eine N-terminal gelegene FSH-Domäne (*Tag*) aufweist. Anschließend erfolgte die Herstellung mutationstragender Viruspartikel sowie die entsprechende Transfektion immortalisierter Mausembryofibroblasten (MEFs) mit homozygot geflochten *Gpx4*-Allelen (PFa1^{flox/flox}). Das lentivirale Expressionsplasmid kodiert hierbei für eine bicistronische mRNA, welche über ein IRES-Element die separate Translation sowohl der Enzymmutation als auch des VENUSnucmem als Reportergen ermöglicht (Abbildung 21). Ergänzend wurde die PFa1-Zelllinie bereits mit dem pCAG-3SIP-MCM-Plasmid stabil transfiziert, welches für eine Cre-Rekombinase kodiert, die beidseits an mutierte Östrogenrezeptorbindungsstellen fusioniert wurde (Verrou et al. 1999). Nach Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen wird die Rekombinase aus ihrem Komplex entlassen und transloziert aus dem Zytosol in den Zellkern (siehe Material), woraufhin die Exons 5 - 7 der endogenen *Gpx4*-Allele im Bereich ihrer flankierenden loxP-Schnittstellen deletiert werden. (Seiler et al. 2008). Wie bereits aufgezeigt wurde, führt der endogene *Gpx4*-Knockout zu einem enormen Anstieg intrazellulärer Lipidhydroperoxide, zu der Freisetzung des *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) aus den Mitochondrien sowie letztlich dem vollständigen Absterben der induzierten MEFs nach 72 Std. (Seiler et al. 2008). Folglich lassen sich die transfizierten MEFs entsprechend selektieren, nachdem all diejenigen Fibroblasten versterben, welche ihre ektop eingebrachte Enzymmutation nach Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen entweder unzureichend exprimieren oder sich diese als nicht lebensfähig erweist. Ebenso wurden die nativen MEFs sowohl mit dem leeren lentiviralen Expressionsvektor (mock – Negativkontrolle) als auch dem *Gpx4*-Wildtyp (WT – Referenz) transfiziert, zumal die Enzymmutationen unter dem SFFV-Promotor überexprimiert werden. Anschließend wurde die Proteinexpression via Immunoblot unter Verwendung des, gegen den *Tag* gerichteten, α -HA-Antikörpers nachgewiesen. Initial ließ sich die Mutation Y63E nach Induktion mittels Tamoxifen nur schwach nachweisen, wobei

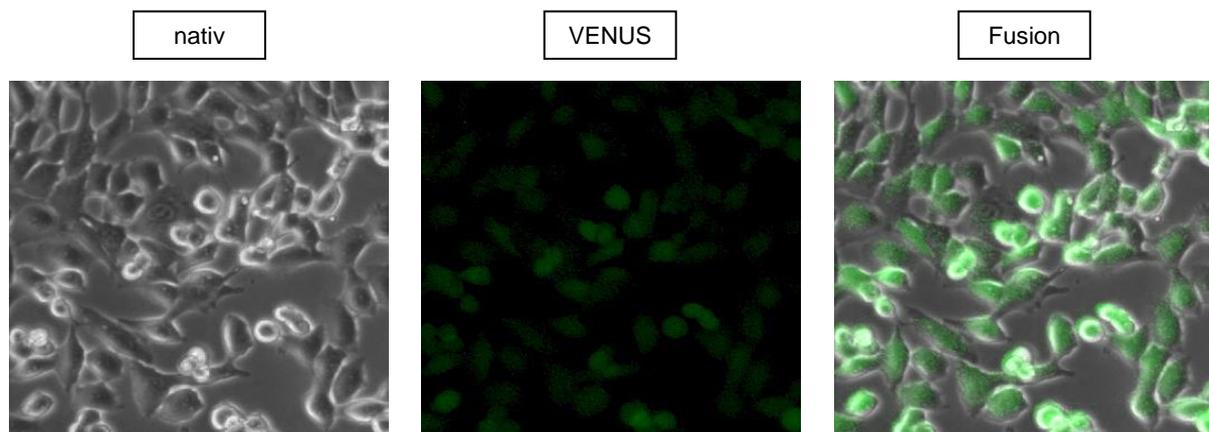


Abbildung 21: Darstellung nativer und fluoreszierender Fibroblasten nach Transfektion. Der Nachweis des VENUSnucmem ist nur durch die simultane Translation der eingebrachten *Gpx4*-Mutation ermöglicht. Unzureichend exprimierende Zellen sterben nach Induktion mittels 4-Hydroxytamoxifen ab.

Ergebnisse

sich die Expression mit zunehmender Zellpassage (> 20) normalisierte (Abbildung 22). Diesbezüglich zeigen die Fluoreszenzsignale des VENUSnucmem interessanterweise von Beginn an einheitliche Intensitäten (nicht angegeben). Die jeweiligen Expressionen wurden auf β -Aktin relativiert und in Bezug auf den Wildtyp als Referenz gesetzt.

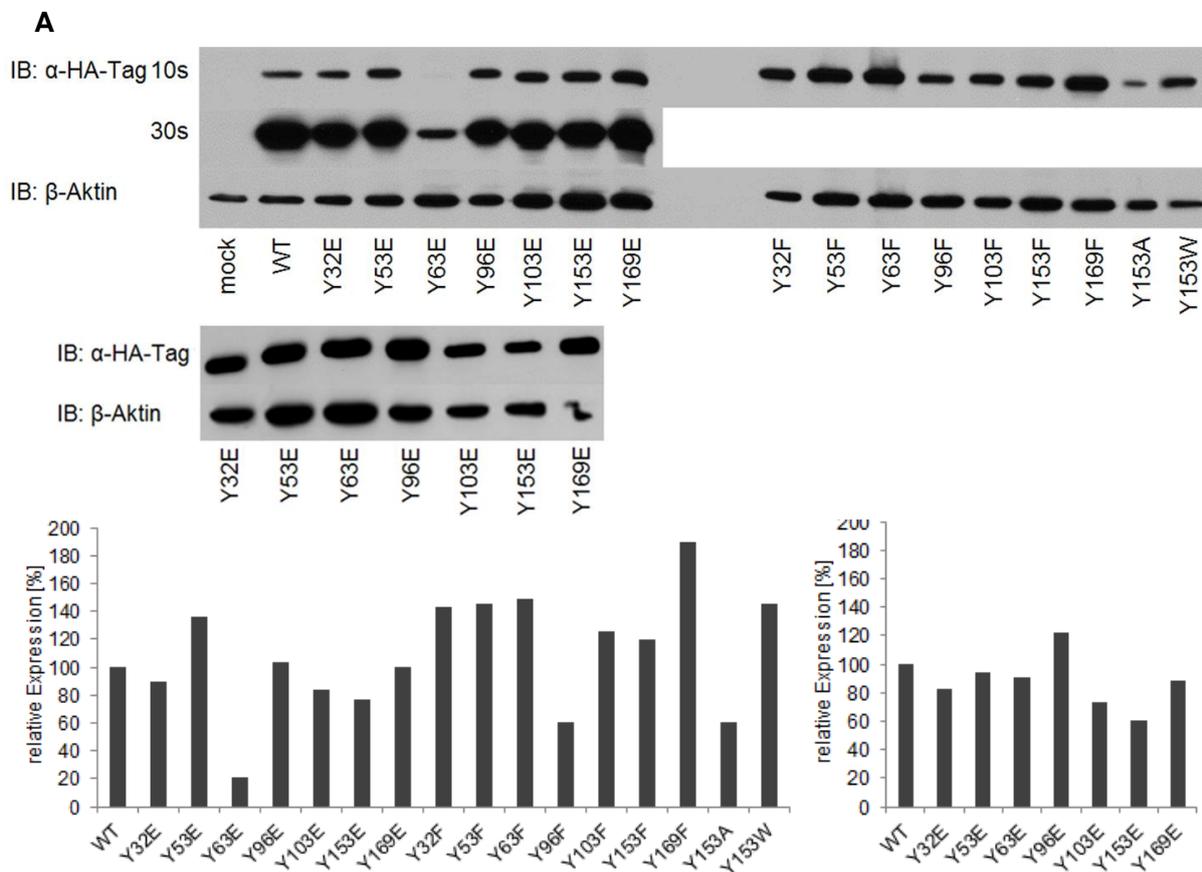


Abbildung 22: Die Enzymexpressionen der verschiedenen Gpx4-Mutanten. (A) Nachweis der Enzymexpression mittels Immunoblot. In frühen Stadien war eine reduzierte Expression der Y63E-Mutante zu erkennen, welche sich nach (B) mehreren Passagen normalisierte. (C) Die einzelnen Expressionen sind auf ihre interne Ladekontrolle normalisiert und auf die Wildtypexpression relativiert. (D) In späteren Stadien nähert sich die Expression von Y63E den Übrigen an.

Nach Etablierung der stabil exprimierenden Zelllinien wurden die Enzymaktivitäten der *Gpx4*-Mutationen indirekt unter Verwendung des spezifischen Substrats Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PCOOH) und dem Verbrauch von NADPH/H⁺ durch die Glutathionreduktase gemessen (freundlicherweise wurden die Aktivitätsmessungen von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Matilde Maiorino, Padua, Italien, durchgeführt) (Abbildung 23). Die Angaben des WT sowie der Y/E exprimierenden Zelllinien stellen Mittelwerte aus drei Messungen, der Y/F-Varianten aus zwei dar. Die Aktivitäten für Y153A sowie Y153W wurden lediglich einmal bestimmt. Um eine semi-quantitative Aussage über die einzelnen Aktivitäten zu erhalten, wurden die absoluten Werte in Relation zu ihrer Expression gesetzt. Die hierfür herangezogenen Immunoblots wurden aus Teilen der hiesig verwendeten Zelllysate angefertigt. Man beachte, dass die relative Aktivität der Mutation Y63E durch ihr initiales

Ergebnisse

Expressionsdefizit ($1_{\text{früh}} : 4,5_{\text{spät}}$) beachtlicher Schwankung ausgesetzt ist, wobei sich deren absoluter Betrag im Verlauf nur geringfügig verändert ($1_{\text{früh}} : 1,8_{\text{spät}}$). Des Weiteren zeigt Y32E, verglichen mit ihrer Phenylalaninkontrolle, eine markant erhöhte Enzymaktivität.

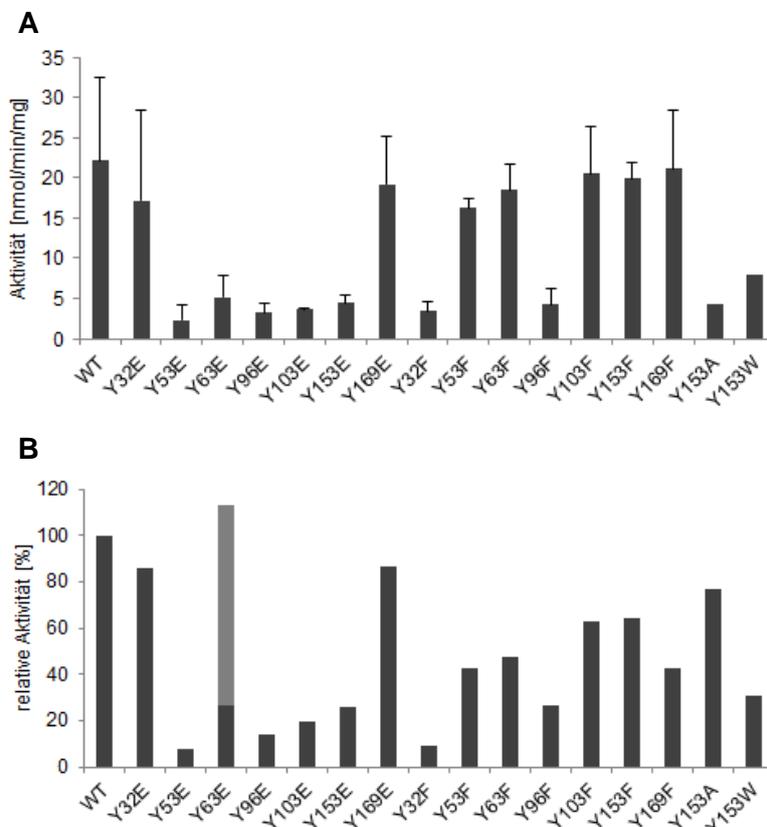


Abbildung 23: Darstellung der Aktivitäten ohne (A) und in (B) Relation zu ihrer individuellen Expression. Die relative Aktivität korreliert indirekt proportional mit der Expression. Die Aktivität von Y63E variiert in Abhängigkeit ihrer Zellpassage entsprechend deutlich (hellgrau: früh, anthrazit: spät).

5.2.2. Subzelluläre Lokalisation diverser Gpx4-Varianten

Um Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen Gpx4-Mutanten zu bekommen, wurden die Y/E-Enzymvarianten mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Konfokallasermikroskops untersucht. Hierbei ließen sich die exprimierten Proteine mit einem, gegen den α -HA-Antikörper gerichteten, sekundären und fluoreszenzgekoppelten Antikörper (Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rat IgG) nachweisen (Abbildung 24). Die Fluoreszenz des VENUSnucmem-Reportergens interferiert hierbei nicht mit dem Antikörper und erzeugt auch kein Hintergrundsignal. Als Färbekontrollen für die Plasmamembranen wurde WGA verwendet, zumal es selektiv an N-Acetylglucosaminen sowie Sialinsäuren bindet und somit ein Nachweis für Biomembranen darstellt. Die Darstellung der Kernstrukturen erfolgte durch DAPI.

Ergebnisse

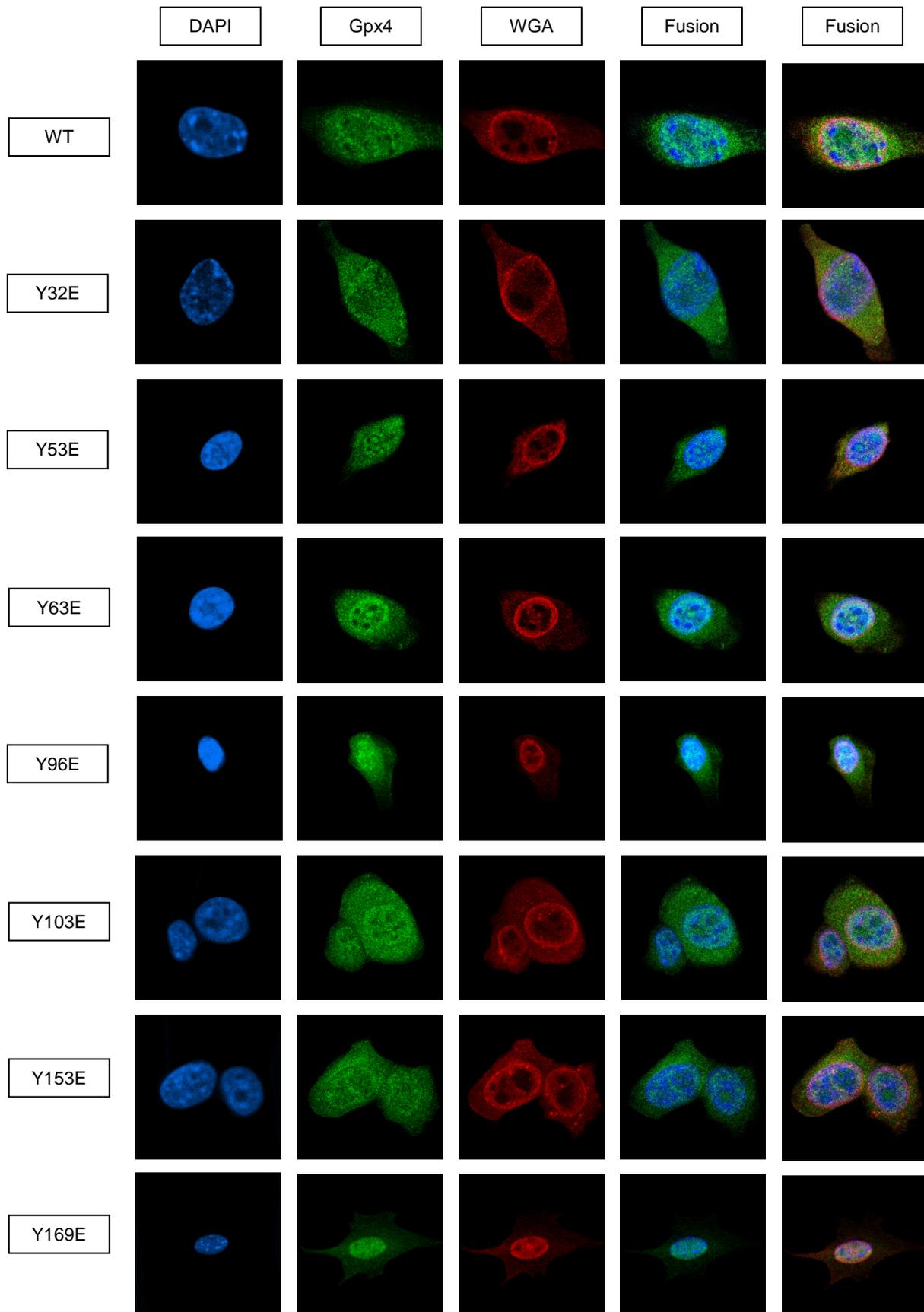


Abbildung 24: Darstellung der Fluoreszenzsignale diverser Enzymvarianten. Die ubiquitäre *Gpx4*-Expression (grün) wurde durch den fluoreszierenden Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rat IgG-Sekundärantikörper nachgewiesen. Zusätzlich erfolgte eine Kontrollfärbung gegen Biomembranen (rot) sowie die Kerndarstellung (blau). Ebenso sind zwei Abbildungen mit sich überlagernden Farbkanälen (Fusion) (blau/grün, blau/grün/rot) dargestellt.

5.2.3. Proliferationsverhalten der verschiedenen *Gpx4*-Mutationen

Nach Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen sterben die *Gpx4*-Knockout Fibroblasten innerhalb von 72 Std. ab. Allerdings vermögen sie sich bei entsprechend hoher Zelldichte vor oxidativem Stress gegenseitig zu schützen und überleben infolgedessen (Seiler et al. 2008). Um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen auf das Proliferationsverhalten isolierter Klone zu studieren, wurden 100 Zellen auf einer 3,5 cm Mikrotiter ausplattiert und ihr Koloniebildungspotential beurteilt (*Clonogenic Assay*). Gemessen am WT zeigten die Y/E-Enzymvarianten, trotz herabgesetzter Aktivität, vergleichbares Wachstum unter normalen Kulturbedingungen (Abbildung 24). Aufgrund dessen wurden die Proliferations-eigenschaften zudem unter Stressbedingungen analysiert, wobei den Zellen hierbei ihr endogenes Glutathion entzogen wurde. Gemeinhin wird GSH nicht als Tripeptid aufgenommen, sondern intrazellulär in einem zweiteiligen Schritt synthetisiert. Die Zugabe von BSO, einem spezifischen Hemmstoff der γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase (γ -GCS), inhibiert die *de novo* GSH-Biosynthese und resultiert folglich in einem starken Abfall intrazellulärer Glutathionspiegel. Der Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass bei Konzentrationen von 1 μ M BSO die Fähigkeit zur Koloniebildung bei den Enzymvarianten Y32E, Y53E, Y96E und Y103E bereits deutlich beeinträchtigt sowie für Y153E fast gänzlich aufgehoben war.

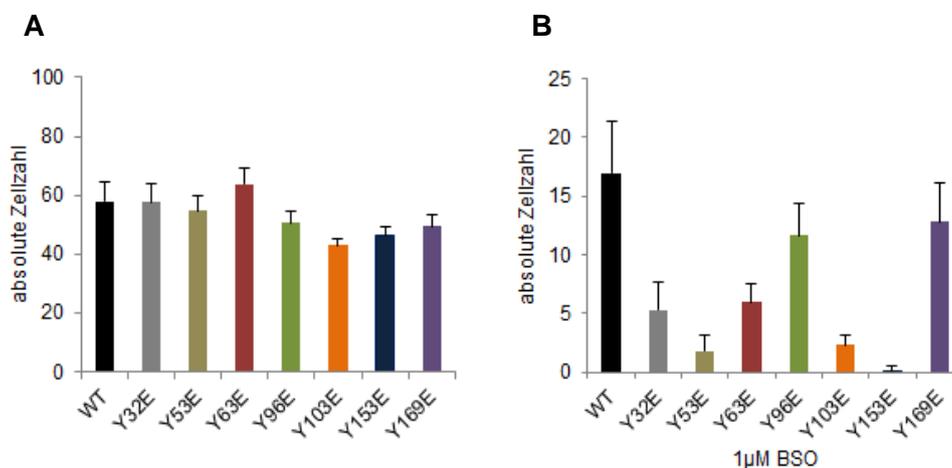


Abbildung 24: Proliferationsverhalten diverser *Gpx4*-Mutanten unter normalen Zellkultur- (A) sowie Stressbedingungen (B). Bei Zugabe von 1 μ M BSO können bei der Mutation Y153E kaum Kolonien nachgewiesen werden.

5.2.4. Resistenz der Zelllinien gegenüber lipophilen Hydroperoxiden

Im weiteren Verlauf wurde die Sensitivität der Mutanten gegenüber ausgewählten Stressoren geprüft. Die *Gpx4* wurde ursprünglich als ein Enzym charakterisiert, welches vornehmlich Lipidhydroperoxide in Biomembranen oder Lipoproteinen zu reduzieren vermag (Ursini et al.

Ergebnisse

1982). Insofern wurden 1000 Zellen der entsprechenden Zelllinien mit dem aliphatischen tert-Butylhydroperoxid (tBOOH) sowie anschließend mit Cholesterolhydroperoxid (ChOOH) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Paolo Di Mascio, Sao Paulo, Brasilien) inkubiert, um oxidativen Stress in steigender Konzentration auszulösen (Abbildung 25). 72 Std. nach der Behandlung wurde die Rate überlebender Zellen mittels *AquaBluer* bestimmt. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in den folgenden Experimenten stets in gleicher Weise verfahren wurde. Da nur geringe Mengen Cholesterolhydroperoxid zur Verfügung stand, konnte die Versuchsreihe mit ChOOH lediglich für die Y/E-Mutationen durchgeführt werden. Gemessen am WT zeigten sich sämtliche Mutanten (Y/E & Y/F) sowohl bei der Behandlung mit tBOOH als auch ChOOH vergleichbar stressresistent.

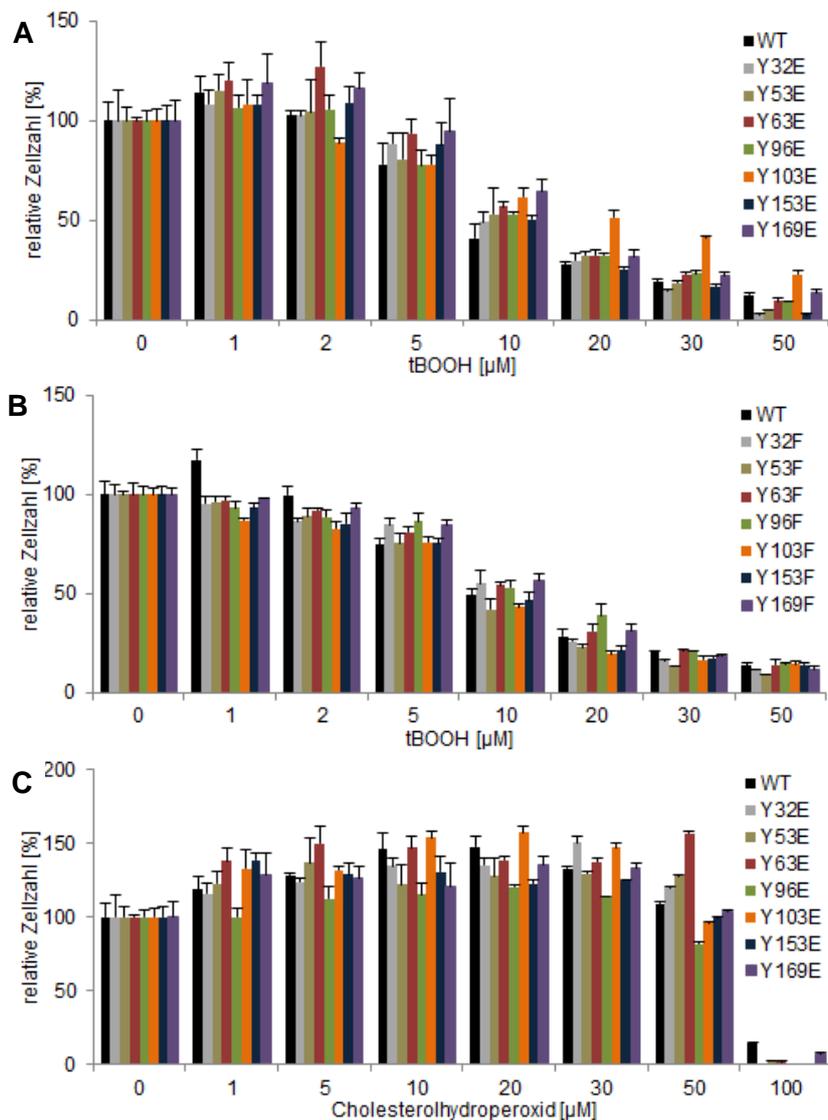
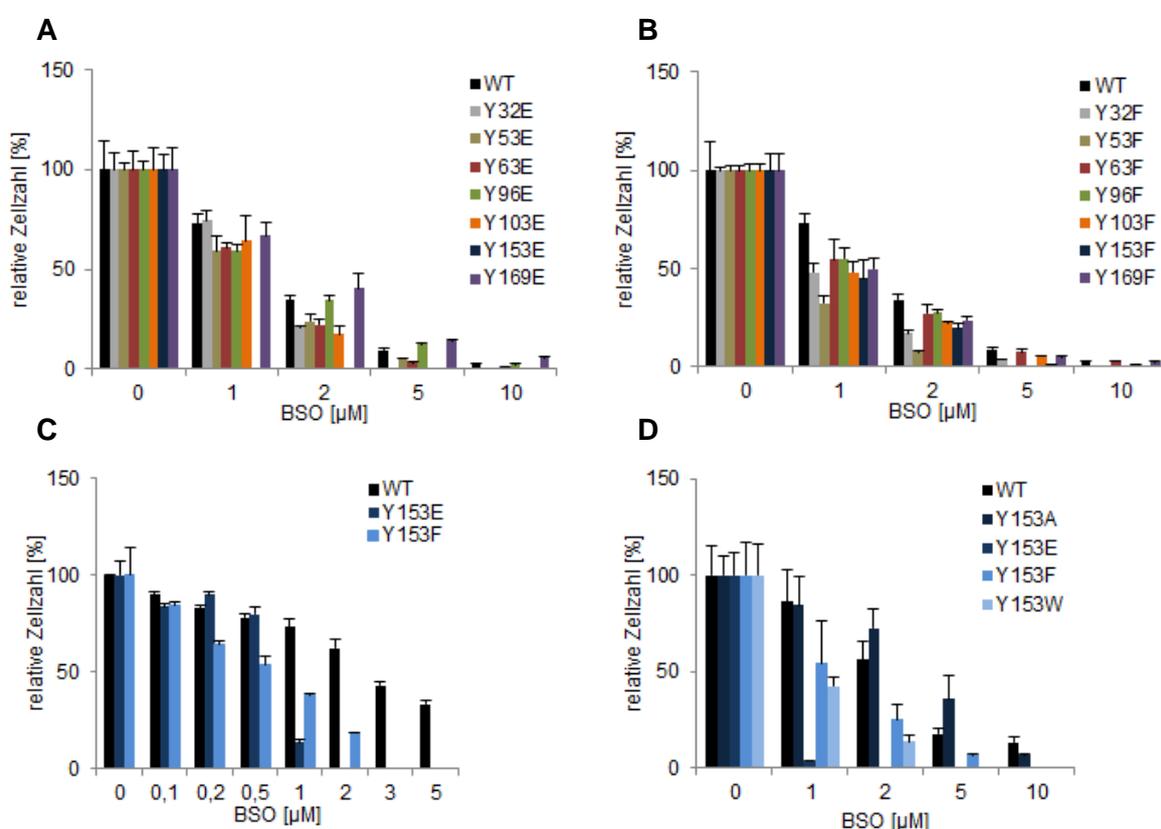


Abbildung 25: Inkubation diverser Gpx4-Mutanten mit steigenden Konzentrationen von tBOOH (A,B) und ChOOH (C). Im Vergleich zum Wildtyp sowie ihren Phenylalanincontrollen zeigen sich die Y/E-Varianten vergleichbar widerstandsfähig.

5.2.5. Modulation der GSH-Konzentration

Nachdem die Transkription der ektopt eingebrachten, lentiviralen Enzymmutationen durch den SFFV-Promotor reguliert und folglich überexprimiert wird, könnten die Aktivitätseinbußen infolgedessen quantitativ ausgeglichen werden. Dementsprechend wurden die einzelnen Varianten steigenden Konzentrationen von BSO ausgesetzt, um die endogenen Glutathionspiegel schrittweise zu senken und kompensierende Mechanismen zu demaskieren (Abbildung 26). Verglichen mit ihren Phenylalaninkontrollen, erwies sich lediglich die Variante Y153E als äußerst sensitiv gegenüber Konzentrationen von bereits 1 μM BSO. Hingegen entpuppten sich sowohl die Kontrollvariante Y153A als auch die tryptophanhaltige Sonderform Y153W als wesentlich resistenter gegenüber BSO.



Im folgenden Ansatz sollte untersucht werden, inwieweit exogen zugeführtes GSH die Behandlung durch BSO kompensieren kann. Hierbei wurde zusätzlich Glutathionethylester (GSH-EE) mit eingeschlossen, zumal es die Zellmembranen leichter passieren kann. Folglich wurde bei den (*Rescue*-)Experimenten eine für Y153E entsprechend letale Dosis von 5 μM BSO verwendet und steigende Konzentrationen von GSH, respektive GSH-EE, simultan in das Zellkulturmedium gegeben. Der Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass sowohl

Ergebnisse

der WT als auch die Variante Y153F durch das zugegebene GSH (GSH-EE) gerettet werden konnten, unerwarteterweise nicht hingegen Y153E. Hierbei hindert die Substitution von Tyrosin durch Glutamat möglicherweise die Gpx4 daran, das GSH (GSH-EE) weiterhin als Reduktans heranzuziehen.

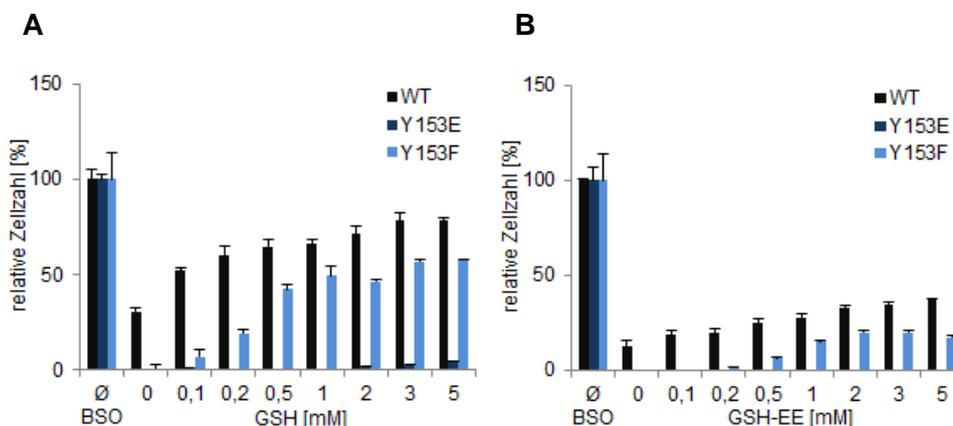


Abbildung 27: (Rescue-)Experimente mit GSH (GSH-EE). Der WT, Y153E und Y153F wurden 5 μ M BSO ausgesetzt und mit steigenden Konzentrationen an GSH (A) sowie GSH-EE (B) behandelt. Allerdings lässt sich das Wachstum lediglich für den WT und Y153F wiederherstellen, nicht hingegen für die Variante Y153E.

Im Umkehrschluss wurde eine weitere Versuchsreihe mit konstant gehaltenen Glutathionkonzentrationen und steigenden BSO-Spiegeln durchgeführt. Zumal für exogenes Glutathion unter gängigen Konzentrationen im niedrigen millimolaren Bereich bislang keine Toxizität beschrieben ist, wurden zur Untersuchung protektiver Effekte Standardkonzentrationen von 5 mM für GSH sowie 2,5 mM für GSH-EE gewählt. Entgegen jeder Erwartungen stellte sich die alleinige Zugabe beider Substanzen, ohne jeglichen Zusatz von BSO, gegenüber Y153E als gleichermaßen toxisch heraus (Abbildung 28). Sowohl der WT als auch die Phenylalaninvariante zeigten bei diesen Glutathionkonzentrationen regelrechtes Wachstum und konnten die, durch BSO induzierten toxischen Effekte, partiell kompensieren.

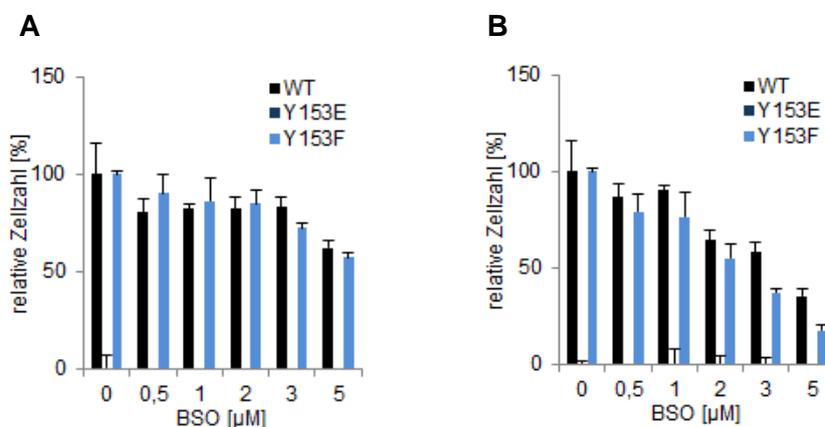


Abbildung 28: Toxischer Effekt durch exogenes GSH sowie GSH-EE. Dem WT, Y153E und Y153F wurde sowohl BSO in steigenden Konzentrationen als auch (A) 5 mM GSH oder (B) 2,5 mM GSH-EE zugesetzt und deren Wachstum bestimmt. Bereits die Zugabe von GSH oder GSH-EE wirkte toxisch gegenüber Y153E, wohingegen die Kontrollen erwartungsgemäß höheren Konzentrationen von BSO widerstanden.

Ergebnisse

Im anschließenden Versuch sollte die exakte Konzentration ermittelt werden, bei welcher sich toxische Effekte für GSH-EE nachweisen lassen (Abbildung 29). Hierbei war eine deutliche Reduktion der Zellzahl bei bereits 2 mM GSH-EE festzustellen (~30%), ab 3 mM waren kaum noch lebende Zellen vorhanden. Deshalb wurde in dem folgenden Experiment eine tolerierbare Glutathionkonzentration bis einschließlich 1 mM definiert und BSO in steigender Dosierung zugegeben. Verglichen mit dem alleinigen Zusatz von BSO (Abbildung 26C) ließen sich unter Zugabe von Glutathion allenfalls marginale protektive Effekte für 0,5 mM GSH-EE nachweisen.

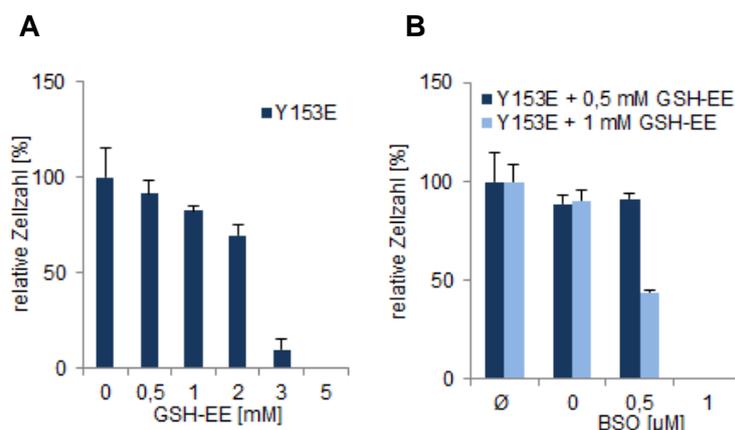


Abbildung 29: Titrierung tolerierbarer GSH-EE-Grenzwerte. (A) Die Zugabe von 2 mM GSH-EE reduzierte die Zellzahl bereits um 30%. (B) Das Verhalten von Y153E gegenüber BSO ließ sich durch verträgliche GSH-EE-Konzentrationen kaum positiv beeinflussen.

5.2.6. Partielle Rescue des BSO-induzierten Zelltods durch NAC

Analog der oben dargestellten Versuchsreihen wurde nun, zusätzlich zu BSO, 2,5 mM N-Acetylcystein (NAC), als thiolhaltiges Antioxidans, zugegeben und das Zellüberleben des WT, Y153E sowie Y153F analysiert (Abbildung 30). Nachdem die endogenen GSH-Konzentrationen durch BSO reduziert wurden, kann die Gpx4 alternativ das, durch NAC eingebrachte, Cystein als Reduktionsmittel verwenden. Im Gegensatz zu GSH (bzw. GSH-EE) konnten BSO-Konzentration bis zu 1 µM durch NAC kompensiert werden, nicht hingegen Dosierungen jenseits 2 µM (Abbildung 30). Hieraus lässt sich ableiten, dass Y153E weiterhin Cysteine akzeptieren kann, wohingegen vergleichbare Mengen GSH (ohne BSO) bereits toxische Effekte hervorrufen.

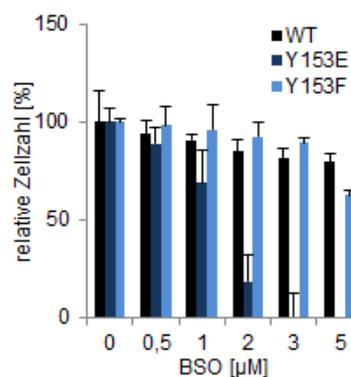


Abbildung 30: Partielle Kompensation des durch BSO induzierten Zelltods. Durch Zugabe von 2,5 mM NAC kann Y153E vor letalen BSO-Konzentrationen partiell (1 µM) geschützt werden.

5.2.7. Keine toxischen Effekte unter NAc, DTT und β -ME

Um zu prüfen, inwiefern gängige, thiolhaltige Reduktionsmittel von den Y153E exprimierenden Zellen toleriert werden, wurden jene mit steigenden Konzentrationen der Antioxidantien NAc, Dithiothreitol (DTT) sowie β -Mercaptoethanol (β -ME) behandelt und anschließend die Zellzahl bestimmt (Abbildung 31). Interessanterweise ergaben sich bei den hier verwendeten thiolhaltigen Antioxidantien keinerlei Unterschiede. Die Mutante Y153E verhielt sich entsprechend der WT-Gpx4 oder Y153F-Variante. Lediglich bei hohen Konzentrationen von NAc (10 mM) konnten Unterschiede für die Variante Y153E eruiert werden. Zumal sämtliche thiolhaltigen Antioxidantien wie NAc, DTT oder β -ME gleichermaßen gut in die Zellen aufgenommen werden, kann diesbezüglich geschlussfolgert werden, dass der Zusatz von GSH-EE den Zelltod der Mutation Y153E anhand spezifischer Effekte provoziert, und weniger Produkt eines exzessiv reduzierenden Milieus ist.

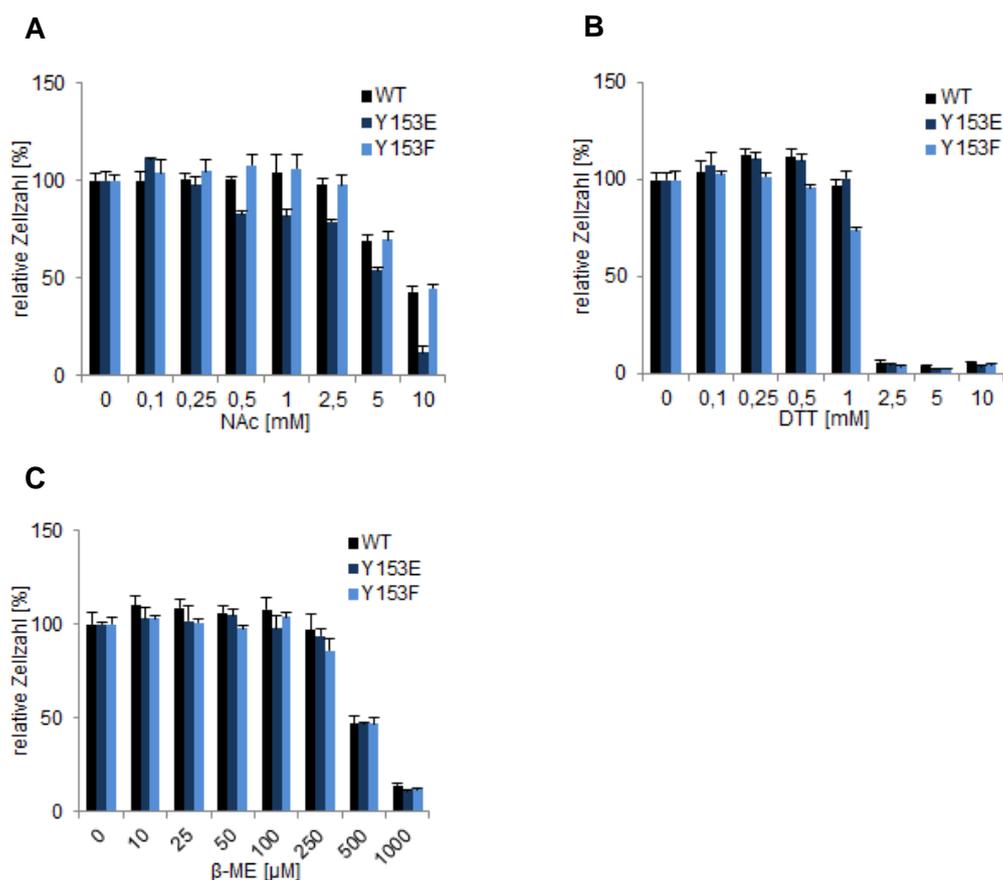


Abbildung 31: Niedermolekulare, thiolhaltige Antioxidantien üben keine toxischen Effekte auf die Y153E-Mutante aus. Die Variante Y153E zeigte unter den gängigen Antioxidantien (A) NAc, (B) DTT sowie (C) β -ME normales Wachstum. Einzig unter hohen Konzentrationen von NAc konnten Unterschiede detektiert werden. Folglich zieht die Zugabe von GSH-EE eher spezifische Auswirkungen nach sich und ist nicht Konsequenz einer stark reduzierenden Umgebung.

5.2.8. α -Tocopherol, β -ME, Necrostatin-1 & Ferrostatin-1 mildern die GSH-Toxizität

Nachdem sich die Variante Y153E als äußerst empfindlich gegenüber dem exogen zugeführten Glutathion erwies, wurde im Folgenden adressiert, inwieweit steigende Konzentrationen diverser Antioxidantien, respektive Inhibitoren, der Toxizität durch GSH (GSH-EE) entgegenwirken können. Hierbei wurden in dieser Studie einerseits β -ME und α -Tocopherol als Hemmstoffe des Caspase-unabhängigen, nicht apoptotischen Zelltods (Doktorarbeit Alexander Seiler, 2007), andererseits die Inhibitoren der Nekroptose (Necrostatin-1) sowie Ferroptose (Ferrostatin-1) mit eingeschlossen (Abbildung 32). Dosisabhängig vermochten jene Substanzen die toxischen Effekte von GSH-EE selektiv zu unterbinden. In höherem Maße reagiert hierbei β -Mercaptoethanol toxisch gegenüber den GSH-EE unbehandelten Zellen, womöglich aufgrund einer Proteindenaturierung oder eines *reductive stress*. Interessanterweise milderte die simultane Zugabe bei der Mutation Y153E nicht nur die Toxizität durch GSH-EE, sondern auch jene des β -Mercaptoethanols. Nachdem das hydrophobe Antioxidans α -Tocopherol sowie die Hemmstoffe der Nekroptose & Ferroptose protektiv auf die Zellen wirkten, erlauben sich spekulative Rückschlüsse auf die hiesige Induktion lipophiler, reaktiver Sauerstoffspezies durch den Zusatz von GSH-EE.

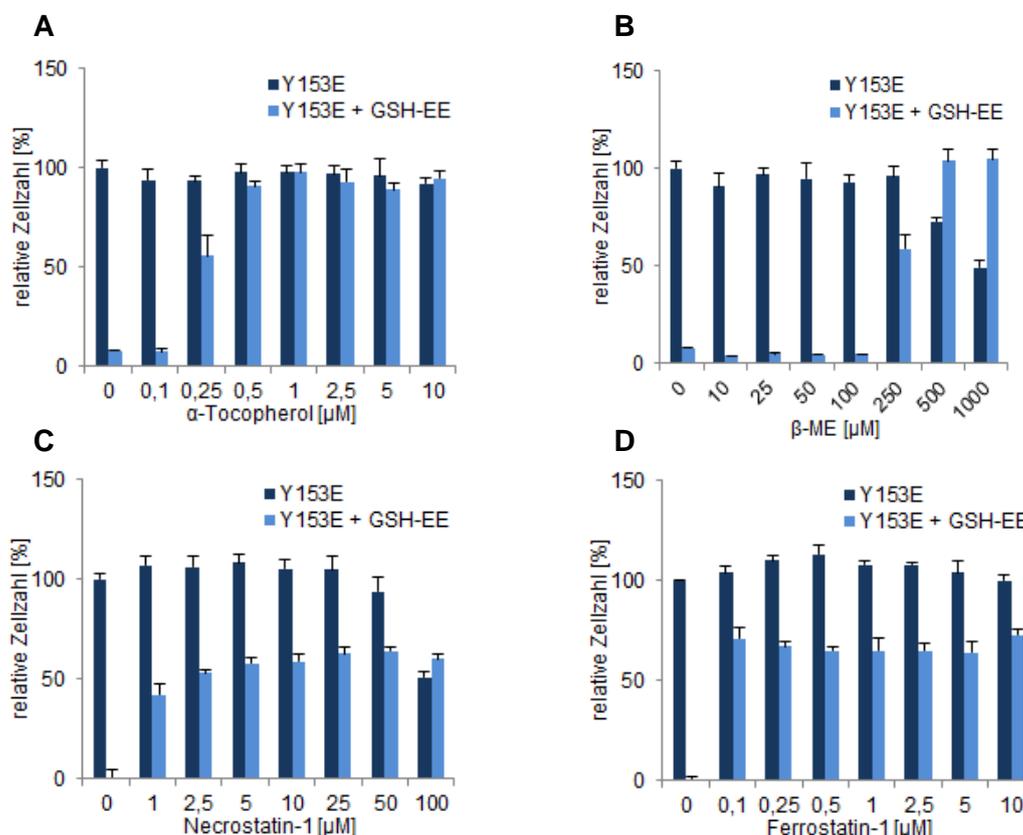


Abbildung 32: Simultane Zugabe von GSH-EE sowie diverser Inhibitoren des Caspase-unabhängigen, nicht apoptotischen Zelltods. (A) α -Tocopherol, (B) β -Mercaptoethanol, (C) Necrostatin-1, (D) Ferrostatin-1 verringern partiell die Toxizität von 2,5 mM GSH-EE in den Y153E exprimierenden Zellen, worauf Rückschlüsse auf die Induktion lipophiler ROS gezogen werden können. Die simultane Zugabe von β -ME und GSH-EE gewährleistet sogar das Zellüberleben bei hohen Konzentrationen.

5.2.9. Sensitivität der Zelllinien gegenüber Erastin

In onkogenen Tumorzelllinien induziert Erastin die Ferroptose und geht mit erhöhter Produktion von Lipidhydroperoxiden einher (Yagoda et al. 2007; Yang and Stockwell 2008). Diesbezüglich inhibiert Erastin den Glu/(Cys)₂-Antiporter X_c⁻ (System X_c⁻) (Dixon et al. 2012), welcher die Aufnahme von Cystin (Cys)₂ im Austausch gegen Glutamat vermittelt. Intrazellulär wird Cystin zu zwei Molekülen Cystein reduziert und dient vielfältigen biologischen Prozessen. Die Aminosäure ist mitunter das ratenlimitierende Substrat der *de novo* Synthese von GSH (Bannai 1986), wobei die Zugabe von Erastin in einem raschen Abfall der intrazellulären Glutathionkonzentration resultiert. Aufgrund dessen stehen – ähnlich der BSO-Behandlung – keine Reduktionsmittel für Glutathion-abhängige Prozesse, allen voran der Gpx4, zur Verfügung. Entsprechend wurden die, durch Erastin hervorgerufenen, Effekte auf die Mutante Y153E untersucht (Abbildung 33). Analog der Zugabe von BSO, reagierten die Y153E exprimierenden Zellen wesentlich sensibler gegenüber Erastin und starben bei bereits 0,25 µM nahezu vollständig ab. Die für Erastin beschriebene Modifikation des VDAC führt zu der Aggregation mitochondrialer ROS. Insofern wurden die Zelllinien weiterhin mit Rotenon versetzt, dessen Inhibition des Komplex I der Atmungskette eben eine derartige letale Akkumulation mitochondrialer ROS provoziert. Allerdings starben sämtliche Y/E-Mutationen bei Zugabe von etwa 0,5 µM Rotenon gleichermaßen ab (lediglich für den WT sowie Y153E abgebildet). Ergo gründen auch hier die unterschiedlichen toxischen Effekte des Erastins auf die verschiedenen Zelllinien vornehmlich auf der Inhibition des Systems X_c⁻ und allenfalls nachrangig auf der Manipulation des VDAC.

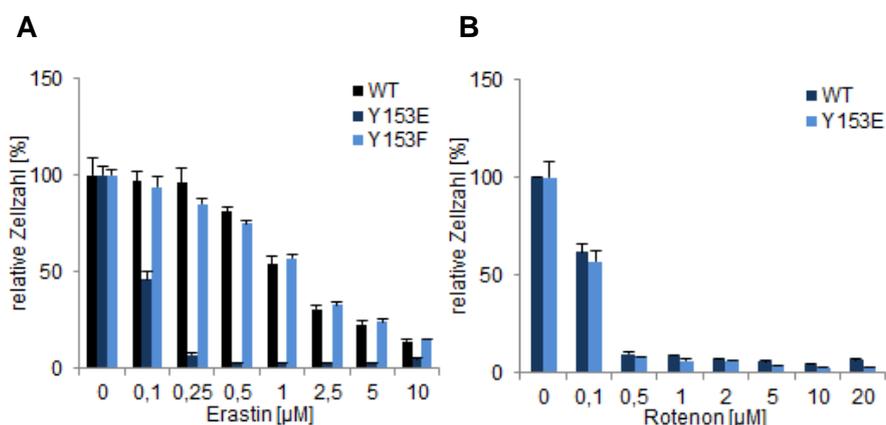


Abbildung 33: Sensitivität der Mutation Y153E gegenüber Erastin. (A) WT, Y153E sowie Y153F wurden steigenden Konzentrationen an Erastin ausgesetzt. Y153E reagierte bei bereits 0,1 µM äußerst empfindlich und führt zu einem Verlust von etwa 50% der Zellpopulation. Hingegen reagierte Y153E nicht sensibler auf Rotenon, einem etablierten Inhibitor des Komplex I der Atmungskette.

6. Diskussion

6.1. Die Polymorphismen der GPX4

Eine der zentralen Komponenten der Pathophysiologie einer *Delayed Graft Function* ist die Generierung hoher Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (Castaneda et al. 2003) sowie die konsekutive Produktion von Lipidhydroperoxiden, welche vornehmlich durch die Gpx4 reduziert werden (Ursini et al. 1982). Die Ischämie & Reperfusion geht weiterhin mit erniedrigten GSH-Konzentrationen (Fleck et al. 1997) einher, wodurch die Aktivität der Gpx4 durch Substratmangel indirekt gehemmt werden kann. Nachdem der Phänotyp des induzierbaren *Gpx4*-Knockouts mit der Histopathologie akuter Tubuluszellnekrosen im Rahmen einer *Delayed Graft Function* einerseits nahezu übereinstimmt (Patschan et al. 2012), andererseits die Ischämie & Reperfusion mit erniedrigten GSH-Konzentrationen (Fleck et al. 1997) einhergeht, wodurch die Aktivität der Gpx4 durch Substratmangel indirekt gehemmt wird, bestand wesentliches Element dieser Dissertation in der Identifizierung potentieller Polymorphismen der GPX4 innerhalb eines ausgewählten Kollektivs von 32 Organspendern. Die Zuordnung der Individuen in ihre entsprechende Kategorie gründete hierbei auf der kurzen kalten Ischämiezeit (CIT) als relevantestem Parameter (Ojo et al. 1997). Weder der kodierende Bereich, noch angrenzende Promotoreregionen ließen hinreichend Rückschlüsse auf *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) zu, die auf die Ausbildung einer *Delayed Graft Function*, respektive auf das letztendliche *Outcome* einer Nierentransplantation, Einfluss nahmen. Die identifizierte Homozygotie C/C der 3'-UTR (Position: mRNA 718, genomisch 5237) ließ sich gegenüber den Genotypen T/T & T/C mit einer reduzierten Enzymaktivität der GPX4 sowie gesteigerter Leukotriensynthese assoziieren (Gautrey et al. 2011; Villette et al. 2002). Allerdings waren entsprechende Merkmale über die Gruppierungen homogen verteilt. Außerdem wurden im Rahmen dieser Untersuchung bedeutende Risikofaktoren des Empfängers wie Alter, körperliche Konstitution, ethnische Herkunft sowie eine vorangegangene Nierentransplantation vernachlässigt. Die klinische Erfahrung, dass sich Nieren eines verstorbenen Transplantatspenders regelhaft konkordant verhalten, ergo entweder beide oder keine eine *Delayed Graft Function* ausbilden, stellt nach wie vor ein markantes Detail dar und erhärtet weiterhin den Verdacht der Partizipation genetischer Faktoren. Inzwischen ließen sich Polymorphismen bei Enzymen des Glutathion-Systems nachweisen, welche sich als protektiv im Rahmen einer Nierentransplantation herausstellten. Der Glutathion-S-Transferase kommt eine herausragende Bedeutung bei der Entgiftung organischer Stoffwechselprodukte zu, da sie die Ausbildung kovalenter Bindungen von GSH an

Xenobiotika katalysiert, wodurch deren Sekretion begünstigt wird. Konnte die Variante *GSTM1*B* (Position: 2, P → A) bei betreffenden Organspendern identifiziert werden, gingen jene Gewebe mit erniedrigter Inzidenz einer *Delayed Graft Function* einher (St Peter et al. 2002).

Die während der Ischämie & Reperfusion aufkommende Tubuluszellnekrose wird in Zusammenhang mit stark erhöhten Eisenkonzentrationen gebracht (Martines et al. 2013), welche die Generierung von Hydroxylradikalen in einer Fenton-Reaktion oder Haber-Weiss-Reaktion begünstigen. Diesbezüglich konnten die Gewebeschäden postischämischer Nieren durch die medikamentöse Gabe glomerulär filtrierbarer Eisenchelatoren (Deferoxamin) signifikant reduziert werden (Paller and Hedlund 1994). Interessanterweise ließ sich auf zellulärer Ebene der, durch den Verlust der Gpx4 hervorgerufene, Zelltod mittels Deferoxamin weitgehend kompensieren (Angeli, persönliche Mitteilung). Wie eingangs erwähnt gehen die alternativen *Pathways* der Nekroptose oder aber der Ferroptose mit einer gesteigerten Lipidperoxidation einher (Degterev and Yuan 2008; Dixon et al. 2012). Erstaunlicherweise wird die Expression der Gpx4 nach Zugabe von TNF- α reduziert (Latchoumycandane et al. 2012), sowie sich auch der Zelltod nach *Gpx4*-Knockout via Necrostatin-1 verhindern lässt (unveröffentlicht). Außerdem weisen erste Indizien auf eine Herunterregulierung der Gpx4 im Zuge der Ischämie & Reperfusion hin (Wirth, Lillig, persönliche Mitteilung). Obgleich in dieser Studie keine relevanten Polymorphismen der GPX4 identifiziert werden konnten, deuten jene Erkenntnisse explizit auf die Relevanz der GPX4 im Szenario der Ischämie & Reperfusion hin. Inwieweit hierbei die Inhibition oder der Expressionsverlust eines der zentralen, ROS-regulierenden Enzyme im Vordergrund steht, verbleibt indes noch unklar und ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6.2. Die putative Phosphorylierung der Gpx4

Physiologische Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies stellen einen essenziellen Bestandteil der zellulären Homöostase dar, beispielsweise im Rahmen der Immunabwehr oder der intrazellulären Signaltransduktion, wobei sowohl restriktive (*reductive stress*) als auch exzessive (*oxidative stress*) Deviationen in gesteigerter Zelltoxizität resultieren können (D'Autreaux and Toledano 2007; Zhang et al. 2012). Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, partizipieren diverse Redoxenzyme bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Bezüglich der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren bedürfen ROS akkurater Regulationsmechanismen, um adäquate Proliferationssignale zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang ließ sich die lokale Inhibition von Prx1 durch Tyrosinphosphorylierung oder die Oxidation des katalytisch aktiven Cysteins von Prx2 als eleganter Adaptationsmechanismus nachweisen (Woo et al. 2010).

Nachdem in einer früheren Studie aus unserer Gruppe gezeigt wurde, dass HPETE das katalytische Cystein der PTP in mehr als tausendfach niedriger Konzentration, verglichen mit H_2O_2 , zu oxidieren vermochten, bestand ein weiteres Element dieser Dissertation in der Untersuchung einer möglichen Regulation der Gpx4 durch Phosphorylierung. Zur Generierung permanenter Phosphorylierungszustände wurden folglich die entsprechenden Tyrosinreste in der Gpx4 durch die Aminosäure Glutamat abgeändert und die Varianten in immortalisierten Mausembryofibroblasten unter Deletion des endogenen Gpx4-Enzyms zur Expression gebracht. Wenngleich phosphorylierte Tyrosine eine unterschiedliche Stereochemie gegenüber Glutamat aufweisen, wurde diese Methode bereits zur Untersuchung von *Cytochrom c* erfolgreich eingesetzt (Pecina et al. 2010). Für Gpx1 ist die posttranslationale Modifikation durch die selektive Phosphorylierung an Position 96 (\triangleq Y-96) inzwischen beschrieben worden. Hierbei führt H_2O_2 zunächst zur Phosphorylierung der Tyrosinkinase c-ABL1 & ABL2 (Arg), welche via SH3-Domänen an prolinreiche Sequenzabschnitte der Gpx1 binden und infolgedessen die Aktivität der Gpx1 beeinflussen

Gpx1	PAPSDDATALMTDP
Gpx4	NAIKWNFTKFLIDK

Abbildung 34: Das Motiv der Tyrosinkinase ABL1/2

(Cao et al. 2003; Ushio-Fukai et al. 2005). Eine derartige Regulation der Gpx4 durch c-ABL1/2 liegt vermutlich nicht vor, zumal die entsprechende Region bei Gpx4 nicht existiert (Abbildung 34).

Nachdem gezeigt wurde, dass sämtliche Enzymvarianten stabil in den induzierbaren *Gpx4*-Knockout-Zellen exprimiert werden konnten, wurden deren Aktivitäten semi-quantitativ mittels eines spezifischen Gpx4-Aktivitätstests *in vitro* bestimmt (freundlicherweise wurden die Aktivitätsmessungen von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Matilde Maiorino,

Padua, Italien, durchgeführt). Obgleich die teilweise drastisch reduzierte Enzymaktivität eine zelluläre Proliferation erlaubte, ließen sich dennoch beträchtliche Unterschiede in den bestimmten Aktivitäten aufzeigen. Vornehmlich die Y/E-Mutationen waren in ihren Aktivitäten drastisch eingeschränkt, wobei die Enzym-Kinetik sogar überwiegend nicht vollendet werden konnte (bis auf Y169E), da die peroxidative Reaktion vorzeitig zum Erliegen kam (Maiorino,

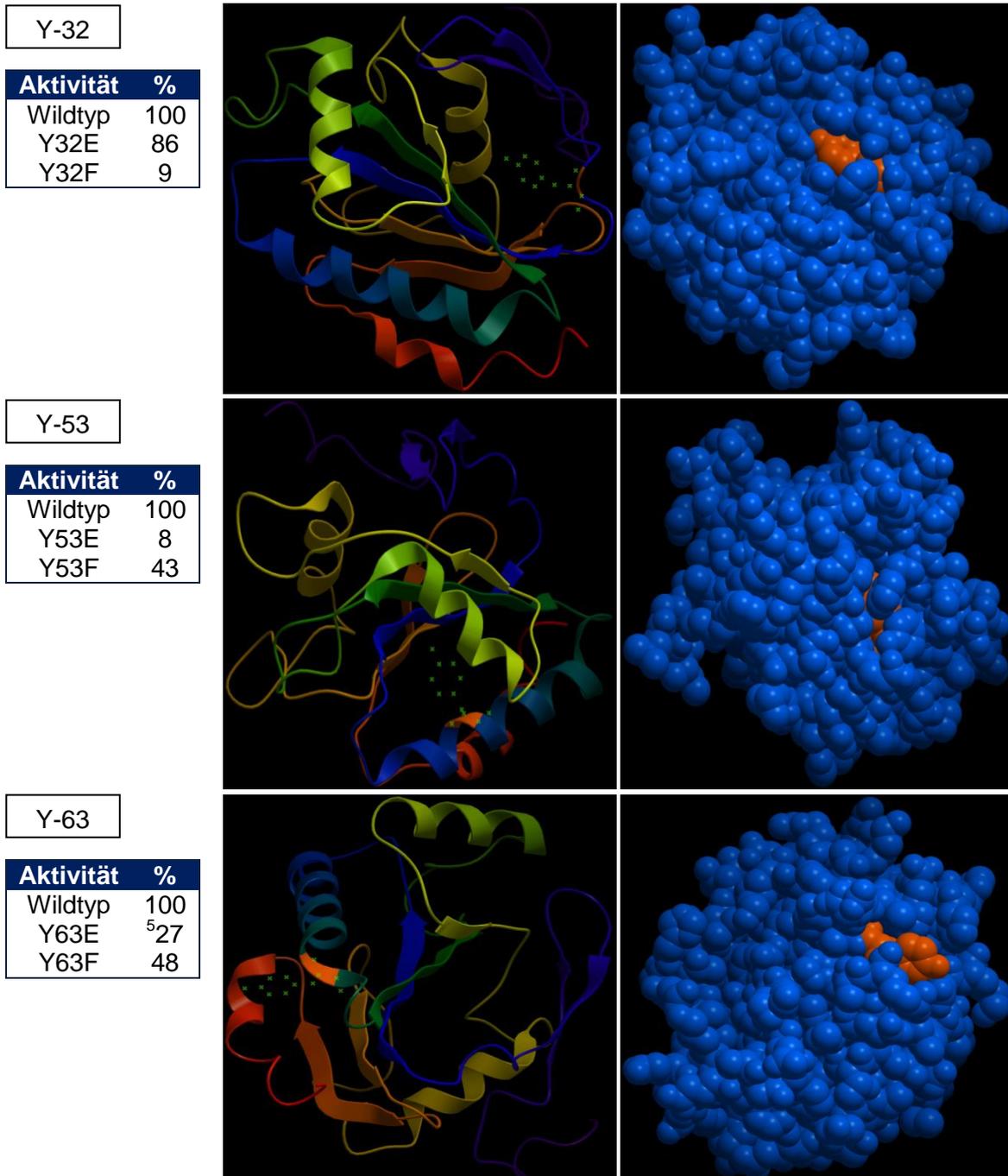


Abbildung 35a: Darstellung der individuellen Tyrosine (orange) gemäß Kristallstruktur. Die Enzymstruktur wurde über *The European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>) bezogen und mittels *ICM-Browser* (Molsoft) analysiert. Nach (Scheerer et al. 2007).

⁵ Aktivität stabiler Expression später Zellpassagen.

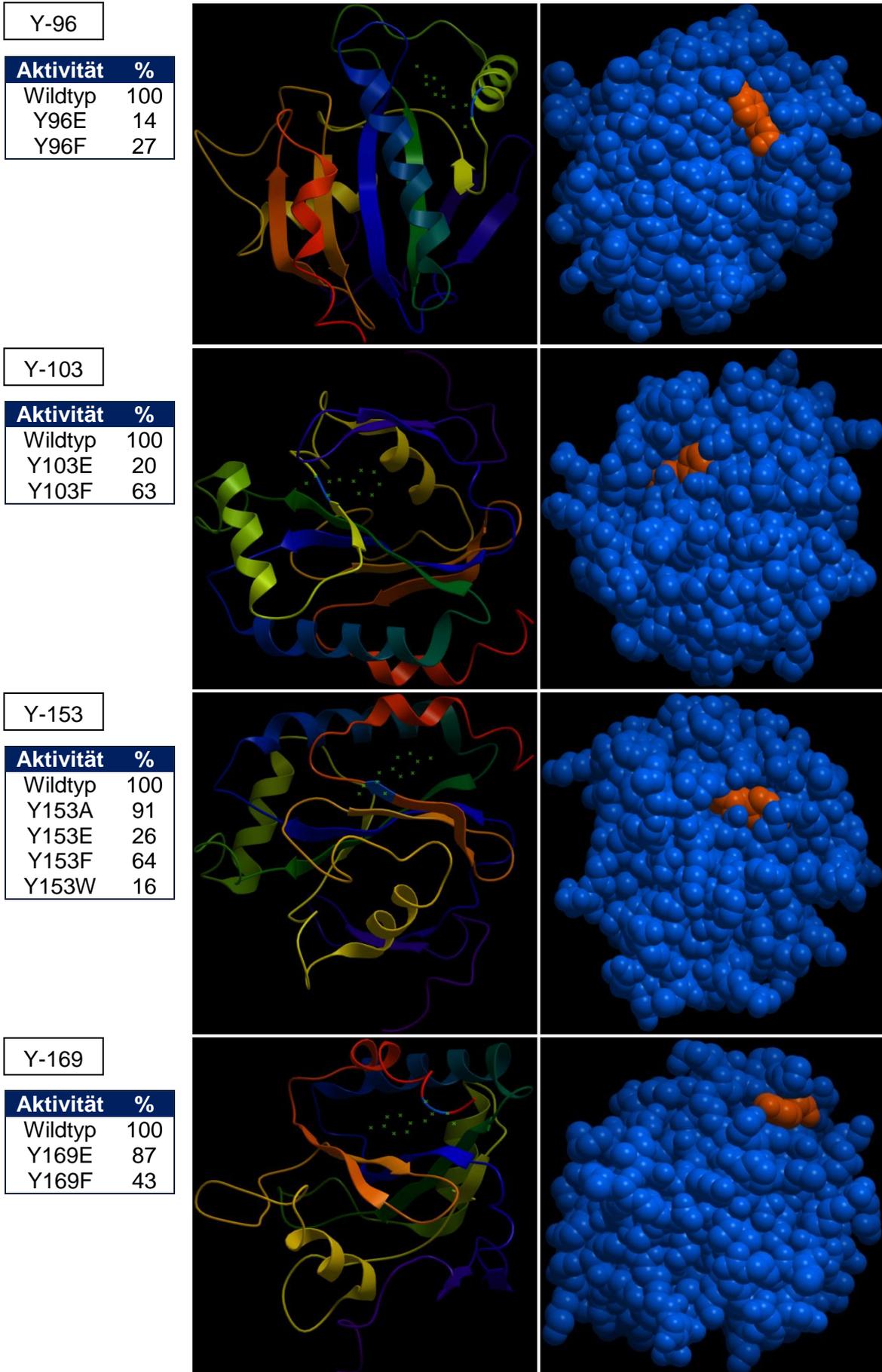


Abbildung 35b: Darstellung der ind. Tyrosine (orange) gemäß Kristallstruktur.

persönliche Mitteilung). Dies gründete womöglich auf der deutlich eingeschränkten Enzymaktivität selbst oder deren entsprechender Autoinaktivierung. Allerdings sollte ergänzend darauf hingewiesen werden, dass quantitativ bereits äußerst geringe Enzymkonzentrationen der Gpx4 zum Überleben ausreichen (Mannes et al. 2011). Nachdem die murine Gpx4 und humane GPX4 hochkonservierte Sequenzabschnitte aufweisen (94% identische, 98% konservierte), sollen demzufolge zunächst theoretische Überlegungen anhand der Kristallstrukturanalyse menschlicher GPX4 diskutiert werden (Scheerer et al. 2007). Röntgenkristallographisch präsentiert die GPX4 eine typische Thioredoxinstruktur, bestehend aus vier peripheren α -Helices sowie sieben β -Strängen, deren zentrales Quintett zu einem β -Faltblatt orientiert ist (Abbildung 35). Eine genaue Betrachtung der GPX4 ergibt, dass Y-32 kaum zugänglich für eine mögliche Phosphorylierung zu sein scheint. Nachdem die Mutation Y32E gegenüber ihrer Phenylalaninkontrolle durch eine erhöhte Aktivität gekennzeichnet ist, sollte die Relevanz einer möglichen Phosphorylierung experimentell dennoch weiter untersucht werden. Da Y-53 als Teil einer α -Helix tief in der Proteinstruktur verborgen liegt, bedürfe es zunächst einer regionalen Konformationsänderung, ehe eine posttranslationale Modifikation dieses Restes möglich wäre. Hierbei hatten die entsprechenden Aminosäuremutationen bezüglich der Enzymaktivität denkbar strukturellen Einfluss, nachdem jedwede Substitution deutliche Aktivitätseinbußen zur Folge hatte. Andererseits liegt Y-63 exponiert auf der Proteinoberfläche und wäre hinsichtlich einer posttranslationalen Modifikation gut zugänglich. Außerdem könnte eine mögliche Phosphorylierung dieses Restes eine wesentliche Bedeutung bezüglich ihrer Gpx4-spezifischen Aktivität zukommen, sowie ursächlich für die initial reduzierte Expression sein (siehe unten). Y-96 liegt in einem Loop und grenzt an eine α -Helix. Für jene Position ist eine potentielle Phosphorylierung mitunter postuliert worden (Schuckelt et al., 1991), allerdings ließ sich diese These durch massenspektrometrische Untersuchungen nicht erhärten (Brigelius-Flohe et al. 1994). Außerdem beeinträchtigt jeglicher Aminosäureaustausch dieser Position die Aktivität der Gpx4 deutlich und argumentiert eher für eine strukturelle Bedeutsamkeit. Y-103 liegt neben einer β -Faltblattstruktur, deren humanes Homolog bereits ein Phenylalanin aufweist. Infolgedessen scheint dem Tyrosin dieser Position keine konservierte Bedeutung zuzukommen, wenngleich die murine Gpx4 zumindest *in silico* ein Phosphorylierungsmotiv aufweist (Amanchy et al. 2007). Die Y/E-Mutation von Y-153 zeigte einen starken Abfall hinsichtlich der Gpx4-Aktivität, wohingegen die Y153F-Variante annähernde WT-Aktivität aufwies. Glutamat tendiert eher zur Bildung α -helikaler Strukturen und dürfte den korrespondierenden β -Strang in seiner Struktur zwar beeinträchtigen, allerdings trifft jenes auch für die zugehörige Alaninkontrolle zu, welche eine normale Aktivität aufwies. Die Position Y-169 liegt weit abseits vom aktiven Zentrum, wobei die entsprechenden Y/E- sowie Y/F-Mutationen keinen wesentlichen Einfluss bezüglich der

Gpx4-Aktivität hatten, so dass eine putative Phosphorylierung vermutlich nur marginale Effekte erzielen dürfte.

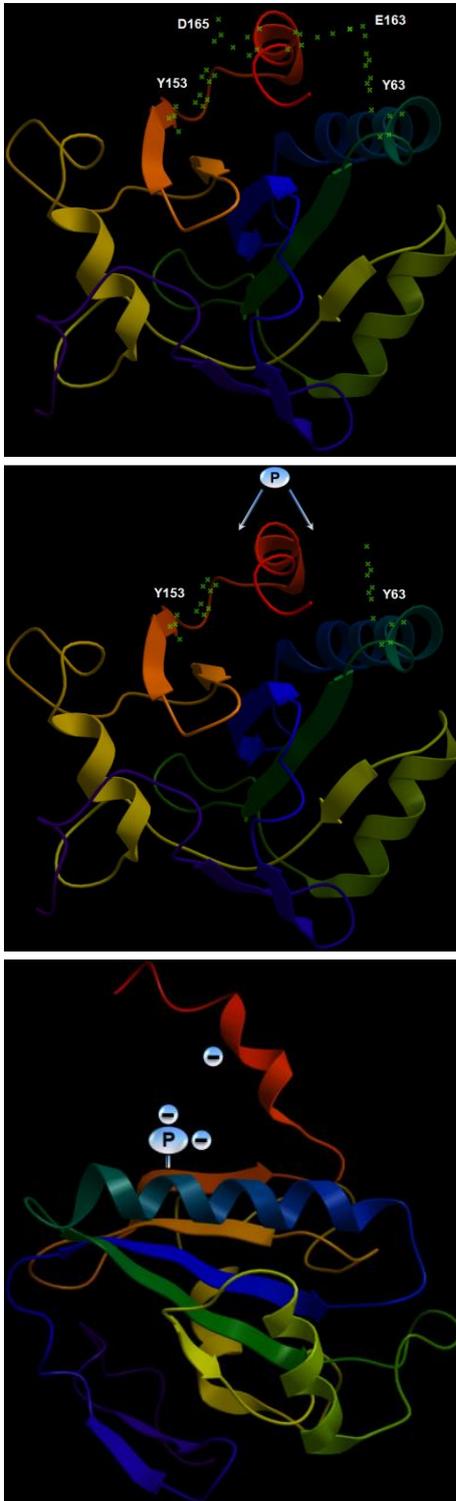


Abbildung 36: Illustration der C-terminalen Struktur der Gpx4. Sowohl Y-63 als auch Y-153 stehen negativ geladene Aminosäuren gegenüber (D ≙ Aspartat, E ≙ Glutamat). Eine Phosphorylierung könnte die Helix entsprechend auslenken.

Im Rahmen eines Stressexperiments wurden die einzelnen Zelllinien mit steigenden Konzentrationen an tBOOH, einem lipophilen Oxidationsmittel, versetzt und deren Zellzahl nach 72 Std. bestimmt. Trotz offenkundiger Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivität, erwiesen sich alle Varianten als vergleichbar stressresistent. Obwohl bereits verschwindend geringe Mengen an funktioneller Gpx4 für das Zellüberleben ausreichen (Mannes et al. 2011), ist hierbei nicht auszuschließen, dass weitere Enzyme des zellulären Redoxnetzwerks das Funktionsdefizit der Gpx4-Varianten kompensieren. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch für Cholesterolhydroperoxid erzielen, deren Reduktion vornehmlich auf die Gpx4 zurückzuführen ist (Imai and Nakagawa 2003), wengleich der Metabolismus von Phospholipidhydroperoxiden ebenso für Peroxiredoxine aufgezeigt werden konnte (Trujillo et al. 2007). Folglich scheinen Kompensationsmechanismen zwar zu greifen, wobei das zelluläre Überleben unter Stressbedingungen jedoch vermutlich durch die *Gpx4*-Überexpression, trotz reduzierter Aktivität, ermöglicht wird.

Des Weiteren wurde das Proliferationsverhalten sowie Koloniebildungspotential der einzelnen Enzymvarianten mittels *Colony Formation Assay* untersucht, wobei sich Unterschiede vornehmlich unter der Zugabe von BSO aufzeigen ließen. Dieses hemmt die γ -GCS und demzufolge das ratenlimitierende Enzyme der *de novo* Glutathionbiosynthese. Durch die hiermit induzierten Mangelzustände konnten deutliche Unterschiede der einzelnen Gpx4-Varianten demaskiert werden. Unter allen Mutanten reagierte die Variante Y153E äußerst

empfindlich auf einen, durch BSO hervorgerufenen, Glutathionmangel. Die Y153E-exprimierenden Zellen starben bei bereits 1 μM BSO nahezu vollständig ab, obgleich diese Variante im Vergleich nicht die geringste Aktivität aufwies. Interessanterweise konnten die, durch den Glutathionmangel induzierten, letalen Auswirkungen nicht durch eine exogene Glutathionsupplementation aufgehoben werden. Dies weist darauf hin, dass die Y153E-Variante vermutlich kein GSH als Reduktionsmittel mehr akzeptieren kann. Des Weiteren ließen sich für die Y153E-Variante toxische Effekte durch die Zugabe von Glutathion aufzeigen, ein in der Literatur bislang noch nicht beschriebenes Phänomen.

Eine genaue Betrachtung der 3D-Struktur des C-Terminus der GPX4, bezüglich Y-153 & Y-63, ergab, dass diesen Resten die negativ geladenen Aminosäuren Aspartat (D-165) sowie Glutamat (E-163) gegenüberliegen (Abbildung 36). Eine entsprechende Phosphorylierung von Y153 und/oder Y63 würde folglich zum Einbringen zusätzlicher negativer Ladungen führen, was in einer vertikalen Deviation der C-terminal gelegenen Helix aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung resultieren könnte. Die Primärstruktur der angrenzenden Windung beinhaltet die Abfolge Glycin – Prolin. Obwohl die unpolare Aminosäure Prolin durch ihre zyklische Struktur natürliche Rigidität aufweist, ließe die hohe Flexibilität des Glycins eine derartige hypothetische Krümmung zu (Bajaj et al. 2007; Yan and Sun 1997).

Interessanterweise konnte die porcine Gpx4 bereits *in vitro* phosphoryliert und entsprechend mittels α -Phosphotyrosinantikörper detektiert werden (Brigelius-Flohe et al. 1994). Die Primärstruktur des phosphorylierten Proteinabschnitts ließ sich hierbei jedoch nicht identifizieren. Ebenso konnten phosphorylierte Proteine nach seminaler Kapazitation in Hamstern nachgewiesen werden (Nagdas et al. 2005). Hiermit wird ein Reifungsprozess der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt bezeichnet, welcher ein essentieller Vorgang im Rahmen der Reproduktion ist (Wassarman 1999). Sowohl die proteomische als auch massenspektrometrische Analyse identifizierte mitunter drei Peptidfragmente, welche in ihrer Aminosäureabfolge mit den entsprechenden Abschnitten der Gpx4 übereinstimmten, ohne aber letztendlich beweisend für die Gpx4 gewesen zu sein (Abbildung 37). Darunter befanden sich mitunter diejenigen Fragmente, welche die Positionen Y-63 und Y-153 beinhalten. Aufgrund ihrer Exposition könnten diese entsprechend phosphoryliert werden, wobei die Motive *in silico* mit einer Modifikation durchaus vereinbar wären (Amanchy et al. 2007). Die Tyrosinkinase Src ist ein zytosolisches Enzym, welches, analog der Gpx4, an die Zellmembran assoziieren kann. Jene phosphorylierten Peptide konnten vornehmlich im seminalen Mittelstück und Flagellum nachgewiesen werden. In eben diesen Kompartimenten der Spermatozoen wird die Gpx4 stark exprimiert (~ 50% der Kapselproteine) und ist

außerdem essenzieller Bestandteil der männlichen Fertilität, wie Knockout-Studien der mitochondrialen Gpx4 aufzeigten (Schneider et al. 2009). Während der Spermatisierung wird die intrazelluläre Glutathionkonzentration bei Eintritt in die Cauda epididymidis bis auf weniger als ein Viertel reduziert (Shalgi et al. 1989). Dadurch führt die Gpx4, aufgrund ihrer Thiolperoxidase-Aktivität, Disulfide bzw. Selenylsulfide über ihr Selenocystein in Sulfhydrylgruppen ein, in diesem Szenario in mitochondriale Kapselproteine. Im seminalen Mittelstück initiiert die Gpx4 beispielsweise die Polymerisation des *sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein* (SMCP) (Maiorino et al. 2005), wobei die Gpx4 ihre katalytische Aktivität unter Ausbildung kovalenter Bindungen verliert (Mauri et al. 2003). Eine mögliche Phosphorylierung an Position 153 (\cong Y153) der Gpx4 könnte insofern ausschlaggebend sein, ob Thiole in Proteinen oder GSH als Reduktionsmittel verwendet werden, was im Folgenden genauer diskutiert werden soll.

	Y32	Y53	Y63	Y96
Mus musculus	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDIDGHMVCLDKYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Rattus nor.	MCASRDDWRCARSMHEFAAKDIDGHMVCLDKYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Sus scrofa	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDIDGHMVNLDKYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Bos taurus	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDIDGRMVNLDKYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Homo sapiens	MCASRDDWRCARSMHEFSAKDIDGHMVNLDKYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Gallus gallus	MCAQADEWRSATSIYDFHARDIDGRDVSLEQYRGVCIIVTNVASQUGK	TDVNYTQLVDLHAR	YAECCGLR	ILAFPCNQFGRQEPGSN--QEIKEFAAG-YN 97
Dro. melano.	MSAN-GDYKNAASIEYFTVKDTHGNDVLSLEKYKGVVIVNVIASCKGLTKNNYEKLTDLKEKYGERGLVILNFPNCQFGSQMPPEADGEAMVCHLRDS-KA 98			
Sac. cerev.	-----MSEFYKLAIPVDKKGQPFPPFDQLKGVVLIIVNVASKCGPTP-QYKELEALYKRYKDEGFTIIIGFPCNQFGHQEPGSD--EIIAQFCQLNYG 87			
	Y103	Y153	Y169	
Mus musculus	VKFDMSKICVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEFQVIEKDLPCYL----			170
Rattus nor.	VRFDMSKICVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEFQVIEKDLPCYL----			170
Sus scrofa	VKFDMSKICVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEFQVIEKDLPCYL----			170
Bos taurus	VKFDMSKICVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEFQVIEKDLPCYL----			170
Homo sapiens	VKFDMSKICVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEFQVIEKDLPCYL----			170
Gallus gallus	VKFDMSKIEVNGDDAHLPLWKMVKVQPKGRGMLGN-AIKWNFTKFLINREGQVVKRYSPMEDPYVIEKDLPCYL----			170
Dro melano.	DIGEVFAKVDVNGDAAAPLYKYLKAKQTG--TLGS-GIKWNFTKFLVKNKEGVPINRYAPTTDPMDIAKDIKLL----			169
Sac cerev.	VTFFIMKKIDVNGNEDPVYKFLKSKQKSG--MLGRGKIKWNFEKFLVDKKGKVVYRYSSTLTKPSSLSSETIEELLKEVE 163			

Abbildung 37: Überblick über die identifizierten Proteinabschnitte in kapazitierten Spermatisiden. Die massenspektrometrisch identifizierten, phosphorylierten Peptide ließen sich bei der Analyse kapazitierten Spermatisiden nachweisen und sind farblich hervorgehoben: Y53 (gelb), Y63 (türkis), Y153 (grün). Sie stimmen in ihrer Aminosäureabfolge mit den entsprechenden Sequenzabschnitten der Gpx4 überein, ohne jedoch letztendlich beweisend für die Gpx4 gewesen zu sein (Nagdas et al. 2005).

Es ließen sich ausschließlich für die Y153E-Variante konzentrationsabhängige, toxische Effekte durch GSH-Supplementation detektieren. Solche Effekte konnten hingegen nicht für die thiolhaltigen Antioxidantien NAc, DTT sowie β -ME detektiert werden. Hierdurch kann geschlussfolgert werden, dass diese Mutante Schwierigkeiten mit der Verwertung von GSH hat, was in der Zelle womöglich reduktiven Stress zur Folge hat. Eine ausgeprägte Verschiebung des Quotienten GSH/GSSG zugunsten des reduzierten Glutathions kann mitunter eine inkorrekte zelluläre Proteinfaltung einschließlich Aggregation, sowie die Bildung mitochondrialer, reaktiver Sauerstoffspezies hervorrufen (Rajasekaran et al. 2007; Zhang et al. 2012). Anhand dieser Zusammenhänge kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es sich bei Gpx4 um einen Sensor für intrazelluläres, reduziertes GSH handelt, welcher über das Überleben oder Absterben der Zellen entscheidet.

Interessanterweise führt eine Behandlung von Hepatozyten der Ratte mit Lithium zu oxidativem Stress sowie reduzierter Zellproliferation. Hierbei reduziert Lithium die

intrazellulären Glutathionkonzentrationen, woraufhin die Aktivität antioxidativer Enzyme eingeschränkt sowie die Generierung von Lipidhydroperoxiden induziert wird (Malhotra and Dhawan 2008). Sowohl eine vorzeitige Depletion (1-Bromoheptan) als auch simultane Zugabe von Glutathion potenziert die Produktion intrazellulärer ROS und induziert infolgedessen das Absterben ausschließlich derjenigen Hepatozyten, welchen 2 mM Lithium zugesetzt wurde (Eskandari et al. 2012). Diese toxischen Effekte ähneln der Interaktion von GSH mit Metallionen, wobei Glutathion intrazelluläre Kationen binden kann (Ciriolo et al. 1990; Pourahmad and O'Brien 2000). Obwohl dissoziiertes GSH in ausschließlich niedriger Konzentration intrazellulär vorherrscht, könnten die deprotonierten Thiolgruppen des GSH hierbei den Redoxmetabolismus der Metallionen beeinflussen, woraufhin der Transfer von Elektronen auf molekularen Sauerstoff und insofern die Entstehung von Superoxidanionen begünstigt wird (Eskandari et al. 2012). Zur Aufrechterhaltung des *Switch* zwischen reduzierenden oder oxidierenden Effekten bedürfte es nur minimaler Konzentrationen an Kationen, solange nur genügend Elektronendonatoren (Thiole) sowie Akzeptoren (molekularer Sauerstoff) zur Verfügung stünden (Pompella et al. 2003).

Weiterhin wurde in Hefen, die den spezifischen GSH/GSSG-Transporter (Hgt1) exprimieren, gezeigt, dass diese Zellen in ihrem Wachstum stark eingeschränkt waren, sobald dem Kulturmedium Glutathion in Konzentrationen über 50 μ M zugesetzt wurde (Kumar et al. 2011). In diesem Szenario sind die letalen Auswirkungen jedoch nicht auf die exzessive Produktion von ROS zurückzuführen, sondern möglicherweise auf eine Eisensequestration durch Glutathion, woraufhin essenzielle Enzyme mit Fe-S-Cluster direkt affiziert werden (Kumar et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Toxizität der GSH-Supplementation in den Y153 exprimierenden Zellen durch diverse Antioxidantien, wie beispielsweise β -Mercaptoethanol und α -Tocopherol, stark abgemildert werden. Interessanterweise kann α -Tocopherol die Zellen sowohl vor den letalen Konsequenzen der Deletion endogener Gpx4 (Seiler et al. 2008) als auch vor denjenigen der Glutathionsupplementation schützen. Da α -Tocopherol ein hydrophobes Antioxidans darstellt, suggeriert die Kompensation des exogenen zugeführten Glutathions die Entstehung lipophiler ROS als fassbares Korrelat. Die simultane Zugabe von β -ME und GSH reduziert außerdem die toxischen Effekte von GSH, da durch β -ME Cysteine in die Zellen transportiert werden, welche mit der Aufnahme von GSH konkurrieren und infolgedessen vor den toxischen Effekten des GSH schützen könnten.

Die Ferroptose wird in onkogenen Zelllinien durch Erastin induziert, welches die Cystinaufnahme durch Inhibition des System Xc⁻ vermindert und mechanistisch insofern dem

BSO ähnelt. Interessanterweise konnten die Inhibitoren der Nekroptose sowie Ferroptose die toxischen Effekte der Glutathions aufheben. In beiden Signalwegen werden ebenfalls erhöhte Konzentrationen an Lipidhydroperoxiden für die Exekution des nicht-apoptotischen Zelltods verantwortlich gemacht (Dixon et al. 2012; Galluzzi et al. 2011). Nachdem komplexe Phospholipidhydroperoxide vornehmlich durch die Gpx4 reduziert werden (Roveri et al. 1994; Thomas et al. 1990), könnte eine potentielle Phosphorylierung der Gpx4 die Generierung lipophiler ROS verstärken und die entsprechende Zelltod-Signalkaskade begünstigen.

7. Ausblick

Unter den Glutathionperoxidasen repräsentiert die zytosolische Gpx4 die einzig lebensnotwendige Isoform, wobei bereits geringe Mengen funktionellen Enzyms ausreichen, um das Überleben von Zellen mit endogenem *Gpx4*-Knockout zu sichern. Um folglich die Auswirkung möglicher Phosphorylierungszustände als posttranslationale Modifikation der Gpx4 zu untersuchen, wurde eine Reihe von Mutanten der Gpx4 generiert und in immortalisierten Mausembryofibroblasten unter Deletion des endogenen Enzyms zur Expression gebracht. Da es sich hierbei um einen Aminosäureaustausch handelt, der sich stereochemisch von einer tatsächlichen Phosphorylierung unterscheidet, ist der Nachweis einer posttranslational modifizierten Gpx4 mittels neu zu etablierender, phosphospezifischer Antikörper gegen die entsprechenden Epitope der nächste wichtige Schritt.

Da die einzelnen Enzymvarianten konsekutiv durch den lentiviralen Vektor überexprimiert wurden, ist eine Aussage bezüglich der entsprechenden Funktion unter physiologischen Expressionsbedingungen noch nicht möglich. Infolgedessen sollten die interessanten Mutanten (e. g. Y153E) mithilfe regulierbarer Expressionssysteme induzierbar exprimiert werden (beispielsweise Tet-On), wodurch mögliche Unterschiede sichtbar gemacht werden können. Obwohl für die Mutanten keine unterschiedliche Sensitivität bezüglich exogen zugegebener Hydroperoxide detektiert werden konnten, sollten die ROS-Konzentrationen sowohl basal als auch nach GSH-Supplementation in den jeweiligen Zelllinien als nächstes bestimmt werden. Ergänzend ist die Messung der tatsächlichen, intrazellulären Glutathionkonzentrationen für die verschiedenen Mutanten ein weiterer wichtiger Schritt, zumal der Zusatz von GSH in Y153E toxische Effekte aufwies.

Weiterhin ist geplant, die strukturellen Auswirkungen interessanter Mutationen (v. a. Y153E und Y153F) anhand von NMR-Untersuchungen von heterolog exprimierten Gpx4-Varianten zu untersuchen.

Um die Relevanz einer möglichen Phosphorylierung *in vivo* studieren zu können, sollten zudem zwei transgene Mauslinien beispielsweise mittels TALEN-Technologie generiert werden, welche die beiden Mutationen Y153E und Y153F abbilden. Einerseits könnte die selektive Beeinträchtigung dieser Varianten das Auftreten degenerativer Krankheiten oder aber die Tumorprogression begünstigen (Y153E). Andererseits könnte das Ausbleiben einer möglichen Phosphorylierung (Y153F) die Fertilität männlicher Tiere erheblich beeinträchtigen.

8. Literaturverzeichnis

- Amanchy R, Periaswamy B, Mathivanan S, Reddy R, Tattikota SG, and Pandey A. 2007. A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nature biotechnology* 25(3):285-286.
- Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH et al. . 2009. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *The EMBO journal* 28(22):3623-3632.
- Antunes F, Han D, and Cadenas E. 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free radical biology & medicine* 33(9):1260-1267.
- Arner ES, and Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* 267(20):6102-6109.
- Aumann KD, Bedorf N, Brigelius-Flohe R, Schomburg D, and Flohe L. 1997. Glutathione peroxidase revisited--simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomedical and environmental sciences : BES* 10(2-3):136-155.
- Bae JH, Lew ED, Yuzawa S, Tome F, Lax I, and Schlessinger J. 2009. The selectivity of receptor tyrosine kinase signaling is controlled by a secondary SH2 domain binding site. *Cell* 138(3):514-524.
- Bajaj K, Madhusudhan MS, Adkar BV, Chakrabarti P, Ramakrishnan C, Sali A, and Varadarajan R. 2007. Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline mutations on protein stability. *PLoS Comput Biol* 3(12):e241.
- Balhorn R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology* 8(9):227.
- Bannai S. 1986. Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 261(5):2256-2263.
- Berry MJ. 2005. Insights into the hierarchy of selenium incorporation. *Nature genetics* 37(11):1162-1163.
- Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, and Holmgren A. 1994. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *The Journal of biological chemistry* 269(47):29382-29384.
- Borchert A, Wang CC, Ufer C, Schiebel H, Savaskan NE, and Kuhn H. 2006. The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *The Journal of biological chemistry* 281(28):19655-19664.
- Braun RE. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* 28(1):10-12.
- Brigelius-Flohe R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine* 27(9-10):951-965.
- Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F et al. . 1994. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *The Journal of biological chemistry* 269(10):7342-7348.

- Brigelius-Flohe R, and Maiorino M. 2013. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta* 1830(5):3289-3303.
- Burk RF, Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, and Yin D. 2011. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 301(1):G32-38.
- Cao C, Leng Y, Huang W, Liu X, and Kufe D. 2003. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 278(41):39609-39614.
- Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, and Devarajan P. 2003. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 76(1):50-54.
- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, and Lenardo MJ. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288(5475):2351-2354.
- Chan FK, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, Orenstein J, Moss B, and Lenardo MJ. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *The Journal of biological chemistry* 278(51):51613-51621.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, and Schumacker PT. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(20):11715-11720.
- Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, and Schumacker PT. 2000. Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene* 19(34):3840-3848.
- Chavatte L, Brown BA, and Driscoll DM. 2005. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology* 12(5):408-416.
- Cheng WH, Ho YS, Ross DA, Valentine BA, Combs GF, and Lei XG. 1997. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *The Journal of nutrition* 127(8):1445-1450.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF, Jr., and Lei XG. 1998. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *The Journal of nutrition* 128(7):1070-1076.
- Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, and Chan FK. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137(6):1112-1123.
- Chu FF, Doroshov JH, and Esworthy RS. 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of biological chemistry* 268(4):2571-2576.

- Ciriolo MR, Desideri A, Paci M, and Rotilio G. 1990. Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I).glutathione complex. *The Journal of biological chemistry* 265(19):11030-11034.
- Collet JF, and Messens J. 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & redox signaling* 13(8):1205-1216.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, and Bornkamm GW. 2005. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Molecular and cellular biology* 25(17):7637-7644.
- Conrad M, Sandin A, Forster H, Seiler A, Frijhoff J, Dagnell M, Bornkamm GW, Radmark O, Hooft van Huijsduijnen R, Aspenstrom P et al. . 2010. 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(36):15774-15779.
- Conrad M, Schick J, and Angeli JP. 2013. Glutathione and thioredoxin dependent systems in neurodegenerative disease: what can be learned from reverse genetics in mice. *Neurochemistry international* 62(5):738-749.
- Conrad M, Schneider M, Seiler A, and Bornkamm GW. 2007. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological chemistry* 388(10):1019-1025.
- Conrad M, and Schweizer U. 2010. Unveiling the molecular mechanisms behind selenium-related diseases through knockout mouse studies. *Antioxidants & redox signaling* 12(7):851-865.
- D'Autreaux B, and Toledano MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8(10):813-824.
- Daemen MA, van't Veer C, Wolfs TG, and Buurman WA. 1999. Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. *Journal of immunology* 162(9):5506-5510.
- Degterev A, and Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9(5):378-390.
- Denu JM, and Dixon JE. 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Current opinion in chemical biology* 2(5):633-641.
- DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, Bosinger SE, Persad D, Kelvin AA, Coombs JC, Wang H, Zhong R, Cameron MJ et al. . 2003. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Seminars in immunology* 15(1):33-48.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS et al. . 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149(5):1060-1072.
- Edelstein CL, Ling H, and Schrier RW. 1997. The nature of renal cell injury. *Kidney international* 51(5):1341-1351.

- Eskandari MR, Fard JK, Hosseini MJ, and Pourahmad J. 2012. Glutathione mediated reductive activation and mitochondrial dysfunction play key roles in lithium induced oxidative stress and cytotoxicity in liver. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 25(5):863-873.
- Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, and Chu FF. 2001. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 281(3):G848-855.
- Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, and Chu FF. 2005. Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *The Journal of nutrition* 135(4):740-745.
- Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, Castanares M, and Wu M. 2007. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular signalling* 19(10):2056-2067.
- Finkel T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology* 10(2):248-253.
- Finkel T, and Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239-247.
- Fleck C, Haubold D, Hillmann T, and Braunlich H. 1997. Influence of vitamin E treatment on glutathione system after renal ischemia in immature and adult rats. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 49(1-2):81-86.
- Flohe L, Gunzler WA, and Schock HH. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters* 32(1):132-134.
- Flohe L, Toppo S, Cozza G, and Ursini F. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling* 15(3):763-780.
- Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, and Brigelius-Flohe R. 2001. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free radical research* 35(6):655-663.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, and van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* 1(5):2315-2319.
- Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, and Lei XG. 1999. Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 27(5-6):605-611.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, and Kroemer G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation* 14(7):1237-1243.
- Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, Madeo F, and Kroemer G. 2011. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *International review of cell and molecular biology* 289:1-35.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S et al. . 2012. Molecular definitions of cell death

- subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19(1):107-120.
- Gautrey H, Nicol F, Sneddon AA, Hall J, and Hesketh J. 2011. A T/C polymorphism in the GPX4 3'UTR affects the selenoprotein expression pattern and cell viability in transfected Caco-2 cells. *Biochimica et biophysica acta* 1810(6):584-591.
- Giordano FJ. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of clinical investigation* 115(3):500-508.
- Gromer S, Johansson L, Bauer H, Arscott LD, Rauch S, Ballou DP, Williams CH, Jr., Schirmer RH, and Arner ES. 2003. Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(22):12618-12623.
- Gronenborn AM, Clore GM, Louis JM, and Wingfield PT. 1999. Is human thioredoxin monomeric or dimeric? *Protein science : a publication of the Protein Society* 8(2):426-429.
- Halloran PF, and Hunsicker LG. 2001. Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 1(2):115-120.
- Haugen E, and Nath KA. 1999. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood purification* 17(2-3):58-65.
- Henchcliffe C, and Beal MF. 2008. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice Neurology* 4(11):600-609.
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, and Drevet JR. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal* 274(9):2163-2180.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, and Funk CD. 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *The Journal of biological chemistry* 272(26):16644-16651.
- Hoffmann PR, Hoge SC, Li PA, Hoffmann FW, Hashimoto AC, and Berry MJ. 2007. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. *Nucleic acids research* 35(12):3963-3973.
- Hordijk PL. 2006. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circulation research* 98(4):453-462.
- Imai H, and Nakagawa Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free radical biology & medicine* 34(2):145-169.
- Ivanov I, Saam J, Kuhn H, and Holzhutter HG. 2005. Dual role of oxygen during lipoxygenase reactions. *The FEBS journal* 272(10):2523-2535.
- Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, and Dong Z. 2012. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney international* 82(12):1271-1283.

- Jin G, Arai K, Murata Y, Wang S, Stins MF, Lo EH, and van Leyen K. 2008. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 39(9):2538-2543.
- Johnson LN. 2009. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society transactions* 37(Pt 4):627-641.
- Johnson LN, and Lewis RJ. 2001. Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews* 101(8):2209-2242.
- Koken T, Serteser M, Kahraman A, Akbulut G, and Dilek ON. 2004. Which is more effective in the prevention of renal ischemia-reperfusion-induced oxidative injury in the early period in mice: interleukin (IL)-10 or anti-IL-12? *Clinical biochemistry* 37(1):50-55.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR et al. . 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16(1):3-11.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, and Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300(5624):1439-1443.
- Kumar C, Igararia A, D'Autreaux B, Planson AG, Junot C, Godat E, Bachhawat AK, Delaunay-Moisan A, and Toledano MB. 2011. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *The EMBO journal* 30(10):2044-2056.
- Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews Immunology* 4(3):181-189.
- Latchoumycandane C, Marathe GK, Zhang R, and McIntyre TM. 2012. Oxidatively truncated phospholipids are required agents of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 287(21):17693-17705.
- Lebranchu Y, Halimi JM, Bock A, Chapman J, Dussol B, Fritsche L, Kliem V, Oppenheimer F, Pohanka E, Salvadori M et al. . 2005. Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome-results from MOST, A Multinational Observational Study. *Transplantation proceedings* 37(1):345-347.
- Lemmon MA, and Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7):1117-1134.
- Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, and Ran Q. 2009. Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *The Journal of biological chemistry* 284(45):30836-30844.
- Liu S, Hartleben B, Kretz O, Wiech T, Igarashi P, Mizushima N, Walz G, and Huber TB. 2012. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury. *Autophagy* 8(5):826-837.
- Loscalzo J. 2008. Membrane redox state and apoptosis: death by peroxide. *Cell metabolism* 8(3):182-183.

- Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Xie B, and Campochiaro PA. 2009. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxidants & redox signaling* 11(4):715-724.
- Lubos E, Loscalzo J, and Handy DE. 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 15(7):1957-1997.
- Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohe R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, and Flohe L. 1995. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 376(11):651-660.
- Maiorino M, Roveri A, Benazzi L, Bosello V, Mauri P, Toppo S, Tosatto SC, and Ursini F. 2005. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *The Journal of biological chemistry* 280(46):38395-38402.
- Malhotra A, and Dhawan DK. 2008. Zinc improves antioxidative enzymes in red blood cells and hematology in lithium-treated rats. *Nutrition research* 28(1):43-50.
- Mannes AM, Seiler A, Bosello V, Maiorino M, and Conrad M. 2011. Cysteine mutant of mammalian GPx4 rescues cell death induced by disruption of the wild-type selenoenzyme. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(7):2135-2144.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, and Margis-Pinheiro M. 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal* 275(15):3959-3970.
- Marinho HS, Antunes F, and Pinto RE. 1997. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free radical biology & medicine* 22(5):871-883.
- Martines AM, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JF, and Swinkels DW. 2013. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nature reviews Nephrology* 9(7):385-398.
- Mauri P, Benazzi L, Flohe L, Maiorino M, Pietta PG, Pilawa S, Roveri A, and Ursini F. 2003. Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biological chemistry* 384(4):575-588.
- Micheau O, and Tschoop J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2):181-190.
- Miller D, Brinkworth M, and Iles D. 2010. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? *DNA, histones, protamines and epigenetics. Reproduction* 139(2):287-301.
- Moore EC, Reichard P, and Thelander L. 1964. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides.V. Purification and Properties of Thioredoxin Reductase from *Escherichia Coli* B. *The Journal of biological chemistry* 239:3445-3452.
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, and Van Remmen H. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free radical biology & medicine* 43(4):477-503.

- Nagdas SK, Winfrey VP, and Olson GE. 2005. Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biology of reproduction* 72(1):164-171.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, and Finkel T. 2000. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and cellular biology* 20(19):7311-7318.
- Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, and Ruddock LW. 2011. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of molecular biology* 406(3):503-515.
- Nishi H, Hashimoto K, and Panchenko AR. 2011. Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* 19(12):1807-1815.
- Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H et al. . 2012. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PloS one* 7(6):e38565.
- Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, and Port FK. 2000. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney international* 57(1):307-313.
- Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, and Schmodder RL. 1997. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 63(7):968-974.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, and Mann M. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127(3):635-648.
- Olson GE, Whitin JC, Hill KE, Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, Deal J, Cohen HJ, and Burk RF. 2010. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 298(5):F1244-1253.
- Ostman A, Frijhoff J, Sandin A, and Bohmer FD. 2011. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry* 150(4):345-356.
- Paller MS, and Hedlund BE. 1994. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free radical biology & medicine* 17(6):597-603.
- Patel NS, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Di Paola R, Sautebin L, Britti D, and Thiemermann C. 2004. Reduction of renal ischemia-reperfusion injury in 5-lipoxygenase knockout mice and by the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. *Molecular pharmacology* 66(2):220-227.
- Patschan D, Patschan S, and Muller GA. 2012. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *Journal of transplantation* 2012:764154.
- Pecina P, Borisenko GG, Belikova NA, Tyurina YY, Pecinova A, Lee I, Samhan-Arias AK, Przyklenk K, Kagan VE, and Huttemann M. 2010. Phosphomimetic substitution of cytochrome C tyrosine 48 decreases respiration and binding to cardiolipin and abolishes ability to trigger downstream caspase activation. *Biochemistry* 49(31):6705-6714.

- Perez-Gonzalez JA, Vara J, and Jimenez A. 1985. The mechanism of resistance to puromycin and to the puromycin-precursor O-demethyl-puromycin in *Streptomyces alboniger*. *Journal of general microbiology* 131(11):2877-2883.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, and Remuzzi G. 2004. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364(9447):1814-1827.
- Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, and Behne D. 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(7):1236-1238.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, and Casini AF. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* 66(8):1499-1503.
- Pourahmad J, and O'Brien PJ. 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* 143(3):263-273.
- Poyton RO, Ball KA, and Castello PR. 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 20(7):332-340.
- Ptacek J, and Snyder M. 2006. Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends in genetics : TIG* 22(10):545-554.
- Rajasekaran NS, Connell P, Christians ES, Yan LJ, Taylor RP, Orosz A, Zhang XQ, Stevenson TJ, Peshock RM, Leopold JA et al. . 2007. Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell* 130(3):427-439.
- Reddy VN, Giblin FJ, Lin LR, Dang L, Unakar NJ, Musch DC, Boyle DL, Takemoto LJ, Ho YS, Knoernschild T et al. . 2001. Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 42(13):3247-3255.
- Rhee SG. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & molecular medicine* 31(2):53-59.
- Rhee SG, Chae HZ, and Kim K. 2005a. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine* 38(12):1543-1552.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, and Kim K. 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB life* 52(1-2):35-41.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, and Woo HA. 2005b. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current opinion in cell biology* 17(2):183-189.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, and Hoekstra WG. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179(4073):588-590.
- Roveri A, Maiorino M, Nisii C, and Ursini F. 1994. Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1208(2):211-221.

- Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, and Barford D. 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423(6941):769-773.
- Scheerer P, Borchert A, Krauss N, Wessner H, Gerth C, Hohne W, and Kuhn H. 2007. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry* 46(31):9041-9049.
- Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumuller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabe de Angelis M et al. . 2009. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(9):3233-3242.
- Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W et al. . 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism* 8(3):237-248.
- Sena LA, and Chandel NS. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell* 48(2):158-167.
- Sengupta A, Lichti UF, Carlson BA, Cataisson C, Ryscavage AO, Mikulec C, Conrad M, Fischer SM, Hatfield DL, and Yuspa SH. 2013. Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2. *The Journal of investigative dermatology* 133(7):1731-1741.
- Shalgi R, Seligman J, and Kosower NS. 1989. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biology of reproduction* 40(5):1037-1045.
- Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala SV, Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM, and Lieberman MW. 2000. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5101-5106.
- Shoskes DA, Xie Y, and Gonzalez-Cadavid NF. 1997. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 63(4):495-500.
- Siedlecki A, Irish W, and Brennan DC. 2011. Delayed graft function in the kidney transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11(11):2279-2296.
- Singh U, and Jialal I. 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP* 13(3):129-142.
- St Peter SD, Imber CJ, Jones DC, Fuggle SV, Watson CJ, Friend PJ, and Marshall SE. 2002. Genetic determinants of delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 74(6):809-813.
- Suppmann S, Persson BC, and Bock A. 1999. Dynamics and efficiency in vivo of UGA-directed selenocysteine insertion at the ribosome. *The EMBO journal* 18(8):2284-2293.

- Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, Tanaka H, Koike M, Shibata M, Uchiyama Y, Takahara S, and Imai E. 2008. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 368(1):100-106.
- Szabo C, Ischiropoulos H, and Radi R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* 6(8):662-680.
- Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, and Takahashi K. 2002. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *The Journal of biological chemistry* 277(43):41254-41258.
- Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, and Iwasaki A. 2009. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(8):2770-2775.
- Taylor JS, and Raes J. 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annual review of genetics* 38:615-643.
- ten Klooster JP, and Hordijk PL. 2007. Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99(1):1-12.
- Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M, Ursini F, and Girotti AW. 1990. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et biophysica acta* 1045(3):252-260.
- Toledano MB, Planson AG, and Delaunay-Moisan A. 2010. Reining in H₂O₂ for safe signaling. *Cell* 140(4):454-456.
- Tonks NK. 2005. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121(5):667-670.
- Toppo S, Vanin S, Bosello V, and Tosatto SC. 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & redox signaling* 10(9):1501-1514.
- Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohe L, Ursini F, and Maiorino M. 2008. The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants & redox signaling* 10(9):1515-1526.
- Tripp CS, Wolf SF, and Unanue ER. 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(8):3725-3729.
- Trujillo M, Ferrer-Sueta G, Thomson L, Flohe L, and Radi R. 2007. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Sub-cellular biochemistry* 44:83-113.
- Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, and Yanagi Y. 2012. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *The Journal of biological chemistry* 287(10):7675-7682.

- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, and Flohe L. 1999. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285(5432):1393-1396.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, and Gregolin C. 1982. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et biophysica acta* 710(2):197-211.
- Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S, Tojo T, Patrushev NA, and Alexander RW. 2005. cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT1 receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circulation research* 97(8):829-836.
- van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, and Lo EH. 2006. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 37(12):3014-3018.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, and Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology* 11(10):700-714.
- Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, and Vandenabeele P. 2008. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current molecular medicine* 8(3):207-220.
- Verrou C, Zhang Y, Zurn C, Schamel WW, and Reth M. 1999. Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer. *Biological chemistry* 380(12):1435-1438.
- Villette S, Kyle JA, Brown KM, Pickard K, Milne JS, Nicol F, Arthur JR, and Hesketh JE. 2002. A novel single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of human glutathione peroxidase 4 influences lipoxygenase metabolism. *Blood cells, molecules & diseases* 29(2):174-178.
- Wassarman PM. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96(2):175-183.
- Watanabe T, and Endo A. 1991. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutation research* 262(2):93-99.
- Wei PC, Hsieh YH, Su MI, Jiang X, Hsu PH, Lo WT, Weng JY, Jeng YM, Wang JM, Chen PL et al. . 2012. Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease. *Molecular cell* 48(5):747-759.
- Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, and Cohen HJ. 2002. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 283(1):F20-28.
- Wingler K, Bocher M, Flohe L, Kollmus H, and Brigelius-Flohe R. 1999. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 259(1-2):149-157.
- Winterbourn CC. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology* 4(5):278-286.

- Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L et al. . 2010. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(3):844-852.
- Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, and Rhee SG. 2010. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell* 140(4):517-528.
- Wortmann M, Schneider M, Pircher J, Hellfritsch J, Aichler M, Vegi N, Koelle P, Kuhlencordt P, Walch A, Pohl U et al. . 2013. Combined Deficiency in Glutathione Peroxidase 4 (Gpx4) and Vitamin E Causes Multi-Organ Thrombus Formation and Early Death in Mice. *Circulation research*.
- Xia Y. 2007. Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxidants & redox signaling* 9(10):1773-1778.
- Xu XM, Mix H, Carlson BA, Grabowski PJ, Gladyshev VN, Berry MJ, and Hatfield DL. 2005. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *The Journal of biological chemistry* 280(50):41568-41575.
- Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, Wolpaw AJ, Smukste I, Peltier JM, Boniface JJ et al. . 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447(7146):864-868.
- Yan BX, and Sun YQ. 1997. Glycine residues provide flexibility for enzyme active sites. *The Journal of biological chemistry* 272(6):3190-3194.
- Yang J, Groen A, Lemeer S, Jans A, Slijper M, Roe SM, den Hertog J, and Barford D. 2007. Reversible oxidation of the membrane distal domain of receptor PTPalpha is mediated by a cyclic sulfenamide. *Biochemistry* 46(3):709-719.
- Yang WS, and Stockwell BR. 2008. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chemistry & biology* 15(3):234-245.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, and Prolla TA. 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radical Biology and Medicine* 34(4):496-502.
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, and Lenardo M. 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(13):4952-4957.
- Zhang H, Limphong P, Pieper J, Liu Q, Rodesch CK, Christians E, and Benjamin IJ. 2012. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(4):1442-1451.
- Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, and Thompson CB. 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development* 18(11):1272-1282.

9. Zusammenfassung

Eine *Delayed Graft Function* beschreibt die Notwendigkeit mindestens einer Dialyse nach erfolgter Nierentransplantation und geht histopathologisch mit der Morphologie einer akuten Tubuluszellnekrose bei intakten Glomeruli einher. Eben jenen selektiven Phänotyp zeigt der konditionale Knockout der Glutathionperoxidase 4, einem zentralen, antioxidativen Enzym des Redoxmetabolismus. In der Familie der Glutathionperoxidasen (Gpx) vermag lediglich die Gpx4 komplexe Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren und schützt Biomembranen infolgedessen vor oxidativer Degradation. Ein Teil dieser Dissertation bestand in der Identifizierung möglicher genetischer Polymorphismus, welche die Ausbildung einer *Delayed Graft Function*, respektive das *Outcome* einer Nierentransplantation, beeinflussen könnten. In der gängigen Literatur konnte bereits ein vorgefundener Polymorphismus mit einer gesteigerten Leukotriensynthese als Produkt der 5-Lipoxygenase assoziiert werden. Diese entstehen aus Arachidonsäuren, deren Expression durch die Gpx4 reguliert wird. Allerdings konnte in dieser Pilotstudie kein Polymorphismus in der Zielgruppe identifiziert werden, welcher nicht auch in der Kontrollgruppe anzutreffen war. Folglich konnten genetische Polymorphismus der Gpx4 für das letztendlich (schlechte) *Outcome* der Zielgruppe ausgeschlossen werden. Inwiefern quantitative Unterschiede der GPX4 eine Rolle im Rahmen der Ischämie/Reperfusion spielen, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) stellen ein wichtiges Element der intrazellulären Signaltransduktion von Proliferationsreizen dar. Jene werden negativ durch Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) reguliert. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt die lokale Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die das aktive Zentrum der PTP oxidieren und entsprechend reversibel inaktivieren. Die aliphatischen Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETE) oxidieren gegenüber hydrophilen ROS das aktive Zentrum der PTP in tausendfach niedriger Konzentration. Die Reduktion der HPETE obliegt der Gpx4. Agierend an der Zellmembran wäre jene für eine regulatorische Partizipation prädestiniert. Ihrerseits müsste sie über ihre eigenen Tyrosinreste temporär inhibiert werden können. Der zweite wichtige Teil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung und Analyse der sieben hochkonservierten Tyrosinreste der Gpx4. Zur Simulierung permanenter Phosphorylierungszustände wurden Enzymvarianten generiert, die an der entsprechenden Position ein Glutamat, anstelle des Tyrosins, beinhalteten. Ebenso wurden unphosphorylierbare sowie stereochemische Kontrollen etabliert. Interessanterweise konnte ein Tyrosinrest identifiziert werden, welcher hochsensibel auf die selektive Depletion sowie Repletion von Glutathion (GSH) reagierte, wobei die korrespondierenden Kontrollen nicht beeinträchtigt waren. Die Position des Tyrosinrests liegt sowohl exponiert als auch unmittelbar gegenüber einer

Zusammenfassung

negativ geladenen Aminosäure. Folglich könnte eine mögliche Phosphorylierung in der elektrostatischen Abstoßung und konsekutiv in einer Konformationsänderung des Proteins resultieren. Auch ließ sich in der Literatur jenes Areal als phosphorylierbares Motiv bereits identifizieren. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze bedarf es noch der Bestätigung einer Phosphorylierung durch neu zu etablierende, phosphospezifische Antikörper.

Publikationen

Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurina VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, **Seibt T**, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Förster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O`Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M 2014. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol* 16(12):1180-1191.

10. Danksagung

Bildung ist etwas Wunderbares. Doch sollte man sich von Zeit zu Zeit daran erinnern, daß wirklich Wissenswertes nicht gelehrt werden kann. – Oscar Wilde

In diesem Sinne möchte ich mich ganz herzlich bei einer Vielzahl von Mitmenschen bedanken, die mit mir diese wunderbare Erfahrung geteilt, nein erst ermöglicht haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zu dem geworden, was sie heute ist.

Allen voran möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Marcus Conrad danken, der mir die Weiterführung dieser Dissertation erst ermöglichte und mich immer wieder motivierte, auch als das Projekt zu scheitern drohte.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Fischereider bedanken, der es schaffte, in mir die Begeisterung für diese Arbeit hochzuhalten! Auch sind ihm die Spenderproben zu verdanken, deren Analyse ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit gewesen war.

Im gleichen Atemzug möchte Dr. José Pedro Friedmann Angeli nennen, durch dessen Ideen und Expertise diese Arbeit ihr letztendliches Detail erlangt hat. Muito obrigado!

Weiterhin möchte ich Dr. Klaus Witter für seine Unterstützung bei der Sequenzierung der GPX4 herzlich danken, auch wenn es einen fast verzweifeln ließ!

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meinen Kollegen aus dem Labor bedanken, beginnend mit Heidi Förster und Olena Yefremova. Ferner möchte ich mich bei Irina Kliewer, Caroline Kuschidlo sowie Marc Heinrichmeyer ganz herzlich bedanken!

Ein ganz besonderer Gruß gebührt auch noch Cornelia Kuklik-Roos, selbst wenn die B-Zell-Experimente in diese Arbeit nicht miteingeflossen sind!

Den letzten Absatz möchte ich dafür verwenden meinen Eltern, Sieglinde und Friedrich Seibt zu danken, die mich unterstützen, seither ich denken kann. Danke, dass ihr bei mir seid!

Tobias Michael Seibt

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Relevanz posttranslationaler Modifikation der
Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) in der Signaltransduktion sowie
Identifizierung genetischer Polymorphismen der humanen
GPX4 zur präferenziellen Ausbildung einer
delayed graft function (DGF)“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, im Juli 2015

Tobias Michael Seibt