

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanistische und evolutionäre Aspekte der Glutathionperoxidase 4  
(Gpx4)

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Sophia Regina Roth

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Zusammenfassung.....	12
Abstract .....	14
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>15</b>
1.1 Selenoproteine .....	15
1.1.1 Definition und Vorkommen von Selenoproteinen.....	15
1.1.2 Biosynthese von Selenoproteinen .....	17
1.2 Die Familie der Glutathionperoxidasen.....	18
1.2.1 Definition und Katalysemechanismus .....	18
1.2.2 Verbreitung, Vorkommen und strukturelle Eigenschaften der Gpx-Isoformen .....	19
1.2.3 Evolution und Phylogenie der Gpx-Familie .....	20
1.3 Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) .....	23
1.3.1 Biologische Bedeutung der Gpx4 .....	23
1.3.2 Strukturelle Besonderheiten der Gpx4.....	24
1.3.3 Transkripte des <i>Gpx4</i> -Gens.....	25
1.3.4 Alternativer Katalysemechanismus der Gpx4 .....	26
1.4 Der Zebrafisch.....	27
1.4.1 Natürliches Vorkommen und biologische Charakteristika .....	27
1.4.2 Genom des Zebrafisches .....	28
1.5 Eukaryontische Zellkompartimente und Proteinsortierung .....	29
1.6 Ziele der Arbeit.....	32
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
2.1 Materialien.....	33
2.1.1 Chemikalien .....	33
2.1.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien .....	35
2.1.3 Enzyme und Kits.....	37
2.1.4 Plasmide.....	37
2.1.5 Marker und Färbelösungen .....	38
2.1.6 Bakterienstämme und Zelllinien .....	38
2.1.7 Geräte und Gebrauchsware .....	38

---

2.1.8 Computerprogramme .....	39
2.2 Datenbankrecherche zu evolutionären Aspekten der Gpx4 .....	40
2.2.1 Untersuchung zur Gpx4 in irdischen Lebensformen .....	40
2.2.2 Phylogentische Untersuchungen .....	41
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	42
2.3.1 Primerkonstruktion und Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.3.2 Klonierung und Transformation .....	43
2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA, Restriktionsverdau und Gensequenzierung .....	44
2.3.4 Orstgerichtete Mutagenese.....	45
2.3.5 Umklonierung in Zielvektoren.....	47
2.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	48
2.4 Proteinchemische Methoden.....	49
2.4.1 Proteinexpression im prokaryontischen System .....	49
2.4.1.1 Rekombinante Expression in <i>E. coli</i> BL 21(DE3) .....	49
2.4.1.2 Rekombinante Expression in Cys-auxotrophen <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	49
2.4.1.3 Proteinaufreinigung über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose .....	50
2.4.1.4 Entsalzung, Umpufferung und Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	51
2.4.1.5 Quantifizierung des Seleneinbaus mittels Atomabsorptionsspektroskopie .....	52
2.4.2 Eukaryontische Expression in COS7-Zellen und Fluoreszenzmikroskopie .....	52
2.4.3 Herstellung von Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PC-OOH).....	53
2.4.4 Photometrische Messung katalytischer Aktivitäten der Gpx4-Isoformen .....	54
2.4.4.1 Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Gpx4-Isoformen .....	55
2.4.4.2 Temperaturabhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen .....	55
2.4.4.3 pH-Abhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen.....	56
2.4.4.4 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen .....	56
2.4.4.5 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten .	57
2.4.5 Thermostabilität von Sec-Gpx4-Isoformen .....	57
2.5 Computergestützte Modellierungen und Vorhersagen .....	58
2.5.1 Vorhersagen möglicher SECIS-Elemente.....	58
2.5.2 Vorhersagen von Proteinsortierungssignalen .....	58
2.5.3 Dreidimensionale Struktursimulation von Proteinen.....	59
2.6 Statistische Auswertungsverfahren.....	59
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>60</b>
3.1 Evolutionäre Aspekte der Gpx4 .....	60
3.1.1 Die Gpx4 in irdischen Lebensformen .....	60

---

3.1.1.1 Gpx4 in verschiedenen Modellorganismen.....	61
3.1.1.2 Gpx4 in Viren.....	63
3.1.1.3 Gpx4 in Bakterien .....	64
3.1.1.4 Gpx4 in <i>Archaea</i> .....	67
3.1.1.5 Gpx4 in Pilzen.....	68
3.1.1.6 Gpx4 in Pflanzen.....	70
3.1.1.7 Gpx4 in Tieren .....	72
3.1.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Gpx4 .....	80
3.2 Expression der zfGpx4-Isoformen im prokaryontischen System.....	82
3.2.1 Vergleich der zfGpx4-Isoformen auf Genom- und Aminosäureebene.....	82
3.2.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten zfGpx4-Isoformen .....	83
3.2.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung der zfGpx4-Proteine .....	83
3.2.2.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung N-terminal trunkierter zfGpx4-Proteine.....	86
3.2.2.3 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Sec-zfGpx4b-Mutanten .....	88
3.2.2.4 Proteinkonzentrationen und Quantifizierung des Seleneinbaus.....	89
3.3 Enzymatische Charakterisierung verschiedener Gpx4-Isoformen .....	90
3.3.1 Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Gpx4-Isoformen .....	90
3.3.2 Temperaturabhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen.....	91
3.3.3 pH-Abhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen .....	93
3.3.4 Substratspezifitäten von Sec-Gpx4-Isoformen .....	94
3.3.4.1 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen.....	94
3.3.4.2 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten ..	97
3.3.5 Thermostabilität von Sec-Gpx4-Isoformen .....	101
3.3.6 Dreidimensionale Struktursimulation der zfGpx4-Isoformen .....	103
3.4 Biologische Aspekte der zfGpx4 Isoformen .....	105
3.4.1 Expression der zfGpx4-Isoformen während der Zebrafiscentwicklung .....	105
3.4.2 Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen.....	106
3.4.2.1 Analyse N-terminaler Peptidsequenzen der zfGpx4-Isoformen .....	106
3.4.2.2 Experimentelle Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der zfGpx4-Isoformen an COS-Zellen .....	108
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>110</b>
4.1 Evolutionäre Aspekte der Gpx4 .....	110
4.1.1 Die Gpx4 in irdischen Lebensformen.....	110
4.1.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Gpx4 .....	114

---

4.2 Expression der zfGpx4-Isoformen im prokaryontischen System.....	115
4.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter zfGpx4-Isoformen .....	115
4.2.2 Ausbeute und Seleneinbau .....	118
4.3 Biologische Relevanz der Gpx4-Isoformen im Zebrafisch .....	118
4.3.1 Temporäre Expression der zfGpx4-Isoformen während der Zebrafiscentwicklung.	120
4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen.....	121
4.3.3 Enzymatische Charakterisierung der WT-zfGpx4-Isoformen .....	122
4.4 Mutagenesestudien an zfGpx4-Isoformen.....	126
4.5 Perspektivische Betrachtungen.....	129
Literaturverzeichnis.....	130
Eidesstattliche Versicherung .....	145
Lebenslauf.....	146
Publikationsliste .....	147
Danksagung.....	148

Abkürzungsverzeichnis

Ala, A	<i>Alanin</i>	HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
Amp	<i>Ampicillin</i>	hGPX	<i>humane Glutathionperoxidase<sup>1</sup></i>
Arg, R	<i>Arginin</i>	His, H	<i>Histidin</i>
AS	<i>Aminosäure</i>	HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
Asn, N	<i>Asparagin</i>	ILE, I	<i>Isoleucin</i>
Asp, D	<i>Aspartat</i>	IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>	JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
bp	<i>Basenpaare</i>	Kan	<i>Kanamycin</i>
c-, m-, n-	<i>zytosolisch, mitochondrial, nukleär</i>	kDa	<i>Kilo-Dalton</i>
cDNA	<i>kodierende DNA</i>	<i>lacI</i>	<i>lac repressor</i>
CDS	<i>kodierende Sequenz</i>	LB	<i>Luria-Broth</i>
CPV	<i>Canarypox virus</i>	Leu, L	<i>Leucin</i>
CVB	<i>Coxsackie-B-Virus</i>	LUCA	<i>last universal common ancestor</i>
Cys, C	<i>Cystein</i>	Lys, K	<i>Lysin</i>
Dio	<i>Iodothyronindeiodinasen</i>	Met, M	<i>Methionin</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	MCV	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>	Mio.	<i>Millionen</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>	Mrd.	<i>Milliarden</i>
eEFSec	<i>Sec-spezifischer Elongationsfaktor</i>	m(t)	<i>messenger (transfer) RNA</i>
EF1α	<i>eukaryontischer Elongationsfaktor 1 α</i>	RNA	
FPV	<i>Fowlpox virus</i>	MsrB1	<i>Methionen-R-sulfoxidreduktase 1</i>
g	<i>relative Zentrifugalbeschleunigung</i>	NADPH	<i>Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat</i>
GDP, GTP	<i>Guanosindiphosphat, Guanosintriphosphat</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Gln, Q	<i>Glutamin</i>	Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriessigsäure</i>
Glu, E	<i>Glutamat</i>	OD	<i>Optische Dichte</i>
Gly, G	<i>Glycin</i>	OH-Gruppe	<i>Hydroxylgruppe</i>
Gpx	<i>Glutathionperoxidase<sup>1</sup></i>	Opti-MEM	<i>Opti-Minimum Essential Medium</i>
GR	<i>Glutathionreduktase</i>	ORF	<i>offener Leserahmen</i>
GSH	<i>Glutathion</i>	PBS	<i>phosphatgepufferte Salzlösung</i>
GSSG	<i>Glutathiondisulfid</i>	PC-OOH	<i>Phosphatidylcholin-Hydroperoxid</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Wasserstoffperoxid</i>	PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
		Phe, F	<i>Phenylalanin</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

PHGpx, Gpx4	<i>Phospholipid-Hydroperoxid- Glutathionperoxidase, Glutathionperoxidase 4</i>	TR	<i>Thioredoxinreduktase</i>
Pro, P	<i>Prolin</i>	Trp, W	<i>Tryptophan</i>
PSTK	<i>Phosphoseryl-Kinase</i>	Tyr, Y	<i>Tyrosin</i>
qRT-PCR	<i>Real-Time- Polymerasekettenreaktion</i>	UTR	<i>untranslatierte Region</i>
RefSeq	<i>Reference Sequence</i>	Val, V	<i>Valin</i>
r(g)ER	<i>raues (glattes) endoplasmatisches Retikulum</i>	WT	<i>Wildtyp</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>	YLS	<i>yolk syncytial layer</i>
RP-HPLC	<i>Umkehrphasen-Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie</i>	zfGpx	<i>Zebrafisch-Gpx<sup>1</sup></i>
rpm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>		
SARS- CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>		
SBP2	<i>SECIS-bindendes Protein 2</i>		
SDS- PAGE	<i>Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid- Gelelektrophorese</i>		
Se	<i>Selen</i>		
Se <sup>-</sup>	<i>Selenol</i>		
SECIS	<i>Selenocystein- Insertionssequenz</i>		
SecS	<i>Sec-Synthase</i>		
Sec, U	<i>Selenocystein</i>		
SeO <sup>-</sup>	<i>Selenensäure</i>		
SeOO <sup>-</sup>	<i>Seleninsäure</i>		
Sep15	<i>15 kDa Selenoprotein</i>		
SerS	<i>Seryl-tRNA-Synthase</i>		
Ser, S	<i>Serin</i>		
SMCP	<i>Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein</i>		
SPS	<i>Selenophosphatsynthetase</i>		
T7lac	<i>T7 lac Promotor</i>		
TBHP	<i>tert-Butyl-Hydroperoxid</i>		
Thr, T	<i>Threonin</i>		

---

<sup>1</sup> Gpx-Gene und -Proteine des Menschen werden üblicherweise mit Großbuchstaben gekennzeichnet. Der Zusatz „h“ sollte Verwechslungen vermeiden. Gpx-Gene des Zebrafisches (Zusatz „zf“) wurden in Kleinbuchstaben, Proteine mit einem Großbuchstaben am Beginn notiert. Bei allgemeinen Beschreibungen ohne Zuordnung zu einem Organismus wurde die Abkürzung „Gpx“ genutzt. Gene wurden durch kursive Notation kenntlich gemacht.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformel von Cystein (Cys) und Selenocystein (Sec). .....	15
Abb. 2:	Biosynthese von Selenocystein. ....	17
Abb. 3:	Katalysemechanismus der SecGpx-Isoformen mit GSH als Elektronendonator (19). ....	18
Abb. 4:	Katalytische Tetrade am Beispiel der rekombinanten humanen SecGPX4 (PDB Eintrag 6ELW). ....	19
Abb. 5:	Phylogenie der Gpx-Familie. ....	21
Abb. 6:	Evolution der Gpx-Familie. ....	22
Abb. 7:	Gpx im Urorganismus nach Margis et al. (2008, (39)). ....	22
Abb. 8:	Gewebespezifisches Silencing der Gpx4 in in vivo-Modellen mit Ausprägung pathologischer Phänotypen in den dargestellten Systemen. ....	24
Abb. 9:	Quartärstruktur der monomeren Gpx4 am Beispiel der rekombinanten humanen SecGPX4 (PDB Eintrag 6ELW). ....	25
Abb. 10:	Strukturelle Organisation des <i>Gpx4</i> -Gens und Bildung der verschiedenen mRNA-Transkripte, die für die zytosolische, mitochondriale und nukleäre Gpx4-Isoform kodieren. ....	26
Abb. 11:	Erweiterter Reaktionsmechanismus der Gpx4 (3). ....	27
Abb. 12:	Zebrafisch (69). ....	27
Abb. 13:	PCR-Programme. ....	43
Abb. 14:	Aminosäuresequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b. ....	45
Abb. 15:	Prinzip des gekoppelten optischen Tests für die Gpx-katalysierte Reaktion. ..	54
Abb. 16:	Absorptionsspektren von NADPH und NADP <sup>+</sup> . ....	54
Abb. 17:	Skizzenhafte Veranschaulichung des Prinzips des Thermal-Shift-Assays. ....	57
Abb. 18:	Vereinfachte Darstellung des Dreidomänenmodells nach Woese et al. (1990, (121)). ....	60
Abb. 19:	Virale Gpx-Sequenzen im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). ....	63
Abb. 20:	Bakterielle Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetrade im Alignment mit der hGPX4 Isoform A. ....	65
Abb. 21:	Archaische Gpx4-ähnliche Sequenzen am Beispiel von <i>Methanobrevibacter millerae</i> (M. millerae) und <i>Methanosphaera sp. BMS</i> (M. sp. BMS) im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). ....	68
Abb. 22:	Gpx4-ähnliche Sequenzen von Pilzen am Beispiel von <i>Cladophialophora psammophila</i> CBS 110553 (C. psammophila), <i>Kwoniella bestiolae</i> CBS 10118 (K. bestiolae) und <i>Encephalitozoon romaleae</i> SJ-2008 (E. romaleae) im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). ....	69
Abb. 23:	Variationen der katalytischen Tetrade in fungalen Gpx4-ähnlichen Sequenzen. ....	69
Abb. 24:	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase der Sojabohne im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). ....	70
Abb. 25:	Pflanzliche Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetrade im Alignment mit der hGPX4 Isoform A. ....	71
Abb. 26:	Systematik der Suche nach Gpx4-Sequenzen im Tierreich. ....	72
Abb. 27:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in verschiedenen Wurmpezies im Alignment mit der hGPX4 Isoform A. ....	73



Abb. 28:	Gpx4-Sequenzen von <i>Pan troglodytes</i> und <i>Pan paniscus</i> im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). ....	79
Abb. 29:	Phylogenie der Gpx4 und Gpx4-ähnlicher Sequenzen. ....	81
Abb. 30:	Umgebung der <i>zfgpx4</i> -Gene. ....	82
Abb. 31:	Primärstrukturen der zfGpx4-Isoformen im Sequenzalignment. ....	83
Abb. 32:	Expressionskonstrukte ausgewählter Gpx4-Isoformen des Zebrafisches. ....	84
Abb. 33:	Expression der rekombinanten Cys-zfGpx4-Isoformen. ....	85
Abb. 34:	Expression der rekombinanten Sec-zfGpx4-Isoformen. ....	85
Abb. 35:	Ausschnitt der SecCys- und CysAla-mutierten Sequenzen der zfGpx4a Isoform 2 (pET-15b zfGpx4a M.) und der zfGpx4b (pET-15b zfGpx4b M.) im pET-15b mit N-terminalem His-Tag (weiße Schrift auf schwarzem Grund). ....	86
Abb. 36:	Expression der rekombinanten, N-terminal trunkierten zfGpx4a Isoform 2. ...	87
Abb. 37:	Expression rekombinanter Sec-zfGpx4b-Mutanten (Gly72Ala, Glu86Asn, Leu102Met). ....	88
Abb. 38:	Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Isoformen der zfGpx4a Isoform 2 (zfGpx4a) und der zfGpx4b. ....	91
Abb. 39:	Temperaturabhängigkeit der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen. ....	92
Abb. 40:	Aktivierungsenergien $E_a$ der Sec-zfGpx4-WT-Isoformen. ....	92
Abb. 41:	pH-Abhängigkeiten der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen. ....	93
Abb. 42:	Substratspezifitäten verschiedener WT-Gpx4-Isoformen. ....	95
Abb. 43:	Vergleich der Primärstrukturen der exprimierten, trunkierten zfGpx4-Isoformen. ....	97
Abb. 44:	Substratspezifitäten von WT-Gpx4-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bei 15 °C. ....	98
Abb. 45:	Substratspezifitäten von WT-Gpx4-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bei 37 °C. ....	99
Abb. 46:	Schmelzpunktbestimmung mittels Thermal-Shift-Assay am Beispiel der Sec-WT-zfGpx4b. ....	102
Abb. 47:	Thermostabilität verschiedener Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten. ....	102
Abb. 48:	Dreidimensionale Strukturmodelle der N-terminal trunkierten WT-zfGpx4-Isoformen mit SecCys-Mutation. ....	104
Abb. 49:	Lokalisation der Punktmutationen im 3D-Strukturmodell der N-terminal trunkierten WT-zfGpx4b (SecCys-Mutation). ....	104
Abb. 50:	Expression der zfGpx4-Isoformen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. ....	105
Abb. 51:	Analyse der N-terminalen Sequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b. ....	106
Abb. 52:	Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen. ....	108
Abb. 53:	Cys-Reste der trunkierten WT-zfGpx4b (SecCys-Mutante). ....	116
Abb. 54:	Entwicklungsstadien des Zebrafisches nach (148) (149). ....	120

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Bislang bekannte bzw. vermutete virale Gpx-Proteine (7) (8) (9) (10) (11) (12). .....	16
Tab. 2:	Strukturelle Eigenschaften und Vorkommen von Säugetier-Gpx-Isoformen. ....	20
Tab. 3:	Typische Proteinsortierungssignale. ....	31
Tab. 4:	Primersequenzen zur Proteinexpression (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin). ....	42
Tab. 5:	Primersequenzen zur subzellulären Lokalisation (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin). ....	43
Tab. 6:	Primersequenzen für die QuikChange Site-Directed Mutagenesis der Wt-zfGpx4-Isoformen (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin). ....	46
Tab. 7:	Primersequenzen für die QuikChange Site-Directed Mutagenesis der zfGpx4b-Mutanten (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin). ....	47
Tab. 8:	Primersequenzen der qRT-PCR (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin). ....	48
Tab. 9:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in Modellorganismen. ....	61
Tab. 10:	NCBI-Akzessionsnummern Gpx4-ähnlicher Sequenzen in ausgewählten Modellorganismen. ....	62
Tab. 11:	Homologiegrade der Gpx von FPV, der CNPV087 putative glutathione peroxidase von CPV und des Proteins MC066L von MCV Subtyp 1 mit Vertretern der hGPX-Familie. ....	64
Tab. 12:	Gpx4-ähnliche Sequenzen mit CQWN-Tetraden in verschiedenen Bakterienspezies. ....	65
Tab. 13:	Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetraden in verschiedenen Bakterienspezies. ....	66
Tab. 14:	Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Bakterien. ....	67
Tab. 15:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in <i>Archaea</i> . ....	67
Tab. 16:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in Pilzen. ....	69
Tab. 17:	Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Pilzen. ....	70
Tab. 18:	Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetraden in verschiedenen Pflanzenspezies. ....	71
Tab. 19:	Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Pflanzen. ....	71
Tab. 20:	Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen verschiedener Invertebraten. ....	72
Tab. 21:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in Würmer. ....	74
Tab. 22:	Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen verschiedener Wirbeltiere. ....	75
Tab. 23:	Gpx4-Sequenzen in Fischen. ....	75
Tab. 24:	Gpx4-Sequenzen in Vögeln. ....	76
Tab. 25:	Gpx4-Sequenzen in Reptilien. ....	77
Tab. 26:	Gpx4-Sequenzen in Amphibien. ....	78
Tab. 27:	Gpx4-Sequenzen in Säugetieren unter Ausschluss von Primaten. ....	78
Tab. 28:	Gpx4-Sequenzen Nicht-Humaner Primaten. ....	79

## Tabellenverzeichnis

---

Tab. 29:	Zusammenfassung wichtiger Kenndaten zu Gen, kodierender Sequenz (CDS) und Protein der Gpx4 im Zebrafisch. ....	82
Tab. 30:	Proteinkonzentration, Seleneinbau und Ausbeute verschiedener Präparationen der N-terminal trunkierten zfGpx4-Isoformen exprimiert als Cys- und Sec-Variante. ....	90
Tab. 31:	Temperaturoptima $T_{opt}$ der Sec-zfGpx4-Isoformen. ....	92
Tab. 32:	Relative Verhältnisse katalytischer Aktivitäten der Sec-WT-Gpx4-Isoformen bezüglich Substrat und Temperaturpunkt. ....	96
Tab. 33:	Verhältnisse katalytischer Aktivitäten der Gpx4-WT-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bezüglich Substrat und Temperatur. ....	100
Tab. 34:	Computergestützte Vorhersagen zur Funktionalität der N-terminalen Peptidsequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b mit Hilfe von drei verschiedenen Vorhersageprogrammen (PrediSi, Target P-2.0 und Signal P-5.0). ....	107
Tab. 35:	Gpx4-ähnliche Sequenzen in irdischen Lebewesen und Viren. ....	110
Tab. 36:	Positivtreffer Gpx4-ähnlicher Sequenzen mit CQWN-bzw. UQWN-Tetrade mit möglicher Zuordnung zu anderen Gpx-Isoformen. ....	111

### Zusammenfassung

Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) zählt zur Enzymfamilie der Glutathionperoxidasen (Gpx). Diese Proteine reduzieren organische und anorganische Hydroperoxide zu deren jeweiligen Hydroxiden. Charakteristischerweise verfügen die Enzyme der Gpx-Familie über eine Cystein (Cys, C)- bzw. Selenocystein (Sec, U)-basierte katalytische Tetrade (C/U, Glutamin (Gln, Q), Tryptophan (Trp, W), Asparagin (Asn, N)). Als eines von drei monomeren Proteinen der menschlichen Gpx-Familie ist die Gpx4 in der Lage komplexe Lipidhydroperoxide zu reduzieren. In reifen Spermien fungiert das Protein dagegen als Strukturelement. Umfangreiche Untersuchungen zur Evolution der Gpx4 fehlen bisher. In Folge einer Genomduplikation verfügt der Zebrafisch, ein gängiger Modellorganismus, über zwei paraloge *gpx4*-Gene (*zfgpx4a*, *zfgpx4b*). Beide *zfgpx4*-Gene kodieren für funktionelle Selenoproteine, die bislang kaum charakterisiert wurden.

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift erfolgte eine Datenbankrecherche, bei der die Reference Sequence (RefSeq)-Sammlung des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mittels BLAST auf das Vorkommen von Gpx4-ähnlichen Proteinsequenzen durchsucht wurde. Obwohl solche Sequenzen in allen drei Domänen des Lebens und auch bei Viren identifiziert werden konnten, fand sich im Großteil der irdischen Lebewesen (> 90 %) keine Gpx4-ähnliche Sequenz. Diese geringe Verbreitungshäufigkeit trifft auch auf Säugetiere zu, bei denen etwa 10 % aller hinterlegten Säugetierspezies Gpx4-ähnliche Sequenzen enthielten. Niedere Lebensformen wiesen überwiegend katalytische Tetraden mit CQWN auf. Bei Wirbeltieren waren Enzyme mit vorwiegend UQWN-Tetrade nachweisbar. Zusammenfassend scheint irdisches Leben auch ohne Gpx4-ähnlichem Enzym möglich. Ein früher postuliertes hypothetisches *Gpx4*-Urgen müsste im Laufe der Evolution in einer Vielzahl von Organismen verloren gegangen sein.

Für funktionelle Untersuchungen wurden die beiden Gpx4-Paralogue des Zebrafisches (*zfGpx4a* Isoform 2, *zfGpx4b*) als Cys- und Sec-Proteine in *E. coli* rekombinant exprimiert. Verglichen mit dem Sec-Enzym wiesen die Cys-Proteine eine extrem geringe katalytische Aktivität auf. Trotz ähnlicher Temperatur- und pH-Profile zeigten beide Isoformen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Während die *zfGpx4a* auch bei 37 °C hohe katalytische Aktivitäten mit Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PC-OOH) aufwies, war die PC-OOH-Aktivität der *zfGpx4b* deutlich reduziert. Um die beiden *zfGpx4*-Paralogue auf mögliche N-terminale Proteinsortierungssignale zu untersuchen, wurden COS7-Zellen mit Transfektionsplasmiden transfiziert, die neben den potentiellen Sortierungssequenzen die Kodierungssequenzen für verschiedene Fluoreszenzproteine beinhalteten. Bei der *zfGpx4b* konnten deutliche

Fluoreszenzsignale in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Expressionsanalysen der *zfgpx4*-mRNA während der Zebrafiscentwicklung erfolgten mittels Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und zeigten zeitlich, dynamische Expressionmuster. In Zusammenschau scheint es in Folge der Genomduplikation zu einer funktionellen Spezialisierung der beiden *zfGpx4*-Isoformen gekommen zu sein, aus der heraus sich das „Überleben“ des *gpx4*-Paralogen im Zebrafisch begründen lassen könnte.

## Abstract

Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) belongs to the family of glutathione peroxidases (Gpx). These proteins reduce organic and anorganic hydroperoxides to the corresponding hydroxides. Typically, enzymes of the gpx-family contain a cysteine (Cys, C) or selenocysteine (Sec, U) based catalytic tetrad (C/U, glutamine (Gln, Q), tryptophane (Trp, W), asparagine (Asn, N)). Gpx4 is one of three monomeric human gpx-enzymes and capable of reducing complex lipid hydroperoxides. However, Gpx4 acts as a structural component in mature spermatozoa. To date, comprehensive studies on Gpx4 evolution are lacking. Zebrafish is a known model organism. Due to a genome duplication zebrafish exhibits two different *gpx4*-gene paralogs (*zfgpx4a*, *zfgpx4b*). Both encode functional selenoproteins which are scarcely characterised so far.

We performed an *in silico* search and studied the occurrence of Gpx4-like protein sequences in the Reference Sequence (RefSeq)-assemblage of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) via BLAST. Although we identified such sequences in all three domains of terrestrial life and even in viruses, the majority of living organism (> 90 %) does not encode Gpx4-like sequences. This low frequency of occurrence even applies to mammals. About 10 % of mammalian species exhibit Gpx4-like sequences. In lower living organism we predominantly observed catalytic tetrads with CQWN. In contrast, vertebrates mostly contain proteins with UQWN tetrad. To conclude, terrestrial life seems to be possible without Gpx4-like enzymes. A formerly postulated ancient *Gpx4*-gene must have been lost during the time course of evolution in numerous organism.

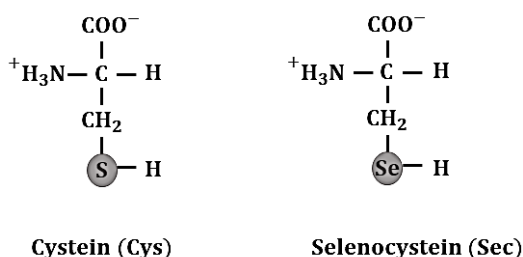
To conduct functional characterisations we performed recombinant protein expression of both zebrafish Gpx4-paralogs (*zfGpx4a* isoform 2, *zfGpx4b*) in *E. coli* and expressed Cys- and Sec-proteins. Unlike Sec-enzymes, Cys-proteins displayed extremely low catalytic activity. Although similar in their temperature- and pH-profile both isoforms differed in their substrate specificity. While *zfGpx4a* also exhibited high catalytic activity for phosphatidylcholin-hydroperoxide (PC-OOH) at 37 °C, *zfGpx4b* showed only minor catalytic PC-OOH-activity. To investigate whether both *zfGpx4*-isoforms contain a potential protein sorting signal, we transfected COS7-cells with transfection plasmids which consisted of coding sequences for potential sorting signals and fluorescent proteins. For *zfGpx4b*, fluorescent signals associated to mitochondria were observed. Expression of *zfgpx4*-mRNA were analysed via real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and revealed dynamic expression patterns during zebrafish development. Summing up, it seems as if *zfGpx4*-isoforms have functionally differentiated after genome duplication which might be the cause of the „survival“ of *gpx4*-paralog in zebrafish.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Selenoproteine

### 1.1.1 Definition und Vorkommen von Selenoproteinen

Selen (Se) ist ein Spurenelement. Selenhaltige Proteine werden als Selenoproteine bezeichnet. Der Begriff Selenoproteom fasst die Gesamtheit aller Selenoproteine eines Organismus zusammen. In Säugetieren findet sich das Selen in Form der 21. proteinogenen Aminosäure (AS), dem Selenocystein (Sec, U) (1). Sec ist ein Analogon zur Aminosäure Cystein (Cys, C). Das



**Abb. 1: Strukturformeln von Cystein (Cys) und Selenocystein (Sec).**  
Hervorgehoben sind jeweils das Schwefelatom (S) des Cys und das Selenatom (Se) des Sec. In Anlehnung an (2).

Schwefelatom (S) im Cys wird dabei durch das reaktionsfähigere Se im Sec ersetzt (Abb. 1) (2). Eine Substitution des Sec am aktiven Zentrum von Enzymen durch ein Cys kann dessen katalytische Aktivität deutlich reduzieren (3). Selenoproteine finden sich in allen drei Domänen des

irdischen Lebens. Insbesondere Säugetiere und andere Vertebraten verfügen über Selenoproteine (4). In Vertebraten sind beispielsweise einige Glutathionperoxidase-Isoformen (Gpx), Thioredoxinreduktasen (TR), Iodothyronindeiodinasen (Dio), die Selenoproteine H, I, K, M, N, O, P, S, T1, W1, das 15 kDa Selenoprotein (Sep15) und die Methionin-R-sulfoxidreduktase 1 (MsrB1) Selenoproteine (5) (6). Die Größe des jeweiligen Selenoproteoms ist Spezies-spezifisch. Der Mensch verfügt über 25 verschiedene Selenoproteine. Der evolutionär weniger weit entwickelte Zebrafisch weist mit 38 verschiedenen Selenoproteinen ein weitaus größeres Selenoproteom auf (6). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass es im Laufe der Wirbeltierevolution entweder zu einer SecCys-Konversion gekommen ist oder das Gene, die für Selenoproteine in weniger weit entwickelten Wirbeltieren kodieren, vollständig verloren gegangen sind. Interessanterweise scheinen Wasserlebewesen meist größere Selenoproteome zu besitzen als Landlebewesen, was möglicherweise Folge ihrer Lebensbedingungen sein könnte (5) (6). Studien zum Vorkommen von Selenoproteinen in marinen Säugetieren fehlen weitgehend. Der Delphin als marines Säugetier verfügt, genau wie der Mensch, über 25 Selenoproteine, während andere Meereslebewesen wie Medaka, Kugelfisch und Stichling 35 bzw. 36 Selenoproteine besitzen (6). Auch Viren können Selenoproteine aufweisen (5). So beschrieben Shisler et al. (1998, (7)) ein zur humanen Glutathionperoxidase 1 (hGPX1) homologes Selenoprotein MCO66L im Molloscum contagiosum virus (MCV) mit einer funktionellen Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) in der

3'-untranslatierten Region (UTR) der viralen messenger Ribonukleinsäure (mRNA). Zu dieser Zeit war dies das erste in Viren beschriebene, funktionale Selenoprotein. Mix et al. (2007, (8)) identifizierten und exprimierten ein zweites vollständiges virales Selenoprotein. Sie fanden im Fowlpox virus (FPV) ein zur humanen GPX4 (hGPX4) homologes Selenoprotein mit einem in-frame SECIS-Element innerhalb der kodierenden mRNA. Im Canarypox virus (CPV) konnten sie ein fossiles SECIS-Element innerhalb der kodierenden mRNA einer CysGpx4 nachweisen. Mutmaßliche SecGpx-Homologe bzw. Abschnitte dieser wurden auch in offenen Leserahmen (ORF) des Human immunodeficiency virus 1 und 2 (HIV), im Hepatitis C Virus (HCV), im Coxackie-B-Virus (CVB) und im Masernvirus gefunden (9) (10) (11) (12). Zhang et al. (1999, (11)) vermuteten, dass Gpx-Homologe von HIV-2, CVB und dem Masernvirus möglicherweise als Fusionsproteine anderer viraler Proteine exprimiert würden. Ein weiteres mögliches virales Selenoprotein entdeckten Zhong et al. (2004, (13)) im Japanese encephalitis virus (JEV). Inwieweit die zuletzt genannten Proteine *in vivo* exprimiert werden und welche Mechanismen eine Sec-Insertion ermöglichen, ist bislang nicht abschließend bekannt, auch wenn Versuche von Zhao et al. (2000, (12)) mit dem Gpx-Homolog *env-fs* von HIV-1 auf eine *in vivo*-Expression hindeuten.

**Tab. 1: Bislang bekannte bzw. vermutete virale Gpx-Proteine** (7) (8) (9) (10) (11) (12). Katalytische Tetraden wurden basierend auf Alignments in genannten Publikationen bzw. eigenen Sequenzalignments angegeben.

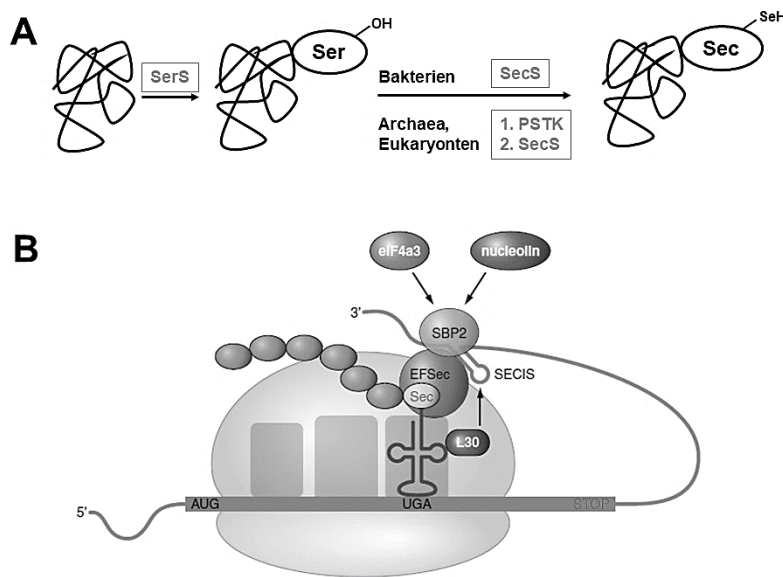
Virus	Protein	katalytische Tetrade	Gpx-Homolog
MCV	MCO66L	UQWN	Gpx1
FPV	glutathione peroxidase	UQWN	Gpx4
CPV	putative glutathione peroxidase	CQWN	Gpx4
HIV-1	<i>env-fs</i>	UQWK	Gpx3
HIV-2	GPx- <i>env</i> Fusionsprotein	URXX	Gpx1
HCV	HCV GPx	UQWS	Gpx1; Gpx3
CVB	GPx- <i>vp3</i> Fusionsprotein	UTWT	--
Masernvirus	GPx-F Fusionsprotein	ULXX	--

Tab. 1 fasst die bisher bekannten viralen Gpx-Proteine zusammen. Für das Covid-19 auslösende Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) ist bislang kein Selenoprotein bekannt. Wang et al. (2020, (14), preprint) beobachteten in SARS-CoV-2 infizierten Zellen jedoch eine Abnahme der Expression verschiedener eukaryontischer Selenoproteine u.a. der hGPX4.



### 1.1.2 Biosynthese von Selenoproteinen

Die Biosynthese von Selenoproteinen ist ein komplexer Prozess, der auf Translationsebene ein Zusammenwirken verschiedener Elemente erfordert (Abb. 2, B). Sec wird von dem Codon UGA kodiert, das normalerweise als Stoppsignal fungiert. Damit es am Ribosom nicht zu einer Beendigung der Translation kommt, vermittelt das SECIS-Element eine Rekodierung des UGA. Das SECIS-Element hat typischerweise eine Haarnadelstruktur und befindet sich bei Eukaryonten und nahezu allen *Archaea* in der 3'-UTR der mRNA (5) (15). Bakterielle SECIS-Elemente finden sich innerhalb der kodierenden Sequenz (CDS) der mRNA unmittelbar nachfolgend auf das Sec-



**Abb. 2: Biosynthese von Selenocystein. (A) Vereinfachte Darstellung zur Sec-tRNA<sup>[Ser]</sup> Sec-Synthese in Bakterien, *Archaea* und Eukaryonten.** Seryl-tRNA-Synthase (SerS), Sec-Synthase (SecS), Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK). OH bzw. SeH markieren die funktionellen Gruppen von Ser bzw. Sec. In Anlehnung an (5). **(B) Eukaryontischer Translationskomplex zur Sec-Synthese** (5). Mit freundlicher Genehmigung von The American Physiological Society.

kodierende UGA (5). Durch die Wirkung des SECIS-Elementes bindet eine Sec-transfer RNA (tRNA)<sup>[Ser]</sup> Sec mit dem zum UGA komplementären Anticodon an die mRNA und ermöglicht den Einbau von Sec in die wachsende Polypeptidkette. Für die Synthese der Sec-tRNA<sup>[Ser]</sup> Sec wird zunächst eine tRNA durch eine Seryl-tRNA-Synthase (SerS) aminoacetyliert und dabei mit Serin (Ser, S) beladen. In

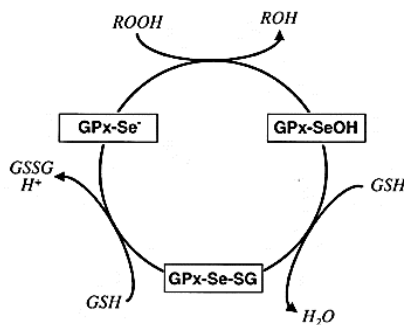
Bakterien katalysiert nachfolgend die Sec-Synthase (SecS) die Umwandlung des Ser in ein Sec, wobei die Hydroxylgruppe (OH-Gruppe) des Ser durch Selenol (SeH) ersetzt wird. Dabei wird das Se vermutlich in Form von Monoselenophosphat von einer Selenophosphatsynthetase (SPS) bereitgestellt (5) (15). Bei Eukaryonten und *Archaea* wird die Ser-beladene tRNA zunächst durch eine Phosphoseryl-Kinase (PSTK) phosphoryliert, bevor die SecS den Einbau von Se katalysiert (Abb. 2, A). Dabei wird Se in Form von Selenophosphat bereitgestellt. Neben dem SECIS-Element sind bei Eukaryonten eine Reihe weiterer Faktoren an der Translation von Selenoproteinen beteiligt, insbesondere das SECIS-bindende Protein 2 (SBP2) und der Sec-spezifische Elongationsfaktor (eEFSec). SBP2 bindet an der großen Untereinheit des Ribosoms und interagiert ebenfalls mit eEFSec. Das gebundene eEFSec rekrutiert nun die Sec-tRNA<sup>[Ser]</sup> Sec und erleichtert

damit den Einbau von Sec in die entstehende Polypeptidkette. Auch weitere Faktoren wie ribosomales Protein L30, eukaryontischer Initiationsfaktor 4a3 und Nucleolin sind an der Sec-Translationsmaschinerie beteiligt (1) (5). In Bakterien vereint ein Sec-spezifischer Translationselongationsfaktor (SelB in *E. coli*) die molekularen Funktionen von SBP2 und eEFSec. Für *Archaea* sind die Faktoren, die zwischen Sec-kodierendem UGA, dem SECIS-Element und dem Translationsort vermitteln, noch nicht abschließend identifiziert. Bislang konnten SelB- und L30-Homologe in verschiedenen *Archaeaspezies* gefunden werden (15).

## 1.2 Die Familie der Glutathionperoxidasen

### 1.2.1 Definition und Katalysemechanismus

Die Glutathionperoxidasen umfassen eine Familie phylogenetisch verwandter Enzyme, die aufgrund ihrer katalytischen Aktivität als Teil des antioxidativen Schutzsystems der Zelle betrachtet werden (16). Aber auch jenseits ihrer antioxidativen Funktionen kommen den Gpx-Isoformen andere biologische Funktionen zu. Gpx-Isoformen reduzieren Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), organische und anorganische Hydroperoxide zu Wasser bzw. entsprechenden Hydroxiden (17) (18). Neben dem namensgebenden Elektronendonator, dem Glutathion (GSH), können auch andere Substrate wie verschiedene Redoxine oder Proteinthiole als Elektronendonatoren fungieren (16). Innerhalb der Gpx-Familie finden sich sowohl selenhaltige als auch Cystein-haltige Enzyme.

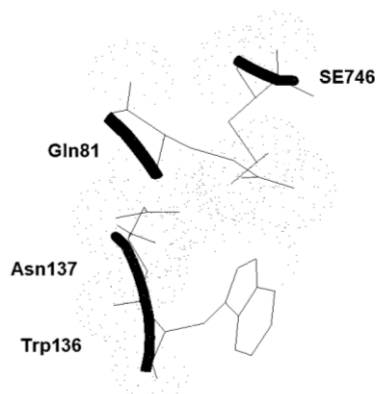


**Abb. 3: Katalysemechanismus der SecGpx-Isoformen mit GSH als Elektronendonator** (19). GPx = Glutathionperoxidase (Gpx). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Während die Selenoproteine ein Sec am aktiven Zentrum tragen, weisen Selen-freie Gpx-Isoformen typischerweise ein Cys am aktiven Zentrum auf. Für SecGpx-Isoformen wird ein dreischrittiger Katalysemechanismus angenommen (Abb. 3). Das im Grundzustand des Enzyms vorliegende Selenol ( $Se^-$ ) wird durch ein Hydroperoxid zu Selenensäure ( $SeOH$ ) oxidiert. Dieses  $SeOH$  wird mit Hilfe eines geeigneten Elektronendonators (beispielsweise GSH) in zwei Schritten unter temporärer Ausbildung einer Selenodisulfidbindung ( $GPx-Se-SG$ ) wieder zum Selenol rückreduziert. Dabei wird Glutathiondisulfid (GSSG) frei (3). Demgegenüber wird das Cys der CysGpx-Isoformen durch ein Hydroperoxid zur Sulfensäure oxidiert. Verfügt die CysGpx über ein sogenanntes resolving Cys, bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen der Sulfensäure und diesem Cys aus. Die Disulfidbrücke kann durch Reduktion unter Verwendung von Redoxinen (z.B. Thioredoxin) wieder gespalten

werden. Dieser Reaktionsmechanismus stellt eine atypische Zwei-Cys-Peroxiredoxinreaktion dar und wird beispielsweise für CysGpx-Isoformen von Pflanzen und Invertebraten angenommen (16).

1.2.2 Verbreitung, Vorkommen und strukturelle Eigenschaften der Gpx-Isoformen  
Gpx-Isoformen sind weit verbreitet und finden sich in allen drei Domänen des irdischen Lebens (20). Die überwiegende Mehrzahl der Enzyme trägt ein Cys am aktiven Zentrum. Selenoproteine der Gpx-Familie stellen eine Minderheit dar und sind vorwiegend unter Wirbeltieren anzutreffen (21). Seit der Erstbeschreibung einer Gpx in Erythrozyten von Ratten und Kühen durch G. C. Mills 1957 (22) sind inzwischen acht GPX-Isoformen beim Menschen bekannt. Bei den humanen GPX-Isoformen 1 bis 4 handelt es sich um Selenoproteine, die GPX-Isoformen 5, 7 und 8 tragen ein Cys am aktiven Zentrum. Die GPX6 ist beim Menschen ebenfalls ein Selenoprotein. Gemäß SelenoDB Release 2.0 sind auch unter anderem die Gpx6-Homologe von Alpaca, Schimpanse, Delphin, Eichhörnchen, Elefant, Faultier, Hund, Igel, Kängururatten, Koboldmaki, Kuh, Makaka, Mausmakis, Meerschweinchen, Panda und Pferd Selenoproteine, während Maus, Kaninchen, Katze, Krallenaffe und Ratte Cys-enthaltende Orthologe aufweisen (23) (24) (25). Strukturell bilden die Gpx-Isoformen 1, 2, 3, 5 und 6 Homotetramere. Gpx4, Gpx7 und Gpx8 sind hingegen monomere Enzyme. Als wesentlicher Bestandteil der bisher beschriebenen Reaktionsmechanismen der Gpx-Isoformen galt lange Zeit eine katalytische Triade, die sich am aktiven Zentrum der Enzyme befindet. Diese Triade besteht aus dem katalytisch aktivem Sec (bzw. Cys), einem Glutamin (Gln, Q) und einem Tryptophan (Trp, W), die sich in der Raumstruktur der



**Abb. 4: Katalytische Tetrade am Beispiel der rekombinanten humanen SecGPX4 (PDB Eintrag 6ELW).** Die Tetrade umfasst die Aminosäuren Sec46 (SE746), Gln81, Trp136 und Asn137. Darstellung mittels Swiss-PdbViewer 4.1.0 (26).

Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden. Basierend auf Mutageneseuntersuchungen an einer Gpx-Isoform der Taufliege (*Drosophila melanogaster*, *D. melanogaster*) wurde dieses Triadenkonzept von Tosatto et al. (2008, (21)) um eine vierte Aminosäure erweitert (Abb. 4). Nach diesem Tetradenkonzept spielt ein Asparagin (Asn, N) das in der Primärstruktur unmittelbar auf das Trp der vormaligen Triade folgt, eine wesentliche Rolle für die katalytische Aktivität. Am aktiven Zentrum sind die Aminosäuren Cys bzw. Sec weithin

konserviert (Cys >> Sec). Für die übrigen Aminosäuren finden sich in der Literatur folgende Konservierungsgrade: 100 % für Trp, > 99 % für Asn und 97 % für Gln (20). Abweichung von dieser katalytischen Tetrade finden sich beispielsweise in der Sequenz der humanen GPX8 (hGPX8). Hier ersetzt ein Ser das Gln. Die Gpx8 des Zebrafisches (zfGpx8) weist eine katalytische Tetrade mit den Aminosäuren Ser, Threonin (Thr, T), Trp und Asn auf. Hierbei ersetzt Ser das Cys bzw. Sec am aktiven Zentrum und Thr in Analogie zur hGPX8 das Gln. Studien, die die katalytische Aktivität dieser zfGpx8 prüfen, fehlen jedoch bislang. Neben der katalytischen Tetrade (unterstrichen) finden sich in Sequenzalignments AS-Abfolgen wie NVA(S/T)x(U/C)xxT, FPCNQFGxQ, KxxVNG und WNFxKxLxxxxG, die innerhalb der Gpx-Familie hoch konserviert zu sein scheinen (21). Homologiegrade innerhalb der Gpx-Familie einer Spezies fallen variabel aus. Toppo et al. (2008, (20)) fanden in Alignments der humanen GPX-Isoformen höhere Homologiegrade zwischen der hGPX1 und der hGPX2 (66 %), der hGPX3, der hGPX5 und der hGPX6 (67 %) und zwischen der hGPX7 und der hGPX8 (51 %). Eine Übersicht zu strukturellen Aspekten und Expression der Säugetier-Gpx-Isoformen findet sich in Tab. 2.

**Tab. 2: Strukturelle Eigenschaften und Vorkommen von Säugetier-Gpx-Isoformen.**

Isoform	Struktur	Tetrade	Lokalisationen
Gpx1	Homotetramer	UQWN	ubiquitär; zytosolisch, mitochondrial (27) (28)
Gpx2	Homotetramer	UQWN	gastrointestinal (29), Lunge (30), Leber, malignes Gewebe (31)
Gpx3	Homotetramer	UQWN	Plasma, Niere, Nebenhoden, gastrointestinal, bronchial, Typ II Pneumozyten (32) u.a.
Gpx4	Monomer	UQWN	ubiquitär (33); zytosolisch, mitochondrial, nukleär
Gpx5	Homotetramer	CQWN	Nebenhoden (34)
Gpx6	Homotetramer	(U/C)QWN	Riechepithel (35)
Gpx7	Monomer	CQWN	endoplasmatisches Retikulum (36)
Gpx8	Monomer	CxWN	endoplasmatisches Retikulum (36)

### 1.2.3 Evolution und Phylogenie der Gpx-Familie

Phylogenie bezeichnet die Stammesgeschichte. Mit phylogenetischen Bäumen können evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse rekonstruiert werden (37). In den Jahren 2007 und 2008 sind mehrere Arbeiten zur Phylogenie und Evolution der Gpx-Familie veröffentlicht worden. Herbet et al. (2007, (38)) untersuchten Aminosäuresequenzen von Gpx-Isoformen aus Vertebraten, Invertebraten, Parasiten, Pflanzen und Bakterien. In der phylogenetischen Rekonstruktion fanden sie drei Subgruppen der Gpx-Familie: Gruppe I mit allen Gpx 1 und -2 Isoformen von Säugetieren und Vertebraten, Gruppe II mit Gpx-Isoformen 3, 5 und 6 von Säugetieren und Gruppe III mit Gpx4-Isoformen von Säugetieren und allen Gpx-Isoformen

anderer Organismen (Abb. 5, A). Die Autoren vermuteten, dass nicht-selenhaltige Gpx-Isoformen eine eigenständige Subfamilie innerhalb der Gpx4-Familie abseits der Säugetiere bilden müssten (38). Margis et al. (2008, (39)) untersuchten Gpx-Sequenzen von *Viridiplantae*, Pilzen, *Metazoa* (Tiere), Protisten und Prokaryonten. Basierend auf diesen Untersuchungen teilten sie die Gpx-Familie in drei Hauptcluster, den *Metazoa*-Cluster, den Cluster der Pilze, Bakterien, Cyanobakterien einschließlich zweier Algensubtypen und den Cluster der pflanzlichen Gpx-Isoformen ein. Jeden Cluster konnten sie nochmals separat untergliedern. Im *Metazoa*-Cluster beobachteten sie vier Untergruppen der Gpx-Isoformen von Wirbeltieren: (i) Gpx1/Gpx2, (ii) Gpx3/Gpx5/Gpx6, (iii) Gpx4, (iv) Gpx7. Im zweiten Cluster fanden sie drei Subgruppen (Bakterien, Pilze, eukaryontische unizelluläre Organismen/ Diatomeen/ Grünalgen). Die pflanzlichen Gpx-Sequenzen konnten sie in fünf Gruppen entsprechend ihrer jeweiligen subzellulären Lokalisation einteilen (Abb. 5, B) (37). Toppo et al. (2008, (20)) untersuchten im gleichen Jahr an

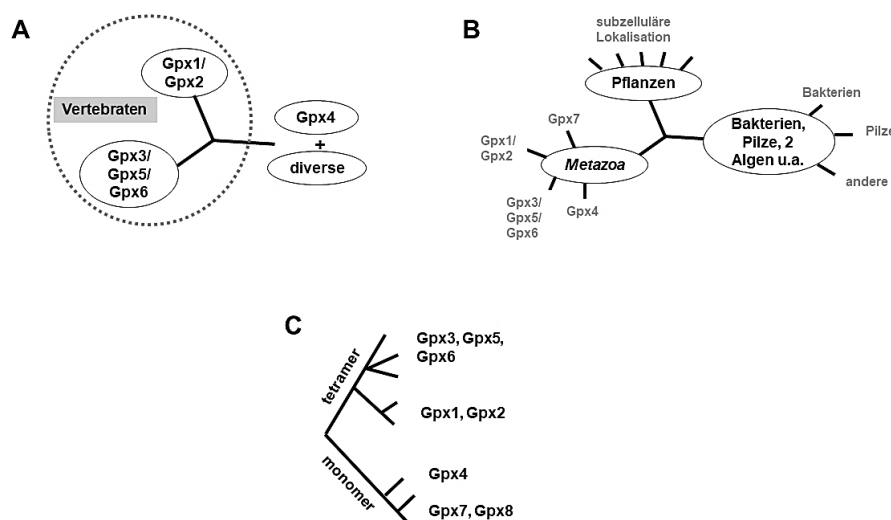


Abb. 5: Phylogenie der Gpx-Familie. (A) Phylogenie nach Herbetta et al. (2007, (38)). (B) Phylogenetische Rekonstruktion nach Margis et al. (2008, (39)). (C) Phylogenie der Gpx-Familie in Säugetieren nach Toppo et al. (2008, (20)).

724 Proteinen die phylogenetischen Beziehungen der Säugetier-Gpx-Isoformen. Dabei identifizierten sie zwei Enzymcluster. Der erste Cluster umfasste die monomeren Gpx-Isoformen 4, 7 und 8, während der zweite Cluster die tetrameren

Gpx-Isoformen beinhaltet. In jedem Cluster konnten sie weitere Subcluster identifizieren (Abb. 5, C) (20). Eine ähnliche Untergliederung der Gpx-Familie fanden auch Mariotti et al. (2012, (6)) bei der Untersuchung der Selenoproteome von Vertebraten. Ausgehend von den verschiedenen phylogenetischen Rekonstruktionen entwickelten die jeweiligen Gruppen unterschiedliche Thesen zur Evolution der Gpx-Familie. Bereits in Artikeln aus den 1980-er Jahren waren phylogenetische Verwandtschaften zwischen den bis dahin bekannten Gpx-Isoformen und der Gpx4 (Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathionperoxidase (PHGpx)) postuliert worden. Brigelius-Flohé et al. (1994, (40)) vermuteten, die Verwandtschaft der Familie der Gpx/PHGpx könne sich von einem einzigen homologen Exon abgeleitet haben, da sich nur in

zwei der sieben Exone des *Gpx4*-Gens hochkonservierte Regionen in Übereinstimmung mit den anderen Gpx-Isoformen fanden. Exone, die in keinerlei Beziehung zu anderen Gpx-Isoformen standen, müssten demzufolge erst später in der Evolutionsgeschichte in das Gen der *Gpx4*

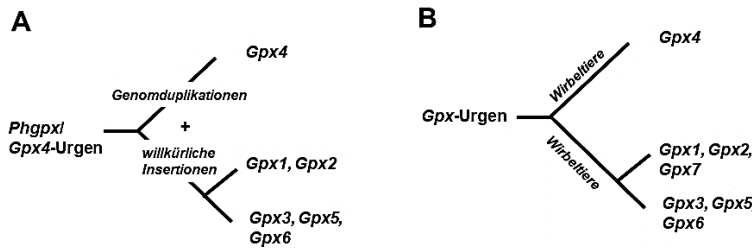


Abb. 6: Evolution der Gpx-Familie. (A) Nach Herbette et al. (2007, (38)). (B) Nach Margis et al. (2008, (39)).

integriert worden sein. Die Autoren bezeichneten die *Gpx4* als phylogenetisch alte Variante der heutigen Vertreter der Gpx-Familie (40). Herbette et al. griffen diese Idee auf und postulierten, dass die Gpx-Familie in Säugetieren durch Multiplikation eines *Gpx4*-Urgens entstanden sei. Die neu entstandenen Genduplikate seien dabei zufällig in das Genom früher Säugetiere integriert worden. Entsprechend ihrer phylogenetischen Rekonstruktionen schlugen die Autoren vor, dass aus diesem Urgen die Gene der intrazellulären Gpx-Isoformen (*Gpx1*, *Gpx2*) zum einen und der sekretorischen Gpx-Isoformen (*Gpx3*, *Gpx5*, *Gpx6*) zum anderen hervorgegangen seien (Abb. 6, A) (38). Margis et al. vermuteten dagegen, dass zwei verschiedene Urgene der Gpx im hypothetischen Uroorganismus (last universal common ancestor, LUCA) vorkamen. Aus einer dieser Sequenzen entstanden die Gpx-Isoformen 1-7 der Tiere, während sich die andere Sequenz zur heutigen Form der in verschiedensten Organismen vorkommenden *Gpx4* entwickelte. Möglich sei auch, dass das Fehlen der Gpx-Isoformen 1, 2, 3, 5, 6, 7 in Pflanzen und Pilzen Folge eines Evolutions-bedingten Genverlustes sei (Abb. 7). Auch ein horizontaler Gentransfer könne die Verwandtschaft zwischen der *Gpx4* aus Wirbeltieren und anderen Organismen (Nematoden,

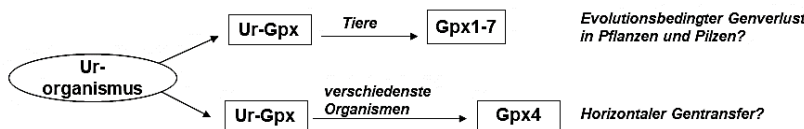


Abb. 7: Gpx im Uroorganismus nach Margis et al. (2008, (39)).

*Ciona intestinalis*) erklären. Weiter vermuteten die Autoren, dass die Gpx-Familie der Wirbeltiere von einem gemeinsamen

Genvorfahren abstammen könnte, der in Beziehung zur *Gpx4*-Sequenz steht. Aus diesem gemeinsamen Vorfahren könnten nach der ersten Genduplikation zwei Gengruppen hervorgegangen sein: die Gruppe der *Gpx4* und die Gruppe, aus der nach Duplikation die Subgruppen mit den *Gpx*-Isoformen 1, 2, 7 und 3, 5, 6 entstanden seien (Abb. 6, B). Die Evolutionsgeschichte der Gpx-Familie beschrieben sie als hochkomplex und Resultat verschiedener und unabhängiger evolutionärer Ereignisse. Sie nahmen an, dass die Gpx-Isoformen schon früh in der Evolutionsgeschichte des *Gpx*-Gens entstanden seien müssten (39). Toppo et al.

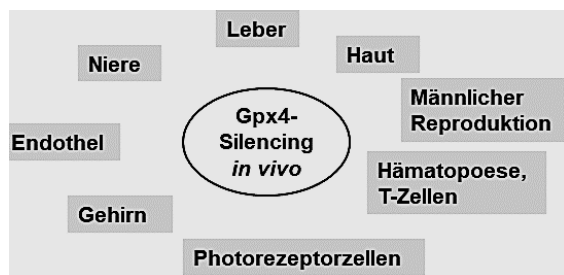
schlugen anhand ihrer phylogenetischen Rekonstruktion einen gemeinsamen Cys-basierten Vorfahren der monomeren und tetrameren Gpx-Isoformen vor. Die tetrameren Gpx-Isoformen 1, 2, 3, 5 und 6 seien in Säugetieren aus einem Sec-Vorfahren entstanden. Im Falle der Gpx5 und in Nagetieren sei es hierbei zu einer SecCys-Konversion gekommen, die möglicherweise durch eine verringerte Bioverfügbarkeit von Selen ausgelöst worden war (20). Mariotti et al. vermuteten ebenfalls Sec-basierte Vorfahren der Cys-enthaltenden Mitglieder der Gpx-Familie. Sie identifizierten drei phylogenetisch verwandte Gruppen (Gpx 1/2, die Gpx 3/5/6 und Gpx 4/7/8). Nach ihrer Auffassung seien die *Gpx5*- und *Gpx6*-Gene durch Duplikationen aus dem Gen der SecGpx3 hervorgegangen, während die Gene der CysGpx7 und CysGpx8 aus einem Vorläufer des Sec-*Gpx4*-Gens entstanden seien. Die SecCys-Konversion der Gpx5 sei früh in der Evolution erfolgt. Die SecCys-Konversion der Gpx6 in einzelnen Vertebratenspezies sei vermutlich unabhängig davon aufgetreten. Wie andere Gruppen zuvor nahmen sie an, dass die Gpx4 eine der ältesten Gpx-Isoformen darstellen müsste. Zu den zuletzt evolvierten Gpx-Isoformen zählten dagegen die Gpx5 und Gpx6 (6).

### 1.3 Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4)

#### 1.3.1 Biologische Bedeutung der Gpx4

Die Gpx4 ist ein Vertreter der Gpx-Familie. Sie wurde erstmals 1982 von Ursini et al. (41) bei Untersuchungen an Leberzellen des Schweins als „peroxidation-inhibiting protein“ beschrieben. Ursini et al. (1985, (42)) schlugen zwei Jahre später aufgrund der Glutathionperoxidaseaktivität und der Fähigkeit dieses Enzyms insbesondere Phospholipidhydroperoxide zu reduzieren eine Umbenennung in „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase“ (PHGpx) vor. Sie vermuteten einen Zusammenhang zwischen der PHGpx und der bis dahin bekannten klassischen Glutathionperoxidase (Gpx1) (42). Nachdem man erkannt hatte, dass in vielen Spezies mehrere Gpx-Isoformen existieren, wurde die Gpx4-Nomenklatur aktualisiert und die PHGpx als Gpx4 in die Familie der Glutathionperoxidasen eingegliedert. Gegenüber anderen Vertretern der Gpx-Familie grenzt sich die Gpx4 durch verschiedene Eigenschaften ab. In Säugetieren verfügt die Gpx4 über ein Sec am aktiven Zentrum und zählt damit zu den Selenoproteinen. Ihr kommt ein hoher Stellenwert in der Hierarchie der Biosynthese der Selenoproteine zu, wobei nach Brigelius-Flohé R. (1999, (43)) gilt:  $Gpx2 > Gpx4 > Gpx1$ . Strukturell handelt es sich bei der Gpx4 um ein monomeres Protein (vgl. 1.3.2 Strukturelle Besonderheiten der Gpx4, S. 24) (3), das im Gegensatz zu anderen Gpx-Isoformen ein breites Substratspektrum aufweist (44). Substrate der Gpx4 können

sowohl kleine Peroxide wie  $H_2O_2$  als auch komplexe Phospholipid- und Cholesterolesterhydroperoxide sein. Diese komplexen Substrate werden auch dann reduziert, wenn sie nicht in freier Form, sondern als Bestandteil von Biomembranen oder Lipoproteinen vorkommen (41) (42) (45). Für die Katalyse kann die Gpx4 bei begrenzter Verfügbarkeit von GSH auf andere Reduktionsäquivalente wie z.B. Proteinthiole zurückgreifen (16). Beschrieben ist dies u.a. für Chromatin (46), das sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein (SMCP) (47) und die Gpx4 selbst (48). Andererseits konnten Ursini et al. (1999, (49)) die Gpx4 auch als unlösliche, enzymatisch inaktive Strukturkomponente in reifen Spermatozoen nachweisen. Unter oxidierenden Bedingungen besitzt die Gpx4 eine ausgeprägte Polymerisationstendenz. Diese



**Abb. 8:** Gewebespezifisches Silencing der Gpx4 in *in vivo*-Modellen mit Ausprägung pathologischer Phänotypen in den dargestellten Systemen. In Anlehnung an (60).

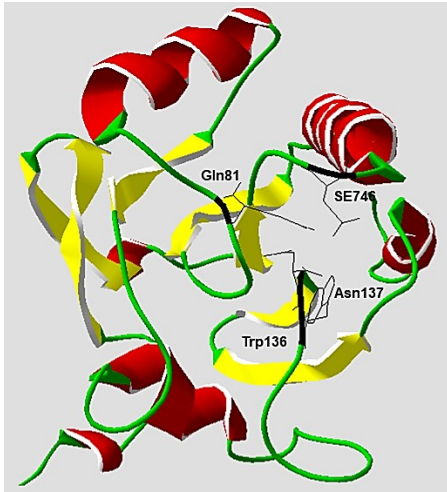
Eigenschaft scheint die Basis für die Beteiligung der Gpx4 bei der Bildung der mitochondrialen Kapsel im Rahmen der Spermenentwicklung zu sein (48) (49). Die Gpx4 ist an einer großen Anzahl physiologisch and pathophysiologisch bedeutsamer Prozesse beteiligt. So konnte eine Rolle des Enzyms bei der Embryogenese (50), der Spermatogenese (49), der Regulation redoxsensitiver Gene (51), der

Eicosanoidbiosynthese (52), der Apoptose (53) und der Ferroptose (reviewed in (54)) nachgewiesen werden. Pathophysiologisch wird die Gpx4 u.a. mit männlicher Infertilität (55) (56), neurodegenerativen Erkrankungen (57), Tumorangiogenese (58) und idiopathischer pulmonaler Fibrose (59) assoziiert. Maiorino et al. (2018, (60)) fassten in ihrem Review Untersuchungen zu gewebespezifischen Gpx4-Silencing in *in vivo*-Modellen zusammen, die zur Ausprägung verschiedener pathologischer Muster führten (Abb. 8).

### 1.3.2 Strukturelle Besonderheiten der Gpx4

Die Gpx4 ist ein monomeres Protein, das als zytosolische, mitochondriale und nukleäre Isoform vorkommt. Das Molekulargewicht variiert je nach Gpx4-Isoform. Die zytosolische Gpx4-Isoform weist ein Molekulargewicht von 19 Kilo-Dalton (kDa) auf. Kristallstrukturanalysen der rekombinanten humanen GPX4 von Scheerer et al. (2007, (61)) und Borchert et al. (2018, (3)) identifizierten ein typisches Thioredoxinmotiv für die selenfreie Sec46Cys-Mutante der humanen GPX4 und das selenhaltige rekombinante Wildtyp (WT)-Enzym. Dieses Motiv setzt sich





**Abb. 9: Quartärstruktur der monomeren Gpx4 am Beispiel der rekombinanten humanen SecGPX4 (PDB Eintrag 6ELW).**  $\alpha$ -Helices sind rot dargestellt,  $\beta$ -Faltblätter in gelb gekennzeichnet. Die Tetrade umfasst die Aminosäuren Sec46 (SE746), Gln81, Trp136 und Asn137. Darstellung mittels Swiss-PdbViewer 4.1.0 (26).

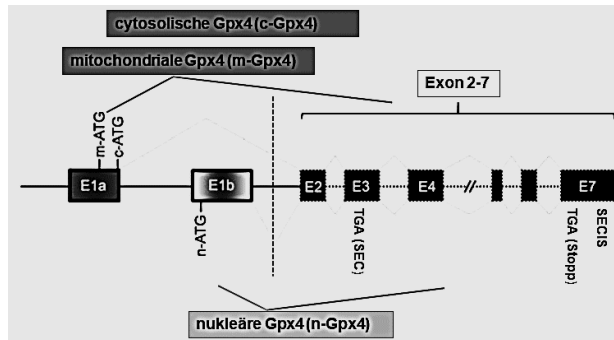
zusammen aus vier  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Faltblättern. Fünf dieser sieben  $\beta$ -Faltblätter bilden das zentrale  $\beta$ -Faltblattmotiv, welches strukturell sehr stabil ist. Die katalytische Tetrade (U46, Q81, W136, N137) findet sich in einer flachen Impression an der Oberfläche des Proteins (3) (61) (Abb. 9). Scheerer et al. (2007, (61)) identifizierten in den tetrameren Gpx-Isoformen einen Abschnitt von etwa 20 Aminosäuren, der in der dreidimensionalen Struktur dieser Enzyme einen Loop (Loop 1) bildet, in der GPX4 aber vollständig fehlt. Auch ein kürzerer Abschnitt von sechs Aminosäuren fehlt innerhalb der GPX4-Sequenz (Loop 2). Die Autoren vermuteten, dass Loop 1 der

tetrameren Gpx-Isoformen komplexen Hydroperoxiden den Zugang zum aktiven Zentrum versperren könnte (61). Da dieses Strukturelement bei der GPX4 fehlt, sollten komplexe Hydroperoxide ungehindert an das aktive Zentrum des Enzyms gelangen können und dort problemlos zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden.

### 1.3.3 Transkripte des *Gpx4*-Gens

Die Gpx4 wird in Säugetieren ubiquitär exprimiert (62) und kann dabei in verschiedenen subzellulären Kompartimenten (Zytosol, Mitochondrien, Zellkern) auftreten (44). Die primären Translationsprodukte der zytosolischen, der mitochondrialen und der nukleären Gpx4-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer proteinchemischen Eigenschaften. Alle drei Isoformen der humanen GPX4 werden durch ein gemeinsames *GPX4*-Gen kodiert, das auf dem langen Arm des Chromosom 19 (19p13.3) lokalisiert ist (63) und etwa 4.000 Basenpaare (bp) umfasst (57). Das humane *GPX4*-Gen setzt sich aus sieben Exons und sechs Introns zusammen. Diese genomische *Gpx4*-Organisation gilt als weithin konserviert unter Säugetieren (57). Die verschiedenen Gpx4-Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer N-terminalen Proteinsequenz. Diese Sequenz wird durch die Wahl verschiedener Translationsstartpunkte, die sich in zwei verschiedenen Exons (Exon 1a bzw. Exon 1b) befinden, bestimmt (44). Im Exon 1a liegen zwei funktionelle AUG-Startcodons (m-AUG, c-AUG). Beginnt die Translation der Gpx4-mRNA am m-AUG, das upstream des c-AUG liegt, resultiert die mitochondriale Gpx4 (m-Gpx4) (Abb. 10). Dieses Protein

enthält in seiner N-terminalen Region ein mitochondriales Transitpeptid, das durch das Exon 1a kodiert wird. Nach der Aufnahme in die Mitochondrien wird dieses Transitpeptid proteolytisch abgespalten (64), sodass die m-Gpx4 proteinchemisch nicht mehr von der zytosolischen Gpx4 (c-Gpx4) unterschieden werden kann. Beginnt die Translation der Gpx4-mRNA am c-AUG des Exon



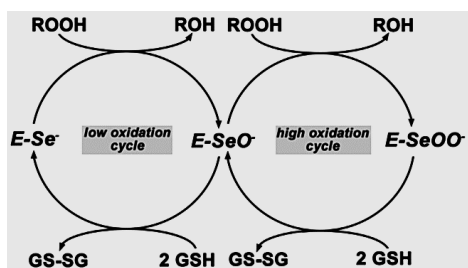
**Abb. 10: Strukturelle Organisation des *Gpx4*-Gens und Bildung der verschiedenen mRNA-Transkripte, die für die zytosolische, mitochondriale und nukleäre Gpx4-Isoform kodieren.** Modifiziert nach Savaskan et al. (2007, (57)).

1a wird die c-Gpx4 gebildet. Ein weiterer Translationsstartpunkt ist im alternativen Exon 1b lokalisiert (Abb. 10). Dieses Exon kodiert für ein nukleäres Importpeptid, welches für den Import der nukleären Gpx4 (n-Gpx4) bedeutsam ist (65). Exon 2 bis 7 kodieren für den Hauptteil aller drei Proteinisofomen. Exon 3 beinhaltet bei Säugetieren ein Sec-kodierendes UGA Triplet (63), während Exon 7 das Stop-

Codon UGA und das für den Einbau des Sec essentielle SECIS-Element enthält (19). An der Expressionsregulation der einzelnen Gpx4-Isoformen ist ein komplexes Netzwerk von cis- und transregulatorischen Transkriptionsfaktoren beteiligt. Auch posttranskriptionale Modifizierungen der Gpx4-Translationsprodukte werden in der Literatur diskutiert (57). Im Menschen findet sich neben der zytosolischen (hGPX4 Isoform D), der mitochondrialen (hGPX4 Isoform A) und der nukleären (hGPX4 Isoform C) Isoform noch eine weitere Gpx4-Isoform. Diese 227 Aminosäure lange Isoform wird als hGPX4 Isoform B bezeichnet und verfügt über einen verlängerten C-Terminus im Vergleich zur m-hGPX4. Diese Isoform enthält ebenfalls die mitochondriale Insertionssequenz, wobei deren Funktionalität bisher noch nicht untersucht werden konnte. Alternative Splicingmechanismen führen bei der Prozessierung des Primärtranskripts zu einer in-frame Verschiebung des Leserahmens, aus der die hGPX4 Isoform B resultiert (66).

### 1.3.4 Alternativer Katalysemechanismus der Gpx4

Als Enzym der Gpx-Familie wurde auch für die Gpx4 der unter 1.2.1 Definition und Katalysemechanismus beschriebene Reaktionszyklus (S. 18) angenommen. Borchert et al. (2018, (3)) schlugen eine Erweiterung dieses Katalysemechanismus vor. In der Kristallstruktur der rekombinanten, humanen SecGPX4 beobachteten sie ein zu Seleninsäure ( $\text{SeOO}^-$ ) oxidiertes Selenol ( $\text{Se}^-$ ) am aktiven Zentrum. Ähnliche Beobachtungen waren bereits für eine rekombinante Sec-Variante der Gpx1 publiziert worden (67). Basierend auf Strukturdaten und ihren



**Abb. 11: Erweiterter Reaktionsmechanismus der Gpx4 (3).** Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Beobachtungen schlugen Borchert et al. (3) vor, dass das Selen am aktiven Zentrum nicht nur zwischen den Oxidationsstufen Selenol und Selenensäure ( $\text{SeO}^-$ ) hin- und her pendelt (Abb. 11, **low oxidation cycle**). Sie postulierten einen zweiten Reaktionszyklus, bei dem sich das Selen zwischen den Oxidationsstufen der Selenensäure und der Seleninsäure ( $\text{SeOO}^-$ ) hin und her bewege (Abb. 11, **high oxidation cycle**). *In vivo* könnte

die Gpx4 damit als intrinsische Anpassung an oxidativen Stress vom low oxidation Zyklus in den high oxidation Zyklus übergehen. Eine einfache Reduktion der Seleninsäure zur Selenensäure würde das Enzym wieder in den kanonischen Katalysemechanismus einspeisen (3). Trotz Proteinpräparation unter stark reduzierenden Bedingungen (Anwesenheit starker Reduktionsmittel) ist bislang nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Seleninsäure in den Kristallstrukturen um einen Präparations- bzw. Kristallisationsartefakt handelt.

## 1.4 Der Zebrafisch

### 1.4.1 Natürliches Vorkommen und biologische Charakteristika

Der Zebrafisch (*Danio rerio*, *D. rerio*) ist ein Süßwasserfisch aus der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*), die zur Unterklasse der Knochenfische (*Teleostei*) zählt. Erstmals beschrieben wurde der Zebrafisch 1822 durch den schottischen Chirurgen Francis Hamilton. Zebrafische sind



**Abb. 12: Zebrafisch (69).** Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

klein (2 bis 3 cm) und weisen einen spindelförmigen Körperbau auf (Abb. 12). Charakteristisches Merkmal der Tiere ist ein alternierendes Muster heller und dunkler, horizontal verlaufender Streifen (68) (69). Zebrafischvorkommen wurden beschrieben für den indischen Subkontinent, Pakistan, Nepal, Bangladesch und

Myanmar. Natürlicher Lebensraum der Zebrafische sind seichte, langsam fließende oder stehende, klare Gewässer. Darüber hinaus findet sich der Zebrafisch auch in schlammig-trüben Gewässern, Reisfeldern oder Entwässerungsgräben. In Feldstudien konnten Zebrafische in Höhen von 5 m bis 1795 m über dem Meeresspiegel in Gewässern mit 6 °C bis 39 °C und pH-Werten zwischen 5,9 und 9,8 nachgewiesen werden (69) (70) (71) (72). *In natura* laichen die Weibchen während des Sommermonsuns meist zu Tagesanbruch. Dabei kann ein Weibchen mehrere hundert Eier auf

einmal ablegen (72). Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches verläuft rasch und kann durch die Umgebungstemperatur beeinflusst werden. Bei einer Temperatur von 28,5 °C beginnt etwa sechs Stunden nach der Befruchtung die Gastrulation (Keimscheibenstadium), nach 24 Stunden sind die meisten Organe angelegt und der Körperbauplan etabliert. Vor Ablauf der ersten 24 Stunden nach Befruchtung beginnt auch das Herz zu schlagen. In den nachfolgenden Stunden differenzieren Zelltypen und Organe weiter aus, sodass diese zunehmend ihre Funktion übernehmen können. Etwa zwei Tage nach Fertilisation schlüpft der Embryo, nach fünf Tagen kann die Zebrafischlarve bereits größere Strecken schwimmend zurücklegen und sich selbstständig Futter suchen. Fortpflanzungsreif sind die Zebrafische etwa drei bis vier Monate später, wobei ein Zebrafisch durchschnittlich etwa zwei bis vier Jahre lebt (68).

### 1.4.2 Genom des Zebrafisches

Der Zebrafisch ist ein viel genutzter Modellorganismus für Wirbeltiere, was insbesondere auf folgende Eigenschaften zurückzuführen ist: i) preisgünstige Haltung und Züchtung, ii) hohe Anzahl an Nachkommen, iii) leicht verfolgbare Embryonalentwicklung (Durchsichtigkeit der frühen Entwicklungsstufen), iv) vollständig sequenziertes Genom, v) einfache genetische Manipulierbarkeit (69). Das Genom des Zebrafisches umfasst 25 Chromosomen (68). Howe et al. (2013, (73)) konnten zeigen, dass für 70 % der menschlichen Gene mindestens ein orthologes Gen im Zebrafischgenom vorhanden ist. Umgekehrt haben 69 % der Zebrafischgene ein orthologes humanes Gen. Für etwa 80 % aller humanen Gene, die in der Vergangenheit mit bestimmten Erkrankungen assoziiert worden sind, findet sich ein orthologes Gen im Genom des Zebrafisches (73).

Für alle Knochenfische wird angenommen, dass sie aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind. Dieser lebte vor etwa 340 Millionen (Mio.) Jahren und erfuhr auf einer frühen Entwicklungsstufe eine Duplikation seines gesamten Genoms (73). Nach der Genomduplikation gingen einzelne duplizierte Gene wieder verloren, andere wurden durch Mutationen stark verändert und übernahmen andere Funktionen (68). Die Gpx-Familie des Zebrafisches umfasst die orthologen Gene, die für die humanen GPX-Isoformen 1 bis 4, 7 und 8 kodieren. Zusätzlich findet sich im Zebrafisch eine Gpx9. Für die Gpx1 (zfGpx1) und die Gpx4 des Zebrafisches (zfGpx4) gibt es jeweils zwei separate Genkopien, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und mit hoher Wahrscheinlichkeit das Resultat der frühen Genomduplikation sind. Für die anderen Gpx-Isoformen verschwand die zweite Genkopie im

Verläufe der Evolution des Zebrafisches wieder. Diese Daten deuten darauf hin, dass ein evolutionärer Selektionsdruck auf den duplizierten *gpx1*- und *gpx4*-Genen lastet. Für den Zebrafisch scheint es vorteilhaft zu sein, dass die Gpx1 und die Gpx4 von zwei unterschiedlichen Genen (*zfgpx1a* bzw. *zfgpx1b*, *zfgpx4a* bzw. *zfgpx4b*) kodiert werden.

Für die *gpx4*-Gene des Zebrafisches beobachteten Thisse et al. (2003, (74)) und Mendieta-Serrano et al. (2015, (75)) ein dynamisches Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung mit differenzieller Expression der *zfgpx4a* in der extraembryonalen yolk syncytial layer (YLS) und der *zfgpx4b* im Blastoderm. Im Verlauf der ersten 24 Stunden nach Fertilisation wurden die Enzyme zunehmend in langsamen Muskelfasern der Myotome exprimiert (74) (75). Beide Isoformen konnten ab dem fünften Tag nach Fertilisation im Darm und in der Leber, die *zfgpx4b* zusätzlich auch im Auge und im Gehirn nachgewiesen werden (74). Das Ausschalten der Genfunktion (Knockout) der *zfgpx4b* führte zum Entwicklungsstopp während der Gastrulation. Ein Knockout der *zfgpx4a* resultierte in einer deutlichen Abnahme des exprimierten Proteins erst ab der Segmentation (75). Mendieta-Serrano et al. konnten darüber hinaus eine Translokation der zytoplasmatisch exprimierten *zfgpx4* in den Zellkern zwischen dem 128- und 512-Zellstadium beobachten (75). Vermutlich handelt es sich hier um die *zfgpx4b*. Aufgrund des verwendeten Antikörpers für die Immunfluoreszenz, der ein in beiden *zfgpx4*-Isoformen hoch konserviertes Epitop erkennt, konnten die Autoren nicht abschließend zwischen *zfgpx4a* und *zfgpx4b* unterscheiden, auch, wenn die *zfgpx4a* während der Embryonalentwicklung ausschließlich extraembryonal exprimiert wird. In Übereinstimmung zu ihren Beobachtungen fanden sie mit einem Vorhersageprogramm (SeqNLS) in beiden *zfgpx4*-Isoformen potentielle nukleäre Importsignale.

### 1.5 Eukaryontische Zellkompartimente und Proteinsortierung

Eukaryontische Zellen weisen verschiedene Zellkompartimente auf (76). Die Plasmamembran umgibt das wässrige Zytosol mit den darin befindlichen Organellen und grenzt die Zelle von ihrer Umgebung ab (76) (77). Im Zellinneren finden sich neben dem rundlichen Zellkern (ca. 7 µm im Durchmesser) (77), der die genetische Information beherbergt, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Lysosomen, die Peroxisomen, verschiedene Endosomen und Mitochondrien. Das raue ER (rER) ist ein ausgedehntes, röhrenförmiges, Ribosomen-besetztes Membransystem, das maßgeblich an der Biosynthese von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen beteiligt ist (2) (76). Das glatte ER (gER) ist nicht mit Ribosomen besetzt. Es dient vor

allem der Lipidsynthese, der Biotransformation und fungiert als intrazellulärer Calciumspeicher (2). Der Golgi-Apparat ist ein komplexes System stapelförmig-angeordneter, flacher Zisternen. Hier erfolgt die Modifikation, Sortierung und Verpackung der am ER synthetisierten Proteine (2) (76). Als Endosomen bezeichnet man vakuoläre Organellen, die zunächst einen per Endocytose aufgenommenen Stoff aufnehmen (77). Lysosomen sind meist rundlich oder oval (ca. 0,5  $\mu\text{m}$  im Durchmesser) und dienen dem enzymatischen Abbau von Makromolekülen und Organellen. Peroxisomen sind ebenfalls rundliche Organellen (bis 1  $\mu\text{m}$  im Durchmesser), die u.a. am oxidativen Abbau von Lipiden, einigen Aminosäuren und Umweltgiften beteiligt sind (2) (77). Die schlauchförmigen Mitochondrien (ca. 0,5  $\mu\text{m}$  im Durchmesser) stellen den größten Teil des zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) bereit. Auch weitere Stoffwechselwege wie z.B. der Citratzyklus, die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, Teile des Harnstoffzyklus und die Hämbiosynthese erfolgen in den Mitochondrien (2) (77).

Damit innerhalb der Zelle synthetisierte Proteine an ihren jeweils richtigen Bestimmungsort gelangen, werden sie mit spezifischen Signalen ausgestattet (76). Es gibt verschiedenartige Sortierungssignale. Einige davon sind Bestandteile der primären Translationsprodukte und werden als Signalsequenzen bezeichnet. Andere werden im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung an Proteine angehängt (z.B. Glykosylierung). Signalsequenzen sind häufig N- bzw. C-terminale Peptidsequenzen. Sie können sich aber auch innerhalb einer Polypeptidkette befinden (76) (78). Sekretorische Proteine verfügen häufig über ein N-terminales Signalpeptid von 15 bis 30 Aminosäuren. Der N-Terminus ist meist positiv geladen. Das Mittelstück der Signalpeptide besteht vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren, während sich der C-Terminus vor allem aus polaren ungeladenen Aminosäuren zusammensetzt. Oftmals wird das Signalpeptid nach der Translokation an den Bestimmungsort durch Signalpeptidasen abgespalten. In unmittelbarer Umgebung (-1 bis -3 Aminosäuren) der Spaltstelle finden sich häufig kleine ungeladene Aminosäuren (78). Signalpeptide können zudem weitere Informationen zum Bestimmungsort des Proteins beinhalten wie Retentionssignale, die die Verweildauer eines Proteins in einem bestimmten subzellulären Kompartiment erhöhen. Ein solches Retentionssignal des ER ist beispielsweise die KDEL-Sequenz (Lysin (Lys, K), Aspartat (Asp, D), Glutamat (Glu, E), Leucin (Leu, L)) (76). Transitpeptide mitochondrialer Proteine sind dagegen weniger stark konserviert und relativ schlecht charakterisiert. Beobachtete Längen variieren zwischen 6 und 85 Aminosäuren. Typischerweise bilden Transitpeptide eine amphipathische  $\alpha$ -Helix und sind reich an Arginin (Arg, R), Ser und Alanin (Ala, A). Da auch Transitpeptide häufig nach Erreichen des Zielorganells abgespalten werden, können sich ggf. in näherer Umgebung des Spaltortes R-Reste

# 1. EINLEITUNG

befinden (reviewed in (78), (79)). Proteine mit nukleärer Lokalisation besitzen ein nukleäres Lokalisationssignal. Klassische nukleäre Lokalisationssignale weisen ein oder zwei Cluster basischer Aminosäure-Abfolgen auf (76). Eine Übersicht einiger bislang bekannter Eigenschaften von Sortierungssignalen findet sich in Tab. 3.

**Tab. 3: Typische Proteinsortierungssignale.** Modifiziert nach Graeve et al. (2014, (76)), Emanuelsson et al. (2007, (78)) und Bauer et al. (2015, (79)). AS = Aminosäuren.

Zielkompartiment	Lokalisation	Eigenschaften
Zellkern		klassisch: vorwiegend basische AS-Sequenz singulär oder als Cluster andere: - hydrophobe oder basische AS-Abfolge mit Prolin (P)- Tyrosin (Y) eingebettet zwischen positiv geladenen AS - duales Serinphosphoryliertes S-P-S-Motif
Kompartimente des sekretorischen Weges	N-terminal	- 15-30 AS - N-terminal positiv geladene AS - H-Region mit $\geq 6$ hydrophoben AS - C-terminal 3-7 polare, ungeladene AS - kleine, ungeladene AS um Spaltort (-1 bis -3 AS) - ggf. weitere Signale z.B. Retentionssignal (K-D-E-L)
Mitochondrium	N-terminal	- 6-85 AS - amphipathische $\alpha$ -Helix - reich an R, S, A - in Spaltortumgebung R-Reste
Peroxisomen	C-terminal N-terminal	- 10 AS peroxisomales Targetingsignal (PTS1) - 9 AS peroxisomales Targetingsignal (PTS2)
Lysosomen		- Mannose-6-Phosphat
Endosomen		- Tyr-X-X - L-L

## 1.6 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit teilt sich in zwei Themenkomplexe auf, in denen evolutionäre und enzymatische Aspekte der Gpx4 untersucht wurden. Beide Themenkomplexe wurden zeitlich überlappend bearbeitet.

**1.) Untersuchung zu evolutionären Aspekten der Gpx4.** Die Gpx4 ist ein Enzym aus der Familie der Glutathionperoxidasen, deren Evolutionsgeschichte bereits in der Vergangenheit mehrfach adressiert wurde. Die derzeit existierenden Hypothesen zum Ursprung und zur Evolution der Gpx4 sind sehr verschieden und eine konzertierte Theorie konnte bislang noch nicht gefunden werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine umfangreiche Datenbankrecherche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen in irdischen Lebewesen und Viren vorgenommen, die nachfolgende Fragen beantworten sollte: (i) In welchen Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, *Archaea*, Eukaryonten) verfügen Lebewesen über Gpx4-Sequenzen? (ii) Finden sich Gpx4-Sequenzen auch in Viren und wie groß ist deren Verbreitung? (iii) Ist die Gpx4 ein typisches Protein der jeweiligen Lebensformen oder kommen solche Sequenzen nur bei wenigen Vertretern der entsprechenden Gattungen vor? (iv) Weisen die verschiedenen Gpx4-Sequenzen Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede auf? (v) Lassen sich aus den vorliegenden Sequenzdaten phylogenetische Beziehungen ableiten?

**2.) Untersuchungen an Gpx4-Paralogen des Zebrafisches.** In Folge einer Genomduplikation, die sehr früh in der Evolution der Fische erfolgte, verfügt der Zebrafisch über zwei separate *gpx4*-Gene (*zfgpx4a* und *zfgpx4b*). Beide kodieren für funktionelle Selenoproteine, deren rekombinante Expression sich *in vitro* im Allgemeinen schwierig gestaltet (80). In der Literatur finden sich daher nur unzureichende Angaben zu den katalytischen Eigenschaften der zfGpx4-Isoformen. Um diese Lücke zu schließen, sollten im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte zfGpx4-Isoformen als rekombinante Proteine exprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften näher charakterisiert werden. Dabei sollten folgende Fragen experimentell beantwortet werden: (i) Ist die Expression der zfGpx4-Isoformen als funktionelles, rekombinantes Selenoprotein möglich? (ii) Sind die beiden Gpx4-Paraloge des Zebrafisches (zfGpx4a, zfGpx4b) katalytisch aktiv? (iii) Welche basalen enzymatischen Eigenschaften weisen die beiden zfGpx4-Paraloge auf? Existieren Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede? (iv) Welche Auswirkungen haben gezielte Punktmutationen auf katalytische Eigenschaften der Isoenzyme? (v) Weisen die verschiedenen zfGpx4-Isoformen differentielle Expressionsmuster während der Individualentwicklung auf? (vi) In welchen Kompartimenten der Zelle werden die zfGpx4-Isoformen exprimiert? (vii) Welche physiologische Bedeutung und Relevanz haben die beiden Gpx4-Paraloge für den Zebrafisch?



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
30 % Acrylamide/Bis solution	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Agarose	Promega (Mannheim, Deutschland); SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Alanin (Ala, A)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin (Amp)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Arginin (Arg, R)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Asparagin (Asn, N)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aspartat (Asp, D)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Biotin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Chlorophorm	Baker (Deventer, Niederlande)
Cobaltchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat-Triphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glutamin (Gln, Q)	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Glutamat (Glu, E)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glutathionreduktase (GR)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycerol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin (Gly, G)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Histidin (His, H)	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Imidazol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isoleucin (Ile, I)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin (Kan)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kupferchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Cystein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Leucin (Leu, L)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Selenocystin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Lysin (Lys, K)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magnesiumacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Manganesechlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methanol	VWR Chemicals (Darmstadt, Deutschland); Fisher Scientific (Loughborough, England)
Methionin (Met, M)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumsuccinat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natrium-Tetraborat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Nicotinamid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Phenylalanin (Phe, F)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Prolin (Pro, P)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Rifampicin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Serin (Ser, S)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
<i>tert</i> -butyl-Hydroperoxid (TBHP)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Thiamin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Threonin (Thr, T)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris-HCl	AppliChem (Darmstadt, Deutschland); Merck (Darmstadt, Deutschland)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP), 0,5 M	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypton	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tryptophan (Trp, W)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tyrosin (Tyr, Y)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Uracil	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Valin (Val, V)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
Zinkchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

### 2.1.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer, Lösungen, Nährmedien	Zusammensetzung
<b>Expression</b>	
LB-Medium	20 g LB-Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf 1000 ml Wasser
LB-Agar	14 g LB-Agar (Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf 400 ml Wasser
SOC-Medium	10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose; 20 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt
M9-Medium	13,1 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 g/l Natriumacetat; 2,75 g/l Natriumsuccinat; 0,435 g/l Magnesiumacetat; 0,01 g/l Calciumchlorid; 100 ml/l 10x Aminosäure-Stock; 2 g/l Ammoniumchlorid; 10 g/l Glycerol; 10 g/l Glucose; 100 ml/l 100x Spurenelemente; 0,1 g/l Nicotinamid; 0,05 g/l Thiamin; 0,0005 g/l Biotin
10x Aminosäure-Stock	0,4 g/l Alanin; 0,4 g/l Arginin; 0,1 g/l Asparagin; 0,25 g/l Aspartat; 0,4 g/l Glutamin; 0,4 g/l Glutamat; 0,4 g/l Glycin; 0,1 g/l Histidin; 0,1 g/l Isoleucin; 0,1 g/l Leucin; 0,1 g/l Lysin; 0,25 g/l Methionin; 0,05 g/l Phenylalanin; 0,1 g/l Prolin; 0,4 g/l Serin; 0,1 g/l Threonin; 0,05 g/l Tryptophan; 0,1 g/l Tyrosin; 0,05 g/l Valin; 0,125 g/l Uracil
100x Spurenelemente	40 nM Borsäure; 3 nM Cobaltchlorid; 0,1 nM Kupferchlorid; 8 nM Manganesechlorid; 1 nM Zinkchlorid
Waschpuffer	10 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 g/l Natriumacetat
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1 l Wasser; pH 7,4

## 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose</b>	
Lysepuffer	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 5 mM TCEP
Waschpuffer	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Elutionspuffer A	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 300 mM Imidazol
Elutionspuffer B	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol
<b>Entsalzung</b>	
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 0,5 mM TCEP; 10 % Glycerol
<b>Gelelektrophorese</b>	
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA-Natriumsalz; 29,6 mM Essigsäure; pH 8,5
<b>SDS-Elektrophorese</b>	
Ammoniumpersulfatlösung 10 % (APS 10 %)	0,5 g APS auf 5 ml Wasser
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS, pH 6,75
Sammelgel	1,35 ml 30 % Acrylamide/Bis Lösung; 2,5 ml Sammelgelpuffer; 6 ml Wasser; 20 µl Temed; 100 µl 10 % APS-Lösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 0,6 % SDS; pH 8,8
12,5 % Trenngel	5 ml 30 % Acrylamide/Bis Lösung; 3 ml Trenngelpuffer; 4 ml Wasser, 20 µl Temed; 120 µl 10 %-ige APS-Lösung
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS (v/v); pH 8,3
<b>Enzymkinetiken</b>	
Standardlösung	100 mM Tris-HCl (pH 7,6); 5 mM EDTA (pH 8); 10 % Triton-X-100; 3 mM GSH; 0,2 mM NADPH; 1 Unit (U) Glutathionreduktase (100-300 (U/mg)); Gpx4-Proteinlösung zu 2-50 (µg/ml)
10 % Triton-X-100	1 g Triton-X-100 auf 10 ml Wasser
0,1 M HCl	83 µl 37 %-ige HCl auf 10 ml Wasser
0,1 mM HCl	10 µl 0,1 M HCl auf 10 ml Wasser
300 mM GSH	0.0922 g in 1 ml 0.1 mM HCl
0,1 % NaHCO <sub>3</sub>	0.01 g NaHCO <sub>3</sub> in 10 ml Wasser
20 mM NADPH	0,0167 g in 1000 µl 0,1 % NaHCO <sub>3</sub>
<b>PCOOH Präparation</b>	
0,05 mM Boratpuffer	2,0 g Natrium-Tetraborat auf 200 ml Wasser; pH 9,0
Natriumdesoxycholat 10 %	0,4 g Natriumdesoxycholat auf 4 ml Wasser
L-α-Phosphatidylcholin-Lösung (50 mg/ml)	0,2 M Tris-HCl Puffer pH 8,5; 3 % Natriumdesoxycholat
HPLC-Lösungsmittel	900 ml Methanol; 100 ml Wasser; 77 mg Ammoniumacetat
<b>Thermostabilität</b>	
Pufferlösung	entspricht Elutionspuffer zur Entsalzung

**Zellkultur**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Opti-Minimum Essential Medium (MEM)	Life Technologies (Paisley, England)

2.1.3 Enzyme und Kits

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
Advantage 2 Polymerase	Clontech Laboratories (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
MyTaq DNA Polymerase	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
Pfu Turbo DNA Polymerase	Invitrogen (Hilden, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen (NdeI, XhoI, BamHI, EcoRI, DpnI)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Soja-Lipoxygenase	Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Promega (Madison, USA)

<b>Kits</b>	<b>Firma</b>
Advantage 2 PCR Enzyme Systems	Clontech Laboratories (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
GeneJET Gel extraction kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
LigaFast Rapid DNA Ligation System	Promega (Madison, USA)
MyTaq DNA Polymerase	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
NucleoSPin Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Invitrogen (Hilden, Deutschland)
SensiMix SYBR No-Rox Kit	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
TransIT-LT1 Transfection Reagent	Mirus (Madison, USA)

2.1.4 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Firma</b>
pCR2.1-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pET-15b	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pEGFP-N1	Clontech Laboratories (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
pmCherry-N1	Clontech Laboratories (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

2.1.5 Marker und Färbelösungen

<b>Marker, Färbelösungen</b>	<b>Firma</b>
100 bp DNA ladder	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
1 kB DNA ladder	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
PageBlue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
ProSieve Pro Tack Dual Color Protein Loading Buffer (4X), 20X Reducing Agent	Lonza (Köln, Deutschland)
5000X SYPRO Orange Dye	Life Technologies (Carlsbad, USA)

2.1.6 Bakterienstämme und Zelllinien

<b>Bakterien</b>	<b>Firma</b>
XL1-Blue	Stratagene (La Jolla, USA)
BL21 (DE3)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
<b>Bakterien</b>	<b>Bereitstellung</b>
BL21 (DE3) <i>selB::kan cys51E</i>	AG Scheerer (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland)

<b>Zelllinien</b>	<b>Firma</b>
COS7-Zellen	ATTC (Manassas, USA)

2.1.7 Geräte und Gebrauchsware

<b>Gebrauchsware</b>	<b>Hersteller</b>
8-well Chambered Coverglass, Lab-Tek155411	Thermo Fischer Scientific (Braunschweig, Deutschland)
Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Diveces	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Econo-Pac 10DG Columns	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HPLC-Säule NUCLEODUR CC250/4, C18, 5 µm	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Elektrophorese-Zubehör	Biometra (Göttingen, Deutschland); Hofer Inc. (Sulzbach, Deutschland)
BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
EVOS-System Imager	Thermo Fisher Scientific (Leihgerät)
HPLC	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Inkubationsschüttler	Infors HT (Einsbach, Deutschland); Gallenkamp (Loughborough, England)
Inkubator Zellkultur	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Photometer	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Rotationsverdampfer	Van der Heijden Labortechnik GmbH (Dörentrup, Deutschland)
Rotor-Gene 3000	Corbett Research (Mortlake, Australien)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallsonde	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, Deutschland)
UV Transilluminator Ti5	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vortex	Janke & Kunkel GmbH (Staufen, Deutschland)
Wasserbad	Haake F3 Fisons (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrifugen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland); Eppendorf (Hamburg, Deutschland); Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland)

### 2.1.8 Computerprogramme

<b>Programm</b>	<b>Betreiber; Webseite</b>
BLAST	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine; <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
bSECISearch	Department of Biochemistry, University of Nebraska-Licolln; <a href="http://genome.unl.edu/bSECISearch/">http://genome.unl.edu/bSECISearch/</a>
Clustal Omega (1.2.4)	EMBL-EBI; <a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
MEGA-X	Molecular Evolutionary Genetics Analysis; <a href="https://www.megasoftware.net/">https://www.megasoftware.net/</a>
NucPred	Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm University; <a href="https://nucpred.bioinfo.se/cgi-bin/single.cgi">https://nucpred.bioinfo.se/cgi-bin/single.cgi</a>

## 2. MATERIAL UND METHODEN

PhyML 3.0	Institut Français de Bioinformatique (IFB) und France Génomique; <a href="http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/">http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/</a>
PREDiction of Signal peptides (PrediSi)	Institut für Mikrobiologie, Technisch Universität Braunschweig; <a href="http://www.predisi.de/">http://www.predisi.de/</a>
Rotor-Gene Monitor Software (Version 4.6)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Selenoprotein prediction server	Mariotti M, Lobanov A; <a href="http://gladyshevlab.org/SelenoproteinPredictionServer/">http://gladyshevlab.org/SelenoproteinPredictionServer/</a>
SeqNLS	Lin JR, Hu J. Machine Learning & Evolution Laboratory, University of South Carolina; <a href="http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/">http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/</a>
Signal P-5.0	Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU; <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
Software Packet DNASTAR	DNASTAR
SPSS Statistics 25	IBM
SWISS-MODEL	Biozentrum, University of Basel, The Center for Molecular Life Sciences; <a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>
Swiss-PdbViewer 4.1.0	Swiss Institute of Bioinformatics; <a href="https://spdbv.vital-it.ch/">https://spdbv.vital-it.ch/</a>
Target P-2.0	Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU; <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>
T-Coffee	Centre for Genomic Regulation (CRG) of Barcelona; <a href="http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular">http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular</a>
TimeTree Datenbank	Institute for Genomics and Evolutionary Medicine, Center of Biodiversity, Temple University; <a href="http://www.timetree.org/">http://www.timetree.org/</a>

## 2.2 Datenbankrecherche zu evolutionären Aspekten der Gpx4

### 2.2.1 Untersuchung zur Gpx4 in irdischen Lebensformen

Die GPX4 ist eine der acht verschiedenen Glutathionperoxidasen, die beim Menschen vorkommen. Eine Datenbankrecherche zum Vorkommen der Gpx4 in irdischen Lebensformen wurde mit Hilfe des auf der Plattform des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> bereitgestellten BLAST-Programmes (81) (82) im Juli 2020 und Januar bzw. Februar 2021 vorgenommen. Als Suchsequenz diente die gesamte Aminosäuresequenz der humanen, mitochondrialen GPX4 Isoform A (NP\_002076.2). Unter den in der Proteindatenbank hinterlegten Referenzsequenzen (Reference Sequences (RefSeq)) von Viren, *Archaea*, Bakterien, Pflanzen und Pilzen sowie verschiedenen Vertretern des Tierreiches



wurde nach Gpx4-ähnlichen- bzw. Gpx4-Sequenzen gesucht. Für die Suche wurde die Funktion „Sequenzabschnitte geringerer Komplexität maskieren“ genutzt und „uncultured/environmental sample sequences“ ausgeschlossen. Treffer mit einer Sequenzidentität kleiner 30 %, einer Länge von weniger als 170 Aminosäuren oder mehr als 300 Aminosäuren sowie fehlender katalytischer Tetrade blieben unberücksichtigt. Als Treffer gewertet wurden „glutathione peroxidase“, „glutathione peroxidase 4“, „glutathione peroxidase family protein“, „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase“, „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like“ und „uncharacterized protein“ sowohl als „putative“, „probable“, „predicted“ als auch „low quality“ Sequenz. Ausgeschlossen wurden dagegen „hypothetical“ Sequenzen, explizit benannte andere Gpx-Isoformen oder explizit benannte andere Enzyme. Um das Vorhandensein einer katalytischen Tetrade zu prüfen, erfolgten Multiple Sequence Alignments mit dem BLAST-Programm. Detailliertere Sequenzalignments verschiedener willkürlich ausgewählter Treffer aus den unterschiedlichen taxonomischen Gruppen wurden unter Verwendung von Clustal Omega 1.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) erstellt (83). Für vergleichende Alignments mit anderen Gpx-Isoformen wurden folgende humane GPX-Isoformen genutzt: hGPX1 Isoform 1 (NP\_000572.2), hGPX2 (NP\_002074.2), hGPX3 Isoform 1 und 2 (NP\_002075.2, NP\_001316719.1), hGPX4 Isoform A (NP\_002076.2), hGPX5 Isoform 1 (NP\_001500.1), hGPX6 (NP\_874360.1), hGPX7 (NP\_056511.2) und hGPX8 Isoformen a und X1 (NP\_001008398.2, XP\_006714694.1).

### 2.2.2 Phylogentische Untersuchungen

Die Rekonstruktion phylogenetischer Beziehungen zwischen verschiedenen Gpx4-ähnlichen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software Pakete T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>) (84) und PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (85). Anhand der mit T-coffee bestimmten gewichteten Transitive Consistency Scores (TCS) wurde in PhyML 3.0 ein phylogenetischer Baum mit 500 Bootstrap-Wiederholungen generiert. Zur Erstellung einer Zeitachse wurde das Programm MEGA-X (86) genutzt. Die Zeitkalibrierungen erfolgte am Beispiel von *Meleagris gallopavo* und *Gallus gallus domesticus* (*G. gallus domesticus*) sowie *Crocodylus porosus* und *Pogona vitticeps*, wobei entsprechende Zeitintervalle der TimeTree Datenbank (<http://www.timetree.org/>) (87) entnommen wurden.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Ausgangspunkt für Klonierungen in Zielvektoren wie pET-15b (Merck, Darmstadt, Deutschland), pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) und pmCherry-N1 (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) bildeten die Sequenzen bzw. Sequenzabschnitte der zfGpx4a Isoform 2 (NM\_001007282.1, NP\_001007283.2), der zfGpx4b (NM\_001030070.2, NP\_001025241.2) und der murinen, mitochondrialen-Gpx4 (murine m-Gpx4) (NM\_008162.3), die von der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>) heruntergeladen wurden.

### 2.3.1 Primerkonstruktion und Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der PCR synthetisieren Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Polymerasen ausgehend von Oligonukleotiden, den Primern, komplementäre Einzelstränge eines zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes (2). Die nötigen Primer (Tab. 4) wurden so konstruiert, dass sie jeweils komplementär an den Enden der DNA-Sequenzen des entsprechenden Gens binden und die für eine spätere Umklonierung in die Zielvektoren benötigten Erkennungssequenzen ausgewählter Restriktionsenzyme am 5'- bzw. 3'- Ende der Primersequenzen beinhalten.

**Tab. 4: Primersequenzen zur Proteinexpression (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin).**

Primer	Primersequenz 5'-3'	Insert (bp)
<b>Klonierung in pET-15b</b>		
NdeI zfGpx4a up	CAT ATG CGT TTC TTA GGG TCT GCT GTC	570
XhoI zfGpx4a do	CTC GAG TTA GAG ATA TTT AGA AAG ATC CTT CTC	
NdeI zfGpx4b up	CAT ATG TGG TTG TTT CAG AGA GCG CTG	585
BamHI zfGpx4b do	GGA TCC CTA CAG GTA CTT GGG AAG ATC CTT	
NdeI zfGpx4a ATG 49 up	CAT ATG TCT GCA CAG CTA GAG GAC TG	513
XhoI zfGpx4a do	CTC GAG TTA GAG ATA TTT AGA AAG ATC CTT CTC	
NdeI zfGpx4b ATG 64 up	CAT ATG GCT GCC CAA GCC AAT GAC TG	513
BamHI zfGpx4b do	GGA TCC CTA CAG GTA CTT GGG AAG ATC CTT	

Für spätere Proteinexpressionen der zfGpx4-Isoformen wurde mit dem Advantage 2 PCR Enzyme System (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) gearbeitet. Als Template diente kodierende DNA (cDNA) aus adulten Zebrafischen. Eine PCR der am 5'- Ende um 48 bzw. 63 bp verkürzten zfGpx4-Isoformen erfolgte an mutierter cDNA der zfGpx4-Isoformen im pET-15b-Vektor. Es wurden 25,0 µl Ansätze mit 0,3 µl bis 1,0 µl Template, je 1,0 µl Primer up und Primer do (je 5 µM), 0,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), 2,5 µl 10X Advantage 2

A		B	
1. Vordenaturierung	95 °C 90 s	1. Vordenaturierung	95 °C 5 Min
2. Denaturierung	95 °C 30 s	2. Denaturierung	95 °C 15 s
3. Annealing	68 °C 60 s	3. Annealing	67 °C 15 s
4. Elongation		4. Elongation	72 °C 10 s
5. Nachelongation	68 °C 3 Min	5. Nachelongation	72 °C 5 Min

Abb. 13: PCR-Programme. (A) Advantage 2 Polymerase-PCR. (B) MyTaq Polymerase PCR.

PCR Buffer, 0,3 µl 50X Advantage 2 Polymerase Mix und Wasser add 25,0 µl vorbereitet. Die PCR-

Reaktion erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland). Abb. 13 A fasst das verwendete PCR-Programm zusammen. Für Untersuchungen subzellulärer Lokalisationen wurden Abschnitte der 5'-UTR bis einschließlich eines zweiten Methionin (Met, M)-kodierenden ATGs der kodierenden Sequenz der zfGpx4-Isoformen und der murinen m-Gpx4 mittels MyTaq DNA Polymerase (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) amplifiziert. Als Template dienten adulte zf-cDNA und WT-cDNA aus den Hoden der Maus. Die PCR der 25,0 µl Ansätze zu 1,0 µl Template, je 2,0 µl Primer up und Primer do (je 5 µM), 12,5 µl MyTaq Polymerase Mix und 7,5 µl Wasser erfolgte entsprechend des Programmes aus Abb. 13 B. PCR-Produkte wurden im Anschluss in Agarosegelen aufgetrennt.

Tab. 5: Primersequenzen zur subzellulären Lokalisation (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin).

Primer	Primersequenz 5'-3'	Insert (bp)
<b>Klonierung in pEGFP und pmCherry</b>		
EcoRI Exon 1 zfgpx4a up	GAA TTC TGT AAT TCG CTG TCT GCT GTT TCA G	109
BamHI Exon 1 zfgpx4a do	GGA TCC ATA GTC TGC AAC ACT AGA GAG AAA AC	
EcoRI Exon 1 zfgpx4b up	GAA TTC GTG GTC TTG TGC CGC AGT GCT A	104
BamHI Exon 1 zfgpx4b do	GGA TCC ATT GCT CTG GCG AAG CTC TTG CT	
EcoRI Exon 1 mus musculus up	GAA TTC CAG GGG CCT CGC GTC TTA GCG	239
BamHI Exon 1 mus musculus do	GGA TCC ATG GTG CCT GCC AGA CCA GGC	

### 2.3.2 Klonierung und Transformation

Unter einer Klonierung wird der Einbau einer DNA-Sequenz in einen Vektor verstanden, der die Vervielfältigung dieser Sequenz ermöglicht (88). Die in der PCR synthetisierte cDNA wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in den pCR2.1-TOPO Vektor kloniert. Hierfür wurden Ansätze zu 6,0 µl mit 3,0 µl bis 4,0 µl PCR-Produkt, 0,5 µl pCR2.1-TOPO Vektor, 1,0 µl Salzlösung und Wasser add 6,0 µl für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der TOPO TA Klonierung erfolgte eine Aufreinigung der cDNA-Sequenzen der verkürzten zfGpx4-Isoformen sowie der cDNA-Sequenzen aus der MyTaq Polymerase PCR mittels DNA-Extraktion aus Agarosegelen. Verwendet wurden das GeneJET Gel Extraction Kit

(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bzw. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Es wurde entsprechend der Herstellervorgaben vorgegangen und cDNA mit 25 µl bis 50 µl des jeweiligen Elutionspuffers eluiert. Eine Aufreinigung per DNA-Extraktion war insbesondere aufgrund von Farbstoffen im MyTaq Polymerase System nötig.

Ligierte Plasmid-DNA kann in kompetente Zellen transformiert werden (88). Im Rahmen dieser Arbeit wurden XL1-Blue Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) für Routineklonierungen verwendet, während die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) (Life Technologies, Carlsbad, USA) und BL21(DE3)*selB::kan cys51E* (AG Scheerer, Charité-Universitätsmedizin Berlin) für Expressionsversuche genutzt wurden. Bei allen Transformationen wurde eine variable Menge an Plasmid-DNA in 100 µl chemisch kompetenter Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden im 42 °C warmen Wasserbad (Haake F3 Fisons, Karlsruhe, Deutschland) mit anschließender einminütiger Inkubation der Proben auf Eis, was die Aufnahme der Plasmid-DNA über die nun poröse Bakterienmembran erleichtern sollte. Nach Zugabe von je 300 µl bis 500 µl SOC-Medium wurden die Ansätze für eine Stunde bei 180 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 37 °C im Schüttler (Infors AG, Einsbach, Deutschland) inkubiert und abschließend auf entsprechenden Antibiotika-haltigen Luria-Broth (LB)-Agarplatten ausplattiert. Die Antibiotikabeschichtung erlaubt eine Selektion der Plasmid-tragenden Bakterienzellen, da die Plasmide ein Antibiotikaresistenzgen besitzen, welches den Wirtszellen eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum verleiht (2).

### 2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA, Restriktionsverdau und Gensequenzierung

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten XL1-Blue Zellen wurden Bakterienklone in Flüssigkulturen zu je 2,5 ml bis 5,0 ml LB-Medium mit 2,5 µl bis 5,0 µl Ampicillin (Amp) (100 mg·ml<sup>-1</sup>) bzw. Kanamycin (Kan) (50 mg·ml<sup>-1</sup>) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm sowie auf einer entsprechenden LB-Agarplatte bei 37 °C im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) angezüchtet. Die Präparation der Plasmid-DNA aus den Flüssigkulturen erfolgte am Folgetag mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bzw. dem NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Plasmid-DNA wurde mit je 50 µl Wasser eluiert. Um die isolierte Plasmid-DNA auf das Vorhandensein des interessierenden Inserts zu überprüfen, wurde eine Spaltung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen angeschlossen. Diese Enzyme besitzen

spezifische Erkennungssequenzen und können am Ort ihrer Erkennungssequenz doppelsträngige DNA spalten. Dabei entstehen DNA-Fragmente definierter Längen (2) (88). In Abhängigkeit vom jeweiligen Plasmid wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen wie EcoRI, NdeI, XhoI und BamHI (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in 10,0 µl Ansätzen zu 1,0 µl bis 2,0 µl Plasmid-DNA, 0,25 µl pro Restriktionsendonuklease, 1,0 µl 10X FastDigest Green Buffer und Wasser add 10,0 µl bei 37 °C im T3 Thermocycler für mindestens 30 Minuten inkubiert. Das Auftreten von DNA-Fragmenten, die für Insert-tragende Plasmid-DNA jeweils spezifisch sind, wurde durch Auftrennung der Proben in einem 2 %-igen Agarosegel kontrolliert. Insert-tragende Plasmid-DNA wurde abschließend mittels Gensequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) überprüft.

### 2.3.4 Orstgerichtete Mutagenese

Die WT-zfGpx4-Isoformen sind Selenoproteine. Für nachfolgende Proteinexpressionsversuche wurden die Sec an den aktiven Zentren der Enzyme in Cys und alle weiteren Cys-Reste in Ala als Redox-insensitive Aminosäure mutiert. Die SecCys-Mutation und Mutationen weiterer Cys der zfGpx4-WT-Isoformen sind dabei fundamental für die gewählte Selenoprotein-Expressionsstrategie. Punktmutationen erfolgten mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen, Hilden, Deutschland). Bei diesem System verlängert eine DNA-Polymerase ausgehend von Primern, die die gewünschte Mutation enthalten und sich komplementär an die gegenüberliegenden DNA-Stränge eines Plasmids anlagern, die einzelnen Stränge der Plasmid-DNA. Durch Einfügen der Primer in die synthetisierten Stränge entstehen mutierte Plasmide (88).

zfGpx4a Isoform 2	----MRFLGSAVVFSLVLQTM <sup>Q</sup> SAQLEDW <sup>Q</sup> TAKSIYEFTATDIDGNEVSL <sup>E</sup> KYRGK <sup>V</sup> W <sup>I</sup> I	55
zfGpx4b	MWLFQRALLVGVGSKSFARAN <sup>C</sup> QANDWQSAKSIYEFSAIDIDGNDVSL <sup>E</sup> KYRGV <sup>C</sup> I	60
zfGpx4a Isoform 2	TNVASK <sup>G</sup> IKTPVNY <sup>S</sup> QFAEMHAKYSE <sup>R</sup> GLRILAF <sup>P</sup> SNQFGR <sup>Q</sup> EPGTNSQI <sup>E</sup> FAKSYNAE	115
zfGpx4b	TNVASK <sup>G</sup> IKTPVNY <sup>T</sup> QLAAMHV <sup>T</sup> YAEKGLRILGF <sup>C</sup> QFGR <sup>Q</sup> EPGSEAEI <sup>E</sup> FAKGYNAE	120
zfGpx4a Isoform 2	FDMFSKIDVNGDGAHPLWK <sup>L</sup> KDQ <sup>P</sup> NGKGF <sup>L</sup> NGI <sup>K</sup> IN <sup>N</sup> FTKFLINREGQV <sup>K</sup> KRYSPL <sup>Q</sup> DP	175
zfGpx4b	FDLFSKIDVNGDAAHPLWK <sup>M</sup> KEQ <sup>P</sup> KGRG <sup>T</sup> LGN <sup>N</sup> IK <sup>N</sup> FTKFLIDREGQV <sup>K</sup> KRYGPM <sup>D</sup> DP	180
zfGpx4a Isoform 2	SVVEK <sup>D</sup> LSKYL	186
zfGpx4b	SVVEK <sup>D</sup> LPKYL	191

Abb. 14: Aminosäuresequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b. Markiert sind die katalytische Tetrade (Kästen) und Cysteine der zfGpx4b (Kreise).

Als Template der Mutagenese dienten die WT-zfGpx4-Isoformen im pCR2.1-TOPO Vektor. Da die Sequenz der zfGpx4b

insgesamt drei Cys aufweist (Abb. 14), erfolgten nach der SecCys-Mutation am aktiven Zentrum konsekutiv die weiteren CysAla-Mutationen. Die Mutagenese-Primer fasst Tab. 6 zusammen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 6: Primersequenzen für die QuikChange Site-Directed Mutagenesis der WT-zfGpx4-Isoformen (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin).**

Primer	Primersequenz 5`-3`
zfGpx4aSec62Cys up	CGT TGC CTC CAA ATG TGG TAA AAC CCC AGT AAA C
zfGpx4aSec62Cys do	GTT TAC TGG GGT TTT ACC ACA TTT GGA GGC AAC G
zfGpx4bSec67Cys up	CAC AAA CGT AGC CTC TAA ATG TGG TAA AAC TCC AGT AAA C
zfGpx4bSec67Cys do	GTT TAC TGG AGT TTT ACC ACA TTT AGA GGC TAC GTT TGT G
zfGpx4bCys23Ala up	CGC CAG AGC AAT GGC TGC CCA AGC CAA TGA C
zfGpx4bCys23Ala do	GTC ATT GGC TTG GGC AGC CAT TGC TCT GGC G
zfGpx4bCys58Ala up	GAA ATA CAG GGG TTA TGT GGC TAT CAT CAC AAA CGT AGC C
zfGpx4bCys58Ala do	GGC TAC GTT TGT GAT GAT AGC CAC ATA ACC CCT GTA TTT C
zfGpx4bCys96Ala up	CCT GGG CTT CCC CGC CAA CCA GTT CGG AAA G
zfGpx4bCys96Ala do	CTT TCC GAA CTG GTT GGC GGG GAA GCC CAG G

Für die PCR wurden 25,0 µl Ansätze à 1,0 µl Template (25 ng·µl<sup>-1</sup>), 12,5 µl 2X PfuUltra II PCR Mix, je 1,0 µl up und do Primer (5 µM) und Wasser add 25,0 µl hergestellt. PCR-Reaktionen erfolgten mit 60 s Vordenaturierung bei 95 °C, 17 Zyklen zu 30 s Denaturierung bei 95 °C, 60 s Annealing bei 55 °C und 10 Minuten Elongation bei 68 °C. Nach der PCR wurden die einzelnen Ansätze mit 1,0 µl DpnI (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Endonuklease DpnI erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte Plasmid-DNA, die z.B. aus *E.coli*-Stämmen isoliert wurde und verdaut diese WT-DNA (86). Jeweils 8,0 µl der DpnI-behandelten PCR-Produkte wurden in XL1-Blue Zellen transformiert. Aufarbeitung der Plasmid-DNA, Restriktionsverdau und Gensequenzierung erfolgten wie beschrieben.

Mutanten einer N-terminal um 21 Aminosäuren verkürzten zfGpx4b im pET-15b-Vektor wurden analog hergestellt, die nötigen Primer finden sich in Tab. 7. Mutationsorte wurden durch Vergleich der zfGpx4-Isoformen mit den im Zytosol-lokalisierten Gpx4-Isoformen von Mensch (NP\_001354761.1) und Maus (NP\_001354924.1) unter Berücksichtigung von Abweichungen in der Sequenzabfolge oder von chemisch-physikalischen Eigenschaften der Aminosäuren ausgewählt (vgl. 3.3.4.2 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten, S. 97). Hierbei wurde stets die Aminosäure der zfGpx4b in die Aminosäure der zfGpx4a an gleicher Stelle mutiert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

**Tab. 7: Primersequenzen für die QuikChange Site-Directed Mutagenesis der zfGpx4b-Mutanten (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin).**

Primer	Primersequenz 5`-3`
zfGpx4bAla58Glu up	CAC TCA GCT TGC GGA AAT GCA CGT CAC GTA C
zfGpx4bAla58Glu do	GTA CGT GAC GTG CAT TTC CGC AAG CTG AGT G
zfGpx4bVal61Ala up	CTT GCG GCA ATG CAC GCG ACG TAC GCT GAG AAG
zfGpx4bVal61Ala do	CTT CTC AGC GTA CGT CGC GTG CAT TGC CGC AAG
zfGpx4bThr62Lys up	CTT GCG GCA ATG CAC GTC AAA TAC GCT GAG AAG GGT TTA C
zfGpx4bThr62Lys do	GTA AAC CCT TCT CAG CGT ATT TGA CGT GCA TTG CCG CAA G
zfGpx4bGly72Ala up	GTT TAC GCA TCC TGG CGT TCC CCG CCA ACC AG
zfGpx4bGly72Ala do	CTG GTT GGC GGG GAA CGC CAG GAT GCG TAA AC
zfGpx4bGlu86Asn up	GCA GGA GCC TGG AAG TAA CGC GGA GAT TAA GGA G
zfGpx4bGlu86Asn do	CTC CTT AAT CTC CGC GTT ACT TCC AGG CTC CTG C
zfGpx4bLeu102Met up	GGC TAC AAT GCA GAG TTT GAT ATG TTC AGT AAG ATC GAT GTG
zfGpx4bLeu102Met do	CAC ATC GAT CTT ACT GAA CAT ATC AAA CTC TGC ATT GTA GCC
zfGpx4bThr129Phe up	CAG CCC AAA GGC AGA GGA TTC CTG GGG AAC AAC ATC AAG
zfGpx4bThr129Phe do	CTT GAT GTT GTT CCC CAG GAA TCC TCT GCC TTT GGG CTG
zfGpx4bAsn133Gly up	GAG GAA CAC TGG GGA ACG GCA TCA AGT GGA ATT TCA C
zfGpx4bAsn133Gly do	GTG AAA TTC CAC TTG ATG CCG TTC CCC AGT GTT CCT C
zfGpx4bAsp157Gln up	GGT ACG GAC CAA TGC AGG ATC CAA GCG TGG TG
zfGpx4bAsp157Gln do	CAC CAC GCT TGG ATC CTG CAT TGG TCC GTA CC

### 2.3.5 Umklonierung in Zielvektoren

Die Vektoren pET-15b, pEGFP-N1 und pmCherry-N1 stellten Zielvektoren für weitergehende Expressionsversuche und Untersuchungen subzellulärer Lokalisationen dar. Für Proteinexpressionen verschiedener zfGpx4-Isoformen wurde der pET-15b-Vektor genutzt. Die Proteinexpression wird bei dem pET-15b-System in Zusammenspiel mit geeigneten Wirtszellen wie BL21(DE3) über einen Vektor-eigenen *T7 lac Promotor (T7lac)* und *lac repressor (lacI)* bis zur Induktion der Proteinexpression durch Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Zugabe streng kontrolliert. IPTG aktiviert den *lacUV5 Promotor* der Wirtszelle und initiiert damit die Transkription der T7-RNA-Polymerase und die Proteinexpression (89). Die Vektoren pEGFP-N1 und pmCherry-N1 wurden für Untersuchungen subzellulärer Proteinlokalisationen verwendet. Beide Vektoren ermöglichen die Expression von Fusionsproteinen gemeinsam mit einem fluoreszierenden Protein (90) (91).

Umklonierungen der jeweiligen Inserts erfolgten aus dem pCR2.1-TOPO Vektor in die entsprechenden Zielvektoren. Für die präparative Spaltung aus Agarosegelen wurden 3000 ng des

Zielvektors und 2000 ng des in den pCR2.1-TOPO Vektor klonierten Inserts in je 50 µl Ansätzen zu 5,0 µl 10X FastDigest Buffer, Wasser add 50,0 µl mit je 2,0 µl pro Restriktionsendonuklease (NdeI/XhoI, NdeI/BamHI, EcoRI/BamHI) für mindestens 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch den Restriktionsverdau werden die Vektoren an den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme aufgespalten und Inserts von diesen separiert. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in Agarosegelen wurden die entsprechenden Vektor- bzw. Insertbanden unter UV-Licht ausgeschnitten und eine DNA-Extraktion mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit bzw. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit nach Vorgabe der Hersteller durchgeführt. Die einzelnen Inserts konnten nachfolgend per Ligation in ihre Zielvektoren kloniert werden. Hierbei wurde mit dem LigaFast Rapid DNA Ligation System (Promega, Madison, USA) gearbeitet. Ansätze zu 20,0 µl mit 1,0 µl T4 DNA Ligase, 4,0 µl 2X Rapid Ligation Buffer, Wasser add 20,0 µl und definierte Mengen an Insert und Vektor gemäß  $m_{Insert} = 3 \cdot m_{Vektor} \cdot \frac{Länge_{Insert}}{Länge_{Vektor}}$  wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde in XL1-Blue Zellen transformiert. Es folgten die Isolation von Plasmid-DNA, Kontrollspaltungen mittels Restriktionsverdau und Prüfung der Plasmid-DNA per Gensequenzierung.

### 2.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (real-time quantitative PCR) werden im Gegensatz zur herkömmlichen PCR während des gesamten PCR-Prozesses Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet, die mit der Menge des synthetisierten PCR-Produktes korrelieren. Das Mitführen

**Tab. 8: Primersequenzen der qRT-PCR (BioTeZ Berlin – Buch GmbH, Berlin).**

Primer	Primersequenz 5'-3'
ZebraGPx4a105 up	TAT GTC TGC ACA GCT AGA GGA CTG
ZebraGPx4a 286do	CGT GCA TCT CTG CAA ACT GAG AGT
ZebraGPx4b 90up	AAT GTG TGC CCA AGC CAA TGA CTG
ZebraGPx4b 268do	GCA TTG CCG CAA GCT GAG TGT AG

von Standardverdünnungslösungen bekannter Templatemengen erlaubt hierbei eine exakte Quantifizierung von Proben-DNA (88). Für differentielle Genexpressionsanalysen der zfGpx4-Isoformen während der Zebrafischentwicklung wurden qRT-

PCR-Läufe am Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australien) mit dem SensiMix SYBR No-Rox Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Herstellung von Standardlösungen wurden im Vorhinein interessierende DNA-Fragmente in den TOPO 2.1 Vektor kloniert, linearisiert und entsprechende Verdünnungsreihen angesetzt. In der qRT-PCR wurden je 1 µl Zebrafisch-cDNA verschiedener Entwicklungszeitpunkte (Tage nach



Befruchtung), die für die Versuche bereits vorlag, und Primer (Tab. 8) zu final 2,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Pro Enzymisoform und Entwicklungszeitpunkt wurden jeweils Dreifachwerte erhoben. Als Bezugsgen diente *efl $\alpha$*  bzw. *eefl $\alpha$ III*, das den eukaryontischen Elongationsfaktor (EF1 $\alpha$ ) kodiert. Die Auswertung erfolgte mittels Rotor-Gene Monitor Software (Version 4.6).

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Proteinexpression im prokaryontischen System

#### 2.4.1.1 Rekombinante Expression in *E. coli* BL 21(DE3)

Für die Expression der zfGpx4-Isoformen als Cys-Varianten wurden die pET-15b-Plasmide der beiden Isoformen in vollständiger und verkürzter Form in *E. coli* BL21(DE3) Stämme transformiert. Vorkulturen zu 25 ml LB-Medium mit Amp (final 0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) wurden mit einem Bakterienklon der Transformationsansätze beimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) bei  $\lambda = 600$  nm von  $OD_{600} = 0,6$  bis 1,0 inkubiert. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 4 °C gelagert und am Folgetag für 15 Minuten bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem LB-Amp-Medium (0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) resuspendiert und je 2 ml Resuspensionspellet in 50 ml LB-Amp (0,1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )-Hauptkulturen bei 37 °C und 180 rpm angezchtet. Die Proteinexpression wurde bei einer  $OD_{600} = 0,8$  durch IPTG-Zugabe (final 1 mM) gestartet. Nach dreistündiger Inkubationszeit bei 37 °C und 180 rpm wurden die Zellen durch 15-minütige Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C geerntet. Bis zum Proteinaufschluss wurden die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.1.2 Rekombinante Expression in Cys-auxotrophen *E. coli* BL21(DE3)

Eine Methode Selenoproteine rekombinant in ausreichenden Mengen herzustellen, bedient sich eines Cys-auxotrophen *E. coli* BL21-Stammes, *E. coli* BL21(DE3)*selB::kan cys51E* (92). Bei diesem Expressionsverfahren werden die mit dem interessierenden Protein transformierten *E. coli* BL21(DE3)*selB::kan cys51E*-Klone in Anwesenheit von Cystein angezchtet. Wird das Cys-haltige Medium vor der Induktion der Proteinsynthese gründlich ausgewaschen und durch ein Sec-haltiges Medium ersetzt, kann nach IPTG-Zugabe der Einbau von Sec anstelle des fehlenden und nicht synthetisierbaren Cys erzielt werden. Die Cys-Auxotrophie des *E. coli*-Stammes bedingt eine Mutation im *cysE*-Gen, das eigentlich für eine Serin-O-Acetyltransferase kodiert. Die Serin-O-Acetyltransferase katalysiert normalerweise den ersten Schritt der Cysteinsynthese (93) (94). Für

die rekombinante Expression der Sec-Varianten der zfGpx4a, der zfGpx4b und verschiedener zfGpx4b-Mutanten in *E. coli* BL21(DE3)*selB::kan cys51E* wurden je 50 ng bis 100 ng der pET-15b-Plasmide in 100 µl kompetenter Cys-auxotropher Zellen transformiert. Den selektiven Einbau von Sec am aktiven Zentrum sollten vorhergehende SecCys- und CysAla-Mutationen gewährleisten. Die Transformationsreaktionen wurden auf LB-Amp-Kan-Platten aufgetragen. Mit einem Klon der Amp-Kan-Platten beimpfte Vorkulturen zu je 15 ml bis 100 ml LB-Medium, Amp (100 mg·l<sup>-1</sup>), Kan (15 mg·l<sup>-1</sup>), Cystein (50 mg·l<sup>-1</sup>) und 1 % Glucose wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurden die Kulturen bei 4000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und die Zellpellets zweimal mit 50 ml Waschpuffer (10 g·l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g·l<sup>-1</sup> Natriumacetat) gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde in Hauptkulturen zu je 50 ml bis 250 ml M9-Medium (siehe 2.1.2 Puffer, Lösungen, Nährmedien, S. 35) mit Amp (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>), Kan (0,015 mg·ml<sup>-1</sup>) und Cystein (0,01 mg·ml<sup>-1</sup>) resuspendiert. Dabei wurden die Hauptkulturen auf eine initiale OD<sub>600</sub> = 0,5 eingestellt. Bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> = 1,7 wurden die Hauptkulturen im Schüttler bei 180 rpm und 37 °C angezüchtet. Es folgten zwei weitere Waschschriffe. Nach einer Hungerperiode von 30 Minuten in 50 ml bis 250 ml Cystein-freien M9-Medium mit Amp (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>) und Kan (0,015 mg·ml<sup>-1</sup>) wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Weitere 10 Minuten später wurden L-Selenocystin (200 mg·l<sup>-1</sup>) und Rifampicin (400 mg·l<sup>-1</sup>) in die Kulturen gegeben. Rifampicin hemmt hierbei die RNA-Polymerase von *E. coli* und damit die übrige zelluläre Proteinsynthese (94). Beendet wurde die Proteinexpression nach weiterer dreistündiger Inkubation bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C für 15 Minuten. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellpellets bei -20 °C gelagert.

### 2.4.1.3 Proteinaufreinigung über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose

Die zfGpx4-Proteine wurden gemeinsam mit einem N-terminalen His-Tag, einem kurzen Histidin (His, H)-reichen Aminosäureabschnitt, exprimiert. Dieser ist auf dem pET-15b-Vektor kodiert. Eine Aufreinigung der His-Tag-Proteine konnte daher affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Agarosesäulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgen. Zellpellets wurden in 12 ml Lysepuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM TCEP) resuspendiert und per Ultraschallsonde (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) mit dreimal 20 %-iger Amplitude für 3 x 10 Sekunden und einmal 10 x 1 Sekunde lang mit 30 %-iger Amplitude aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde für 15 Minuten bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand auf 1 ml äquilibrierte Ni-NTA-Agarosesuspension gegeben und für eine Stunde unter

ständiger, langsamer Bewegung bei 4 °C inkubiert. Fakultativ wurden Aliquots des anfallenden Zellpellets in 50 µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 4 °C und 800 rpm sollten nicht His-Tag-tragende Proteine durch zweimaliges Waschen mit 12 ml Waschpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) aus der Ni-NTA-Gelsuspension entfernt werden. Das spezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebundene His-Tag-Protein wurde in nachfolgenden zwei Schritten mit je 1 ml bis 2 ml Elutionspuffer A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, 5 mM TCEP) und Elutionspuffer B (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 mM TCEP) eluiert. Die Elution der His-Tag-Proteine wird hierbei durch die hohen Imidazolkonzentrationen in den Elutionspuffern, bei denen die His-Tag-Proteine mit dem Imidazol um die Bindungsstellen an der Ni-NTA-Agarose konkurrieren, erzielt (95). Die Eluate wurden nach Zugabe von 10 % Glycerol bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe der anschließenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte das Auftreten von Zielproteinen in verschiedenen Aliquots des beschriebenen Aufreinigungsprozesses überprüft und eine Aussage über deren Reinheitsgrad getroffen werden. Durch die Anlagerung von SDS an die Proteine entstehen denaturierte, negativ geladene SDS-Proteinkomplexe, die im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (96). Je 15,0 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit 5 µl reduziertem Ladungspuffer (Lonza, Köln, Deutschland) für 10 Minuten bei 95 °C im Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Das gesamte Probevolumen wurde in der SDS-PAGE (4 %-iges Sammel- und 12,5 %-iges Trenngel) gemeinsam mit einem Marker, dem PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgetrennt. Weitere SDS-PAGE-Analysen wurden freundlicherweise durch Fr. Sabine Stehling durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser à 10 Minuten wurden die Gele mittels Coomassie-Färbung (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) angefärbt.

### 2.4.1.4 Entsalzung, Umpufferung und Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Entsalzung der Protein-Elutionsfraktionen wurden diese zusammengeführt, auf 3 ml Probevolumen mit Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 10 % Glycerol) aufgefüllt und über eine mit dem Elutionspuffer zweimal equilibrierte Entsalzungssäule Econo-Pak DG10 column (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) mit je 4 ml Elutionspuffer eluiert. Proteinkonzentrationen  $c$  konnten über photometrische Messungen (Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) der Extinktion  $E$  bei  $\lambda = 280$  nm

und anhand der molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  (<http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm>) gemäß des Lambert-Beerschen-Gesetzes  $I = I_0 \cdot e^{-\alpha cx} \Leftrightarrow E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot x$  (97) mit der von der Probe durchgelassenen Lichtintensität  $I$ , der einfallenden Lichtintensität  $I_0$ , dem Absorptionskoeffizienten  $\alpha$  und der Schichtdicke  $x$  bestimmt werden. Fakultativ erfolgten Konzentrierungen von Proteinlösungen mittels Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices (Merck, Darmstadt, Germany) nach Herstellervorgaben.

### 2.4.1.5 Quantifizierung des Seleneinbaus mittels Atomabsorptionsspektroskopie

Um den Einbau von Sec während der Proteinexpression zu quantifizieren, erfolgte eine Bestimmung des Selengehaltes der rekombinanten Selenoproteine mittels Atomabsorptionsspektroskopie, die freundlicherweise von Fr. Constanze Richter (Technische Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie) durchgeführt wurde. Diese beruht auf der Messung von Extinktionsunterschieden einer Referenzsubstanz und der Probe bei Einstrahlung einer Emissionslinie, die spezifisch für das zu quantifizierende Probenelement ist (98).

### 2.4.2 Eukaryontische Expression in COS7-Zellen und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der WT-zfGpx4-Isoformen wurden pEGFP- und pmCherry-Plasmide, die Abschnitte der ersten Exone der WT-zfGpx4-Isoformen und der murinen m-Gpx4 trugen, in COS7-Zellen (ATTC, Manassas, USA) exprimiert. COS-Zellen sind Fibroblasen-ähnliche Zellen aus dem Nierengewebe der afrikanischen grünen Meerkatze. Sie wurden 1981 von Y. Gluzman durch Transformation von CV-1 Zellen mit einer Mutante des Simian-Virus 40 entwickelt (99). Am Vortag der Transfektion wurden 20.000 Zellen auf 8-well Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) in 300  $\mu$ l Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) eingesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Für die Transfektion wurden Ansätze zu 50  $\mu$ l Opti-Minimum Essential Medium (Opti-MEM) (Life Technologies, Paisley, England), 100 ng bzw. 200 ng Plasmid-DNA und TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus, Madison, USA) im Verhältnis von 3 zu 1 zur Plasmid-DNA für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das gesamte Volumen der Transfektionsansätze wurde hiernach auf die Zelleinsaat gegeben, vorsichtig gemischt und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der

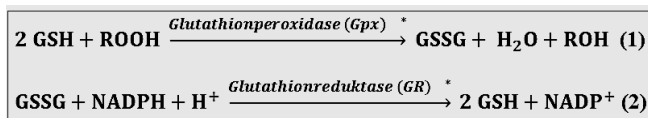
Versuche erfolgte am EVOS-System Imager (Thermo Fisher Scientific, Leihgerät) bei Anregung des EGFP-Proteins mit  $\lambda = 488$  nm und des mCherry-Proteins mit  $\lambda = 587$  nm.

### 2.4.3 Herstellung von Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PC-OOH)

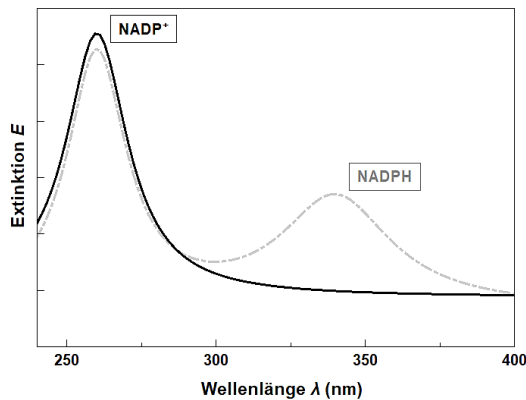
Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Gpx-Familie kann die Gpx4 auch komplexe Lipidhydroperoxide wie Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PC-OOH) reduzieren. Zur Herstellung von PC-OOH wurden 10 mg L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin der Sojabohne (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in 20 ml 0,05 M Boratpuffer (pH 9,0 mit 0,2 % Natriumdesoxycholat) gelöst. Zur Oxygenierung des Phosphatidylcholins wurde 1 mg Sojabohnen-Lipoxygenase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugegeben und der Ansatz für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Extraktion der Gesamtlipide (100) bei 4 °C. Dazu wurden dem Ansatz 40 ml Methanol und 20 ml Chloroform zugegeben und der Ansatz für 5 Minuten im Scheidetrichter geschüttelt (keine Phasentrennung). Anschließend wurden 20 ml Chloroform und 20 ml Wasser zum Ansatz zugegeben. Der Ansatz wurde erneut für 5 Minuten geschüttelt. Nach 15 Minuten kam es zur Phasentrennung und die untere Chloroformphase enthielt die extrahierten Lipide. Zum Lipidextrakt wurden 2 ml Isopropanol zugegeben, um eine azeotrope Verdampfung des im Lipidextrakt enthaltenen Wassers zu ermöglichen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die rückständigen Lipide wurden in 1 ml Methanol aufgenommen und das PC-OOH mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) präpariert. Bei der HPLC wird die interessierende Substanz in einer mobilen Phase über eine stationäre Phase in Form einer Trennsäule geleitet. An der Säule haften unterschiedliche Stoffe verschieden stark, sodass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Ende der Säule auftreten und durch einen Detektor nachgewiesen werden können (101). Aliquots des Lipidextraktes (100  $\mu$ l bis 500  $\mu$ l aus 1 ml) wurden über eine NUCLEODUR-RP C<sub>18</sub> Gravity Säule (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 5  $\mu$ m) mit dem Lösungsmittelgemisch Methanol/1 mM Ammoniumacetat (9:1) eluiert, wobei die Absorption bei 235 nm verfolgt wurde. Die konjugierten Diene wurden aufgefangen, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert und die rückständigen Lipide in 1 ml Methanol aufgenommen. Die Konzentrationen des gelösten PC-OOH wurden durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 235$  nm am Photometer bestimmt, wobei ein molarer Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 25000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (102) verwendet wurde. Die Proben wurden abgedunkelt bei -80 °C gelagert.

### 2.4.4 Photometrische Messung katalytischer Aktivitäten der Gpx4-Isoformen

Um die exprimierten Gpx4-Isoformen des Zebrafisches hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden photospektrometrische Aktivitätsmessungen basierend auf dem Prinzip des gekoppelten optischen Tests durchgeführt. Bei dem gekoppelten optischen Test wird der Gpx4-katalysierten Reaktion (Abb. 15, (1)) die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängige Regenerierung des Glutathiondisulfids (GSSG) mittels Glutathionreduktase (GR) nachgeschaltet (Abb. 15, (2)). Hierbei wird das GSSG durch die GR wieder zu Glutathion (GSH) reduziert. In diesem Fall fungiert NADPH als Elektronendonator und wird zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert. In Folge der NADPH-Oxidation kommt es zu einer photometrisch messbaren Abnahme



**Abb. 15: Prinzip des gekoppelten optischen Tests für die Gpx-katalysierte Reaktion.** Auf die Gpx-Reaktion (1) folgt die NADPH-abhängige Regenerierung des GSSG durch GR (2). \* Reaktion prinzipiell reversibel. Nach (103).



**Abb. 16: Absorptionsspektren von NADPH und  $\text{NADP}^+$ .** In Anlehnung an (105).

der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , da das  $\text{NADP}^+$  im Gegensatz zu NADPH keine Lichtabsorption bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  aufweist (Abb. 16) (104). Die Absorptionsabnahme ist hierbei proportional zur Konzentrationsänderung des NADPH. Sofern Substrate der Gpx4, GSH, GR und NADPH im Überschuss vorliegen, ist die Geschwindigkeit der NADPH-Oxidation zu  $\text{NADP}^+$  lediglich von der Bereitstellung des GSSG als Substrat der GR und folglich direkt von der katalytischen Aktivität der Gpx4 abhängig (103). Aus der photometrischen Messung der Extinktion bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  kann auf Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die Geschwindigkeit der Gpx4-katalysierten Reaktion über die Konzentrationsänderung des NADPH pro Zeiteinheit berechnet werden. Gemäß Herstellerangaben (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde für das NADPH ein molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon = 6,22 \cdot 10^3 \text{ mol} \cdot (\text{l} \cdot \text{cm})^{-1}$  berücksichtigt. Die spezifische katalytische Aktivität  $k$  der Gpx4 lässt sich hieraus mit der Annahme, dass  $1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  Protein der Reduktion von  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ ROOH}$  entspricht, bestimmen. Den Umrechnungen auf die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Gpx4-Isoformen wurden die jeweiligen Kennwerte der molaren Massen  $M$

(<http://www.biomol.net/en/tools/proteinextinction.htm>) zugrunde gelegt. Die ermittelten Werte von  $k$  wurden auf einen Seleneinbau von 100 % hochgerechnet.

Die nachfolgend beschriebenen praktischen Aktivitätsmessungen erfolgten am Photometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Falls nicht anders genannt, wurden für alle Messungen einer Versuchsreihe gleiche Reaktionsansätze von 0,5 ml bzw. 1,0 ml hergestellt. Die Reaktionsmischungen bestanden aus 100 mM Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA (pH 8), 10 % Triton-X-100, 3 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 Unit (U) GR (100-300 U·mg<sup>-1</sup>). Zu dieser Mischung wurden unterschiedliche Mengen Gpx4-Präparationen (2-50 µg·ml<sup>-1</sup>) zugegeben. Nach einer Vorinkubationszeit dieser Reaktionsansätze - im Weiteren Standardlösung genannt - von 2 Minuten bei ausgewählter Versuchstemperatur wurde die Reaktion durch Substratzugabe (u.a. *tert*-Butyl-Hydroperoxid (TBHP), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PC-OOH) in einer Konzentration von final 0,0375 mM bis 1 mM gestartet und die Extinktionen bei  $\lambda = 340$  nm kontinuierlich über 60 Sekunden am Photometer aufgezeichnet. Extinktionswerte  $E$  wurden linearen Auswertungsbereichen der Messdaten entnommen und nach Subtraktion von Hintergrundaktivitäten zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten der Enzymisoformen herangezogen.

### 2.4.4.1 Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Katalytische Aktivitäten der Cys-WT-zfGpx4-Isoformen wurden durch photometrische Extinktionsmessungen in 1,0 ml Standardansätzen mit Proteinkonzentrationen von final 10 bis 50 µg·ml<sup>-1</sup> und nach Zugabe von final 0,5 mM TBHP bei  $\lambda = 340$  nm und 37 °C überprüft. Messungen der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen erfolgten mit final 3 µg·ml<sup>-1</sup> Protein. Es wurden jeweils Dreifachwerte ermittelt.

### 2.4.4.2 Temperaturabhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Abhängigkeiten der katalytischen Aktivitäten der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen von der Temperatur wurden von 2 °C bzw. 10 °C bis 45 °C in 1,0 ml Standardansätzen mit final 2 µg·ml<sup>-1</sup> Protein untersucht. Um Temperaturhomogenität auf dem gewünschten Temperaturniveau zu gewährleisten, erfolgten Temperierungen der Standardlösung vor Enzymzugabe von wenigstens 10 Minuten und nach Enzymzugabe von mindestens 5 Minuten. Erst nach Substratzugabe von final 1 mM TBHP wurden Extinktionen bei  $\lambda = 340$  nm über  $\geq 60$  Sekunden aufgenommen und pro Temperaturpunkt Doppelwerte bestimmt. Die Messungen erfolgten mit zwei verschiedenen

Präparationschargen [(1), (2)]. Temperaturoptima  $T_{opt}$  wurden anhand der graphischen Auftragung der katalytischen Aktivitäten  $k$  über der Temperatur  $T$  mittels Gaußfunktion

$$g(T) = y_0 + A \cdot \frac{1}{w} \cdot \sqrt{\frac{2}{\pi}} \cdot e^{-\frac{2(T-T_{opt})^2}{w^2}} \quad (106)$$

mit dem Offset  $y_0$ , der Amplitude  $A$ , dem Mittelwert  $T_{opt}$ , der doppelten Standardabweichung  $w$  ( $2\sigma$ ) unter Verwendung einer statistischen Gewichtung und mit Fehlerwert  $\Delta T_{opt} = T_{opt} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  angenähert. Basierend auf der Arrhenius-

$$\text{Gleichung } k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \Leftrightarrow \ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (101)$$

mit Geschwindigkeitskonstante  $k$ , präexponentiellem Vorfaktor  $A$ , Aktivierungsenergie  $E_a$ , idealer Gaskonstante  $R = 8,314 \text{ J} \cdot (\text{K} \cdot \text{mol})^{-1}$  (107), Temperatur  $T$  (K), die in erster Näherung die Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion mit steigender Temperatur beschreibt, konnten Aktivierungsenergien  $E_a$  bestimmt werden. Die Auftragung von  $\ln k$  über  $T^{-1}$  ermöglicht mittels linearer Fitfunktion  $f(x) = m \cdot x + B$  die Berechnung der Aktivierungsenergie  $E_a = m \cdot R$  einer chemischen Reaktion über die Steigung  $m$  der Fitgeraden.

#### 2.4.4.3 pH-Abhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Spektrophotometrische Messungen wurden zur Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität für die Sec-WT-zfGpx4-Isoformen über einen pH-Bereich von 6,0 bis 10,0 in je 0,4-pH-Schritten bei 15 °C durchgeführt. Hierzu wurden 0,5 ml Reaktionsansätze verwendet. Als Reaktionsmischungen wurde eine 1:1 Mischung aus 50 mM Tris-HCl und 50 mM Boratpuffer eingesetzt, wobei der jeweilige pH-Wert (pH 6,0-10,0) durch Zugabe von 5 M KOH bzw. 5 M HCl eingestellt wurde. Die eingestellten Pufferlösungen enthielten außerdem 5 mM EDTA, 10 % Triton-X-100, 3 mM GSH, 0,2 mM NADPH, 1 Unit (U) GR (100-300 U·mg<sup>-1</sup>). Zur Messung wurden 2 µg·ml<sup>-1</sup> Gpx4-Präparation eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Vorinkubation durch Zugabe von final 1 mM TBHP gestartet. Pro pH-Wert wurden Doppelwerte aufgezeichnet. pH-Optima wurden anhand der graphischen Auftragung der katalytischen Aktivitäten  $k$  über dem pH-Wert per instrumentell gewichtetem Gaußfit (Vgl. Abschnitt 2.4.4.2, S. 51) ermittelt.

#### 2.4.4.4 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Substratspezifitäten der zfGpx4-WT-Isoformen wurden spektrophotometrisch in 1,0 ml Standardansätzen unter Einsatz von final 3 µg·ml<sup>-1</sup> Enzymprotein durchgeführt. Dabei wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBHP oder PC-OOH in einer Endkonzentration von 0,1 mM verwendet. Verglichen



wurden die Substratspezifitäten der WT-zfGpx4-Isoformen mit der humanen zytosolischen SecGPX4, die für die Versuche von Fr. Dr. Astrid Borchert (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Biochemie) zur Verfügung gestellt wurde. Messungen erfolgten bei 15 °C und bei 37 °C. Pro Enzym, Substrat und Temperatur wurden jeweils Dreifachwerte ermittelt.

#### 2.4.4.5 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten

Der Einfluss verschiedener Aminosäuren auf den Katalysemechanismus der Gpx4 wurde durch vergleichende spektrophotometrische Messungen zwischen der WT-hGPX4, den WT-zfGpx4-Isoformen und neun verschiedenen zfGpx4b-Mutanten untersucht. Hierzu wurden Messungen bei 15 °C in 0,5 ml Standardlösung unter Einsatz von final 3 µg·ml<sup>-1</sup> Protein durchgeführt. Als Substrate dienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. PC-OOH zu final 0,1 mM. Messungen bei 37 °C erfolgten in 0,5 ml Standardansatz mit final 2 bis 6 µg·ml<sup>-1</sup> Protein und final 0,0375 mM Substrat. Pro Enzym, Substrat und Temperatur wurden Doppelwerte ermittelt. Für diese Messungen wurde eine weitere Präparation der humanen SecGPX4 von Frau. Dr. Astrid Borchert zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.5 Thermostabilität von Sec-Gpx4-Isoformen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Gpx4-Isoformen (hGPX4, WT-zfGpx4a, WT-zfGpx4b, zfGpx4b-Mutanten) im Hinblick auf ihr Verhalten unter variierenden thermischen Bedingungen untersucht und Isoform-spezifische Schmelztemperaturen  $T_m$  mittels Thermal-Shift-Assay bestimmt. Im Falle der zfGpx4-WT-Isoformen wurden jeweils zwei verschiedene

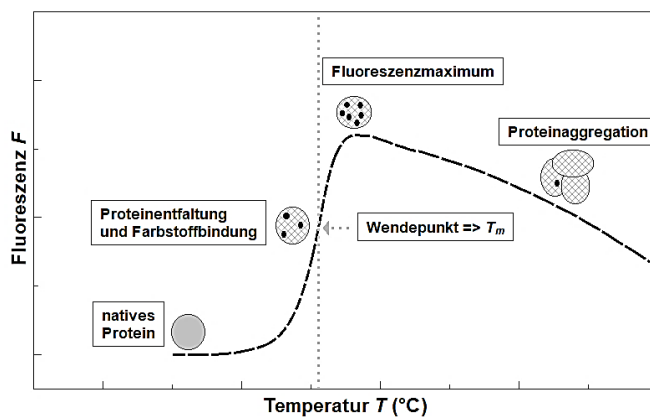


Abb. 17: Skizzenhafte Veranschaulichung des Prinzips des Thermal-Shift-Assays. In Anlehnung an (108).

Präparationschargen getestet. Im Thermal-Shift-Assay wird das zu untersuchende, nativ gefaltete Protein mit einem fluoreszierenden Farbstoff inkubiert. Unter stetiger Temperaturerhöhung dieses Systems kommt es in Folge des einsetzenden Denaturierungsprozesses zur zunehmenden Entfaltung des Proteins mit vermehrter Exposition der ursprünglich

zur Innenseite der Proteinstruktur angeordneten hydrophoben Aminosäuren an der Protein-Oberfläche. Der Fluoreszenzfarbstoff kann an diese nun Oberflächen-exponierten hydrophoben

Aminosäuren binden, was zu einem deutlichen Anstieg der messbaren Fluoreszenzintensitäten führt (108). Werden die Fluoreszenzsignale über eine gewählte Temperaturspanne aufgezeichnet, beschreibt der Wendepunkt der Fluoreszenzkurve die Protein-eigene Schmelztemperatur  $T_m$  (Abb. 17). Die Fluoreszenz-Emissionen nehmen unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung nach Erreichen eines maximalen Wertes wieder ab. Grund hierfür ist die Aggregation des denaturierten Proteins und die damit einhergehende Reduktion der Bindungspositionen für den Fluoreszenzmarker. Als Fluoreszenzfarbstoff diente im TSA der 5000X SYPRO Orange Dye (Life Technologies, Carlsbad, USA). Die Ansätze zu je 50  $\mu$ l mit einer finalen Enzymkonzentration von 2-5  $\mu$ M, Pufferlösung und dem SYPRO Orange Dye in final 20-facher Konzentration wurden im Rotor-Gene 3000 qRT-PCR-Gerät von 30 °C bis 99 °C in 0,5 °C-Schritten systematisch erhitzt und Fluoreszenzintensitäten mit dem FAM/SYBR-Green Filter kontinuierlich aufgezeichnet. Die initiale Temperaturstufe wurde für 90 Sekunden, alle folgenden Temperaturstufen für jeweils 30 Sekunden aufrechterhalten, um ein Erreichen der Zieltemperatur zu gewährleisten. In zwei unabhängigen Messläufen wurden pro Isoform jeweils Dreifachwerte der Fluoreszenzintensitäten ( $F$ ) über der Temperatur ( $T$ ) aufgenommen. Schmelztemperaturen  $T_m$  konnten als Extrema aus der graphischen Auftragung der ersten Ableitung der Fluoreszenzen ( $dF$ ) über der Temperatur ( $dT$ ) ermittelt werden.

## 2.5 Computergestützte Modellierungen und Vorhersagen

### 2.5.1 Vorhersagen möglicher SECIS-Elemente

Um potentielle SECIS-Elemente innerhalb der cDNA möglicher bakterieller Selenoproteine zu identifizieren, wurde das Programm bSECISearch (<http://genome.unl.edu/bSECISearch/>) genutzt (109). SECIS-Elemente in Genen möglicher pflanzlicher und tierischer Selenoproteine wurden mittels Selenoprotein prediction server (<http://gladyshevlab.org/SelenoproteinPredictionServer/>) (110) analysiert.

### 2.5.2 Vorhersagen von Proteinsortierungssignalen

Für Vorhersagen von möglichen Proteinsortierungssignalen wurden die N-terminalen Sequenzabschnitte der zfGpx4a Isoform 2 (NP\_001007283.2) und der zfGpx4b (NP\_001025241.2) mit den Programmen PREDIction of Signal peptides (PrediSi) (<http://www.predisi.de/>), Target P-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) und Signal P-5.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) untersucht (111) (112). Für Vorhersagen möglicher nukleärer Importsignale wurden SeqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>) (113) und NucPred (<https://nucpred.bioinfo.se/cgi-bin/single.cgi>) genutzt (114).

### 2.5.3 Dreidimensionale Struktursimulation von Proteinen

Dreidimensionale Modelle der N-terminal um 16 bzw. 21 Aminosäuren verkürzten WT-Cys-zfGpx4-Isoformen wurden mittels SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (115) (116) (117) (118) (119) (120) basierend auf den Daten der rekombinanten humanen SecGPX4 (PDB Eintrag 6ELW) erstellt und mit dem Swiss-PdbViewer 4.1.0 (26) visualisiert.

## 2.6 Statistische Auswertungsverfahren

Statistische Auswertungen erfolgten in SPSS 25 auf Grund der Messung von Naturgrößen unter Annahme einer Normalverteilung mittels T-Test für unabhängige Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde stets 0,05 festgelegt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Evolutionäre Aspekte der Gpx4

##### 3.1.1 Die Gpx4 in irdischen Lebensformen

Die Erde existiert seit etwa 4,6 Milliarden (Mrd.) Jahren. Leben auf der Erde begann vor mehr als 3,5 Mrd. Jahren (37). Die gesamte Lebewelt, die sich seitdem ausgebildet hat, unterlag im Laufe der Zeit verschiedenen Systematisierungsversuchen. Neben der Unterscheidung zwischen Tieren,

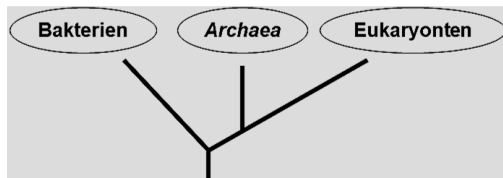


Abb. 18: Vereinfachte Darstellung des Dreidomänenmodells nach Woese et al. (1990, (121)).

Pflanzen und unbelebter Natur, Pro- und Eukaryonten oder der Unterteilung der Lebewelt in verschiedene Lebensreiche schlugen Woese et al. (1990, (121)) basierend auf dem strukturellen Vergleich ribosomaler RNA (rRNA) das Dreidomänenmodell vor (122). Demnach lässt sich

die Lebewelt den drei Domänen Bakterien, *Archaea* und Eukaryonten (Abb. 18) zuordnen, wobei jeder Domäne verschiedene Reiche (*Regna*) oder Stämme (*Phyla*) untergeordnet werden können. Viren können nicht in dieses Modell eingeordnet werden, da sie keine lebenden Organismen darstellen. Als kleine infektiöse Einheiten besitzen sie ein Genom und sind zur Evolution fähig. Da sie sich weder in einem zellulären Verbund organisieren noch zu einem selbstständigen Leben befähigt sind, werden sie, auch, wenn sie Teil der lebenden Welt sind, nicht zu den Lebewesen gezählt (37).

Zur Evolutionsgeschichte der Gpx-Familie und zur evolutionären Stellung der Gpx4 wurden in der Literatur bislang verschiedene Hypothesen diskutiert. Für die vorliegende Arbeit wurden gut untersuchte Modellorganismen, aber auch Viren und eine große Anzahl von Lebewesen der drei Domänen des irdischen Lebens (Bakterien, *Archaea*, Eukaryonten) im Juli 2020 und Januar bzw. Februar 2021 mit BLAST P (81) (82) nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen durchsucht. Unter den Eukaryonten wurden Pilze sowie niedere und höhere Pflanzen und Tiere berücksichtigt. Als Suchvorlage diente die gesamte Aminosäuresequenz der hGPX4 Isoform A. Eingeschränkt wurde die Suche auf Proteinsequenzen der RefSeq-Sammlung, wobei „uncultured/environmental sample sequences“ und Sequenzabschnitte geringerer Komplexität unberücksichtigt blieben. Ausgeschlossen wurden ferner: (i) Proteine mit einer Aminosäureidentität < 30 %, (ii) Proteine mit einer Länge von < 170 oder > 300 Aminosäuren, (iii) Proteine mit fehlender katalytischer Tetrade und (iv) Proteine mit eindeutiger Zuordnung zu einem anderen Enzym. Das Vorhandensein einer katalytischen Tetrade wurde per Multiple Sequence Alignment im BLAST-Programm überprüft. Als Treffer gezählt wurden im Weiteren „glutathione peroxidase“,

„glutathione peroxidase 4“, „glutathione peroxidase family protein“, „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase“, „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like“ und „uncharacterized protein“ sowohl als „putative“, „probable“, „predicted“ als auch „low quality“ Sequenz. Pro taxonomischer Gruppe wurden jeweils willkürlich ausgewählte Treffer eingehender analysiert. Alignments erfolgten hierfür mit Clustal Omega 1.2.4 (83). Für vergleichende Sequenzalignments mit anderen Gpx-Isoformen wurden verschiedene hGPX-Isoformen (vgl. Abschnitt 2.2.1, S. 40) herangezogen.

### 3.1.1.1 Gpx4 in verschiedenen Modellorganismen

In einer ersten orientierenden Suche wurden verschiedene gut charakterisierte Modellorganismen nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen durchsucht. Als Repräsentanten gram-negativer bzw. -positiver Bakterien wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) bzw. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) untersucht. *Archaea* wurden durch *Methanobacteriaceae* repräsentiert. Pilze wurden am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Neurospora crassa* (*N. crassa*), niedere bzw. höhere Pflanzen am Beispiel von *Physcomitrella patens* (*P. patens*) bzw. *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), Insekten am Beispiel von *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), Würmer anhand von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Platynereis dumerilii* (*P. dumerilii*), Amphibien am Beispiel von *Xenopus laevis* (*X. laevis*), Vögel am Beispiel von *Gallus gallus domesticus* (*G. gallus domesticus*), Fische am Beispiel von *Danio rerio* (*D. rerio*) und Säugetiere am Beispiel von *Mus musculus* (*M. musculus*) untersucht.

**Tab. 9: Gpx4-ähnliche Sequenzen in Modellorganismen.** Angegeben sind die Homologiegrade im Vergleich zur hGPX4 Isoform A und die jeweiligen katalytischen Tetraden.

	Spezies (NCBI-Taxid)	Treffer	Tetrade	Homologiegrad (%)
<b>Bakterien</b>	<i>E. coli</i> (562)	7	CQWN	25,3-40,7
<b>Archaea</b>	<i>Methanobacteriaceae</i> (2159)	11	CQWN	38,0-42,4
<b>Moose</b>	<i>P. patens</i> (3218)	5	CLWN, CQWN, CTWN, STWN	34,3-47,9
<b>Pflanzen</b>	<i>A. thaliana</i> (3702)	1	CQWN	45,2
<b>Insekten</b>	<i>D. melanogaster</i> (7227)	3	CQWN	34,8-40,0
<b>Würmer</b>	<i>C. elegans</i> (6239)	4	CQWN	30,6-42,0
<b>Amphibien</b>	<i>X. laevis</i> (8355)	3	UQWN	35,5-73,5
<b>Vögel</b>	<i>G. gallus domesticus</i> (9031)	3	UQWN	71,8-72,7
<b>Fische</b>	<i>D. rerio</i> (7955)	3	UQWN	61,3-69,1
<b>Säugetiere</b>	<i>M. musculus</i> (10090)	3	UQWN	83,4-93,5

### 3. ERGEBNISSE

Keine Treffer lieferte die Suche für das gram-positive Bakterium *B. subtilis* (NCBI-Taxid: 1423), der zu den Pilzen zählenden Hefe *S. cerevisiae* (NCBI-Taxid: 4932), dem Schimmelpilz *N. crassa* (NCBI-Taxid: 5141) und dem Borstenwurm *P. dumerilii* (NCBI-Taxid: 6359). Für alle anderen Modellorganismen lieferte die Suche mindestens einen Treffer (Tab. 9, Tab. 10). Bei dem gram-negativen Proteobakterium *E. coli* und dem Fadenwurm *C. elegans* fanden sich als Treffer nicht weiter subklassifizierte Glutathionperoxidasen. In der Gruppe der *Methanobacteriaceae* fanden sich Glutathionperoxidasen in verschiedenen Vertretern der *Methanobrevibacter* und *-sphaera*. Treffer in den übrigen Modellorganismen waren als Gpx4 oder PHGPX bzw. einer entsprechenden Isoform bezeichnet. Zusätzlich fand sich je ein uncharakterisiertes Protein bei *D. melanogaster* (NP\_611393.2) und dem Krallenfrosch *X. laevis* (NP\_001088000.1). Der Zebrafisch *D. rerio* und *X. laevis* enthalten mehrere Gpx4-Paraloge. Katalytische Tetraden finden sich in der Form CQWN (Cys-enhaltene Enzyme) in den Sequenzen von *E. coli*, den *Methanobacteriaceae*, dem Laubmoos *P. patens*, der Schaumkresse *A. thaliana* und den wirbellosen Tieren (*D. melanogaster*, *C. elegans*). Die extrahierten Sequenzen der Wirbeltiervertreter (*X. laevis*, *G. gallus domesticus*, *D. rerio*, *M. musculus*) weisen hingegen UQWN-Tetraden auf. Die entsprechenden Enzyme sind also Selenoproteine.

**Tab. 10: NCBI-Akzessionsnummern Gpx4-ähnlicher Sequenzen in ausgewählten Modellorganismen.**

Spezies	Treffer (NCBI-Akzession)
<i>E. coli</i>	WP_163446508.1, WP_109010316.1, WP_115258660.1, WP_025238929.1, WP_057064684.1, WP_063109566.1, WP_153671759.1
<i>Methanobacteriaceae</i>	WP_058738801.1, WP_012956733.1, WP_116592078.1, WP_112123681.1, WP_067147729.1, WP_067042098.1, WP_042692458.1, WP_091699751.1, WP_112123682.1, WP_069574638.1, WP_069593263.1
<i>P. patens</i>	XP_024375174.1, XP_024372544.1, XP_024401193.1, XP_024400435.1, XP_024400434.1
<i>A. thaliana</i>	NP_566128.1
<i>D. melanogaster</i>	NP_728868.1, NP_728869.1, NP_611393.2
<i>C. elegans</i>	NP_001368229.1, NP_001023368.1, NP_001123171.1, NP_509615.3
<i>X. laevis</i>	NP_001165213.1, NP_001165215.2, NP_001088000.1
<i>G. gallus domesticus</i>	NP_001333377.1, NP_989551.2, NP_001333378.1
<i>D. rerio</i>	NP_001025241.2, NP_001007283.2, NP_001333466.1
<i>M. musculus</i>	NP_001354924.1, NP_032188.3, NP_001032830.2

Die Homologiegrade mit der humanen GPX4 Isoform A variieren zwischen 25 % und 94 %. Dabei zeigen die Sequenzen der Wirbeltiervertreter die höchsten Homologiegrad mit der hGPX4 Isoform A. Wie zu erwarten weist die hGPX4 Isoform A den höchsten Homologiegrad mit dem orthologen Enzym der Hausmaus (*M. musculus*) auf.

**Zusammenfassung:** In höher entwickelten Modellorganismen wurden regelhaft Gpx4-ähnliche Sequenzen gefunden. In mehreren primitiveren Organismen (*B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *P. dumerilii*) waren solche Sequenzen jedoch nicht nachweisbar. Wirbeltiere weisen im Vergleich zu wirbellosen Tieren, Pflanzen, Moosen, *Archaea* und Bakterien katalytische Tetraden mit UQWN auf und teilen höhere Homologiegrade mit der humanen GPX4.

### 3.1.1.2 Gpx4 in Viren

Zum Suchzeitpunkt umfasste die RefSeq-Sammlung mehr als 10000 Viren. Die BLAST-Recherche nach Gpx4-Sequenzen in Viren (NCBI Taxid: 10239) lieferte drei in der Literatur bereits beschriebene Treffer: Glutathione peroxidase des Fowlpox Virus (NP\_039027.1),



**Abb. 19: Virale Gpx-Sequenzen im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert).** Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren, hell umrandete Aminosäureabschnitte stellen längere Insertionsabschnitte dar. Hell-grau hervorgehoben ist das Cys als Aminosäuren der katalytischen Tetrade der Sequenz von CPV. FPV = Fowlpox virus, CPV = Canarypox Virus, MCV Subtyp 1 = Molluscum contagiosum Virus Subtyp 1.

CNPV087 putative glutathione peroxidase des Canarypox Virus (NP\_955110.1) und ein Protein MC066L des Molluscum contagiosum Virus Subtyp 1 (NP\_044017.2). Damit fanden sich Gpx4-ähnliche Sequenzen in etwa 0,03 % der Viren. In humanpathogenen Viren wie HIV, HCV, Coxsackie-Virus, Masenvirus oder SARS-CoV-2 lieferte diese Suche keine Treffer. FPV, CPV und MCV stammen aus der Familie der

Poxviridae. FPV und CPV werden zur Gattung der Avipoxviren gezählt. Sie können verschiedenste Vogelarten infizieren und lösen pockenartige Erkrankungen aus (121) (122). MCV aus der Gattung der Molluscipoxviren ist humanpathogen. Es verursacht meist runde, kleine, haut- oder pinkfarbene Papeln der Haut (123). Im Sequenzalignment (Abb. 19) weisen die hGPX4 Isoform A und die Gpx von FPV den höchsten Homologiegrad auf (44,0 %), während die hGPX4 Isoform A mit der Sequenz von MCV Subtyp 1 am wenigsten übereinstimmt (38,0 %). Die viralen Sequenzen weisen untereinander Homologiegrade von 28,3 % bis 72,2 % auf. In allen drei viralen Sequenzen finden sich katalytische Tetraden der Form UQWN bzw. CQWN im Falle von CPV sowie gemeinsame konservierte Aminosäureabfolgen. Ein zweites Alignment der viralen Sequenzen mit Vertretern der hGPX-Familie erlaubt anhand der Homologiegrade (Tab. 11) die Vermutung, dass es sich bei dem Protein MC066L von MCV Subtyp 1 möglicherweise um einen

### 3. ERGEBNISSE

anderen Gpx-Subtypen wie beispielsweise der Gpx1 handeln könnte. Passend hierzu finden sich wie in der Sequenz der hGPX1 Isoform 1 auch im MCO66L-Protein Abschnitte längerer Insertionen im Vergleich zu den anderen in Abb. 19 dargestellten Proteinen.

**Tab. 11: Homologiegrade der Gpx von FPV, der CNPV087 putative glutathione peroxidase von CPV und des Proteins MC066L von MCV Subtyp 1 mit Vertretern der hGPX-Familie. Angaben jeweils in Prozent.**

	hGPX1 Isoform 1	hGPX2	hGPX3 Isoform 1	hGPX4 Isoform A	hGPX5 Isoform 1	hGPX6	hGPX7	hGPX8 Isoform a
FPV	32,9	31,3	34,7	44,0	34,4	33,7	31,7	31,1
CPV	32,9	31,3	33,5	42,2	34,4	34,1	34,1	32,9
MCV Subtyp 1	78,3	59,5	40,8	38,3	43,8	37,1	37,2	29,0

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen finden sich nur in 0,03 % der untersuchten Viren. In verschiedenen humanpathogenen Viren einschließlich des SARS-CoV-2 wurden keine Gpx4-ähnlichen Sequenzen gefunden. Die Gpx-ähnliche Sequenz von MCV Subtyp 1 ist einem anderen Gpx-Subtyp zuzuordnen.

#### 3.1.1.3 Gpx4 in Bakterien

Als eine der drei Domänen des irdischen Lebens gehören Bakterien zu den Prokaryonten. Sie besitzen 70S-Ribosomen und ein im Cytoplasma lokalisiertes Chromosom (122). In der RefSeq-Sammlung sind mehr als 63.000 Bakterienspezies hinterlegt. Von diesen wurden im Rahmen der BLAST-Recherche verschiedenste Bakterien-Phyla nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen durchsucht: *Aquificae* (NCBI-Taxid: 200783), *Acidobacteria* (NCBI-Taxid: 57723), *Chrysiogenetes* (NCBI-Taxid: 200938), *Dictyoglomi* (NCBI-Taxid: 68297), *Deferribacteres* (NCBI-Taxid: 200930), *Fusobacteria* (NCBI-Taxid: 32066), *Nitrospirae* (NCBI-Taxid: 40117), *Spirochaetes* (NCBI-Taxid: 203691), *Thermodesulfobacteria* (NCBI-Taxid: 200940), *Thermotogae* (NCBI-Taxid: 2335), *Nitrospinae/Tectomicrobia* (NCBI-Taxid: 1802340), *Vertreter der Terrabacteria* (NCBI-Taxids: 201174, 200795, 1798711, 1297, 1239, 67819, 544448), der *FCB-* (NCBI-Taxid: 1783270) und der *PVC-*Gruppe (NCBI-Taxid: 1783257) sowie verschiedene Untergruppen der Proteobakterien (NCBI-Taxids: 28211, 28216, 28221, 29547, 1807140, 2008785, 1553900, 580370, 1692040, 135624, 135622, 1617890, 135615, 1706369, 135613, 91347, 1934945, 118969, 135618, 1775403, 135619, 1240482, 135625, 72274, 742030, 72273, 135623, 135614, 118884, 50423). Die Suche lieferte insgesamt 10265 Treffer in 5809 verschiedenen Bakterienspezies. Dies entspricht einer Häufigkeitsverteilung Gpx4-ähnlicher Proteine von 9,2 %. Dabei fanden sich die meisten Treffer in der Klasse der Gammaproteobakterien. Keine Treffer



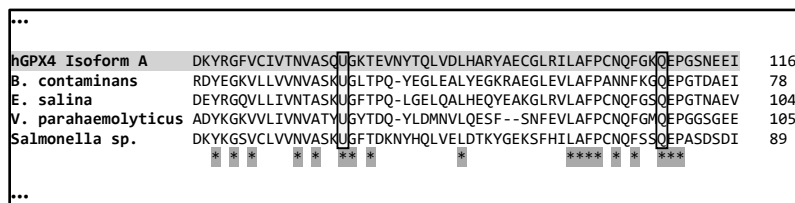
### 3. ERGEBNISSE

lieferte die Suche in folgenden Phyla: *Aquificae*, *Chrysiogenetes*, *Dictyoglomi*, *Deferribacteres*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae*, *Nitrospinae/Tectomicrobia* und Vertretern der Terrabacteria wie *Deinococcus-Thermus* (NCBI-Taxid: 1297) sowie in Klassen der Proteobakterien (*Acidithiobacillia* (NCBI-Taxid: 2008785), *Acidiferrobacterales* (NCBI-Taxid: 1692040), *Arenicellales* (NCBI-Taxid: 1617890), *Immundisolibacterales* (NCBI-Taxid: 1934945), *Orbales* (NCBI-Taxid: 1240482) und *Pasteurellales* (NCBI-Taxid: 135625)).

**Tab. 12: Gpx4-ähnliche Sequenzen mit CQWN-Tetraden in verschiedenen Bakterienspezies.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
glutathione peroxidase [ <i>Occallatibacter savannae</i> ]	WP_109488989.1	45,4
glutathione peroxidase [ <i>Enterobacter cancerogenus</i> ]	WP_080327196.1	44,6
glutathione peroxidase [ <i>Legionella birminghamensis</i> ]	WP_058522973.1	36,4
glutathione peroxidase [ <i>Thiomonas</i> sp. FB-Cd]	WP_038168184.1	44,7
glutathione peroxidase [ <i>Arcobacter nitrofigilis</i> ]	WP_013134192.1	47,2

Katalytische Tetraden fanden sich zumeist in der Form CQWN wie beispielsweise in den Gpx-Sequenzen von *Occallatibacter savannae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Legionella birminghamensis*, *Thiomonas* Spezies und *Arcobacter nitrofigilis* mit Homologiegraden von 36,4 % bis 47,2 % zur hGPX4 Isoform A (Tab. 12). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem



**Abb. 20: Bakterielle Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetrade im Alignment mit der hGPX4 Isoform A.** Ausschnitt aus dem Alignment der hGPX4 Isoform A mit den Gpx-Sequenzen von *Burkholderia contaminans* (*B. contaminans*), *Enhygromyxa salina* (*E. salina*), *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) und *Salmonella* sp. S146\_54837 (*Salmonella* sp.). Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren.

Großteil der bakteriellen Gpx4-ähnlichen Sequenzen nicht um Selenoproteine handelt. In den folgenden vier Spezies fielen katalytische Tetraden mit UQWN auf (Abb. 20): (i) glutathione peroxidase [*Burkholderia contaminans*]

(WP\_175812100.1), (ii) glutathione peroxidase [*Enhygromyxa salina*] (WP\_146660245.1), (iii) glutathione peroxidase [*Vibrio parahaemolyticus*] (WP\_180804923.1), (iv) glutathione peroxidase [*Salmonella* sp. S146\_54837] (WP\_187787935.1). *Burkholderia contaminans* (*B. contaminans*) ist ein gram-negatives, aerobes, nicht-sporenbildendes Betaproteobakterium aus dem *Burkholderia cepacia complex* (*Bcc*). Es wurde 2009 als Kontaminante von Proben aus der Saragossasee beschrieben und seitdem unter anderem als opportunistischer Erreger bei Mukoviszidose-Patienten nachgewiesen (126) (127). *Enhygromyxa salina* (*E. salina*) ist ein

### 3. ERGEBNISSE

Deltaproteobakterium und zählt zu den marinen Myxobakterien. *E. salina* ist ein halophiles, obligat aerobes, gram-negatives Stäbchenbakterium, das sich durch Gleiten fortbewegen und Fruchtkörper bilden kann. Insbesondere wegen ihrer Fähigkeit spezielle sekundäre Metabolite mit pharmakologischem Potential zu produzieren, bieten Myxobakterien ein weitreichendes Forschungsfeld (128) (129). *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) ist ebenfalls ein gram-negatives Proteobakterium aus der Klasse der Gammaproteobakterien (Ordnung *Vibrionales*). Es kann Gastroenteritiden, Wundinfektionen und in schweren Fällen septische Verläufe verursachen. Typischerweise findet sich *V. parahaemolyticus* in wärmerem Wasser und salzärmerer Umgebung (130). *Salmonellen* sind gram-negative, begeißelte Stäbchen aus der Klasse der Gammaproteobakterien (Ordnung *Enterobacterales*). Insbesondere bekannt sind *Salmonellen* als Erreger von Typhus, Paratyphus oder Durchfallerkrankungen (131). In Alignments mit der hGPX4 Isoform A weisen die potentiellen Selenoproteine dieser vier Proteobakterien Homologiegrade von 34,1 % bis 53,0 % auf (Tab. 13).

**Tab. 13: Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetraden in verschiedenen Bakterienspezies.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A. \* bezeichnen Sequenzen mit höheren Homologiegraden zu anderen hGPX-Isoformen.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
glutathione peroxidase [Burkholderia contaminans]	WP_175812100.1	38,4* (hGPX7)
glutathione peroxidase [Enhygromyxa salina]	WP_146660245.1	45,3
glutathione peroxidase [Vibrio parahaemolyticus]	WP_180804923.1	34,1* (s. Text)
glutathione peroxidase [Salmonella sp. S146_54837]	WP_187787935.1	53,0

Untereinander stimmen sie zu 37,6 % bis 47,2 % überein. Neben der katalytischen Tetrade finden sich weitere Abschnitte hoch konservierter Regionen (Abb. 20). Bei vergleichenden Alignments mit ausgewählten Vertretern der humanen GPX-Familie weist die glutathione peroxidase von *V. parahaemolyticus* höhere Homologiegrade mit der humanen GPX1 (um 5 %), GPX2 (um 5 %), GPX3 (um 8 %), GPX5 (um 4 %) und GPX6 (um 8 %) auf. Zudem finden sich analoge kürzere und längere Insertionen in der Sequenz von *V. parahaemolyticus*. Mutmaßlich ist diese glutathione peroxidase einer anderen Gpx-Isoform zuzuordnen. Auch in der Sequenz von *B. contaminans* findet sich eine längere Insertion. Die glutathione peroxidase von *B. contaminans* teilt mit der hGPX7 den höchsten Homologiegrad (< 2 %), die allerdings keine vergleichbare Insertion aufweist. Dies lässt eine Zuordnung zu einer anderen Gpx-Isoform offen. Mittels bSECISearch (109) wurde nach möglichen SECIS-Elementen innerhalb der cDNA der potentiellen bakteriellen Selenoproteine gesucht. Hierbei wurde nur für die Gpx von *E. salina* ein solches SECIS-Element innerhalb der cDNA vorhergesagt. Neben katalytischen Tetraden der Form CQWN oder UQWN konnten innerhalb der gesamten durchsuchten bakteriellen Sequenzen verschiedene

**Tab. 14: Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Bakterien.**

Tetraden-Aminosäure	Konservierungsgrad (%)
C/U	99,95 (99,91/ 0,04)
Q	88,60
W	99,94
N	99,96

Tetradenvariationen beobachtet werden. Am häufigsten fanden sich Variationen des Glutamins (Gln, Q). Tatsächlich fielen bei der Überprüfung der katalytischen Tetraden Diskrepanzen zwischen den verwendeten Alignmentprogrammen auf, die eine sichere Quantifizierung der Tetradenvariationen und deren Ausgestaltung nicht

erlaubten. In Zusammenschau können für die bekannte katalytische Tetrade C/U, Q, W, N, die in Tab. 14 angeführten Konservierungsgrade der Aminosäuren bestimmt werden.

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen finden sich in weniger als 10 % der untersuchten Bakterienspezies. Diese weisen überwiegend katalytische Tetraden mit CQWN auf und stellen somit keine Selenoproteine dar. Vier Spezies aus dem Phylum der Proteobakterien wiesen UQWN-Tetraden auf, von denen möglicherweise die glutathione peroxidase des *V. parahaemolyticus* einer anderen Gpx-Isoform zuzuordnen ist. Für die katalytische Tetrade mit C/U, Q, W, N konnten Konservierungsgrade von 88,60-99,96 % ermittelt werden.

### 3.1.1.4 Gpx4 in *Archaea*

*Archaea* stellen die zweite Domäne des irdischen Lebens dar. Auch sie sind Prokaryonten mit 70S-Ribosomen und einem frei im Cytoplasma liegendem Chromosom (122). Die RefSeq-Sammlung umfasst etwa 1300 *Archaeaspezies*. Insgesamt lieferte die Suche in der Domäne der *Archaea* (NCBI-Taxid: 2157) zwölf Treffer in 10 Organismen. Dies entspricht einer Häufigkeit Gpx4-ähnlicher Sequenzen unter *Archaea* von weniger als 1 %. Unter den Treffern finden sich Vertreter der *Methanobrevibacter* und der *Methanosphaera*, obligat anaeroben, methanbildenden *Archaea* aus der Familie der *Methanobacteriaceae* (132).

**Tab. 15: Gpx4-ähnliche Sequenzen in *Archaea*.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A. \* bezeichnen Sequenzen mit höheren Homologiegraden zu anderen hGPX-Isoformen.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
glutathione peroxidase [Methanobrevibacter millerae]	WP_058738801.1	42,4
glutathione peroxidase [Methanobrevibacter ruminantium]	WP_012956733.1	41,1* (hGPX5/7)
glutathione peroxidase [Methanobrevibacter thaueri]	WP_116592078.1	41,1
glutathione peroxidase [Methanosphaera sp. BMS]	WP_112123681.1	40,5
glutathione peroxidase [Methanobrevibacter olleyae]	WP_067147729.1	41,1

Die Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen unter allen archaeaischen Sequenzen lieferte damit dieselben Ergebnisse wie die Suche am Modellorganismus der *Methanobacteriaceae*.

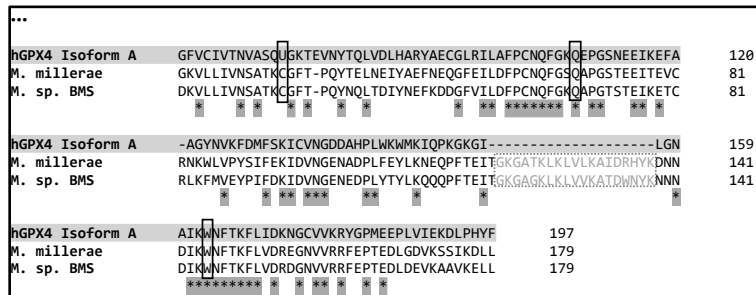


Abb. 21: Archaeaische Gpx4-ähnliche Sequenzen am Beispiel von *Methanobrevibacter millerae* (*M. millerae*) und *Methanosphaera sp. BMS* (*M. sp. BMS*) im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren. Abschnitte einer längeren Insertion sind hell hinterlegt.

Exemplarisch wurden fünf willkürlich ausgewählte Treffer näher untersucht. Tab. 15 führt deren Homologiegrade aus dem Alignment mit der hGPX4 Isoform A an. Untereinander weisen die Sequenzen Homologiegrade von 68,2 % bis 86,0 % auf. Wie exemplarisch in Abb. 21 dargestellt, tragen die

Gpx-Isoformen der *Methanobrevibacter* bzw. *Methanosphaera* alle ein Cys am katalytischen Zentrum. Zudem finden sich Abschnitte hoch konservierter Aminosäuren. Alle fünf archaeaischen Gpx-Sequenzen weisen im Gegensatz zur hGPX4 Isoform A eine längere Insertion auf, die sich zu Teilen auch in den humanen Gpx-Isoformen 1 bis 3, 5 und 6 findet. Im Alignment mit Vertretern der hGPX-Familie teilt lediglich die Gpx-Sequenz des *Methanobrevibacter ruminantium* geringfügig höhere Homologiegrade mit der hGPX5 Isoform 1 (41,3 %) und der hGPX7 (42,5 %).

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen wurden in weniger als 1,0 % der durchsuchten *Archaeaspezies* gefunden. Treffer fanden sich in methanbildenden *Archaea*, den *Methanobrevibacter* und *-sphaera*, die ausschließlich katalytische Tetraden mit CQWN aufwiesen.

### 3.1.1.5 Gpx4 in Pilzen

Pilze repräsentieren ein Lebensreich innerhalb der Domäne der Eukaryonten. Eine Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen in Pilzen erfolgte in den Gruppen *Ascomycota* (NCBI-Taxid: 4890), *Basidiomycota* (NCBI-Taxid: 5204) und anderen Pilzen („Fungi Not *Ascomycota* Not *Basidiomycota*“ (NCBI-Taxid: 4751 Not 4890 Not 5204). Dabei umfasst die RefSeq-Sammlung mehr als 13900 Pilze. In Summe erzielte die Suche in allen drei Suchgruppen 102 Treffer in 100 verschiedenen Organismen. Gpx4-ähnliche Sequenzen kommen damit mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % in Pilzen vor. Die meisten Treffer fanden sich unter den *Ascomycota* (76 Treffer in 75 Organismen).



**Tab. 17: Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Pilzen.**

Tetraden-Aminosäure	Konservierungsgrad (%)
C	99,0
Q	97,1
W	100,0
N	100,0

Gpx4-ähnlichen Sequenzen folgen für die einzelnen Aminosäuren der Tetrade Konservierungsgrade von 97,1 % bis 100,0 % (Tab. 17).

Alignment mit Clustal Omega nicht immer den BLAST-Identitätswerten entsprechen, resultiert in einem Fall ein Homologiegrad < 30 %. Im Alignment mit anderen Vertretern der hGPX-Familie weisen diese Sequenzen vereinzelt höhere Homologiegrade mit der hGPX1 oder der hGPX2 auf (< 5 %). In Zusammenschau aller fungalen

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen finden sich in weniger als 1 % der untersuchten Pilze. Überwiegend weisen die Sequenzen CQWN-Tetraden auf und stellen keine Selenoproteine dar. Für die CQWN-Tetrade konnten Konservierungsgrade von 97,1-100,0 % bestimmt werden.

### 3.1.1.6 Gpx4 in Pflanzen

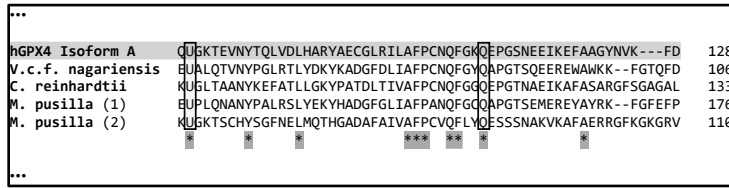
Pflanzen stellen ein weiteres eukaryontisches Lebensreich dar. Die RefSeq-Sammlung beinhaltet mehr als 5600 Pflanzen. Bei der Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen in der taxonomischen Gruppe der *Viridiplantae* (NCBI-Taxid: 33090) nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen fanden sich 413 Treffer in 124 Organismen. Dies entspricht einer Häufigkeit Gpx4-ähnlicher Sequenzen in Pflanzen von 2,2 %. Unter den Treffern finden sich sowohl Vertreter der *Embryophyta* (Landpflanzen) wie probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Glycine max] (XP\_003532707.1) als auch Vertreter der *Chlorophyta* (Grünen Algen) wie putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Auxenochlorella protothecoides] (XP\_011396794.1). Im

...		
hGPX4 Isoform A	DWRCARSMHEFSAKDIDGHMVNLDKYRGFVCIVTNVASQIGKTEVNYTQLVDLHARYAEC	93
Glycine max	ATSNKSVHDFTVKDAKGNIDLDYKGGKVLIIIVNVASQGLTNSNYTELSQLYEKYKQK	120
	*** **	
hGPX4 Isoform A	GLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKFAA-GYVVKDFMFSKICVNGDDAHLWKWKMKIQPK	152
Glycine max	GLEILAFPCNQFGAEPGSNEIQEFVCTRKAEPVFDKVDVNGDKAAPLYKYLKSS--	178
	** ***** **	
hGPX4 Isoform A	GKGILGNAIKWTFKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPLVIEKDLPHYF--	197
Glycine max	KGGLLDGIGKWFVAFKFLVDKEGNVVDRYAPTTSPLSIEKDLLKLLDA	225
	** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	

**Abb. 24: Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase der Sojabohne im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert). Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren.**

Alignment stimmen die beiden vorgenannten Sequenzen zu 47,2 % bzw. 43,2 % mit der hGPX4 Isoform A überein. In der überwiegenden Zahl der positiven Treffer konnten Sequenzen mit CQWN-Tetrade und Abschnitte hoch konservierter Regionen

beobachtet werden wie am Beispiel der Gpx4-Sequenzen von Glycine max in Abb. 24 dargestellt. UQWN-Tetraden fanden sich in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von *Volvox carteri f. nagariensis*,



**Abb. 25: Pflanzliche Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetraden im Alignment mit der hGPX4 Isoform A.** Ausschnitt aus dem Alignment der hGPX4 Isoform A mit den Gpx-Sequenzen von *Volvox carteri f. nagariensis* (V.c.f. nagariensis), *Chlamydomonas reinhardtii* (C. reinhardtii) und *Micromonas pusilla CCMP1545* (M. pusilla (1) entspricht XP\_003057917.1 bzw. M. pusilla (2) entspricht XP\_003058400.1). Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetraden, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren.

*Chlamydomonas reinhardtii* und *Micromonas pusilla CCMP1545* (Abb. 25). Alle drei Spezies stammen aus dem Phylum der *Chlorophyta*. *Volvox carteri f. nagariensis* aus der Familie der *Volvocaceae* ist ein vielzelliger, obligat photoautotropher Organismus, der natürlicherweise

in Teichen oder Bächen vorkommt (133). *Chlamydomonas reinhardtii* aus der Familie der *Chlamydomonadaceae* ist ein einzelliger Organismus, der im Boden und in der pelagischen Zone von Seen lebt (134). *Micromonas pusilla* zählt zur Familie der *Mamiellaceae* und findet sich als marines Phytoplankton in allen Ozeanen der Welt (135). Die Gpx-Sequenzen dieser drei Spezies mit UQWN-Tetraden stimmen zu 29,4 % bis 39,6 % mit der hGPX4 Isoform A überein (Tab. 18).

**Tab. 18: Gpx4-ähnliche Sequenzen mit UQWN-Tetraden in verschiedenen Pflanzenspezies.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A. \* bezeichnen Sequenzen mit höheren Homologiegraden zu anderen hGPX-Isoformen.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
glutathione peroxidase, selenoprotein [ <i>Volvox carteri f. nagariensis</i> ]	XP_002947451.1	39,6* (hGPX2/3)
glutathione peroxidase, selenoprotein [ <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ]	XP_001701658.1	36,8
glutathione peroxidase [ <i>Micromonas pusilla CCMP1545</i> ]	XP_003057917.1	29,4* (hGPX7)
glutathione peroxidase [ <i>Micromonas pusilla CCMP1545</i> ]	XP_003058400.1	33,5

Untereinander weisen sie Homologiegrade zwischen 25,5 % bis 43,8 % auf. Im Alignment mit anderen Vertretern der hGPX-Familie finden sich höhere Homologiegrade für XP\_002947451.1 bzw. XP\_003057917.1 mit der hGPX2, der hGPX3 bzw. hGPX7 von weniger als 2 %. In *Volvox carteri f. nagariensis* und in *Chlamydomonas reinhardtii* fanden sich neben Sequenzen mit UQWN- auch Gpx4-ähnliche Sequenzen mit CQWN-Tetraden. Eine Vorhersage von SECIS-Elementen innerhalb der potentiellen pflanzlichen Selenoproteine erfolgte mit Hilfe des

**Tab. 19: Konservierungsgrade der katalytischen Tetraden mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen von Pflanzen.**

Tetraden-Aminosäure	Konservierungsgrad (%)
C/U	99,5 (98,5/ 1,0)
Q	94,9
W	100,0
N	100,0

Selenoprotein prediction server (110). Hierbei konnte in der 3'UTR der Gpx-Sequenz von *Chlamydomonas reinhardtii* ein mögliches SECIS-Element identifiziert werden. Innerhalb des Pflanzenreiches konnten zudem verschiedene Variationen der katalytischen Tetraden beobachtet werden. Hierbei fanden sich insbesondere

Variationen des Glutamins sowie je einmal eine Substitution des C durch Ala (A) bzw. Leu (L). Die Konservierungsgrade der einzelnen Tetraden-Aminosäuren sind in Tab. 19 zusammengefasst.

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen finden sich in 2,2 % der untersuchten Pflanzen. Überwiegend fanden sich Sequenzen mit CQWN-Tetrade, die keine Selenoproteine darstellen. In drei Pflanzenspezies konnten potentielle Selenoproteine mit UQWN-Tetrade gefunden werden. Die Konservierungsgrade der Tetrade mit C/U, Q, W, N liegen zwischen 94,9-100,0 %.

### 3.1.1.7 Gpx4 in Tieren

Auch die Tierwelt wird als eigenständiges eukaryontisches Lebensreich zusammengefasst. Das

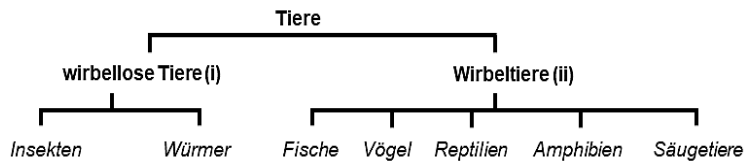


Abb. 26: Systematik der Suche nach Gpx4-Sequenzen im Tierreich.

Vorkommen einer Gpx4 wurde exemplarisch anhand verschiedener wirbelloser Tiere (Insekten, Würmer) und ausgewählter Vertreter der

Wirbeltiere (Fische, Vögel, Reptilien, Amphibien, Säugetiere) untersucht (Abb. 26).

#### (i) Gpx4 in wirbellosen Tieren

Die RefSeq-Sammlung enthält Sequenzen von mehr als 4000 Invertebraten. Zusammenfassend fanden sich in Insekten und Würmern 367 Treffer in 164 Organismen. Dies entspricht einer Häufigkeit Gpx4-ähnlicher Sequenzen in diesen wirbellosen Tieren von 3,8 %. Die meisten Treffer fanden sich in Insekten. Üblicherweise konnten CQWN-Tetraden beobachtet werden.

Tab. 20: Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen verschiedener Invertebraten.

Tetraden-Aminosäure	Konsverierungsgrad (%)
C/U	95,6 (94,5/ 1,1)
Q	96,7
W	98,4
N	98,9

Entsprechend verfügen wirbellose Tiere in der Regel nicht über SecGpx4-Proteine. In je einem Vertreter der Insekten und der Würmer konnten UQWN-Tetraden gefunden werden. Für die einzelnen Aminosäuren der Tetrade C/U, Q, W, N konnten Konservierungsgrade zwischen 95,4 % und 98,9 % ermittelt werden (Tab. 20).



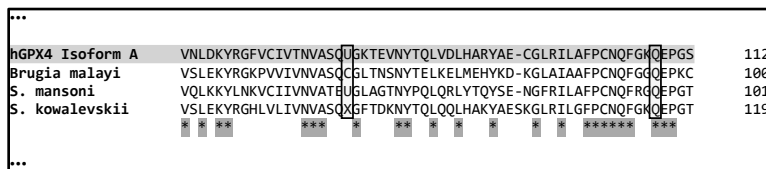
*Gpx4 in Insekten*

In der Gruppe der Insekten (NCBI-Taxid: 6960) fanden sich 354 positive Treffer in 157 Organismen, darunter beispielsweise die Gpx4-Sequenz des Reiskäfers *Sitophilus oryzae* (XP\_030753790.1). Wie bei *D. melanogaster* wiesen die positiven Treffer vorwiegend CQWN-Tetraden auf. *Folsomia candida*, eine Spezies aus der Klasse der Springschwänze (*Collembola*), wies dagegen drei Isoformen einer Gpx4-Sequenz mit UQWN-Tetrade auf (XP\_021956885.1, XP\_021956886.1, XP\_021956889.1). Für das Gen der Gpx4-Sequenzen von *Folsomia candida* wurde ein SECIS-Element vorhergesagt. Während die Gpx4 von *Sitophilus oryzae* zu 54,6 % mit der hGPX4 Isoform A übereinstimmt, teilen die potentiellen Selenoproteine von *Folsomia candida* mit der hGPX4 Isoform A Homologiegrade von 46,9 % bis 53,0 %. Untereinander stimmen die Gpx4-Isoformen von *Folsomia candida* zu > 90 % überein, mit der Gpx4 von *Sitophilus oryzae* stimmen sie zu etwa 50 % überein. Innerhalb der Insekten fielen vielfältige Variationen der katalytischen Tetrade auf, darunter im Besonderen Substitutionen des Cys oder Sec durch ein Serin (Ser, S) wie in XP\_021185030.1 und Substitutionen des Gln durch Aminosäuren wie beispielsweise Threonin (XP\_031616883.1) oder Asparagin (XP\_027842036.1).

**Zusammenfassung:** In Insekten fanden sich Gpx4-Sequenzen mit insbesondere CQWN-Tetrade. Als einzige Spezies wies *Folsomia candida* drei Gpx4-Isoformen mit UQWN-Tetrade auf. Darüber hinaus konnten vielfältige Varianten der katalytischen Tetrade beobachtet werden.

*Gpx4 in Würmern*

Auf der Suche nach Gpx4-Sequenzen in Würmern wurden Nematoden (NCBI-Taxid: 6231), Trematoden (NCBI-Taxid: 6178) und verschiedene andere Wurmart (NCBI-Taxids: 10220, 6340, 10232, 66780, 10229, 6217, 43120, 33310, 33467, 120557, 27563, 6433, 6219) durchsucht. Insgesamt lieferte die Suche 13 Treffer in 7 Organismen. Die meisten Treffer fanden sich unter



den Nematoden, die allesamt wie *C. elegans* und eine Gpx4-Sequenz aus *Brugia malayi* (XP\_001897517.1) CQWN-Tetraden aufwiesen. In der Gruppe der Trematoden fand sich nur eine Gpx-Sequenz aus *Schistosoma mansoni* als

**Abb. 27: Gpx4-ähnliche Sequenzen in verschiedenen Wurmpezies im Alignment mit der hGPX4 Isoform A.** Ausschnitt aus dem Alignment der hGPX4 Isoform A mit den Gpx4-ähnlichen Sequenzen von *Brugia malayi*, *Schistosoma mansoni* (S. mansoni) und *Saccoglossus kowalevskii* (S. kowalevskii). Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren.

potentielles Selenoprotein mit UQWN-Tetrade (XP\_018647612.1). *Schistosoma mansoni* aus der Gattung der Schistosoma (Pärchenegel) ist als humanpathogener Erreger der Schistosomiasis bekannt. Ein SECIS-Element konnte mittels Selenoprotein prediction server (110) in dem die Gpx-Sequenz kodierenden Gen nicht identifiziert werden. Unter sonstigen Wurmartarten fand sich eine Gpx4-Sequenz aus *Saccoglossus kowalevskii* mit XQWN-Tetrade (XP\_006823378.1). Mit der hGPX4 Isoform A teilen die Sequenzen aus *Brugia malayi*, *Schistosoma mansoni* und *Saccoglossus kowalevskii* Homologiegrade von 41,9 % bis 58,3 % (Tab. 21). Untereinander stimmen die Sequenzen zu 43,1 % bis 47,0 % überein. Im Alignment finden sich zudem Abschnitte hoch konservierter Regionen (Abb. 27). Die Gpx-Sequenz von *Schistosoma mansoni* stimmt im Alignment mit anderen Vertretern der humanen GPX-Familie am meisten mit der hGPX4 Isoform A überein.

**Tab. 21: Gpx4-ähnliche Sequenzen in Würmer.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
<b>Nematoden</b>		
Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, putative [Brugia malayi]	XP_001897517.1	42,1
<b>Trematoden</b>		
putative glutathione peroxidase [Schistosoma mansoni]	XP_018647612.1	41,9
<b>Sonstige Wurmpezies</b>		
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial-like [Saccoglossus kowalevskii]	XP_006823378.1	58,3

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen konnten in 11 Nematoden mit CQWN-Tetrade, in *Schistosoma mansoni* aus der Klasse der Trematoden als potentielles Selenoprotein mit UQWN-Tetrade und in *Saccoglossus kowalevskii* mit XQWN-Tetrade detektiert werden.

(ii) *Gpx4* in Wirbeltieren

In der RefSeq-Sammlung sind etwa 4500 Sequenzen von Wirbeltieren hinterlegt, die nicht in die Klasse der Säugetiere einzuordnen sind. In Zusammenschau lieferte die Suche unter Wirbeltieren wie Fischen, Vögeln, Reptilien und Amphibien 386 Treffer in 168 Organismen. Dies entspricht einer Häufigkeit Gpx4-ähnlicher Sequenzen von 3,7 %. Die überwiegende Mehrheit der Treffer fand sich unter Fischen. In > 97 % der Fälle konnten UQWN-Tetraden beobachtet werden, in 1 % der Fälle fanden sich CQWN-Tetraden, in weiteren Fällen waren Tetraden noch nicht vollständig spezifiziert (XQWN) (Tab. 22). Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil der Gpx4-ähnlichen Sequenzen potentielle Selenoproteine darstellen. Im Speziellen sind mehr als 1200 Sequenzen von

### 3. ERGEBNISSE

Säugetieren in die RefSeq-Sammlung eingepflegt. Unter Säugetieren fanden sich 195 Treffer in 134 Organismen, entsprechend einer Häufigkeit von 10,4 %. Eine Vielzahl von Sequenzen wies UQWN-Tetraden auf (> 90 %) (Tab. 22). Daneben fanden sich zwei Sequenzen mit CQWN- und mehrere Sequenzen mit bislang unbekannter vollständiger Tetrade (XQWN).

**Tab. 22: Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade mit C/U, Q, W, N in Gpx4-ähnlichen Sequenzen verschiedener Wirbeltiere.**

#### Fische, Vögel, Reptilien, Amphibien

Tetraden-Aminosäure	Konservierungsgrad (%)
C/U	98,2 (1,0/ 97,2)
Q	100,0
W	100,0
N	100,0

#### Säugetiere

Tetraden-Aminosäure	Konservierungsgrad (%)
C/U	93,3 (0,5/ 92,8)
Q	100,0
W	100,0
N	100,0

#### *Gpx4* in Fischen

Die Klasse der Fische wurde in den Gruppen *Actinopterygii* (NCBI-Taxid: 7898), *Chondrichthyes* (NCBI-Taxid: 7777), *Coelacanthimorpha* (NCBI-Taxid: 118072), *Dipnoi* (NCBI-Taxid: 7878), *Hyperoartia* (NCBI-Taxid: 117569) und *Myxini* (NCBI-Taxid: 117565) auf das Vorkommen von Gpx4-ähnlichen Sequenzen untersucht. Die Suche lieferte insgesamt 311 Treffer in 103 Organismen, wobei sich insbesondere unter den *Actinopterygii* viele Gpx4-ähnliche Sequenzen fanden. Keine Treffer lieferte die Suche unter den *Dipnoi* (Lungenfischen) und den *Myxini* (Schleimaale). Typischerweise fanden sich potentielle Selenoproteine mit UQWN-Tetrade.

**Tab. 23: Gpx4-Sequenzen in Fischen.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
<b><i>Actinopterygii</i></b> PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial [Pygocentrus nattereri]	XP_017552629.1	71,7
<b><i>Chondrichthyes</i></b> phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X1 [Rhincodon typus]	XP_020386343.1	64,8
<b><i>Coelacanthimorpha</i></b> PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial-like [Latimeria chalumnae]	XP_014344037.1	62,4
<b><i>Hyperoartia</i></b> phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like isoform X2 [Petromyzon marinus]	XP_032826518.1	62,1

### 3. ERGEBNISSE

Tab. 23 führt beispielhaft verschiedene SecGpx4-Proteine aus den unterschiedlichen Suchgruppen unter Angabe der Homologiegrade zur hGPX4 Isoform A (62,1 %-71,7 %) an. In drei Spezies der *Actinopterygii* wurden abgesehen von zumeist mehreren „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase“- oder „phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like“-Isoformen mit UQWN-Tetrade Gpx4-ähnliche Sequenzen mit CQWN-Tetraden beobachtet: (i) in *Oryzias latipes* (Medaka) (XP\_004079224.2), (ii) in *Salmo salar* (Atlantischer Seelachs) (NP\_001140075.1), (iii) in einem uncharakterisierten Protein von *Oncorhynchus tshawytscha* (Königslachs) (XP\_024267392.1). Diese Proteine stimmen zu 37,0 % bis 62,8 % mit der hGPX4 Isoform A überein. Im Alignment mit anderen Vertretern der humanen GPX-Familie weist das uncharakterisierte Protein von *Oncorhynchus tshawytscha* kaum höhere Homologiegrade mit der hGPX1 (< 0,5 %) und etwas höhere Homologiegrade mit der hGPX7 (um ca. 5 %) auf.

**Zusammenfassung:** Gpx4-ähnliche Sequenzen in Fischen konnten in *Actinopterygii*, *Chondrichthyes*, *Coelacanthimorpha* und *Hyperoartia* zumeist mit UQWN-Tetrade gefunden werden. In drei Spezies fiel neben mehreren SecGpx4-Isoformen je eine Gpx4-ähnliche Sequenz mit CQWN-Tetrade auf. Bei dem uncharakterisierten Protein von *Oncorhynchus tshawytscha* könnte es sich um eine andere Gpx-Isoform handeln.

#### *Gpx4* in Vögeln

Unter Vögeln (NCBI-Taxid: 8782) lieferte die Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen 45 Treffer in 41 Organismen. Katalytische Tetraden fanden sich mit UQWN wie bei den in Tab. 24 exemplarisch angeführten Treffern mit Homologiegraden zur hGPX4 Isoform A von 60,6 % bis 74,0 %. In fünf Fällen waren katalytische Tetraden noch nicht vollständig bekannt (XQWN).

**Tab. 24: Gpx4-Sequenzen in Vögeln.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Falco cherrug]	XP_014142707.2	63,2
PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial [Calidris pugnax]	XP_014814050.1	60,6
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X2 [Phasianus colchicus]	XP_031460065.1	73,2
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase precursor [Meleagris gallopavo]	NP_001295580.1	74,0
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Strigops habroptila]	XP_030364991.1	71,0

**Zusammenfassung:** Gpx4-Sequenzen finden sich in Vögeln soweit bekannt mit UQWN-Tetrade.

*Gpx4 in Reptilien*

Reptilien zählen wie die Vögel zu den *Sauropsida* (37). Es wurde in den Ordnungen *Crocodylia* (NCBI-Taxid: 1294634) und *Testudines* (NCBI-Taxid: 8459) sowie in der Klasse der *Lepidosauria* (NCBI-Taxid: 8504) nach Gpx4-Sequenzen gesucht.

**Tab. 25: Gpx4-Sequenzen in Reptilien.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
<b><i>Crocodylia</i></b> PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial [Crocodylus porosus]	XP_019393805.1	73,2
<b><i>Lepidosauria</i></b> phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X1 [Pogona vitticeps]	XP_020649820.1	74,2
<b><i>Testudines</i></b> phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Gopherus evgoodei]	XP_030396396.1	71,7

Insgesamt fanden sich 19 Treffer in 18 Organismen. Die meisten positiven Treffer (11) konnten unter den *Lepidosauria* gezählt werden. Katalytische Tetraden fanden sich ausschließlich in der Form UQWN. Exemplarisch führt Tab. 25 je einen positiven Treffer der einzelnen Suchgruppen unter Angabe des jeweiligen Homologiegrades zur hGPX4 Isoform A an. In diesem Fall variieren die Homologiegrade zur hGPX4 Isoform A zwischen 71,7 % und 74,2 %.

**Zusammenfassung:** Unter Reptilien konnten Gpx4-Sequenzen ausschließlich mit UQWN-Tetrade beobachtet werden. Die überwiegende Zahl der positiven Treffer fand sich in der Klasse der *Lepidosauria*.

*Gpx4 in Amphibien*

In der Klasse der Amphibien (NCBI-Taxid: 8292) lieferte die Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen 11 Treffer in 6 Organismen, darunter zehn Selenoproteine mit UQWN-Tetrade und ein Protein mit CQWN-Tetrade (NP\_001088000.1). Bei diesem Protein handelt es sich um ein bislang nicht näher charakterisiertes Protein in *Xenopus laevis* mit einem Homologiegrad von 36,0 % zur hGPX4 Isoform A. *Xenopus laevis* weist dabei zwei Gpx4-Isoformen mit UQWN-Tetrade auf. Das nicht näher charakterisierte Protein von *Xenopus laevis* wies im Alignment mit anderen Vertretern der humanen GPX-Familie Homologiegrade von 73,4 % zur hGPX7 bzw. von 50,5 % zu den hGPX8-Isoformen auf.

### 3. ERGEBNISSE

**Tab. 26: Gpx4-Sequenzen in Amphibien.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X2 [Microcaecilia unicolor]	XP_030075716.1	75,3
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase [Rhinatrema bivittatum]	XP_029469258.1	66,7
glutathione peroxidase 4 S homeolog [Xenopus laevis]	NP_001165213.1	73,5
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform B [Xenopus tropicalis]	NP_001333415.1	63,6
PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial [Nanorana parkeri]	XP_018415016.1	66,3

Demnach könnte es sich hierbei mutmaßlich um eine andere Gpx-Isoform handeln. Exemplarisch sind in Tab. 26 verschiedene positive Treffer mit UQWN-Tetrade unter Angabe der Homologiegrade aus den Alignments mit der hGPX4 Isoform A zusammengestellt.

**Zusammenfassung:** In Amphibien finden sich Gpx4-Sequenzen mit UQWN-Tetrade. Ein bislang nicht näher charakterisiertes Protein aus *Xenopus laevis* fiel mit CQWN-Tetrade auf, wobei es sich mutmaßlich um eine andere Gpx-Isoform handeln könnte.

#### *Gpx4 in Säugetieren*

Ein kennzeichnendes Merkmal der Säugetiere ist die Ernährung des Nachwuchses mit der in den weiblichen Brustdrüsen produzierten Muttermilch (37). Bei der Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen in Säugetieren fanden sich insgesamt 195 Treffer in 134 Organismen. Dabei lieferte eine erste Suche in der Klasse der Säugetiere unter Ausschluss von Primaten (NCBI-Taxid: 40674 Not 9443) 153 Treffer in 109 Organismen. Überwiegend wiesen die positiven Treffer UQWN-Tetraden auf, darunter auch eine Gpx4 aus *Ornithorhynchus anatinus* (Schnabeltier) (XP\_028908081.1), einem Vertreter der *Prototheria* (Ursäuger).

**Tab. 27: Gpx4-Sequenzen in Säugetieren unter Ausschluss von Primaten.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X1 [Felis catus]	XP_011286531.3	84,8
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X1 [Acinonyx jubatus]	XP_026905289.1	84,8
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X1 [Lynx canadensis]	XP_030192245.1	84,8
PREDICTED: phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X2 [Panthera pardus]	XP_019289537.1	95,4
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X1 [Equus caballus]	XP_023500092.1	81,2

### 3. ERGEBNISSE

Einige Beispiele solcher positiven Treffer sind in Tab. 27 unter Angabe der jeweiligen Homologiegrade zur hGPX4 Isoform A zusammengefasst. In neun Proteinen war die katalytische Tetrade noch nicht abschließend aufgeklärt (XQWN-Tetrade). Die probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase von *Artibeus jamaicensis* (Jamaika-Fruchtfledermaus) (XP\_036998924.1) wies eine CQWN-Tetrade auf und teilt mit der hGPX4 Isoform A Homologiegrade von 50,3 %. *Artibeus jamaicensis* verfügt darüber hinaus über ein als phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like bezeichnetes Protein (XP\_036994915.1) mit UQWN-Tetrade, das höhere Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A teilt (84,3 %).

Im Anschluss wurden nicht-humane Primaten unter Ausschluss des *Homo sapiens* (NCBI-Taxid: 9443 NOT 9606) durchsucht. Primaten zeichnen sich gegenüber anderen Säugetieren durch Extremitäten mit Fingern aus, die ein Greifen ermöglichen (37). Hierbei fanden sich 38 Treffer in 24 Organismen mit in der Mehrzahl UQWN-Tetrade oder nicht vollständig aufgeklärter Tetrade (XQWN). Positive Treffer mit hohen Homologiegraden zur hGPX4 Isoform A wiesen beispielsweise die Gpx4 von *Pan troglodytes* (Schimpanse) oder *Nomascus leucogenys* (Nördlicher Weißwangen-Schopfgibbon) auf (Tab. 28). Entsprechend der hohen Homologiegrade zur hGPX4 Isoform A finden sich in Sequenzalignments lange Abschnitte hoch konservierter Regionen (Abb. 28 am Beispiel von *Pan troglodytes* und *Pan paniscus*).

**Tab. 28: Gpx4-Sequenzen Nicht-Humaner Primaten.** Angegeben sind die Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A.

Protein	Akzession	Homologiegrad (%)
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase precursor [Pan troglodytes]	NP_001351663.1	100,0
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform B [Macaca mulatta]	NP_001333349.1	87,8
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial isoform X2 [Pongo abelii]	XP_003780465.2	87,8
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X2 [Pan paniscus]	XP_008964608.2	87,3
phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform X2 [Nomascus leucogenys]	XP_003277028.2	99,5

```

***
hGPX4 Isoform A  GFVCIVTNVASQIGKTEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFA  120
Pan troglodytes  GFVCIVTNVASQIGKTEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFA  120
Pan paniscus     GFVCIVTNVASQIGKTEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQEPGSNEEIKEFA  120
*****
hGPX4 Isoform A  AGYNVVFDMFSKICVNGDDAHLKWKMKIQPKGGKILGNATKHNFTKFLIDKNGCVVKRY  180
Pan troglodytes  AGYNVVFDMFSKICVNGDDAHLKWKMKIQPKGGKILGNATKHNFTKFLIDKNGCVVKRY  180
Pan paniscus     AGYNVVFDMFSKICVNGDDAHLKWKMKIQPKGGKILGNATKHNFTKFGHRLSTVPHRQE  180
*****
***
  
```

**Abb. 28: Gpx4-Sequenzen von *Pan troglodytes* und *Pan paniscus* im Alignment mit der hGPX4 Isoform A (grau markiert).** Schwarz umrandete Kästen markieren die Position der katalytischen Tetrade, grau unterlegte Sterne markieren hoch konservierte Aminosäuren.

Unter den humanen Primaten (NCBI-Taxid: 9606) lieferte die Suche vier Treffer, entsprechend der in der Einleitung (1.3.3 Transkripte des *Gpx4*-Gens, S. 25) vorgestellten vier GPX4-Isoformen A bis D. Diese teilen untereinander Homologiegrade zwischen 75,1 % und 100,0 %.

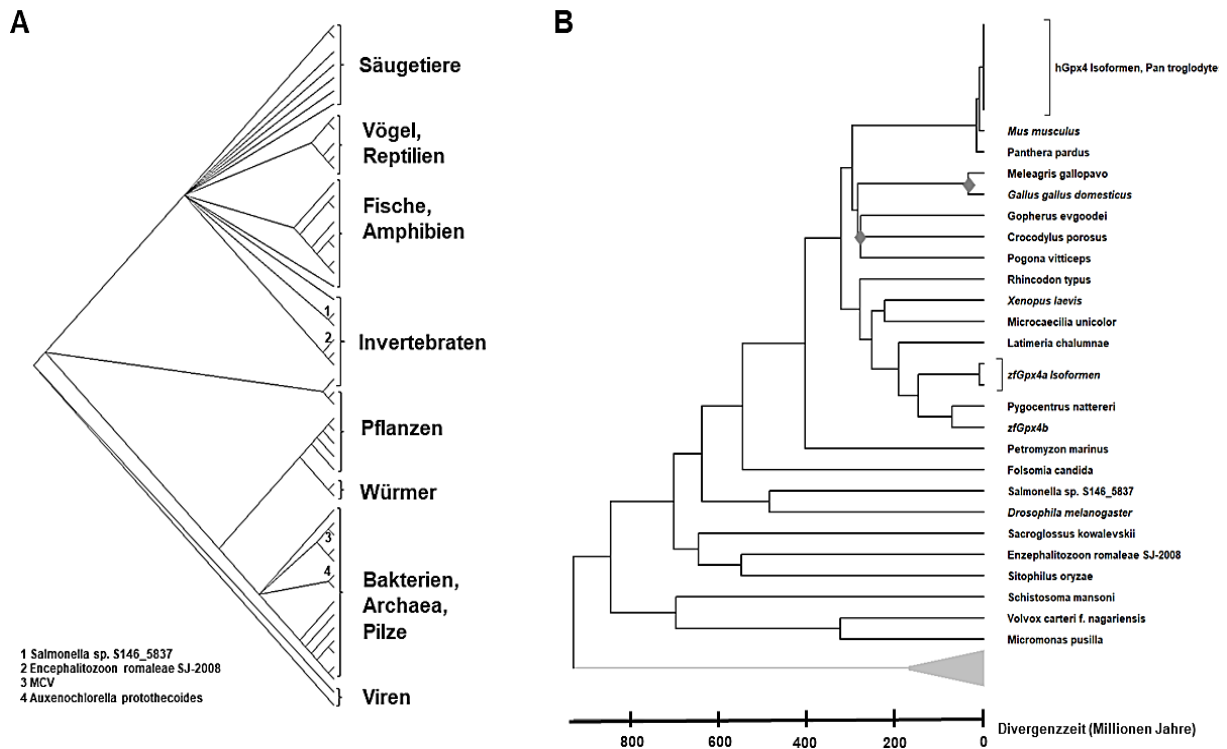
Obwohl in hoch entwickelten Lebewesen mit der von uns genutzten Suchstrategie Gpx4-ähnliche Sequenzen nachgewiesen wurden, fanden sich in anderen hoch entwickelten Säugetieren wie beispielsweise *Gorilla gorilla* (Westlicher Gorilla), *Oryctolagus cuniculus* (Wildkaninchen), *Papio anubis* (Anubispavian) und *Vulpes vulpes* (Rotfuchs) keine solchen Sequenzen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass *Gpx4*-Gene in diesen Organismen tatsächlich nicht vorkommen, dass die Sequenzierung der Genome noch unvollständig ist oder dass die Spezies-spezifischen Gpx4-Sequenzen mit unserer Suchstrategie nicht erfasst wurden.

**Zusammenfassung:** Säugetiere weisen überwiegend Gpx4-Sequenzen mit UQWN-Tetrade auf, darunter auch eine Gpx4-Sequenz in *Ornithorhynchus anatinus*, einem Ursäuger. In *Artibeus jamaicensis* konnte neben einem Gpx4-ähnlichen Protein mit UQWN-Tetrade eine CysGpx4 gefunden werden.

#### 3.1.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Gpx4

Untersuchungen zur Abstammung der Gpx4 erfolgten mit Hilfe des Computerprogramms PhyML 3.0 (85). Hierfür wurden verschiedene beispielhaft angeführte positive Treffer mit CQWN- und UQWN-Tetrade aus dem vorangegangenen Abschnitt, Sequenzen untersuchter Modellorganismen sowie die zfGpx4-Isoformen genutzt. Nach Alignment und Bestimmung der gewichteten TCS in T-coffee (84) konnte ein phylogenetischer Baum mit 500 Bootstrap-Wiederholungen generiert werden (Abb. 29, **A**). Eine Zeitachse zu dieser Phylogenie wurde mit MEGA-X (86) erstellt (Abb. 29, **B**). Die Zeitkalibrierung erfolgte mittels TimeTree (87) anhand der Divergenzzeiten von *Meleagris gallopavo* (Truthuhn) und *Gallus gallus domesticus* sowie *Crocodylus porosus* (Leistenkrokodil) und *Pogona vitticeps* (Streifenköpfige Bartagame). Abb. 29 **A** zeigt ein verdichtetes, ungewurzeltetes Kladogramm zur Phylogenie der Gpx4. Die verschiedenen Gpx4- bzw. Gpx4-ähnlichen Sequenzen konnten darin zu übergeordneten Gruppen zusammengefasst werden. Virale Sequenzen (FPV, CPV) separieren sich hierbei sehr früh, was auf geringe verwandtschaftliche Beziehungen zu den übrigen Gpx4-ähnlichen Sequenzen hindeutet. Während sich bakterielle, archaeaische, fungale und pflanzliche Sequenzen zusammen mit den Sequenzen von Würmern von einem gemeinsamen früheren Vorfahren abspalten, weisen die übrigen tierischen Gpx4-Sequenzen einen späteren gemeinsamen Vorfahren (vor etwa 700 Mio. Jahre) auf (Abb. 29, **B**). Auch eine virale Sequenz (MCV) wird gemeinsam mit den übrigen bakteriellen, archaeaischen und fungalen Sequenzen eingeordnet. Unter den tierischen Sequenzen findet sich das zu den Pilzen zählende *Encephalitozoon romaleae* SJ-2008 sowie die





**Abb. 29: Phylogenie der Gpx4 und Gpx4-ähnlicher Sequenzen.** Die Kladogramme wurden mittels T-Coffee (84) und anhand der gewichteten TCS in PhyML 3.0 (85) mit 500 Bootstrap-Wiederholungen generiert. **(A) Schematisches Kladogramm zur Phylogenie der Gpx4.** Gpx4-(ähnliche)-Sequenzen sind in übergeordneten Gruppen zusammengefasst. Ausreißer sind mit 1-4 markiert. 1 *Salmonella sp. S146\_5837*, 2 *Encephalitozoon romaleae SJ-2008*, 3 *Molloscum contagiosum virus Subtyp 1* (MCV), 4 *Auxenochlorella protothecoides*. **(B) Zeitkalibriertes Kladogramm zur Phylogenie der Gpx4.** Die Zeitachse wurde in MEGA-X (86) bestimmt. Zur Kalibrierung dienten die mit TimeTree (87) bestimmten Divergenzzeiten von *Meleagris gallopavo* - *Gallus gallus domesticus* und *Crocodylus porosus* – *Pogona vitticeps* (graue Rauten). Unter Outgroup wurden bakterielle, archaeaische, fungale, virale und eine pflanzliche Sequenzen zusammengefasst.

Sequenz einer Salmonellenspezies. Wirbellose Tiere und Wirbeltiere divergierten gemäß Abb. 29 B vor mehr als 600 Mio. Jahren voneinander. Eine Separation der Wirbeltiersequenzen erfolgte vor mehr als 300 Mio. Jahren. Säugetiersequenzen und die humanen GPX4-Isoformen divergierten erst in näherer Zeit. Nähere gemeinsame Vorfahren teilen bakterielle, fungale und archaeaische Sequenzen, aber auch Fische und Amphibien sowie Vögel und Reptilien (Abb. 29, A). Zwischen der hGPX4 und einem Großteil der Gpx4-Sequenzen des Tierreiches scheinen insgesamt engere verwandtschaftliche Verbindungen im Vergleich zu Sequenzen in Würmern, pflanzlichen, fungalen, archaeaischen und bakteriellen Gpx4-ähnlichen Sequenzen zu bestehen.

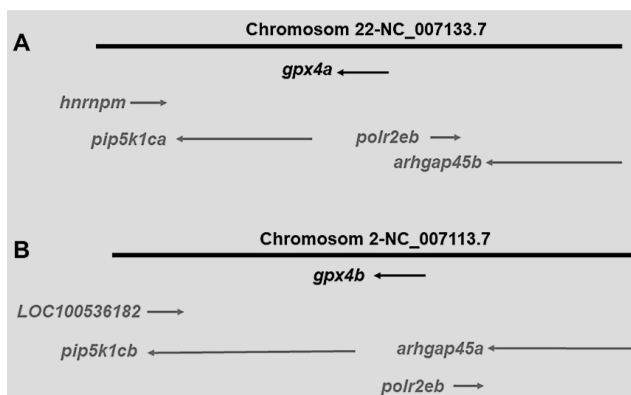
**Zusammenfassung:** Die hGPX4-Isoformen teilen nähere gemeinsame Vorfahren mit den meisten Vertretern des Tierreiches als mit Pflanzen, Pilzen, *Archaea* oder Bakterien. Auch virale Sequenzen spalten sich früh von den übrigen Gpx4-ähnlichen Sequenzen ab.

## 3.2 Expression der zfGpx4-Isoformen im prokaryontischen System

### 3.2.1 Vergleich der zfGpx4-Isoformen auf Genom- und Aminosäureebene

Im Zebrafisch finden sich zwei Gene, die für eine Gpx4 kodieren. Basierend auf den in der NCBI-Plattform hinterlegten Daten wurden die Sequenzen der Gpx4-Paraloga des Zebrafisches auf Nukleotid- und Aminosäureebene verglichen. Sequenzalignments erfolgten mit Clustal Omega 1.2.4 (83).

Das *zfgpx4a*-Gen (ID: 352928) findet sich auf Chromosom 22. Es besitzt eine Länge von 7395 bp und hat acht Exons. Inzwischen sind zwei daraus hervorgehende Transkriptionsvarianten der *zfGpx4a* (NM\_001346537.1, NM\_001007282.2) bekannt (136). Zu Beginn dieser Arbeit war nur



**Abb. 30: Umgebung der *zfgpx4*-Gene. (A) *zfgpx4a*. (B) *zfgpx4b*.** In Anlehnung an (136) bzw. (137). *LOC100536182* (*E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25-like*), *hnrnpM* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*), *phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma x* (*Pip5k1cx*), *polymerase (RNA) II (DNA-directed) polypeptide E* (*polr2ex*), *Rho GTPase activating protein 45* (*arhgap45x*).

die Transkriptionsvariante 2 der *zfGpx4a* (NM\_001007282.1) in der angeführten Fassung bekannt, sodass sich die Arbeit im Weiteren auf diese Variante fokussiert. Sofern nicht explizit genannt, bezeichnet „*zfGpx4a*“ und „*zfGpx4a* Isoform 2“ die Transkriptionsvariante 2 der *zfGpx4a*. Das *zfgpx4b*-Gen (ID: 352929) mit 13632 bp ist auf Chromosom 2 lokalisiert und umfasst sieben Exons (137). In unmittelbarer Umgebung beider *zfGpx4*-Gene befinden sich weitere paraloge Gene

(Abb. 30). Tab. 29 fasst wichtige Kenndaten zu den *gpx4*-Genen bzw. den Gpx4-Isoformen im Zebrafisch zusammen. Die beiden kodierten Proteine haben ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa.

**Tab. 29: Zusammenfassung wichtiger Kenndaten zu Gen, kodierender Sequenz (CDS) und Protein der Gpx4 im Zebrafisch.** AS = Aminosäuren. Nach (136) und (137).

Gen	Transkript	Chromosom	Exon	Genlänge (bp)	CDS (bp)	Länge (AS)	katalytische Tetrade
<i>zfgpx4a</i>	1	22	8	7395	585	194	70 (U), 105 (Q), 160 (W), 161 (N)
	2				561	186	62 (U), 97 (Q), 152 (W), 153 (N)
<i>zfgpx4b</i>	1	2	7	13632	576	191	67 (U), 102 (Q), 157 (W), 158 (N)

Auf Aminosäureebene stimmen die beiden *zfGpx4a*-Isoformen zu 93,0 % überein. Mit der *zfGpx4b* teilen die *zfGpx4a*-Isoformen eine Aminosäureidentität von ca. 73 %. Entsprechend fallen im Sequenzalignment neben der katalytischen Tetrade (UQWN) lange Abschnitte hoch



**Abb. 31: Primärstrukturen der zfGpx4-Isoformen im Sequenzalignment.** Markiert sind die katalytische Tetrade (schwarze Kästen), homologe Sequenzabschnitte (grau unterlegte Sterne) und Cys der zfGpx4b (graue Kreise).

konservierter Regionen auf (Abb. 31). An den Positionen, die unterschiedliche Aminosäuren aufweisen, finden sich sowohl Aminosäuren mit ähnlichen als auch solche mit deutlich abweichenden physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die nicht-konservierten und damit

deutlich unterschiedlichen Aminosäuren stellen im Folgenden Ansatzpunkte für Mutageneseuntersuchungen dar (vgl. 2.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese, S. 45). Darüber hinaus weist die Sequenz der zfGpx4b zusätzlich zum katalytisch aktiven Sec insgesamt drei Cys (Cys23, Cys58, Cys96) auf (Abb. 31).

**Zusammenfassung:** Das *gpx4*-Gen tritt im Zebrafischgenom als Duplikat (*zfgpx4a*, *zfgpx4b*) auf, wobei vom *zfgpx4a*-Gen zwei unterschiedliche, translationsfähige Transkripte (Isoform 1 und 2) gebildet werden können. Die beiden Isoenzyme, die durch das *zfgpx4a*-Gen kodiert werden, teilen eine Aminosäureidentität von 93 %. Im Aminosäuresequenzalignment stimmen beide zu ca. 73 % mit der zfGpx4b überein.

### 3.2.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten zfGpx4-Isoformen

#### 3.2.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung der zfGpx4-Proteine

Um die enzymkinetischen Eigenschaften der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b sowohl als Cys-Variante als auch als Selenoprotein zu untersuchen, wurde die mutierte cDNA beider Isoformen über die NdeI/XhoI (zfGpx4a Isoform 2)- bzw. über die NdeI/BamHI (zfGpx4b)-Schnittstelle in den Expressionsvektor pET-15b kloniert. Die zfGpx4a Isoform 1 blieb unberücksichtigt, da diese zum Zeitpunkt der Versuche noch nicht bekannt war. Vor der Klonierung in den Zielvektor wurden auf cDNA-Ebene die Sec-Codons in beiden Expressionskonstrukten in Cys-Codons umgewandelt (SecCys-Mutationen). Alle weiteren Cys-Reste (Cys23, Cys58, Cys96) in der kodierenden Region der zfGpx4b-cDNA wurden zu Ala-Resten mutiert (CysAla-Mutationen). Diese Mutationen wurden nacheinander an der in den pCR2.1-TOPO Vektor klonierten cDNA beider Isoformen vorgenommen und sollten einen selektiven Sec-Einbau am katalytischen Zentrum während der

### 3. ERGEBNISSE

Selenoprotein-Expression gewährleisten. Die erfolgreiche Einführung der beschriebenen Mutationen in die entsprechenden cDNAs wurde per Sequenzierung der Plasmide überprüft. Abb. 32 zeigt die finalen zfGpx4-Isoformen im pET-15b einschließlich des N-terminalen His-Tags.

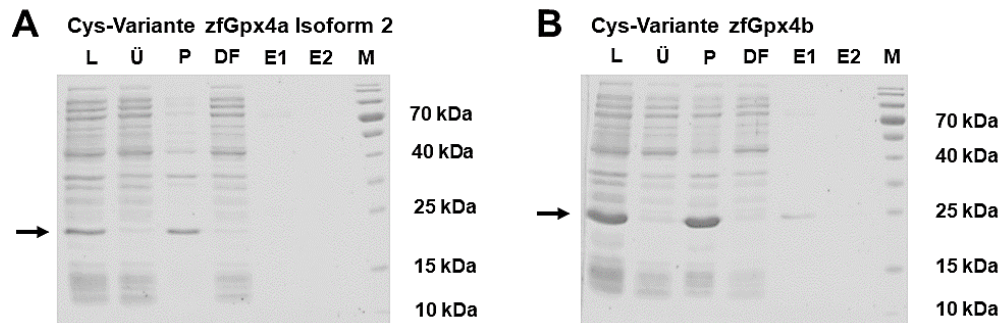
pET-15b zfGpx4a M.	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMRFLGSVVVFL-----VLQTMSAQLEDWQTAKSIYEFTA	55
pET-15b zfGpx4b M.	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMFLQRALLVGAVGSKSFARANAQAANDWQSAKSIYEFTA	60
pET-15b zfGpx4a M.	TDIDGNEVSLEKYRGKVVIIITNVASKGKTPVNYSQFAEMHAKYSEGLRILAFPSNQFG	115
pET-15b zfGpx4b M.	IDIDGNDVSLEKYRGVVAIITNVASKGKTPVNYTQLAAMHVTYAEKGLRILGFRANQFG	120
pET-15b zfGpx4a M.	RQEPGTNSQIKEFAKSYNAEFDMSKIDVNGDGAHPLWKWLKDQPNGKGLGNGIKWNFT	175
pET-15b zfGpx4b M.	KQEPGSEAEIKEFAKGYNAEFDLFSKIDVNGDAAHPLWKWMKEQPKGRGTLGNNIKWNFT	180
pET-15b zfGpx4a M.	KFLINREGQVVKRYSPHQDPSVVEKDL SKYL	206
pET-15b zfGpx4b M.	KFLIDREGQVVKRYGPMDDPSVVEKDL PKYL	211

**Abb. 32: Expressionskonstrukte ausgewählter Gpx4-Isoformen des Zebrafisch.** Sequenzen der zfGpx4-Isoformen im Expressionsvektor pET-15b jeweils mit SecCys- bzw. CysAla-Mutation (graue Kreise) sowie N-terminaler His-Tag-Sequenz (weiße Schrift auf schwarzem Grund). Aminosäuren der katalytischen Tetrade sind schwarz umrandet.

Zur Expression der Cys-Varianten der beiden zfGpx4-Isoformen (zfGpx4a Isoform 2, zfGpx4b) wurden die rekombinanten pET-15b-Plasmide

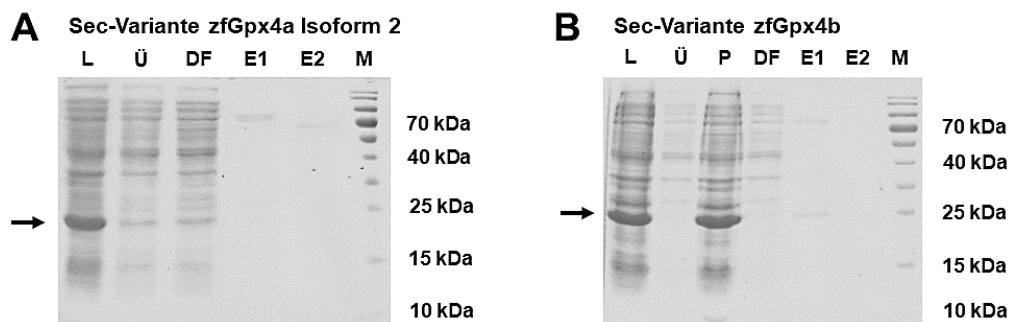
in kompetente *E.coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Vorkulturen zu 25 ml LB-Amp-Medium wurden bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  bis 1,0 angezüchtet, zentrifugiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurde das Zellpellet in ca. 20 ml frischem LB-Amp-Medium aufgenommen. Im Anschluss wurden 50 ml LB-Amp-Hauptkulturen mit 2 ml dieses Resuspensionspellets beimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600} = 0,8$  erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von final 1 mM IPTG. Nach einer Inkubationsphase von drei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Eine Aufreinigung der exprimierten Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Agarose-Säule. Die His-Tag-Fusionsproteine, die sich an der Affinitätsmatrix gebunden haben, konnten kompetitiv durch einen ansteigenden Imidazolgradienten eluiert werden. Verschiedene Fraktionen des Aufreinigungsprozesses wurden in einem 12,5 %-igen SDS-Gel nach Coomassie-Blue-Färbung analysiert. Abb. 33 stellt Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung nach Expression der Cys-Varianten der zfGpx4-Isoformen dar. Einschließlich des His-Tag wären bei erfolgreicher Proteinexpression und -aufreinigung Proteinbanden der zfGpx4-Isoformen im Bereich von 23 kDa bis 24 kDa im Lysat (L) nach Ultraschallbehandlung der Zellen, im Lysatüberstand (Ü) nach Zentrifugation und in den Elutionsfraktionen (E1, E2) zu erwarten. Entsprechende Proteinbanden finden sich im bakteriellen Lysat, im Lysatüberstand nach Zentrifugation des Lysates fehlen sie dagegen. Hingegen war eine ähnlich intensive Gpx4-Bande im resuspendierten Lysatpellet nachweisbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das rekombinante Protein zwar exprimiert wurde, sich aber größtenteils in unlöslicher Form in sogenannten Einschlusskörperchen oder inclusion bodies befindet (138). Da kein Proteinsignal im

Lysatüberstand nachzuweisen war, konnte auch nach der Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose kein Gpx4-Protein eluiert werden (E1, E2).



**Abb. 33: Expression der rekombinanten Cys-zfGpx4-Isoformen.** Fraktionen des Aufreinigungsprozesses mittels Ni-NTA-Agarose in Coomassie-gefärbten 12,5 %-igem SDS-Gel. Aufgetragen sind Aliquots des Lysats (L) nach Ultraschallbehandlung der Zellen, der flüssige Überstand (Ü) sowie in 50 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) resuspendiertes Zellpellet (P) nach Zentrifugation des Lysats, der Durchfluss an nicht an die Ni-NTA-gebundenem Protein (DF) und die Elutionsfraktionen (E1, E2) zusammen mit einem Marker (M). Pfeile markieren die Gpx4-Bande. (A) Cys-zfGpx4a Isoform 2. (B) Cys-zfGpx4b.

Für die Expression der Sec-Varianten der beiden Gpx4-Isoformen wurden Cys-auxotrophe *E.coli* Zellen (BL21(DE3)*selB::kan cys51E*) verwendet. Die Zellen wurden mit den rekombinanten pET-15b-Plasmiden transformiert, über Nacht in 50 ml bzw. 100 ml LB-Medium mit Amp, Kan, Cys und Glucose bei 37 °C angezchtet und am Folgetag durch Zentrifugation geerntet. Nach zweimaligem Waschen des Zellpellets erfolgte die Resuspension in 5 ml Cys-haltigem M9-Medium (mit Amp, Kan). Mit entsprechenden Volumina dieses Resuspensionspellets wurden Hauptkulturen von 100 ml bis 250 ml auf eine initiale  $OD_{600} = 0,5$  eingestellt. Die Hauptkulturen wurden bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 1,7$  bei 37 °C inkubiert, hiernach erneut zweimal gewaschen und für 30 Minuten in einem gleichvolumigen Cys-freien M9-Medium (mit Amp, Kan) kultiviert. Durch Zugabe von final 1 mM IPTG wurde die Expression der rekombinanten Proteine gestartet, weitere 10 Minuten später erfolgte die Zugabe von L-Selenocystin und Rifampicin. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.



**Abb. 34: Expression der rekombinanten Sec-zfGpx4-Isoformen.** Fraktionen des Aufreinigungsprozesses mittels Ni-NTA-Agarose in Coomassie-gefärbten 12,5 %-igem SDS-Gel. Aufgetragen sind Aliquots des Lysats (L) nach Ultraschallbehandlung der Zellen, der flüssige Überstand (Ü) sowie in 50 µl PBS resuspendiertes Zellpellet (P) nach Zentrifugation des Lysats, der Durchfluss an nicht an die Ni-NTA-gebundenem Protein (DF) und die Elutionsfraktionen (E1, E2) zusammen mit einem Marker (M). Pfeile markieren die Gpx4-Bande. (A) Sec-zfGpx4a Isoform 2. (B) Sec-zfGpx4b.

Zellaufschluss, affinitätschromatische Aufreinigung der His-Tag-Proteine über Ni-NTA-Agarose und Analyse der verschiedenen Fraktionen des Aufreinigungsprozesses im SDS-Gel erfolgten wie oben beschrieben. Die Analyse der als Sec-Varianten exprimierten zfGpx4-Isoformen liefert ein ähnliches Bild wie bei der Expression der Cys-Varianten. Dominante Proteinbanden im zu erwartenden Molekulargewichtsbereich fanden sich nur im Zellysate und im Pellet der Zellysatefraktion (Abb. 34, **B**). Die Expression war erfolgreich, das exprimierte Protein ließ sich jedoch nicht weiter verwerten. Zarte Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich zwischen 23 kDa und 24 kDa wurden bei der Analyse der Fraktionen Ü und DF der zfGpx4a Isoform 2 erst bei Überladung der Elektrophoresegele sichtbar (Abb. 34, **A**). Diese Beobachtung deutet an, dass nur wenig rekombinantes Protein in gelöster Form mit dem Überstand gewonnen werden konnte.

**Zusammenfassung:** Die zfGpx4a Isoform 2 und die zfGpx4b konnten sowohl als Cys- als auch als Sec-Variante exprimiert werden. Dabei befanden sich mehr als 95 % des rekombinant exprimierten Enzyms als unlösliches Protein in intrazellulären Einschlusskörperchen. Damit ließ sich eine Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der Enzyme nicht durchführen.

### 3.2.2.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung N-terminal trunktierter zfGpx4-Proteine

N-terminale Peptidsequenzen von Proteinen können Sortierungssignale beinhalten. Innerhalb der Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 fand sich im Abstand von 16 Aminosäuren ein zweites auf das Start-Met folgende Met (Abb. 35). Auch innerhalb der zfGpx4b fand sich ein solches im Abstand von 21 Aminosäuren. Sollte die zwischen den beiden Met liegende Aminosäuresequenz ein Sortierungssignal enthalten, könnte deren Trunkation zu einer verbesserten Expressionseffizienz

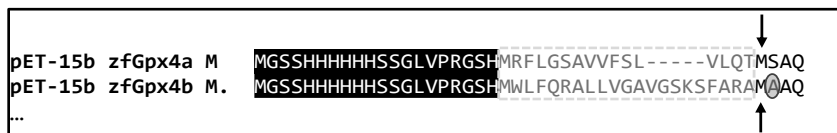
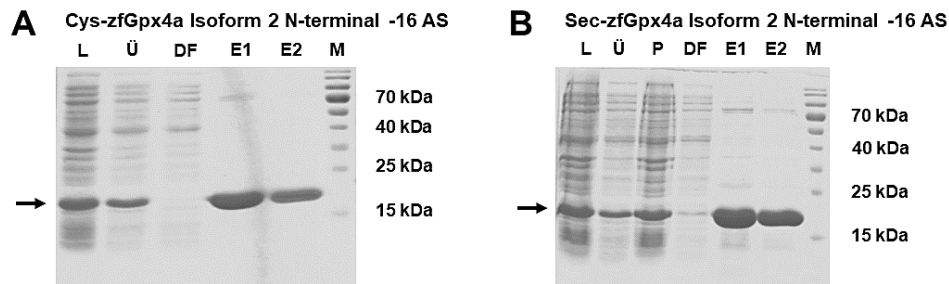


Abb. 35: Ausschnitt der SecCys- und CysAla-mutierten Sequenzen der zfGpx4a Isoform 2 (pET-15b zfGpx4a M.) und der zfGpx4b (pET-15b zfGpx4b M.) im pET-15b mit N-terminalem His-Tag (weiße Schrift auf schwarzem Grund). Weiß hinterlegt ist die 16 bzw. 21 Aminosäure lange N-terminale Peptidsequenz der zfGpx4-Isoformen. Pfeile markieren den Beginn der N-terminal verkürzten Sequenzen beider zfGpx4-Isoformen im pET-15b mit CysAla-Mutation (grauer Kreis).

der rekombinanten Proteine führen. Nach erfolgloser Expression der zfGpx4-Isoformen als katalytisch aktive, rekombinante Proteine, wurden daher N-

terminale Trunktionsvarianten beider zfGpx4-Isoformen hergestellt. cDNA der zfGpx4-Isoformen mit den für die Sec-Expression nötigen Mutationen (SecCys- bzw. CysAla) wurde ab dem zweiten Met-kodierenden ATG über NdeI/XhoI (zfGpx4a Isoform 2) bzw. NdeI/BamHI

(zfGpx4b) in den pET-15b-Vektor kloniert. Per Sequenzierung wurden die Plasmide überprüft. Mit diesen trunkierten Plasmiden wurden Expressionsstudien durchgeführt, die sich methodisch an den Experimenten mit den nicht-trunkierten Plasmiden orientierten (S. 45). Die Cys-Varianten der trunkierten zfGpx4-Isoformen wurden in 50 ml Hauptkulturen, die Sec-Varianten in 100 - 200 ml Hauptkulturen exprimiert. Exemplarisch sind in Abb. 36 die SDS-Gele mit verschiedenen Aufreinigungsfractionen der N-terminal verkürzten zfGpx4a Isoform 2 abgebildet.



**Abb. 36: Expression der rekombinanten, N-terminal trunkierten zfGpx4a Isoform 2.** Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Gel mit Aufreinigungsfractionen nach Expression. Aufgetragen sind Aliquots des Lysats (L) nach Ultraschallbehandlung der Zellen, der flüssige Überstand (Ü) sowie in 50 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) resuspendiertes Zellpellet (P) nach Zentrifugation des Lysats, der Durchfluss an nicht an die Ni-NTA-gebundenem Protein (DF) und die Elutionsfraktionen (E1, E2) zusammen mit einem Marker (M). Pfeile markieren die Gpx4-Bande. (A) Cys-zfGpx4a Isoform 2 N-terminal verkürzt. (B) Sec-zfGpx4a Isoform 2 N-terminal verkürzt.

In Folge der N-terminalen Verkürzung waren die interessierenden Proteinbanden im SDS-Gel im Bereich von 21 - 22 kDa zu erwarten. Eine entsprechende Bande konnte im Lysat (L), im Lysatüberstand (Ü) und in den Elutionsfraktionen (E1, E2) der Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Im Lysatpellet der Sec-Variante fiel ebenfalls eine entsprechende Proteinbande auf. Insofern wurde die zfGpx4a Isoform 2 sowohl als potentiell katalytisch aktives Protein als auch als unlösliches Protein exprimiert. Für die Cys-Variante der zfGpx4-Isoformen wurden entsprechende Analysen des Lysatpellets nicht durchgeführt. In den Durchflussfraktionen (DF) der Affinitätschromatographie konnte kaum rekombinantes Protein nachgewiesen werden. Dagegen ließen sich in den Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Agarose-Chromatographie große Mengen an Gpx4-Protein nachweisen. Da es sich bei der Färbemethode (Coomassie-Färbung) um eine unspezifische Proteinfärbung handelt, kann aus den Färbemustern der Elutionsfraktionen geschlossen werden, dass der Reinheitsgrad der rekombinanten Proteine > 95 % beträgt. Ein vergleichbares Muster im SDS-Gel lieferten die Aufreinigungsfractionen der N-terminal verkürzten zfGpx4b.

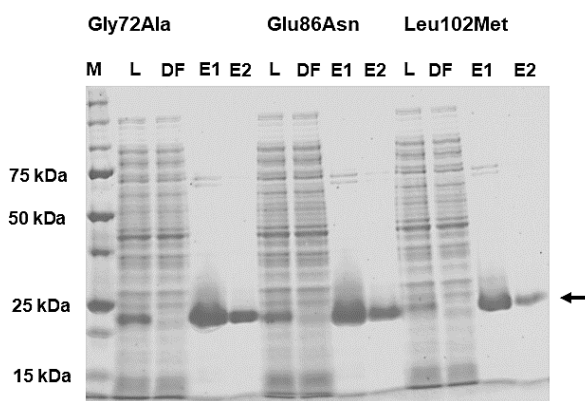
Die exprimierten Enzyme wurden im Anschluss mittels photospektrometrischer Messung bei 37 °C hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität geprüft. Als Substrat diente TBHP. Die Cys-Varianten der trunkierten zfGpx4-Isoformen wiesen bei 37 °C sehr geringe katalytische Aktivitäten auf. Die Sec-Varianten waren hingegen katalytisch aktiv. In den nachfolgenden

Abschnitten werden die trunkierten Varianten der zfGpx4-Isoformen auch als WT-Enzym bezeichnet.

**Zusammenfassung:** N-terminal trunkierte (verkürzte) Varianten der zfGpx4-Isoformen konnten als Cys- und Sec-Enzyme erfolgreich in Form löslicher Proteine in *E. coli* exprimiert werden. Eine affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine an einer Ni-NTA-Agarosesäule führte zu einer Enzympräparation mit einem Reinheitsgrad > 90 %. In spektrophotometrischen Aktivitätsmessungen bei 37 °C waren die Sec-zfGpx4-Isoformen (WT-Sec-zfGpx4-Isoformen) katalytisch aktiv.

### 3.2.2.3 Rekombinante Expression und Aufreinigung von Sec-zfGpx4b-Mutanten

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Aminosäuren auf den Katalysemechanismus der



**Abb. 37: Expression rekombinanter Sec-zfGpx4b-Mutanten (Gly72Ala, Glu86Asn, Leu102Met).** Analyse der Aufreinigungsfraktionen im SDS-Gel. Neben dem Marker (M) sind Aliquots des Lysats (L) nach Ultraschallbehandlung der Zellen, des Durchflusses der nicht an die Ni-NTA-gebundenem Protein (DF) und der Elutionsfraktionen (E1, E2) aufgetragen. Pfeile markieren die Gpx4-Bande.

Sec-zfGpx4-Isoformen wurden neun Mutanten (Ala58Glu, Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala, Glu86Asn, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly, Asp157Gln) der N-terminal trunkierten zfGpx4b mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese hergestellt. Punktmutationen wurden in die Sequenz der SecCys- und CysAla-mutierten zfGpx4b im pET-15b-Vektor eingefügt. Mutationsorte wurden im Hinblick auf differente chemisch-physikalische Eigenschaften der Aminosäuren im Alignment der zfGpx4a Isoform 2 mit der zfGpx4b und im Vergleich zur zytosolischen

Gpx4 von Maus und Mensch ausgewählt. Die Mutationsorte werden ausführlich in Abschnitt 3.3.4.2 (S. 97) besprochen. Die pET-15b-Expressionsplasmide der zfGpx4b-Mutanten wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sec-Expression erfolgte in Cys-auxotrophen *E. coli* BL21(DE3)*selB::kan cys51E* Zellen. Für die Vorkulturen wurden 15 ml Flüssigkulturen angezüchtet. Die Proteinexpression erfolgte in 50 ml Hauptkulturen. Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Ni-NTA-Agarose-Chromatographie und Analyse der Expressionsniveaus wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.



Wie beispielhaft in Abb. 37 für die zfGpx4b-Mutanten Gly72Ala, Glu86Asn und Leu102Met dargestellt, finden sich in der SDS-PAGE-Analyse aller zfGpx4b-Mutanten im Lysat und den beiden Elutionsfraktionen Proteinbanden im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 21-22 kDa. Die Eluate erscheinen dabei weitgehend frei von größeren Verunreinigungen mit Fremdproteinen. Alle exprimierten Sec-zfGpx4b-Mutanten waren in photospektrometrischen Aktivitätsmessungen mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PC-OOH katalytisch aktiv (vgl. Abschnitt 3.3.4.2, S. 97).

**Zusammenfassung:** Neun Mutanten des N-terminal trunkierten zfGpx4b-Proteins konnten als Selenoprotein exprimiert und mit gutem Reinheitsgrad eluiert werden. Alle Mutanten waren katalytisch aktiv.

#### 3.2.2.4 Proteinkonzentrationen und Quantifizierung des Seleneinbaus

Bei elektrophoretisch homogenen Enzympräparationen kann die spektrophotometrische Extinktionsmessung  $E$  bei  $\lambda = 280$  nm (E280) zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen  $c$  gemäß des Lambert-Beerschen-Gesetzes eingesetzt werden. Hierfür wurden die Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Agarosechromatographie vereinigt, entsalzt und umgepuffert (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 10 % Glycerol). Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die E280 gemessen. Der Einbau von Sec während der Expression konnte über die Bestimmung des Selengehaltes der Enzympräparationen mittels Atomabsorptionsspektroskopie quantifiziert werden. In Tab. 30 sind die ermittelten Proteinkonzentrationen und der prozentuale Seleneinbau der verschiedenen zfGpx4-Isoformen und ihrer Mutanten zusammengefasst. Im Rahmen der Expressionsversuche konnten Proteinmengen von 0,2 mg bis 1,6 mg gewonnen werden. Dementsprechend variierten die Expressionshöhen der verschiedenen Proteine pro Liter Flüssigkultur zwischen 3,9 mg bis 31,8 mg. Dabei konnten größere Mengen der N-terminal verkürzten Sec-zfGpx4a Isoform 2 im Vergleich zur N-terminal verkürzten Sec-zfGpx4b aus gleichen Hauptkulturvolumina gewonnen werden. Auch für einige Sec-Mutanten der N-terminal verkürzten zfGpx4b lässt sich ein solcher Trend beobachten. In welchem Ausmaß die eingesetzten Hauptkulturvolumina die Mengen an gewonnenem Protein beeinflussen, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht abschätzen. Die Proteinpräparationen weisen einen Seleneinbau von 23,0 % bis 64,8 % auf.

### 3. ERGEBNISSE

**Tab. 30: Proteinkonzentration, Seleneinbau und Ausbeute verschiedener Präparationen der N-terminal trunkierten zfGpx4-Isoformen exprimiert als Cys- und Sec-Variante.** Die Expressionshöhe der rekombinanten Proteine wurde auf ein Flüssigkeitskulturvolumen von 1 l hochgerechnet (n = 1).

Präparation	Proben	Konzentration (mg/ml)	Seleneinbau (%)	Expressionshöhe (mg/l)
<b>Cys-Präparationen der WT-zfGpx4-Isoformen</b>				
	Cys-zfGpx4a N-term. -16 AS	0,166		13,3
	Cys-zfGpx4b N-term. -21 AS	0,099		7,9
<b>Sec-Präparationen der WT-zfGpx4-Isoformen</b>				
1	Sec-zfGpx4a N-term. -16 AS	0,287	39,8	11,5
1	Sec-zfGpx4b N-term. -21 AS	0,136	41,8	5,5
2	Sec-zfGpx4a N-term. -16 AS	0,397	61,1	31,8
2	Sec-zfGpx4b N-term. -21 AS	0,108	61,3	8,6
<b>Sec-Präparationen der zfGpx4b-Mutanten N-term. -21 AS</b>				
	Ala58Glu	0,069	39,8	5,5
	Val61Ala	0,161	57,6	12,9
	Thr62Lys	0,193	64,8	15,4
	Gly72Ala	0,117	59,5	9,4
	Glu86Asn	0,138	42,5	11,1
	Leu102Met	0,055	38,3	4,4
	Thr129Phe	0,086	34,8	6,9
	Asn133Gly	0,075	31,5	6,0
	Asp157Gln	0,048	23,0	3,9

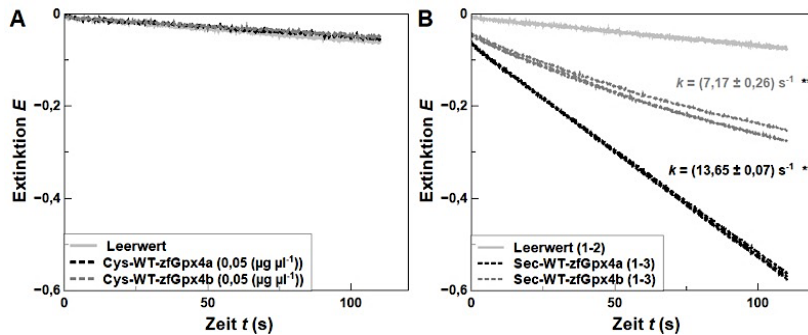
**Zusammenfassung:** Aus 50 ml bzw. 100 ml bakterieller Flüssigkultur konnten 0,2 mg bis 1,6 mg Cys- und Sec-zfGpx4-Protein gewonnen werden. Dies entspricht einer Expressionshöhe von 3,9-31,8 mg pro Liter Flüssigkeitskultur. Bei den Selenoproteinen variierte der Seleneinbau zwischen 23 % und 65 %.

### 3.3 Enzymatische Charakterisierung verschiedener Gpx4-Isoformen

#### 3.3.1 Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Enzyme können in katalytisch aktiver oder inaktiver Form vorliegen. Um die exprimierten Proteine auf ihre katalytische Aktivität zu überprüfen, erfolgten spektrophotometrische Messungen bei 37 °C an den Cys- und Sec-WT-Isoformen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b. Hierbei wurden die Cys-Gpx4-WT-Isoformen des Zebrafisches in Konzentrationen von final bis zu 50 µg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt. Als Substrat diente TBHP (final 0,5 mM). Auch nach Konzentrierung der Proteinlösungen konnten keine gegenüber dem Leerwert messbaren

Extinktionsabnahmen beobachtet werden (Abb. 38, A). Messungen mit den Sec-Gpx4-Isoformen des Zebrafisches (Sec-WT-zfGpx4a Isoform 2, Sec-WT-zfGpx4b) wurden analog nach Adjustierung der Proteinkonzentrationen zu final  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  durchgeführt.



**Abb. 38:** Katalytische Aktivitäten von Cys- und Sec-WT-Isoformen der zfGpx4a Isoform 2 (zfGpx4a) und der zfGpx4b. Photometrische Extinktionsabnahmen bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  und  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  über die Zeit  $t$ . Als Substrat diente TBHP. (A) Cys-WT-zfGpx4-Isoformen in final  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . (B) Sec-WT-zfGpx4-Isoformen in final  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Angegeben sind die selenquantifizierten, mittleren katalytischen Aktivitäten  $k$  ( $n = 3$ ) der Sec-zfGpx4-Isoformen. \*\* markieren einen statistisch signifikanten Unterschied ( $n = 6, p < 0,05$ ).

Es zeigten sich deutliche Extinktionsabnahmen, auch unter Berücksichtigung von Hintergrundaktivitäten, sodass anhand der Messdaten ( $n = 3$ ) die in Abb. 38 B angegebenen mittleren und auf einen Seleneinbau von 100% hochgerechneten katalytischen Aktivitäten  $k$

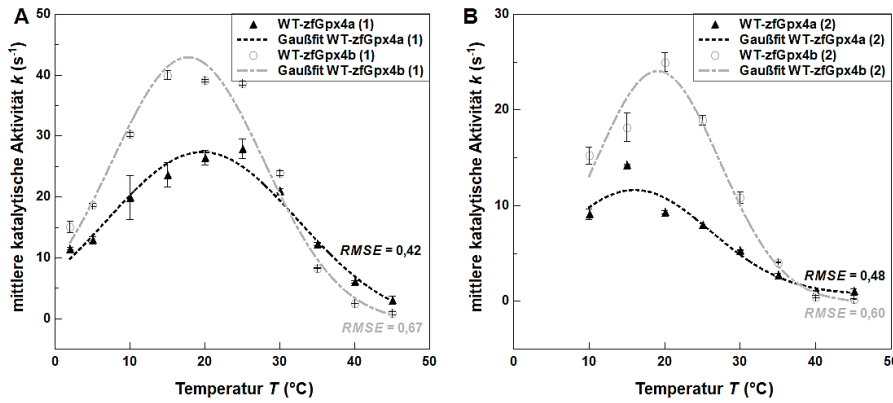
bestimmt werden konnten. Die mittleren Aktivitäten  $k$  der Sec-WT-zfGpx4a Isoform 2 und der Sec-WT-zfGpx4b bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sind im T-Test signifikant verschieden ( $n = 6, p < 0,05$ ).

**Zusammenfassung:** Während bei den exprimierten Cys-Varianten der zfGpx4-Isoformen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine katalytischen Aktivitäten nachgewiesen werden konnten, sind die Sec-Varianten katalytisch aktiv. Die zfGpx4a Isoform 2 hat im vorliegenden Fall verglichen mit der zfGpx4b eine höhere spezifische katalytische Aktivität.

### 3.3.2 Temperaturabhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Temperaturänderungen können die Aktivität von Enzymen maßgeblich beeinflussen (139). Da es sich bei Zebrafischen um wechselwarme Tiere handelt, die ihre Stoffwechselaktivitäten den äußeren Bedingungen anpassen müssen, könnte die Temperaturabhängigkeit der Gpx4-Reaktion von biologischer Bedeutung sein. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Temperaturabhängigkeit der katalytischen Aktivität  $k$  der beiden rekombinant exprimierten Sec-zfGpx4-Isoformen (zfGpx4a Isoform 2, zfGpx4b) spektrophotometrisch über Temperaturbereiche von  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  bis  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht. Diese Messungen wurden mit zwei verschiedenen Enzympräparationen [(1) und (2)] durchgeführt. Final wurden  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Protein und  $1 \text{ mM}$  TBHP eingesetzt. In Abb. 39 sind die ermittelten katalytischen Aktivitäten  $k$ , die hinsichtlich ihres Seleneinbaus korrigiert wurden, über der Temperatur  $T$  aufgetragen. Die Temperaturoptima  $T_{opt}$

### 3. ERGEBNISSE



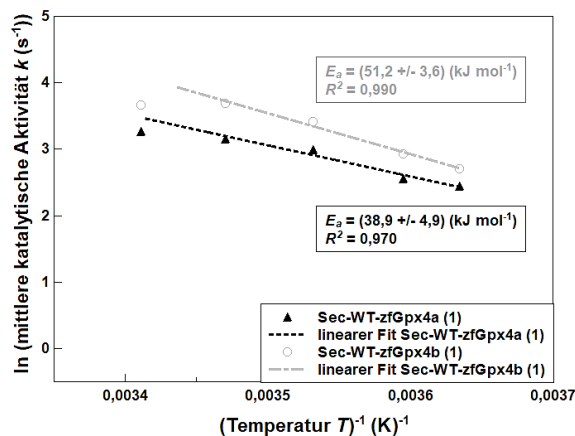
**Abb. 39: Temperaturabhängigkeit der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen.** Mittlere katalytische Aktivitäten  $k$  ( $n = 2$ ) der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen (final  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) mit TBHP als Substrat (final  $1 \text{ mM}$ ) sind über der Temperatur  $T$  aufgetragen. Temperaturoptima  $T_{opt}$  wurden über einen Gaußfit ermittelt. (A) Enzympräparation (1) der Sec-zfGpx4-Isoformen. (B) Enzympräparation (2) der Sec-zfGpx4-Isoformen.

zwischen der katalytischen Aktivität  $k$  der Sec-zfGpx4-Isoformen und der Temperatur  $T$ . Die Werte von  $k$  steigen bis zu einem isoform-spezifischen Temperaturoptimum an. Die angenäherten Temperaturoptima  $T_{opt}$  liegen für die zfGpx4a zwischen  $(16,0 \pm 3,5) \text{ }^\circ\text{C}$  und  $(19,7 \pm 4,0) \text{ }^\circ\text{C}$ , für die zfGpx4b zwischen  $(17,8 \pm 3,2) \text{ }^\circ\text{C}$  und  $(19,1 \pm 2,9) \text{ }^\circ\text{C}$ . Jenseits des Temperaturoptimums sinken die katalytischen Aktivitäten beider Isoformen mit steigender Temperatur wieder. Dabei

**Tab. 31: Temperaturoptima  $T_{opt}$  der Sec-zfGpx4-Isoformen.**

zfGpx4-Isoform	Temperaturoptima $T_{opt}$ ( $^\circ\text{C}$ )
Sec-WT-zfGpx4a	
Sec-WT-zfGpx4a (1)	$19,7 \pm 4,0$
Sec-WT-zfGpx4a (2)	$16,0 \pm 3,5$
Sec-WT-zfGpx4b	
Sec-WT-zfGpx4b (1)	$17,8 \pm 3,2$
Sec-WT-zfGpx4b (2)	$19,1 \pm 2,9$

überwiegt die katalytische Aktivität der zfGpx4b bis zu Temperaturen von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  deutlich diejenige Aktivität der zfGpx4a. Oberhalb von  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  weist die zfGpx4a höhere Restaktivitäten von  $8 \%$  bis  $20 \%$  gegenüber Restaktivitäten der zfGpx4b von  $\leq 6 \%$  auf. Die Aktivierungsenergie einer



**Abb. 40: Aktivierungsenergien  $E_a$  der Sec-zfGpx4-WT-Isoformen.** Die Aktivierungsenergien wurden mit Hilfe eines Arrhenius-Plots berechnet.

katalytischen Reaktion ist die aufzuwendende Energie, die zur Erreichung des katalytischen Übergangszustandes nötig ist (101). Enzyme mit hoher Aktivierungsenergie benötigen mehr Energie, um den katalytischen Übergangszustand zu erreichen. Enzyme mit geringen Aktivierungsenergien brauchen hingegen weniger Energie, um diesen Schwellenwert zu überschreiten und damit die Reaktion überhaupt möglich zu machen. Die

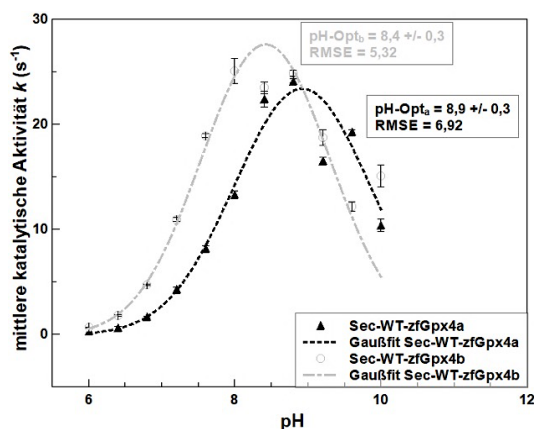
wurden für beide WT-zfGpx4-Isoformen mittels Gaußfunktion unter Ausnutzung einer statistischen Gewichtung angenähert (Tab. 31). Die graphische Auftragung von  $k$  über  $T$  beweist einen Zusammenhang

Aktivierungsenergien  $E_a$  wurden für beide Sec-zfGpx4-Isoformen der Präparationscharge (1) jeweils für den Temperaturbereich von 2 °C bis zum jeweiligen Temperaturoptimum bestimmt (Abb. 40). Der Arrhenius-Plot liefert für die Sec-WT-zfGpx4a eine Aktivierungsenergie von  $(38,9 \pm 4,9)$  kJ·mol<sup>-1</sup>, während die Sec-WT-zfGpx4b eine Aktivierungsenergie von  $(51,2 \pm 3,6)$  kJ·mol<sup>-1</sup> aufweist. Da die zfGpx4b eine deutlich größere Aktivierungsenergie aufweist, benötigt dieses Isoenzym deutlich mehr Energie, um den katalytischen Übergangszustand zu erreichen, obwohl die energetische Gesamtbilanz für beide Reaktionen identisch ist.

**Zusammenfassung:** Temperaturänderungen beeinflussen die katalytische Aktivität der Sec-zfGpx4-Isoformen. Dabei scheint die katalytische Aktivität der zfGpx4b stärker mit der Temperatur veränderlich. Experimentell konnten Temperaturoptima zwischen 16 °C und 20 °C und Aktivierungsenergien  $E_a$  zwischen 39 kJ·mol<sup>-1</sup> bis 51 kJ·mol<sup>-1</sup> für die beiden zfGpx4-Isoformen ermittelt werden.

### 3.3.3 pH-Abhängigkeit von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Auch Veränderungen des pH-Wertes können Einfluss auf die enzymatische Aktivität haben (139). Um Abhängigkeiten zwischen der katalytischen Aktivität  $k$  der beiden Sec-zfGpx4-Isoformen und dem pH-Wert zu untersuchen, erfolgten spektrophotometrische Messungen für beide Sec-zfGpx4-Isoformen bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 6,0 bis 10,0 (je 0,4-pH-Schritte). Für die Messungen wurden final 2 µg·ml<sup>-1</sup> Enzymprotein eingesetzt, wobei TBHP (final 1 mM) als



**Abb. 41: pH-Abhängigkeiten der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen.** Mittlere katalytische Aktivitäten  $k$  der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen (final 2 µg·ml<sup>-1</sup>) bei variierendem pH-Wert. Messungen erfolgten bei 15 °C. Als Substrat diente TBHP (final 1 mM). pH-Optima wurden mittels instrumentell gewichtetem Gaußfit bestimmt.

Substrat verwendet wurde. Die Messtemperatur betrug 15 °C. Abb. 41 stellt die ermittelten und Selen-korrigierten mittleren Werte von  $k$  über dem pH-Wert dar. Die pH-Optima wurden mittels instrumentell gewichtetem Gaußfit bestimmt. Die graphische Auftragung von  $k$  über dem pH-Wert legt einen Zusammenhang zwischen  $k$  der WT-zfGpx4-Isoformen und dem pH-Wert nahe. Um pH 6,0 weisen beide Enzymisoformen Restaktivitäten von < 5 % auf. Die katalytischen Aktivitäten steigen für pH-Werte > 6,0 bis zu einem Isoform-spezifischen pH-Optimum an und

fallen jenseits dieses pH-Optimums wieder rasch ab. Die katalytische Aktivität  $k$  der Sec-zfGpx4b ist vergleichsweise höher als die der Sec-zfGpx4a bis in pH-Bereiche um 8,8. Ab pH-Werten  $> 8,8$  weist die Sec-zfGpx4a eine höhere katalytische Aktivität auf. Für die zfGpx4a konnte ein pH-Optimum von  $(8,9 \pm 0,3)$  ermittelt werden. Das pH-Optimum für die zfGpx4b lag etwas niedriger  $(8,4 \pm 0,3)$ . Unter Berücksichtigung der Fehlertoleranzen weisen damit beide zfGpx4-Isoformen ähnliche pH-Optima im leicht basischen Bereich auf.

**Zusammenfassung:** pH-Veränderungen beeinflussen die katalytische Aktivität der Sec-zfGpx4-Isoformen. Die pH-Optima beider Isoformen liegen im basischen Bereich (um pH 8,5) und sind sehr ähnlich.

#### 3.3.4 Substratspezifitäten von Sec-Gpx4-Isoformen

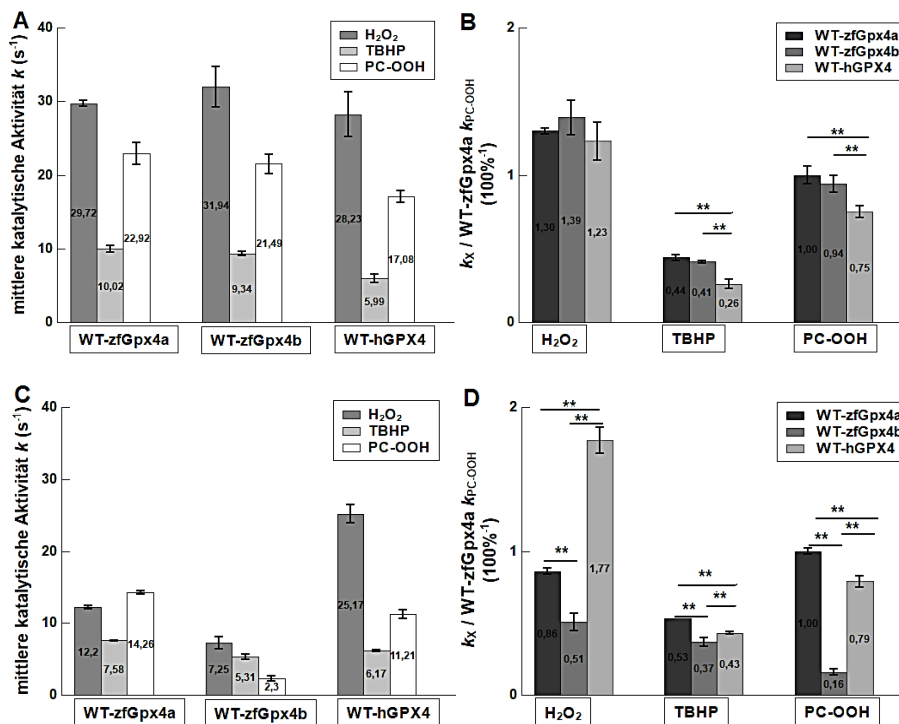
##### 3.3.4.1 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen

Enzyme weisen unterschiedliche Affinitäten gegenüber verschiedenen Substraten auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Substratspezifitäten der zfGpx4a Isoform 2, der zfGpx4b und der humanen rekombinanten GPX4 miteinander verglichen, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TBHP und PC-OOH (0,1 mM Endkonzentrationen im Messansatz) zum Einsatz kamen. Die Aktivitätsmessungen wurden bei  $15\text{ }^\circ\text{C}$  und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Final wurden je  $3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Protein pro Aktivitätsansatz eingesetzt. In Abb. 42 (A, C) sind die katalytischen Aktivitäten  $k$  (korrigiert auf den gleichen Selengehalt) der drei WT-Gpx4-Isoformen in absoluten Zahlen dargestellt. Direkte Vergleiche absoluter Messwerte sind aufgrund der hohen interexperimentellen Schwankungen der genutzten Messmethodik nur begrenzt aussagekräftig. Daher sind zu Vergleichszwecken in Abb. 42 (B, D) die relativen, selenkorrigierten katalytischen Aktivitäten der WT-Gpx4-Isoformen abgebildet. Die relativen katalytischen Aktivitäten wurden jeweils bezogen auf die Aktivität der WT-Sec-zfGpx4a Isoform 2 für PC-OOH (entsprechend 100 %). PC-OOH ist ein spezifisches Substrat der Gpx4 und wird von anderen Gpx-Enzymen in geringem Ausmaß akzeptiert. Signifikanztestungen erfolgten mittels T-Test für unabhängige Stichproben ( $n = 6$  bzw.  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). Sowohl Aktivitätsunterschiede innerhalb einer Enzymisoform als auch im Vergleich zu anderen Enzymisoformen wurden hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz geprüft. Gemäß Abb. 42 A weisen alle drei Sec-Gpx4-Isoformen bei  $15\text{ }^\circ\text{C}$  ähnliche Substratspezifitäten auf. Die größten Aktivitäten wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ) als Substrat erreicht, während katalytische Aktivitäten für PC-OOH ( $k_{\text{PC-OOH}}$ ) und TBHP ( $k_{\text{TBHP}}$ ) geringer ausfielen ( $k_{\text{H}_2\text{O}_2} > k_{\text{PC-OOH}} > k_{\text{TBHP}}$ ). Die Unterschiede hinsichtlich der substratspezifischen Aktivitäten  $k$  innerhalb einer Enzymisoform

### 3. ERGEBNISSE

sind statistisch signifikant ( $p < 0.009$ ). Die katalytischen Aktivitäten der drei verschiedenen Sec-WT-Gpx4-Isoformen bei 15 °C mit  $H_2O_2$  als Substrat sind nicht signifikant verschieden (Abb. 42, **B**, linke Säulen). Ein ähnlicher Vergleich der katalytischen Aktivitäten mit anderen Substraten zeigt jedoch signifikante Unterschiede. So wurden z.B. TBHP und PC-OOH durch die WT-hGPX4 signifikant schlechter umgesetzt als durch die beiden zfGpx4-Isoformen (Abb. 42, **B**, mittlere und rechte Säulen). Demgegenüber sind die Aktivitäten der zfGpx4-Isoformen untereinander bei 15 °C nicht signifikant verschieden.

Die Substratspezifitäten der drei untersuchten WT-Sec-Gpx4-Isoformen unterscheiden sich bei



**Abb. 42: Substratspezifitäten verschiedener WT-Gpx4-Isoformen.** Enzyme wurden final zu  $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  eingesetzt, als Substrate dienten  $H_2O_2$ , TBHP und PC-OOH (jeweils 0,1 mM final). Es wurden Dreifachwerte erhoben. Signifikanzprüfung erfolgte mittels T-Test ( $n = 6$  bzw.  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). Nur Doppelwerte ( $n = 2$ ) bei WT-zfGpx4a Isoform 2 und Testung von  $k$  für  $H_2O_2$  bei 37 °C. \*\* markieren signifikante Unterschiede. (A, B) Messungen bei 15 °C. (C, D) Messungen bei 37 °C.

bei 37 °C relativ höhere katalytische Aktivität als bei 15 °C auf (Abb. 42, **B** vs. **D**) (3). (iii) Bei 37 °C findet sich kein gemeinsames substratspezifisches Aktivitätsprofil. Die WT-hGPX4 weist ein Aktivitätsmuster mit  $k_{H_2O_2} > k_{PC-OOH} > k_{TBHP}$  entsprechend den Messungen bei 15 °C auf. Für die WT-zfGpx4a findet sich  $k_{PC-OOH} > k_{H_2O_2} > k_{TBHP}$ , für die WT-zfGpx4b  $k_{H_2O_2} > k_{TBHP} > k_{PC-OOH}$  (Abb. 42, **C**). (iv) Substratspezifische Aktivitäten aller drei Isoformen sind im Vergleich untereinander bei 37 °C statistisch signifikant verschieden (Abb. 42, **D**). Wie bei 15 °C sind auch die katalytischen Aktivitäten innerhalb einer Isoform signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). (v) Die höchsten katalytischen Aktivitäten mit dem Gpx4-spezifischen PC-OOH erreicht bei

37 °C in mehreren Punkten gegenüber den Messungen bei 15 °C (Abb. 42, **C** und **D**):

- (i) Die katalytischen Aktivitäten der WT-zfGpx4-Isoformen sind bei 37 °C durchschnittlich geringer als bei 15 °C.
- (ii) Die WT-hGPX4 weist

übereinstimmend mit in der Literatur beschriebenen Temperaturprofilen

### 3. ERGEBNISSE

37 °C die WT-zfGpx4a trotz suboptimaler Temperaturbedingungen. Diese PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4a ist signifikant höher als die PC-OOH-Aktivität der WT-hGPX4 und der WT-zfGpx4b (Abb. 42, **D**, rechte Säule). Demgegenüber weist die WT-Gpx4b-Isoform des Zebrafisches eine auffallend kleine PC-OOH-Aktivität bei 37 °C auf, die rund  $\frac{1}{6}$  der WT-zfGpx4a-Aktivität und  $\frac{1}{5}$  der WT-hGPX4-Aktivität beträgt (Abb. 42, **B** und **D**). (vi) Die höchsten katalytischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten erreicht bei 37 °C die WT-hGPX4 (Abb. 42, **D**, linke Säule), die WT-zfGpx4a erreicht die höchsten TBHP-Aktivitäten (Abb. 42, **D**, mittlere Säule). Im Vergleich der drei WT-Gpx4-Isoformen untereinander weist die WT-zfGpx4b bei 37 °C auch mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und TBHP die kleinsten katalytischen Aktivitäten auf. Basierend auf Abb. 42 (**B**, **D**) sind in Tab. 32 die Quotienten aus katalytischer Aktivität bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C pro Substrat und Enzymisoform zusammengefasst. Demnach weist die zfGpx4b-WT bei 15 °C ca. 3-fach höhere Aktivitätswerte für das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und etwa 6-fach höhere Aktivitätszahlen für das PC-OOH auf, während *k*-Werte für TBHP vergleichbar erscheinen. Die katalytischen Aktivitäten der hGPX4 fallen substratunabhängig bei 15 °C geringer als bei 37 °C aus. Aktivitäten der zfGpx4a-WT erscheinen heterogen bzgl. Temperatur- und substratspezifischem Verhalten.

**Tab. 32: Relative Verhältnisse katalytischer Aktivitäten der Sec-WT-Gpx4-Isoformen bezüglich Substrat und Temperaturpunkt.**  $\check{k}$  bezeichnet die prozentualen katalytischen Aktivitäten bezogen auf 100 %-zfGpx4a WT PC-OOH-Aktivität in (100 %<sup>-1</sup>).

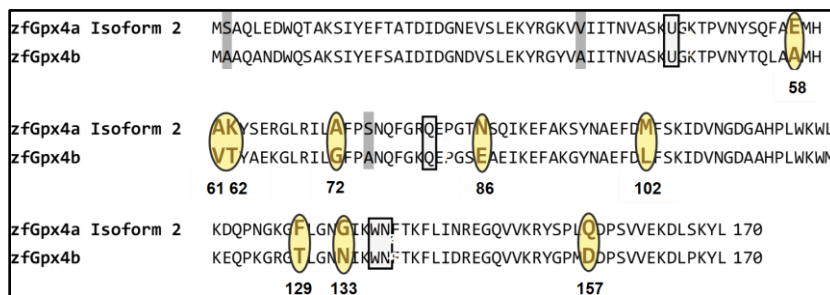
	WT-zfGpx4a	WT-zfGpx4b	WT-hGPX4
$(\check{k}_{\text{H}_2\text{O}_2\ 15^\circ\text{C}} / \check{k}_{\text{H}_2\text{O}_2\ 37^\circ\text{C}})$	1,51	2,74	0,70
$(\check{k}_{\text{TBHP}\ 15^\circ\text{C}} / \check{k}_{\text{TBHP}\ 37^\circ\text{C}})$	0,82	1,09	0,60
$(\check{k}_{\text{PCOOH}\ 15^\circ\text{C}} / \check{k}_{\text{PCOOH}\ 37^\circ\text{C}})$	1,00 (*)	5,81	0,95

**Zusammenfassung:** Bei 15 °C weisen alle drei WT-Sec-Gpx4-Isoformen ähnliche Aktivitätsmuster für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PC-OOH und TBHP auf ( $k_{\text{H}_2\text{O}_2} > k_{\text{PC-OOH}} > k_{\text{TBHP}}$ ). Bei 37 °C finden sich heterogene Profile substratspezifischer Aktivitäten. Als bestes Substrat der WT-zfGpx4b und der WT-hGPX4 fungiert bei 37 °C H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, während die WT-zfGpx4a die höchsten Aktivitäten mit dem Gpx4-spezifischen PC-OOH aufweist. Auffallend sind bei 37 °C deutlich reduzierte Aktivitäten der WT-zfGpx4b, insbesondere für das PC-OOH. Katalytische Aktivitäten der WT-zfGpx4-Isoformen sind bei 15 °C höher als bei 37 °C, Aktivitäten der WT-hGPX4 sind bei 37 °C relativ höher.



### 3.3.4.2 Substratspezifitäten von Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten

Bei kinetischen Messungen zur Substratspezifität fielen Unterschiede hinsichtlich der katalytischen Aktivität auf unterschiedlichen Temperaturniveaus der beiden WT-zfGpx4-Isoformen auf. Um mögliche Ursachen für diese Unterschiede zu finden, wurden zunächst die Primärstrukturen der beiden exprimierten, trunkierten zfGpx4-Isoformen gegenübergestellt und mit den Sequenzen der zytosolischen hGPX4 und der zytosolischen, murinen Gpx4 verglichen. Innerhalb der Primärstruktur der zfGpx4b konnten hierbei verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die sich hinsichtlich ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften von den



**Abb. 43: Vergleich der Primärstrukturen der exprimierten, trunkierten zfGpx4-Isoformen.** Markiert sind die katalytische Tetrade (schwarze Kästen), CysAla-Mutationen (grau hinterlegt) und Kandidaten der ortsgerechten Mutagenese (gelb markiert).

Aminosäuren der übrigen Gpx4-Isoformen an dieser Stelle unterscheiden. Für Mutagenesestudien wurden neun Mutanten der N-terminal trunkierten Sec-zfGpx4b hergestellt (Abb. 43). Dabei wurden Aminosäuren der zfGpx4b

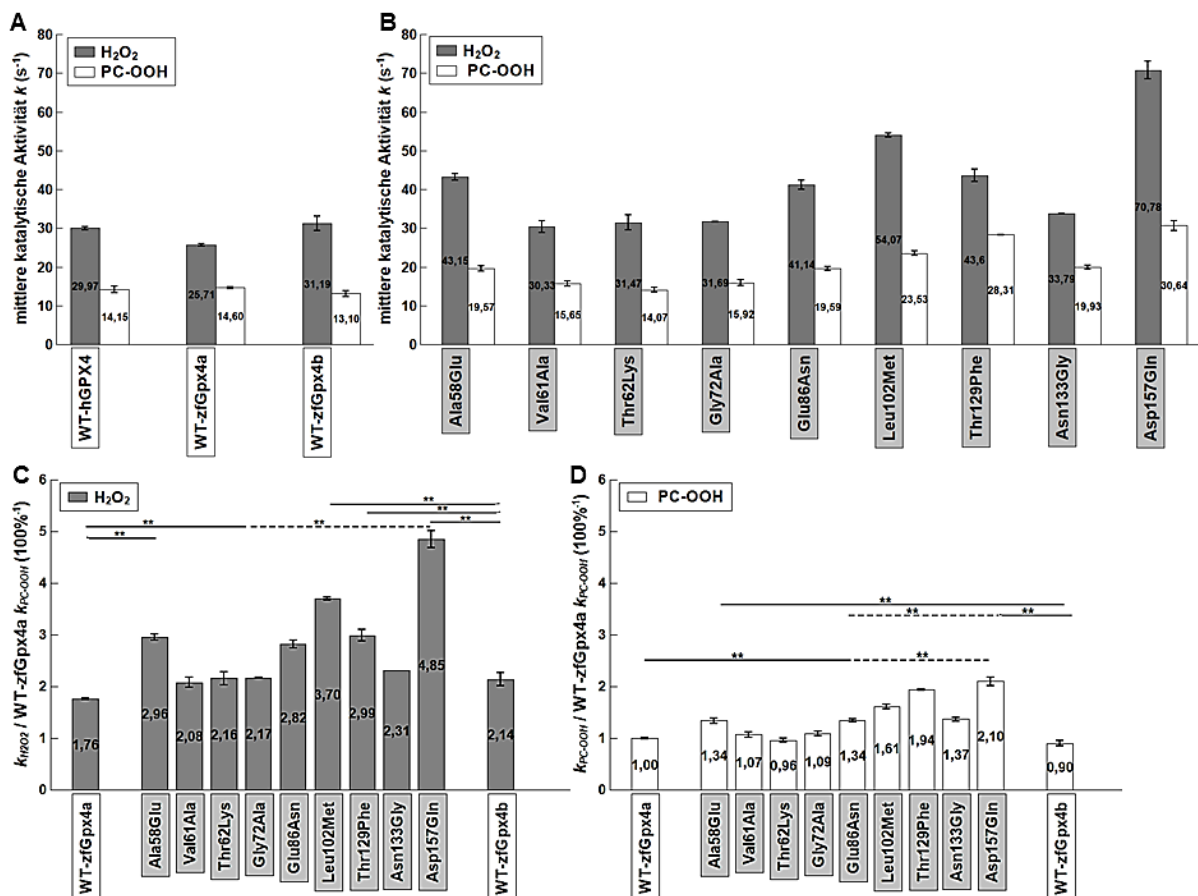
zu Aminosäuren der zfGpx4a an gleicher Stelle mutiert. Bei den Mutanten Ala58Glu und Thr62Lys wurden apolare (Ala) bzw. polar ungeladene (Thr) Aminosäuren durch polare Aminosäuren (Glu, Lys) ersetzt. Die Mutation Val61Ala führt zum Austausch des Val durch das kleinere Ala, während bei Gly72Ala das kleinere Gly durch das etwas größere und hydrophobere Ala ersetzt wird. Mit der Leu102Met-Mutation wird eine weitere schwefelhaltige Aminosäureseitenkette in die Polypeptidkette eingefügt. Bei Thr129Phe wird das polar ungeladene Thr durch Phe mit einem großen aromatischen Ring ersetzt. Demgegenüber ersetzt in Asn133Gly das kleinere Gly das ungeladene polare und deutlich größere Asn. Bei Glu86Asn und Asp157Gln werden polare Aminosäuren (Glu, Asp) durch polar ungeladene Aminosäuren ausgetauscht.

Die katalytischen Aktivitäten der neun verschiedenen Sec-zfGpx4b-Mutanten wurden vergleichend zu den entsprechenden Wildtypenzymen untersucht. Bei 15 °C wurden die Enzyme zu final 3 µg·ml<sup>-1</sup>, bei 37 °C zu final 2 - 6 µg·ml<sup>-1</sup> dem Ansatz hinzugefügt. Als Substrate dienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PC-OOH, die bei den Messungen bei 15 °C in einer Endkonzentration von 0,1 mM eingesetzt wurden. Für die Messungen bei 37 °C wurde die Substratkonzentration auf final 0,0375 mM reduziert. Abb. 44 stellt die spezifischen katalytischen Aktivitäten der einzelnen

### 3. ERGEBNISSE

Isoformen bei 15 °C in absoluten Zahlen und standardisiert bezüglich der WT-zfGpx4a-PC-OOH-Aktivität einander gegenüber. Wie zuvor erfolgte eine Normalisierung der katalytischen Aktivitäten auf einen identischen Selengehalt.

Bei 15 °C konnten nachstehende Beobachtungen gemacht werden: (i) Wie die WT-Sec-Gpx4-Isoformen sind alle getesteten Sec-zfGpx4b-Mutanten katalytisch aktiv. (ii) Bei allen getesteten Gpx4-Varianten ist die katalytische Aktivität mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> höher als mit PC-OOH ( $k_{H_2O_2} > k_{PC-OOH}$ ) (Abb. 44, A und B). (iii) Die WT-Gpx4-Isoformen weisen ähnliche, aus dem Vorversuch (Abschnitt 3.3.4.1, S. 90) bekannte Aktivitätsmuster mit katalytischen Aktivitäten in vergleichbaren Größenordnungen auf (Abb. 44, A). (iv) Ähnliche Aktivitätsmuster und vergleichbare katalytische Aktivitäten wie die WT-Enzyme fallen bei den zfGpx4b-Mutanten Val61Ala, Thr62Lys und Gly72Ala auf (Abb. 44, B). Die übrigen Mutanten weisen für ein oder beide Substrate signifikant höhere katalytische Aktivitäten gegenüber einem oder beiden WT-zfGpx4-Isoformen auf (Abb. 44, B, C, D). (v) Signifikant höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten gegenüber der

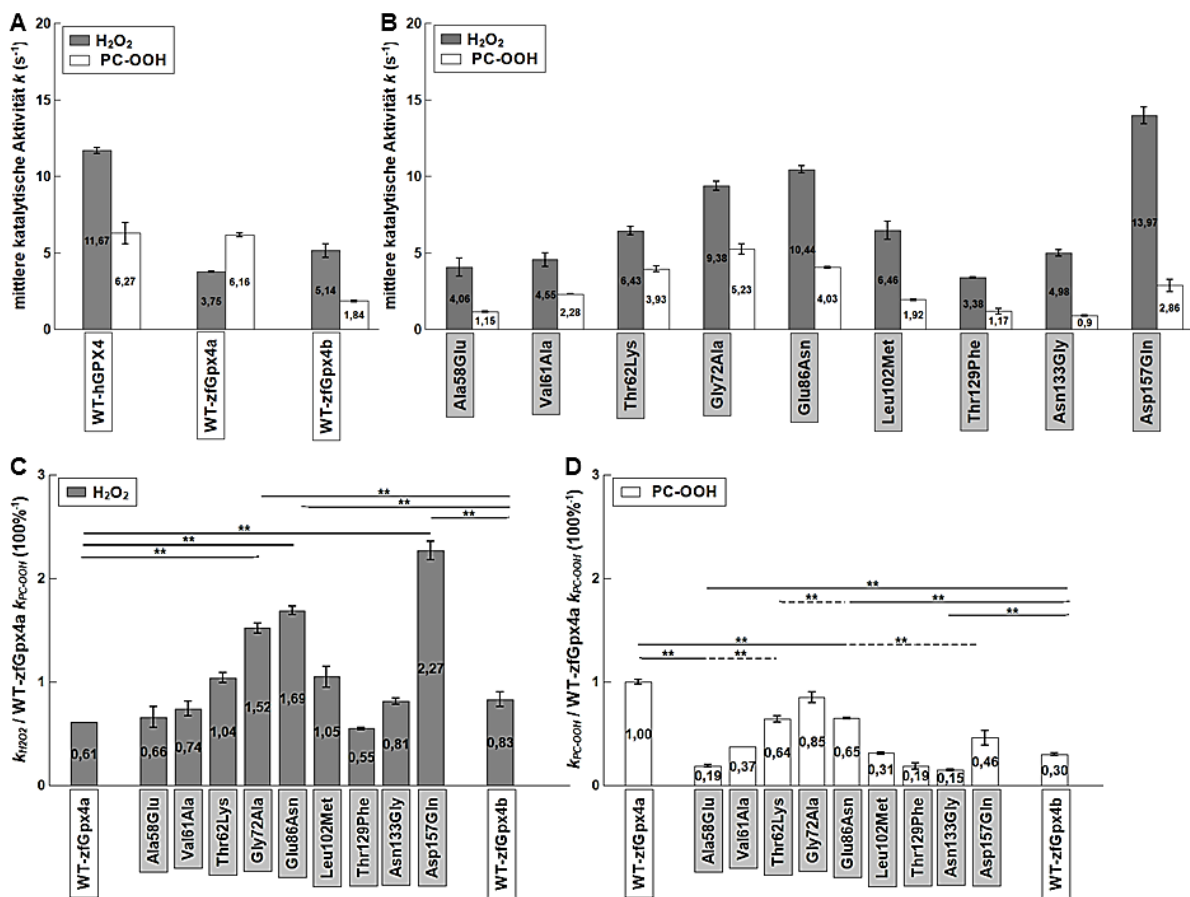


**Abb. 44: Substratspezifitäten von WT-Gpx4-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bei 15 °C.** Enzyme wurden final zu 3 µg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt. Als Substrate dienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) und PC-OOH (0,1 mM). Es wurden Doppelwerte erhoben. Signifikanzprüfung im Vergleich zur WT-zfGpx4a (schwarze Striche) bzw. WT-zfGpx4b (graue Striche) mittels T-Test unter Ausschluss einer Varianzhomogenität (n = 4, p < 0,05) und nach Prüfung auf Plausibilität. \*\* markieren signifikante Unterschiede. (A), (B) WT-Gpx4-Isoformen bzw. zfGpx4b-Mutanten in absoluten Zahlen. (C), (D) Standardisierte Aktivitäten für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. PC-OOH bezüglich der PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4a.

### 3. ERGEBNISSE

WT-zfGpx4a und der WT-zfGpx4b erreichen die zfGpx4b-Mutanten Leu102Met, Thr129Phe und Asp157Glu (Abb. 44, C). Aktivitätssteigerungen um mindestens das Zweifache der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten beider WT-Enzyme weisen die Mutanten Leu102Met und Asp157Gln auf. (vi) Signifikant höhere PC-OOH-Aktivitäten im Vergleich zu beiden WT-zfGpx4-Isoformen weisen die Mutanten Glu86Asn, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly und Asp157Glu auf (Abb. 44, D). Dabei entsprechen die PC-OOH-Aktivitäten der Mutanten Thr129Phe und Asp157Glu dem Zweifachen beider WT-zfGpx4-Isoformen.

Bei 37 °C fielen folgende Beobachtungen auf (Abb. 45): (i) Auch bei 37 °C sind alle Sec-zfGpx4b-Mutanten katalytisch aktiv (Abb. 45, B). (ii) Die untersuchten Gpx4-Isoformen erreichen bei 37 °C mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die höchsten katalytischen Aktivitäten ( $k_{H_2O_2} > k_{PC-OOH}$ ) (Abb. 45, A und B). Einzige Ausnahme bildet die WT-zfGpx4a mit  $k_{PC-OOH} > k_{H_2O_2}$ . (iii) Insofern finden sich bei 37 °C ähnliche aus den Vorversuchen (Abschnitt 3.3.4.2 S. 90) bekannte Aktivitätsprofile der WT-Gpx4-Isoformen mit  $k_{H_2O_2} > k_{PC-OOH}$  für die WT-zfGpx4b und die hGPX4 bzw.  $k_{PC-OOH} > k_{H_2O_2}$  für die



**Abb. 45: Substratspezifitäten von WT-Gpx4-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bei 37 °C.** Enzyme wurden bei den Messungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0375 mM) final zu 2-3 µg·ml<sup>-1</sup> bzw. bei den Messungen mit PCOOH (0,0375 mM) final zu 4-6 µg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt. Es wurden Doppelwerte erhoben. Signifikanzprüfung im Vergleich zur WT-zfGpx4a (schwarze Striche) bzw. WT-zfGpx4b (graue Striche) mittels T-Test unter Ausschluss einer Varianzhomogenität (n = 4, p < 0,05) und nach Prüfung auf Plausibilität. \*\* markieren signifikante Unterschiede. (A), (B) WT-Gpx4-Isoformen bzw. zfGpx4b-Mutanten in absoluten Zahlen. (C), (D) Standardisierte Aktivitäten für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. PCOOH bezüglich der PCOOH-Aktivität der WT-zfGpx4a.

### 3. ERGEBNISSE

WT-zfGpx4a (Abb. 45, A). (iv) Auch die bei 37 °C bereits beobachtete deutlich verminderte PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4b im Vergleich zu den hohen katalytischen PC-OOH-Aktivitäten der WT-zfGpx4a finden sich wieder. Die PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4b beträgt hier  $\frac{1}{4}$  der Aktivität der beiden anderen WT-Gpx4-Isoformen. (v) Substratspezifische Aktivitäten der zfGpx4b-Mutanten fallen heterogen aus. (vi) Signifikant höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten im Vergleich zu beiden WT-zfGpx4-Isoformen weisen die zfGpx4b-Mutanten Gly72Ala, Glu86Asn und Asp157Gln auf (Abb. 45, C). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten dieser Mutanten betragen etwa das Zweifache oder mehr der WT-Aktivität (Abb. 45, C). (vii) Signifikant höhere PC-OOH-Aktivitäten der zfGpx4b-Mutanten finden sich nur im Vergleich zur WT-zfGpx4b (Abb. 45, D). Hierbei erreichen die Mutanten Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn um mehr als das doppelte größere und die Mutanten Ala58Glu (ca. 0,6-fache) und Asn133Gly (ca. 0,5-fache) signifikant kleinere PC-OOH-Aktivitäten. Die PC-OOH-Aktivitäten aller zfGpx4b-Mutanten fallen im Vergleich zur WT-zfGpx4a geringer aus. Nur die PC-OOH-Aktivitäten der Gly72Ala-Mutante unterscheidet sich nicht signifikant von der PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4a (Abb. 45).

Anhand der normalisierten substratspezifischen Aktivitäten wurden die Quotienten der katalytischen Aktivität bei 15 °C im Vergleich zu 37 °C pro Enzymvariante und Substrat berechnet (Tab. 33). Für die WT-zfGpx4-Isoformen und die zfGpx4b-Mutanten bestätigen die substratspezifischen Quotienten im Allgemeinen eine ausgeprägtere katalytische Aktivität bei 15 °C ( $k > 1$ ).

**Tab. 33: Verhältnisse katalytischer Aktivitäten der Gpx4-WT-Isoformen und zfGpx4b-Mutanten bezüglich Substrat und Temperatur.**  $\tilde{k}$  bezeichnet die prozentualen katalytischen Aktivitäten bezogen auf 100 %-zfGpx4a-WT PC-OOH-Aktivität in (100 %<sup>-1</sup>). (\*) Referenzwerte.

	$(\tilde{k}_{\text{H}_2\text{O}_2\ 15^\circ\text{C}} / \tilde{k}_{\text{H}_2\text{O}_2\ 37^\circ\text{C}})$	$(\tilde{k}_{\text{PC-OOH}\ 15^\circ\text{C}} / \tilde{k}_{\text{PC-OOH}\ 37^\circ\text{C}})$
hGPX4 WT	1,08	0,95
zfGpx4a WT	2,89	1,00 (*)
zfGpx4b WT	2,56	3,00
zfGpx4b Ala58Glu	4,49	7,15
zfGpx4b Val61Ala	2,81	2,90
zfGpx4b Thr62Lys	2,07	1,51
zfGpx4b Gly72Ala	1,43	1,28
zfGpx4b Glu86Asn	1,66	2,05
zfGpx4b Leu102Met	3,53	5,17
zfGpx4b Thr129Phe	5,44	10,18
zfGpx4b Asn133Gly	2,86	9,39
zfGpx4b Asp157Gln	2,14	4,52

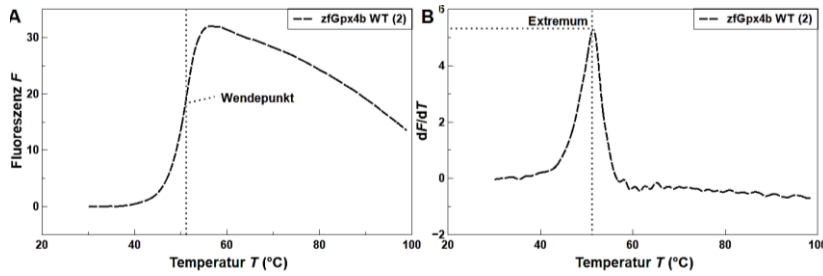
Für die zfGpx4b-Mutanten Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly und Asp157Gln fallen deutliche Diskrepanzen zwischen den jeweiligen substratspezifischen Quotienten mit  $\check{k}_{PC-OOH} \gg \check{k}_{H_2O_2}$  auf (Tab. 33), die vor dem Hintergrund einer ohnehin höheren katalytischen Aktivität der zfGpx4-Isoformen bei 15 °C indirekt vermuten lassen, dass die spezifische PC-OOH-Aktivität bei 15 °C in Folge der Punktmutation relativ gesehen mehr gesteigert werden konnte als die spezifische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivität. Bei 37 °C hingegen bewirken diese Mutationen keine Steigerung der spezifischen PC-OOH-Aktivität (vgl. Abb. 45, **D**). Ähnliche Aktivitätsprofile wie für die WT-zfGpx4-Isoformen fielen für die zfGpx4b-Mutanten Val61Ala, Thr62Lys und Gly72Ala bei 15 °C auf. Bei 37 °C wiesen die Mutanten Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn signifikant höhere PC-OOH-Aktivitäten als die WT-zfGpx4b auf. Die substrat- und isoformspezifischen Quotienten dieser Mutanten liegen in guter Näherung in gleichen Größenordnungen ( $\check{k}_{PC-OOH} \approx \check{k}_{H_2O_2}$ ), sodass hier am ehesten eine generalisierte Aktivitätszunahme vorliegt. Die einzige zfGpx4b-Mutante mit einem nicht signifikanten Unterschied in der PC-OOH-Aktivität bei 37 °C und im Vergleich zur WT-zfGpx4a ist hierbei die Mutante Gly72Ala, deren substratspezifische Quotienten in guter Näherung um 1 liegen.

**Zusammenfassung:** Alle untersuchten Sec-zfGpx4b-Mutanten sind katalytisch aktiv. Die untersuchten zfGpx4-Isoformen weisen bei 15 °C höhere substratspezifische katalytische Aktivitäten auf als bei 37 °C. Die an der WT-zfGpx4b vorgenommenen Punktmutationen haben Auswirkungen auf die katalytische Effizienz des Enzyms, wobei auf der Grundlage der erhaltenen Daten kein überzeugendes Konzept zu den strukturellen Ursachen der beobachteten Aktivitätsveränderungen aufgestellt werden konnte.

### 3.3.5 Thermostabilität von Sec-Gpx4-Isoformen

Die Stabilität von Proteinen wird durch zahlreiche physikochemische Faktoren u.a. von der Umgebungstemperatur beeinflusst (105). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Temperaturveränderungen auf verschiedene Gpx4-Varianten (Sec-WT-hGPX4, Sec-WT-zfGpx4-Isoformen, Sec-zfGpx4b-Mutanten) mit Hilfe des Thermal-Shift-Assays untersucht. Die Proteine wurden dafür mit einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert und die Fluoreszenzveränderungen ( $F$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T$ ) im Temperaturbereich zwischen 30 °C und 99 °C aufgezeichnet. Exemplarisch ist die Ermittlung der Schmelztemperatur  $T_m$  als Extremum aus der graphischen Auftragung von  $dF/dT$  über  $T$  in Abb. 46 am Beispiel der WT-zfGpx4b dargestellt. In gleicher Weise wurden die Schmelztemperaturen der übrigen Enzym-Isoformen bestimmt und

### 3. ERGEBNISSE

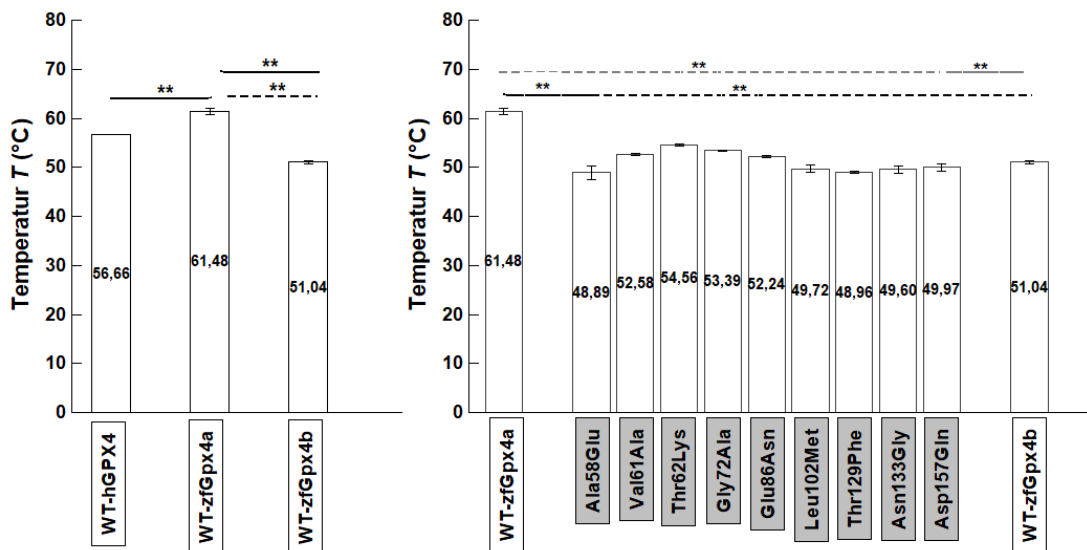


**Abb. 46: Schmelzpunktbestimmung mittels Thermal-Shift-Assay am Beispiel der Sec-WT-zfGpx4b.** Die Schmelztemperaturen konnten als Extrema aus der ersten Ableitung der aufgezeichneten Fluoreszenzen  $F$  nach der Temperatur  $T$  ( $dF/dT$ ) bestimmt werden. (A) Fluoreszenz  $F$  über der Temperatur  $T$ . (B)  $dF/dT$  über der Temperatur  $T$ .

hinsichtlich statistischer Signifikanz mittels T-Test für unabhängige Stichproben überprüft. Hierbei wurden paarweise Vergleiche der WT-Gpx-Isoformen untereinander sowie Vergleiche der einzelnen WT-zfGpx4-

Isoformen mit den zfGpx4b-Mutanten vorgenommen. Für die Signifikanzprüfungen wurden die Messdaten pro Isoform aus beiden Läufen ( $n = 6$ ) zusammengefasst. Bei diesen Läufen wurden auch zwei unterschiedliche Präparationschargen [(1), (2)] der WT-zfGpx4-Isoformen getestet. Die Messwerte dieser verschiedenen Präparationschargen wurden jeweils pro Isoform zusammengefasst ( $n = 12$ ) und ausgewertet. Abb. 47 vergleicht die Schmelztemperaturen und Signifikanzen der WT-Gpx4-Isoformen und der WT-zfGpx4-Isoformen mit den zfGpx4b-Mutanten untereinander.

Für die WT-Gpx4-Isoformen konnten nachstehende mittlere Schmelzpunkte ermittelt werden:  $T_{hGpx4} \approx 56,7 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $T_{zfGpx4a} \approx 61,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $T_{zfGpx4b} \approx 51,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Die Schmelztemperaturen der WT-



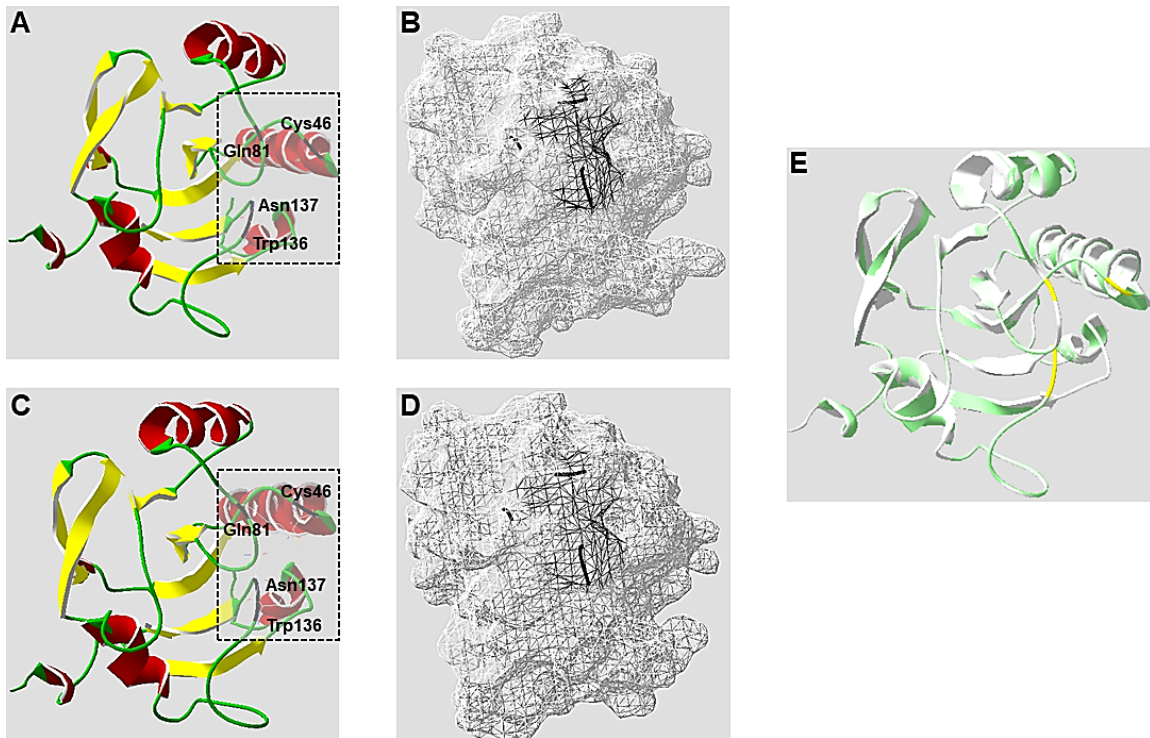
**Abb. 47: Thermostabilität verschiedener Sec-WT-Gpx4-Isoformen und Sec-zfGpx4b-Mutanten.** Proteinlösungen (final 2-5  $\mu\text{M}$ ) wurden mit dem SYPRO Orange Dye (final 20-fach konzentriert) inkubiert und Fluoreszenzsignale über eine Temperaturspanne von 30  $^\circ\text{C}$  bis 99  $^\circ\text{C}$  aufgenommen. In zwei unabhängigen Messläufen wurden pro Enzymisoform Dreifachwerte erhoben. Die Messläufe zweier verschiedener Präparationschargen der WT-zfGpx4-Isoformen wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. (A) Schmelztemperaturen  $T_m$  der Sec-WT-Gpx4-Isoformen. Die Schmelztemperaturen der WT-Gpx4-Isoformen sind jeweils signifikant verschieden ( $n = 18$  bzw.  $n = 24$ ,  $p < 0,001$ ). (B) Schmelztemperaturen  $T_m$  der Sec-zfGpx4b-Mutanten. Der Vergleich der WT-zfGpx4-Isoformen mit den zfGpx4b-Mutanten lieferte für alle Mutanten signifikante Unterschiede der Schmelztemperaturen ( $n = 18$ ,  $p < 0,022$ ).

Gpx4-Isoformen unterscheiden sich signifikant ( $n = 18$  bzw.  $n = 24$ ,  $p < 0,001$ ). Die zfGpx4b-Mutanten weisen Schmelztemperaturen zwischen  $48,9\text{ °C}$  und  $54,6\text{ °C}$  auf, die jeweils zu den WT-zfGpx4-Isoformen signifikant verschieden sind ( $n = 18$ ,  $p < 0,022$ ). Höhere Schmelztemperaturen im Vergleich zur WT-zfGpx4b finden sich bei den zfGpx4b-Mutanten Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn. Im Gegensatz dazu zeigen die Mutanten Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly und Asp157Gln kleinere Schmelztemperaturen als die WT-zfGpx4b. Damit scheinen alle vorgenommenen Punktmutationen die Thermostabilität der rekombinanten Proteine zu beeinflussen.

**Zusammenfassung:** Die untersuchten WT-Gpx4-Isoformen von Mensch und Zebrafisch weisen signifikant verschiedene Schmelztemperaturen auf, was auf eine unterschiedliche Thermostabilität der drei Proteine hindeutet. Die vorgenommenen Punktmutationen an der zfGpx4b beeinflussen ebenfalls die Thermostabilität dieser Enzyme.

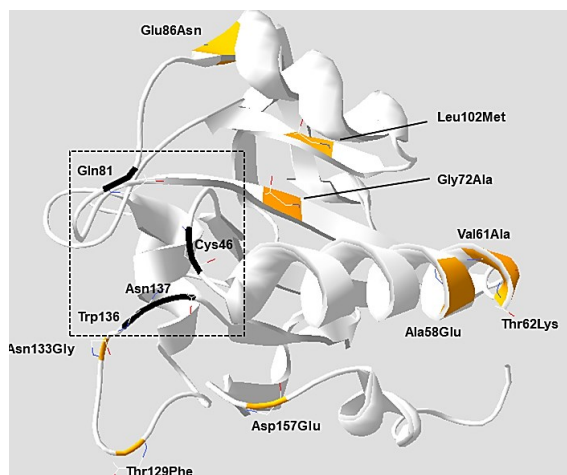
#### 3.3.6 Dreidimensionale Struktursimulation der zfGpx4-Isoformen

In den beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Funktionsparameter der beiden untersuchten zfGpx4-Isoformen (zfGpx4a Isoform 2 vs. zfGpx4b) in einigen Aspekten voneinander unterscheiden. Bei kinetischen Messungen zur Substratspezifität der Sec-WT-zfGpx4-Isoformen fiel insbesondere die hohe katalytische Aktivität der zfGpx4a Isoform 2 bei  $37\text{ °C}$  mit PC-OOH als Substrat auf, während die WT-zfGpx4b nur 15 % bis 25 % der Aktivität der WT-zfGpx4a mit PC-OOH erreichte. Auch hinsichtlich ihrer spezifischen Schmelzpunkte unterscheiden sich die beiden Gpx4-Isoformen des Zebrafisches voneinander. Um die strukturellen Ursachen für diese Unterschiede zu erforschen, wurden mittels SWISS-MODEL (115-120) dreidimensionale Modelle der N-terminal trunkeierten Wildtypvarianten beider zfGpx4-Isoformen erstellt. Als Vorlage diente hierbei die Kristallstruktur der rekombinanten Sec-hGPX4 (PDB-Eintrag 6ELW). Die Modelle konnten mit Global Model Quality Estimate (GMQE)-Werten von 0,87 bis 0,88 und einem Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN)-Z-Wert von -0,24 bis -0,85 generiert werden. Der GMQE-Wert ist ein Wert zwischen 0 und 1, der die Genauigkeit einer Strukturvorhersage unter Berücksichtigung des Aminosäurealignments bewertet. Je größer der GMQE-Wert, desto verlässlicher die Strukturvorhersage. Der QMEAN-Z-Wert beschreibt wie vergleichbar ein simuliertes Strukturmodell mit einem experimentellen Strukturmodell gleicher Größe ist. QMEAN-Z-Werte um 0 zeugen von hoher Qualität, Werte um -4 von niedriger Qualität (140). Methodenbedingt wurden jeweils SecCys-Mutanten der WT-zfGpx4-Isoformen modelliert.



**Abb. 48: Dreidimensionale Strukturmodelle der N-terminal trunkeierten WT-zfGpx4-Isoformen mit SecCys-Mutation.** Die Strukturmodelle wurden per SWISS-MODEL (115-120) basierend auf der Sec-hGPX4 (PDB-Eintrag 6ELW) erstellt und mittels Swiss-SpdbViewer 4.1.0 (26) visualisiert. In Ribbonmodelle sind  $\alpha$ -Helices rot,  $\beta$ -Faltblätter gelb und die katalytische Tetrade schwarz markiert. Im Oberflächenmodell sind Reste der katalytischen Tetrade schwarz hervorgehoben. (A) Ribbonmodell der trunkeierten WT-zfGpx4a Isoform 2 (SecCys-Mutation). (B) Oberflächenmodell der WT-zfGpx4a Isoform 2 (SecCys-Mutation). (C) Ribbonmodell der WT-zfGpx4b (SecCys-Mutation). (D) Oberflächenmodell der WT-zfGpx4b (SecCys-Mutation). (E) Überlagerung der Ribbonmodelle beider zfGpx4-Isoformen. Die WT-zfGpx4a Isoform 2 ist weiß, die WT-zfGpx4b grün eingefärbt. Gelb markiert ist die katalytische Tetrade.

Im Sequenzalignment teilen die WT-zfGpx4-Isoformen mit der zytosolischen hGPX4 Homologiegrade von 66,5 % bis 73,5 %. Dabei ist die zfGpx4b homologer zur zytosolischen



**Abb. 49: Lokalisation der Punktmutationen im 3D-Strukturmodell der N-terminal trunkeierten WT-zfGpx4b (SecCys-Mutation).** Das Strukturmodell wurde per SWISS-MODEL (113-118) basierend auf der Sec-hGPX4 (PDB-Eintrag 6ELW) erstellt und mittels Swiss-SpdbViewer 4.1.0 (26) visualisiert. Gekennzeichnet sind die katalytische Tetrade (schwarz) sowie die Aminosäuren der Mutagenesestudien (orange).

hGPX4. Wie in den bekannten Kristallstrukturen der hGPX4 finden sich in den Modellen beider zfGpx4-Isoformen vier  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Faltblätter (Abb. 48, A und C). Fünf  $\beta$ -Faltblätter bilden im Inneren der Proteine ein stabiles Strukturmotiv. Die katalytische Tetrade Cys46, Gln81, Trp136 und Asn137 ist an der Oberfläche der Proteine lokalisiert (Abb. 48, B und D). Bei Überlagerung der Ribbonmodelle beider WT-zfGpx4-Isoformen finden sich kaum strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen (Abb. 48, E). Strukturmodelle der zfGpx4b-Mutanten sind nicht erstellt worden. Hier ist



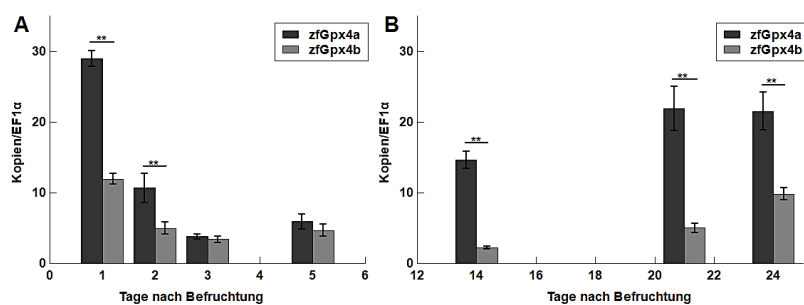
anzunehmen, dass aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der WT-Enzyme untereinander und der Funktionsparameter der Mutanten keine wesentlichen strukturellen Unterschiede resultieren. Abb. 49 veranschaulicht die Lage der einzelnen Punktmutationen im 3D-Strukturmodell der trunkierten WT-zfGpx4b. Die in den Mutagenesestudien genutzten Aminosäuren finden sich in  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und Coils. Während die Aminosäuren Ala58, Val61 und Thr62 am zur katalytischen Tetrade distalen Ende einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert sind, finden sich die Aminosäuren Gly72, Glu86, Leu102, Trp129, Asn133 und Asp157 scheinbar in näherer Umgebung der Tetrade.

**Zusammenfassung:** Die Strukturmodelle der zfGpx4-Isoformen sind aufgrund der hohen Aminosäuresequenzhomologie zur humanen SecGPX4 von hoher Qualität. Beide zfGpx4-Isoformen weisen ähnliche Sekundärstrukturelemente wie die humane SecGPX4 auf. Eine Strukturüberlagerung der Zebrafischmodelle zeigt kaum strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen.

### 3.4 Biologische Aspekte der zfGpx4 Isoformen

#### 3.4.1 Expression der zfGpx4-Isoformen während der Zebrafiscentwicklung

Bei Mäusen werden die Gpx4-Isoformen in frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert (62). Eine systemische Inaktivierung des Gpx4-Gens führt zu einer frühen embryonalen Letalität (50). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Gpx4 essentiell für die Embryonalentwicklung von Mäusen ist, wobei die unmittelbare Todesursache bisher noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden konnte. Um zu erforschen, in welchen Stadien der Entwicklung des Zebrafisches die beiden Gpx4-



**Abb. 50: Expression der zfGpx4-Isoformen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten.** Mittels qPCR wurde die Expression der zfGpx4-Isoformen in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Pro Zeitpunkt wurden Dreifachwerte erhoben. Als Referenzgen diente *ef1a*. Signifikanzprüfungen erfolgten mittels T-Test für unabhängige Stichproben ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) in SPSS. \*\* markieren signifikante Unterschiede. (A) Tag 1 bis 5 nach Befruchtung. (B) Spätere Entwicklungsstadien.

Isoformen exprimiert werden, wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen weit entwickelten Zebrafischindividuen extrahiert und das Expressionsniveau der beiden Gpx4-Isoformen auf mRNA-Ebene quantifiziert. Es wurde mit dem SensiMix SYBR No-

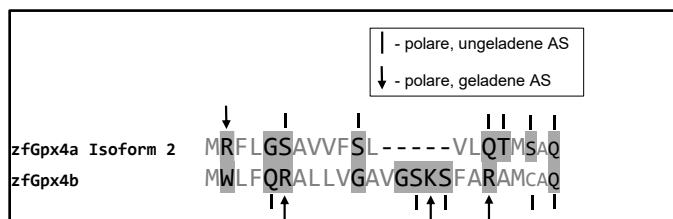
Rox Kit gearbeitet. Pro Isoform und Entwicklungszeitpunkt wurden Dreifachwerte bestimmt. Die mRNA von *eflα* fungierte als Referenz. EF1α beliefert das Ribosom während der Synthese einer Polypeptidkette mit der nächsten folgenden Aminoacyl-tRNA. Dabei ist die tRNA als Komplex an das Guanosintriphosphat (GTP)-haltige EF1α gebunden. Erst nach der Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) und Phosphat dissoziiert EF1α von der tRNA (2). Nach Tang et al. (2007, (141)) ist das EF1α kodierende Gen im Zebrafisch ein stabiles Gen mit hohem Expressionsniveau. Die Gpx4-mRNAs liegen über den gesamten Untersuchungszeitraum in deutlich höheren steady-state-Konzentrationen als die EF1α-mRNA vor (Abb. 50). Am Tag 1 der Individualentwicklung konnten ca. 30 Kopien der zfGpx4a pro Kopie EF1α-mRNA nachgewiesen werden. Selbst am Tag 5 waren die zellulären Konzentrationen beider Gpx4-mRNAs noch fünffach höher als die der EF1α-mRNA. Dabei sind die zfGpx4-Isoformen zu allen untersuchten Entwicklungsphasen des Zebrafisches nachweisbar (Abb. 50). Die höchsten Expressionsniveaus finden sich in frühen (Tag 1) und relativ späten Stadien (Tag 21 bzw. 24) der Individualentwicklung. Zu fast allen Zeitpunkten (Tag 1, 2, 14, 21, 24) wurde die zfGpx4a-mRNA auf signifikant höherem Niveau exprimiert als die zfGpx4b-mRNA.

**Zusammenfassung:** Auf mRNA Ebene konnte die Expression der beiden zfGpx4-Isoformen zu allen untersuchten Zeitpunkten der Individualentwicklung nachgewiesen werden. Die Expressionshöhen übersteigen die des Referenzgens *eflα* deutlich. Die zfGpx4a-mRNA wird zu fast allen Untersuchungszeitpunkten auf höherem Niveau exprimiert als die zfGpx4b-mRNA. Die zeitlichen Expressionsprofile der beider Isoformen ähneln sich, wobei zu frühen (Tag 1) und späten (Tag 24) Zeitpunkten der Individualentwicklung Expressionsmaxima nachweisbar sind.

### 3.4.2 Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen

#### 3.4.2.1 Analyse N-terminaler Peptidsequenzen der zfGpx4-Isoformen

Die N-terminalen Peptidsequenzen von Proteinen können Informationen beinhalten, die den



**Abb. 51:** Analyse der N-terminalen Sequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b. Hellgraue Buchstaben markieren hydrophobe, dunkelgrau hinterlegte Buchstaben markieren hydrophile Aminosäuren.

weiteren Werdegang des Proteins und dessen subzelluläre Lokalisation innerhalb der Zelle festlegen. Da eine N-terminale Verkürzung der zfGpx4a Isoform 2 um 16 AS und der zfGpx4b um 21 AS die Aufreinigung und Elution von löslichem Protein nach

vorangegangener Proteinexpression ermöglichte, wurden die N-terminalen Sequenzen beider Isoformen im Hinblick auf Anteil und Eigenschaften von Aminosäuren untersucht und mit Vorhersagen bezüglich etwaiger Proteinsortierungssignalen verglichen. Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation der Proteine erfolgten mit PrediSi, Target P-2.0 und Signal P-5.0, wobei jeweils die gesamte Primärstruktur als Vorlage diente. Bei Analyse des N-Terminus der zfGpx4a Isoform 2 (Abb. 51) findet sich N-terminal eine geladene Aminosäure gefolgt von einem längerem Abschnitt mit vorwiegend hydrophoben Resten. C-terminal finden sich zwei polare ungeladene Aminosäuren (Q, T). Damit weist die N-terminale Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 Eigenschaften von Signalsequenzen auf (vgl. 1.5 Eukaryontische Zellkompartimentierung und Proteinsortierung, S. 29). Dies entspricht den in Tab. 34 zusammengefassten computergestützten Vorhersagen zu möglichen Sortierungssignalen. Hierbei werten alle drei genutzten Programme die N-terminale Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 als Signalpeptid mit einer Spaltstelle im Bereich der 18. bis 20. Aminosäure. Damit wäre die zfGpx4a Isoform 2 in einem zellulären Kompartiment zu finden, das Teil des sekretorischen Weges ist. Kompartimente des sekretorischen Weges sind das rER und der Golgi-Apparat. Von hier aus kann der Transport zu Lysosomen, der Plasmamembran oder aus der Zelle heraus erfolgen (2).

Innerhalb der N-terminalen Aminosäuresequenz der zfGpx4b fallen Abschnitte hydrophober und Abschnitte hydrophiler Aminosäuren auf (Abb. 51). Gemäß den Vorhersagen wird die N-terminale Sequenz der zfGpx4b explizit nicht als Signalpeptid gewertet (PrediSi, Signal P-5.0). Target P-2.0 assoziiert diese mit der Sequenz eines mitochondrialen Transitpeptids. Häufig bilden mitochondriale Transitpeptide amphipathische  $\alpha$ -Helices aus, die reich an Arginin, Serin oder Alanin sind. In der N-terminalen Sequenz der zfGpx4b finden sich zwei Arginin-, vier Alanin- und zwei Serin-Reste.

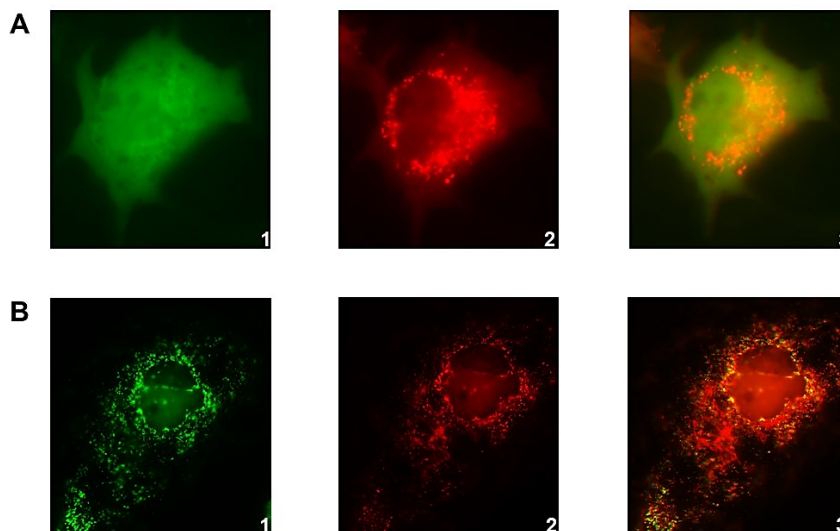
**Tab. 34: Computergestützte Vorhersagen zur Funktionalität der N-terminalen Peptidsequenzen der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b mit Hilfe von drei verschiedenen Vorhersageprogrammen (PrediSi, Target P-2.0 und Signal P-5.0).**

	Programm	Sequenztyp (Wahrscheinlichkeit)	Spaltort (Wahrscheinlichkeit)
<b>zfGpx4a Isoform 2</b>			
	PrediSi	Signalpeptid (0,6165)	Pos. 18
	Signal P-5.0	Signalpeptid (0,9944)	Pos. 19/20 (0,4505)
	Target P-2.0	Signalpeptid (0,9956)	Pos. 19/20 (0,5902)
<b>zfGpx4b</b>			
	PrediSi	kein Signalpeptid	Pos. 19
	Signal P-5.0	anderes Peptid (0,7454)	
	Target P-2.0	mitochondriales Transitpeptid (0,7582)	Pos. 22/23 (0,3421)

**Zusammenfassung:** Bei der N-terminalen Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 könnte es sich um ein Signalpeptid handeln, sodass die zfGpx4a Isoform 2 intrazellulär in Kompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu könnte die zfGpx4b ein mitochondriales Transitpeptid besitzen und damit *in vivo* in die Mitochondrien importiert werden.

### 3.4.2.2 Experimentelle Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der zfGpx4-Isoformen an COS-Zellen

Für experimentelle Untersuchungen der subzellulären Lokalisation der zfGpx4-Isoformen wurde die 5'-UTR bis einschließlich des zweiten Met-kodierenden ATGs der cDNA der zfGpx4a Isoform 2, der zfGpx4b und der mitochondrialen Gpx4 der Maus in die eukaryontischen Expressionsvektoren pEGFP-N1 und pmCherry-N1 kloniert. Diese Vektoren kodieren für ein grünes (pEGFP-N1) bzw. ein rotes (pmCherry-N1) Fluoreszenzprotein. Werden Zellen mit diesen Vektoren transfiziert, sollte die Expression der Fluoreszenzproteine durch die potentiellen Sortierungssignale der Gpx4-Isoformen in verschiedene subzelluläre Kompartimente dirigiert werden. Vor der Transfektion wurden alle konstruierten Expressionsplasmide hinsichtlich ihrer



**Abb. 52: Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen.** Cotransfizierte COS-7-Zellen nach 48-stündiger Inkubation. (A) Transfektion der Zellen mit der N-terminalen Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 im pEGFP-N1-Vektor (1) und der murinen m-Gpx4 im pmCherry-N1 (2). (3) stellt das Überlagerungsbild dar. (B) Transfektion der Zellen mit der N-terminalen Sequenz der zfGpx4b im pEGFP-N1-Vektor (1) und der murinen m-Gpx4 im pmCherry-N1 (2). (3) stellt das Überlagerungsbild dar.

DNA-Sequenz vollständig sequenziert. Anschließend wurden 20.000 COS7-Zellen mit 100 ng bzw. 200 ng Plasmid-DNA transfiziert und bei 37 °C inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenzsignale unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung des GFP-Proteins mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und des mCherry-Proteins

mit  $\lambda = 587 \text{ nm}$  ausgewertet. Durchlichtbilder konnten nicht aufgenommen werden. COS-Zellen sind sehr flach, sodass die resultierenden Durchlichtbilder meist nur von geringer Qualität sind.

Abb. 52 **A1** zeigt die intrazelluläre Verteilung des GFP-Proteins (grün) mit N-terminaler Sequenz der zfGpx4a Isoform 2. Es lässt sich eine breite flächenhafte Verteilung des Fluoreszenzsignals beobachten, die auch den Zellkern einschließt. In Abb. 52 **A2** ist die subzelluläre Verteilung des mCherry-Proteins (rot) abgebildet, welches das potentielle Sortierungssignal der mitochondrialen murinen Gpx4 enthält. Hier können punktförmige Signale beobachtet werden, die sich unter Aussparung des Zellkerns über das gesamte Zytoplasma erstrecken. Diese Signalverteilung wird im Überlagerungsbild (Abb. 52) verdeutlicht. Eine flächenhafte Verteilung des Fluoreszenzsignals über die gesamte Zelle einschließlich des Zellkerns deutet darauf hin, dass sich die zfGpx4a Isoform 2 im Zytoplasma und im Zellkern befinden sollte. Im Gegensatz dazu dirigiert das potentielle Transitpeptid der mitochondrialen murinen Gpx4 das Markerprotein selektiv in die Mitochondrien der COS-Zellen. Gemäß den Vorhersageprogrammen wäre die zfGpx4a Isoform 2 im ER, dem Golgi-Apparat oder nachgeschalteten Kompartimenten des sekretorischen Weges anzutreffen. In wie weit bei den vorliegenden Aufnahmen tatsächlich zwischen Zytoplasma und diesen Organellen (ER, Golgi-Apparat) differenziert werden kann, ist allerdings fraglich. Nukleäre Importsignale innerhalb der Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 konnten in dieser Arbeit mit SeqNLS (113) und NucPred (114) nicht gefunden werden. Die intrazellulären Verteilungsmuster der Markerproteine, die die potentiellen Sortierungssignale der zfGpx4b (Abb. 52, **B1**) und der murine m-Gpx4 (Abb. 52, **B2**) enthalten, sehen sehr ähnlich aus. Die punktförmige Verteilung über die gesamte Zelle ausschließlich des Zellkerns deuten auf eine mitochondriale Lokalisation der beiden Markerproteine hin.

**Zusammenfassung:** Die Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation lassen in Übereinstimmung mit den computergestützten Voraussagen eine mitochondriale Lokalisation der zfGpx4b vermuten. Die tatsächliche Lokalisation der zfGpx4a Isoform 2 innerhalb der Zelle bleibt unklar.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Evolutionäre Aspekte der Gpx4

#### 4.1.1 Die Gpx4 in irdischen Lebensformen

Die Gpx4 ist ein Enzym aus der Gpx-Familie mit strukturellen, funktionellen und biochemischen Eigenschaften, die sie von anderen Enzymen dieser Familie abgrenzen. Frühere Untersuchungen zur Evolution der Gpx-Familie bemaßen der Gpx4 eine Vorreiterrolle als phylogenetisch alte Ausführung der Gpx-Familie bei, vermuteten ein *Phgpx/Gpx4*-Urgen oder Assoziationen zwischen einem Gpx-Vorläufer und der heutigen PHGpx (38) (39) (40).

In der vorliegenden Datenbankrecherche wurden Vorkommen und Verbreitung Gpx4- bzw. Gpx4-ähnlicher Sequenzen in irdischen Lebewesen und Viren untersucht. Dabei fanden sich Gpx4- bzw. Gpx4-ähnliche Sequenzen in allen drei von Woese et al. (1990, (121)) vorgeschlagenen Domänen des irdischen Lebens. Auch in drei Viren fielen Gpx4-ähnliche Sequenzen auf. In Viren, *Archaea* und Pilzen konnten Gpx4-ähnliche Sequenzen in weniger als 1 % nachgewiesen werden. Demgegenüber verfügten etwa 2 % der untersuchten Pflanzen über Gpx4-ähnliche Sequenzen. Bei Invertebraten und nicht-säugenden Wirbeltieren betrug der Anteil Gpx4-ähnlicher Sequenzen etwa 4 %. Demgegenüber fanden sich in etwa 9 % der Bakterien und 10 % der Säugetiere Gpx4-ähnliche Sequenzen (Tab. 35). Die für Enzyme aus der Gpx-Familie typische katalytische Tetrade trat mehrheitlich entweder mit einem Cys (CQWN) oder einem Sec (UQWN) am aktiven Zentrum auf. Konservierungsgrade der einzelnen Aminosäuren der katalytischen Tetrade sind in Tab. 35 zusammengefasst. Abweichungen von dieser Tetradenabfolge zeigten sich insbesondere an Position zwei mit Substitution des Glutamins (Gln, Q).

**Tab. 35: Gpx4-ähnliche Sequenzen in irdischen Lebewesen und Viren.** Zusammenfassung von Häufigkeiten Gpx4-ähnlicher Sequenzen und Konservierungsgrade der einzelnen Aminosäuren der katalytischen Tetrade.

	Häufigkeit Gpx4-ähnlicher Sequenzen (%)	Konservierungsgrade der Aminosäuren der Tetrade (%)				
		C	U	Q	W	N
Viren	0,03	33,3	66,7	100,0	100,0	100,0
Bakterien	9,2	99,91	0,04	88,59	99,94	99,96
<i>Archaea</i>	0,8	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0
Pilze	0,7	99,0	0,0	97,1	100,0	100,0
Pflanzen	2,2	98,5	1,0	94,9	100,0	100,0
Invertebraten	3,8	94,5	1,1	96,7	98,4	98,9
Nicht-säugende Wirbeltiere	3,7	1,0	97,2	100,0	100,0	100,0
Säugetiere	10,4	0,5	92,8	100,0	100,0	100,0

CysGpx4-ähnliche Sequenzen konnten in einem Virus und der überwiegenden Zahl von Bakterien, *Archaea*, Pilzen, Pflanzen und Invertebraten beobachtet werden. Demgegenüber wiesen die meisten Wirbeltiere und zwei Viren UQWN-Tetraden auf. Tatsächlich konnten aber auch in vier Bakterien, drei Pflanzen und zwei wirbellosen Tieren UQWN-Tetraden gefunden werden, während insgesamt fünf Wirbeltierspezies über Sequenzen mit CQWN-Tetrade verfügten. Homologiegrade mit der hGPX4 Isoform A als Referenzsequenz fielen unter Wirbeltieren im Vergleich zu Viren, Bakterien, *Archaea*, Pilzen, Pflanzen und wirbellosen Tieren deutlich höher aus, entsprechend stellten sich in den Alignments längere Abschnitte hoch konservierter Regionen dar. Einige der positiven Treffer mit CQWN- bzw. UQWN-Tetrade wiesen im Alignment mit anderen Vertretern der humanen GPX-Familie höhere Homologiegrade als zur hGPX4 Isoform A auf, darunter die in Tab. 36 zusammengefassten Enzyme. Dies lässt eine Zuordnung dieser Enzyme zu einer anderen Gpx-Isoform vermuten. Die Beobachtung Gpx4-ähnlicher Sequenzen in allen drei Domänen des irdischen Lebens und Viren steht im Einklang mit der Literatur (20). Das Vorkommen Gpx4-ähnlicher Sequenzen über verschiedenste Organismen hinweg deutet auf eine mögliche vorteilhafte Rolle dieses Enzym für den jeweiligen Organismus hin. In quantitativer Hinsicht scheint die Gpx4 jedoch nach den vorliegenden Daten in der Minderheit der untersuchten Lebewelt vertreten zu sein. Auch bei hoch entwickelten Säugetieren wie beim *Gorilla Gorilla* (Westlicher Gorilla), beim *Papio anubis* (Anubispavian) oder *Vulpes vulpes* (Rotfuchs) fanden sich mit unserer Suchstrategie keine Gpx4-ähnlichen Sequenzen. Dementsprechend muss Leben auch ohne Gpx4 oder Gpx4-ähnlichem Protein möglich sein. Sollte es tatsächlich ein *Gpx4*-Urgen gegeben haben, dass sehr früh im Rahmen der Evolution des Lebens eingeführt wurde, scheint es bei einer großen Anzahl von Lebewesen zum Verlust dieses *Gpx4*-Gens gekommen sein.

**Tab. 36: Positivtreffer Gpx4-ähnlicher Sequenzen mit CQWN-bzw. UQWN-Tetrade mit möglicher Zuordnung zu anderen Gpx-Isoformen.**

Protein	Akzession
MC066L [Molluscum contagiosum virus subtype 1]	NP_044017.2
glutathione peroxidase [Burkholderia contaminans]	WP_175812100.1
glutathione peroxidase [Vibrio parahaemolyticus]	WP_180804923.1
glutathione peroxidase [Methanobrevibacter ruminantium]	WP_012956733.1
glutathione peroxidase [Kwoniella bestiolae CBS 10118]	XP_019043233.1
glutathione peroxidase, selenoprotein [Volvox carteri f. nagariensis]	XP_002947451.1
glutathione peroxidase [Micromonas pusilla CCMP1545]	XP_003057917.1
uncharacterized protein LOC112243833 [Oncorhynchus tshawytscha]	XP_024267392.1
uncharacterized protein LOC494689 precursor [Xenopus laevis]	NP_001088000.1

Dies würde bedeuten, dass der Evolutionsdruck, der auf diesen DNA-Sequenzen lastet, eher gering gewesen ist. So könnte die Gpx4 durch Enzyme mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt worden sein. Möglicherweise könnte die Gpx4 auch in Folge sich verändernder Lebensbedingungen und Lebensräume für den jeweiligen Organismen überflüssig geworden sein. Herbette et al. (2007, (38)) nahmen an, dass es nach Multiplikation eines *Gpx4*-Urgens zur zufälligen Integration der Genduplikate in das Genom früher Säugetiere gekommen sei. Diese These könnte zumindest durch das beobachtete Vorkommen einer Gpx4 in der Minderheit der untersuchten Säugetiersequenzen gestützt werden. Das Auftreten Gpx4-ähnlicher Sequenzen in viralen Genomen ist mutmaßlich auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen. Dabei kommt es zur Übertragung von Genomfragmenten unabhängig von der geschlechtlichen Fortpflanzung und über verschiedene Arten hinweg (37).

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten überwiegend katalytische Tetraden der Form C/UQWN mit Konservierungsgraden der einzelnen Aminosäuren > 80 % beobachtet werden (20). Diese hohen Konservierungsgrade der katalytischen Tetrade unterstreichen die fundamentale Bedeutung der einzelnen Tetraden-Aminosäuren für einen effizienten Katalysemechanismus. In der Vergangenheit hatten bereits verschiedene Mutagenesestudien die Relevanz dieser Aminosäuren für das Enzym belegt (21) (142). Variationen der katalytischen Tetrade fielen insbesondere an Position 2, dem Glutamin (Gln, Q) auf. Tatsächlich bemerkten auch Toppo et al. (2008, (20)) geringere Konservierungsgrade des Gln im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren der Tetrade. Tetradenvariationen konnten in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Insekten beobachtet werden. Inwieweit es sich hierbei um funktionelle, katalytisch aktive Gpx4-ähnliche Proteine handelt und welche evolutionären Vorteile diese für die jeweilige Spezies bergen, bleibt an dieser Stelle offen. CQWN-Tetraden fanden sich überwiegend in Bakterien, *Archaea*, Pilzen, Pflanzen und wirbellosen Tieren. Damit kommen Gpx-Enzyme mehrheitlich mit einem Cys am aktiven Zentrum vor. Selenoproteine mit UQWN-Tetrade fanden sich dagegen bis auf wenige Ausnahmen nur in Wirbeltieren. Bemerkenswerterweise fanden sich in vier Bakterienspezies potentielle Gpx4-ähnliche Selenoproteine mit UQWN-Tetrade. Ob diese den vier Spezies auch hinsichtlich ihrer Pathogenität einen evolutionären Vorteil verschaffen, bleibt unklar. Darüber hinaus fielen UQWN-Tetraden unter anderem in drei Pflanzenspezies und zwei wirbellosen Tieren auf. Eine computergestützte Suche konnte allerdings nur in *E. salina*, *C. reinhardtii* und *Folsomia candida* kanonische SECIS-Elemente identifizieren. Demnach müsste es sich bei den übrigen Treffern um inaktive Gene handeln, da das Sec-kodierende UGA-Triplet in seiner Funktion als Stop-Codon aufgrund des fehlenden, Sec-rekodierenden SECIS-



Elementes einen vorzeitigen Abbruch der Translation vermitteln würde. Es konnte gezeigt werden, dass SecCys-Mutationen des Gpx4-Enzyms in deutlich reduzierten katalytischen Aktivitäten der Cys-Mutanten münden (3) (142). Die weitreichende Verbreitung der Cystein-Variante in irdischen Lebensformen wirft daher nach wie vor Fragen auf. In *Volvox carteri f. nagariensis*, *C. reinhardtii* und *Artibeus jamaicensis* konnten sowohl Sec- als Cys-haltige Gpx4-ähnliche Sequenzen beobachtet werden. Diese Koexistenz von Sec- und Cys-Sequenzen erlaubt Spekulationen über mögliche Subspezialisierungen oder differenzielle zeitliche oder räumliche Expressionsmuster.

#### *Viren*

Alle drei in der Literatur bereits bekannten Gpx4-ähnlichen Sequenzen fanden sich in Viren aus der Familie der *Poxviridae*. Während MCV zur Gattung der Molluscipoxviren zählt, zählen FPV und CPV zur Gattung der Avipoxviren. Shisler et al. (1998, (7)) beschrieben das MCO66L Protein in MCV Subtyp 1 übereinstimmend als zur hGPX1 homologes Selenoprotein mit einem SECIS-Element in der 3'UTR der viralen mRNA. Mix et al. (2007, (8)) charakterisierten die in FPV gefundene Gpx als ein zur humanen GPX4 homologes Selenoprotein mit einem SECIS-Element downstream des Sec-kodierenden UGA-Codons. Auch innerhalb der gefundenen CysGpx von CPV wiesen sie ein fossiles SECIS-Element innerhalb der kodierenden mRNA nach und beschrieben dieses Protein als Gpx4-homolog. Es wird angenommen, dass alle drei viralen Gpx-Sequenzen Folge eines horizontalen Gentransfers ausgehend von Wirtszellen mit SecGpxen sind (143). Guillin et al. (2019, (143)) mutmaßten, dass es in CPV erst nach Erwerb des Sec-Gpx-Gens zu einer SecCys-Mutation gekommen ist. Was für ein evolutionärer Vorteil eine solche SecCys-Mutation dem Virus bieten würde, bleibt offen. Ob das SECIS-Element von CPV eine Recodierung des Cys in ein Sec erlaubt, ist bislang nicht bekannt. Auch inwieweit die CysGpx4 von CPV andere Reduktionsäquivalente für einen effizienten Katalysemechanismus nutzt, ist nicht geklärt. Für die beiden vogelpathogenen Gpx4-Homologe in FPV und CPV wäre auch ein Genaustausch im Rahmen einer Koinfektion denkbar, über den das Gpx-Gen erworben wurde, sofern es in CPV erst nach dem Erwerb des Gpx-Gens zu einer SecCys-Mutation gekommen ist. Virale Genome können etwa 3,5 bis 250 Kilobasen umfassen. Um eine größtmögliche Informationsausbeute aus der zum Teil vergleichsweise geringen Menge an Nukleinsäure zu erhalten, nutzen Viren u.a. mehrere Initiations-, Start- und Stop-Codons pro Leserahmen, ribosomales Frameshift, überlappende Leseraster, mRNA-Splicing, Transaktivierung von Wirtszellgenen und transkribieren beide Stränge eines doppelsträngigen Genoms (144). In der Vergangenheit konnten verschiedene Arbeitsgruppen SecGpx-Homologe oder Abschnitte dieser in offenen Leserahmen insbesondere auch von humanpathogenen Viren wie HIV, HCV, CVB und

dem Masernvirus identifizieren (9) (10) (11) (12). Die einfache Suche nach Gpx4-ähnlichen Sequenzen anhand der hGPX4 Isoform A lieferte dagegen keine Treffer in diesen Viren. Dies suggeriert, dass eine differenziertere Suche in Viren unter Berücksichtigung beispielsweise mehrerer Start- und Stop-Codons pro Leserahmen oder überlappender Leserastern auch weitere potentielle Gpx-Homologe in viralen Genomen identifizieren könnte.

### *Limitationen*

Vermutlich existieren mehrere Zehnmillionen Arten auf der Erde, von denen ca. 1,8 Millionen bekannt sind (37). Die Datenbankrecherche lieferte wahrscheinlich nur einen Bruchteil aller Gpx4-ähnlichen Sequenzen in den untersuchten Domänen und Lebensreichen. Auch ist es möglich, dass bei Einschluss insbesondere kürzerer Sequenzen und Treffer wie unter anderem „glutathione peroxidase-like“ sowie aufgrund der stetig zunehmenden Anzahl klassifizierter Organismen die Trefferanzahl erheblich zunimmt. Im Übrigen ist davon auszugehen, dass die RefSeq-Sammlung nur einen kleineren Anteil an vollständig sequenzierten Genomen beinhaltet. Insofern spiegelt die Recherche nur einen aktuellen Stand der Datenbank wieder, sodass auch hier eine deutliche Korrektur der angegebenen Auftretenshäufigkeiten z.B. für Säugetiere durchaus denkbar ist.

### 4.1.2 Phylogenetische Untersuchungen zur Gpx4

Tatsächlich wird angenommen, dass alles irdische Leben monophyletischen Ursprunges ist. Aus einem letzten gemeinsamen Vorfahren (LUCA), der vor etwa 3,5 Mrd. Jahren lebte, entwickelten sich zunächst die Bakterien (LBCA) von denen sich dann die *Archaea* (LACA) abspalteten. Von diesen spalteten sich schließlich die Eukaryonten (LECA) ab. Damit sind Eukaryonten evolutionär enger mit *Archaea* verwandt als mit Bakterien (37).

In phylogenetischen Untersuchungen mit verschiedenen, ausgewählten Gpx4-ähnlichen Sequenzen fanden sich engere verwandtschaftliche Beziehungen bakterieller, archaeaischer, fungaler und pflanzlicher Sequenzen einerseits und dem Großteil tierischer Gpx4-(ähnlicher)-Sequenzen andererseits. Auch vorangehende Untersuchungen an Sequenzen der gesamten Gpx-Familie aus unterschiedlichen Lebensreichen und Domänen lieferten ähnlichen Zusammenfassungen (39). Das vereinzelte Vorkommen Gpx4-ähnlicher Sequenzen in Viren insbesondere, aber auch in anderen niederen Lebewesen und deren zufällige erscheinende Einordnung in die phylogenetische Rekonstruktion deuten auf horizontale Gentransferprozesse hin. Wann im Rahmen der Evolution des irdischen Lebens Gpx-ähnliche Sequenzen erstmals entstanden sind und wie sie sich seitdem verbreitet haben, sind Fragen, die bei der bisherigen

Datenlage nicht sicher beantwortet werden können. Möglich ist ein gemeinsames *Gpx*-Urgen, welches für eine Cys-enthaltende Gpx kodierte. Aus diesem Urgen könnten sich die derzeit existierenden Isoformen abgeleitet haben. Ob dieses *Gpx*-Urgen eine katalytisch aktive Gpx4 war, ist nicht abschließend zu belegen. Die Fragen, wann dieses *Gpx*-Urgen in der Evolution des Lebens erstmals auftrat und wann die Umstellung der Cys-enthaltenden Isoformen auf Sec-enthaltende Isoformen erfolgte, bleiben ebenfalls offen. Dies liegt vor allem daran, dass das Vorkommen von Gpx-Sequenzen in niederen Organismen nicht sicher Bestandteil einer systematischen Enzymentwicklung ist, sondern auch auf horizontale Gentransferprozesse zurückgeführt werden könnte.

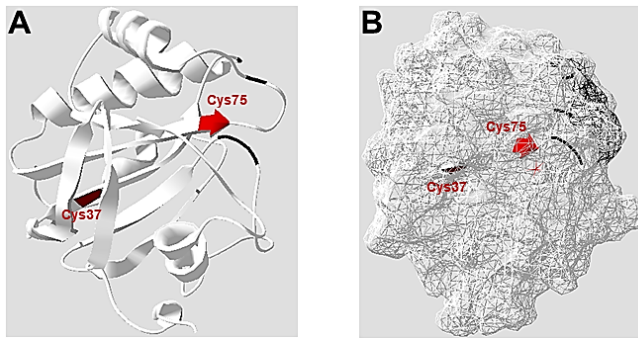
## 4.2 Expression der zfGpx4-Isoformen im prokaryontischen System

### 4.2.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter zfGpx4-Isoformen

Der Zebrafisch besitzt 38 bekannte Selenoproteine, zu denen auch das Gpx4-Paralog zählt (6). Sec als 21. proteinogene Aminosäure wird durch das Codon UGA kodiert. Damit das eigentliche Stop-Codon UGA im Rahmen der Translation in ein Sec umgesetzt wird, bedarf es *in vivo* einer komplexen Rekodierungsmaschinerie (1). Da diese Rekodierungsmechanismen in den meisten Überexpressionssystemen nicht adäquat funktionieren, gestaltet sich die rekombinante Expression von Selenoproteinen schwierig (80). Borchert et al. (2018, (3)) optimierten ein von Müller et al. (1994, (92)) publiziertes Verfahren zur Expression von Selenoproteinen in prokaryontischen Systemen und konnten auf diese Weise erfolgreich die humane GPX4 in mg-Mengen als rekombinantes His-Tag-Fusionsprotein exprimieren. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass exprimierte Cys-Mutanten einer Sec-tragenden Gpx4 mit SecCys-Substitutionen am aktiven Zentrum demgegenüber deutlich geringere katalytische Aktivitäten aufweisen (3) (80) (142).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Expression, Aufreinigung und enzymatische Charakterisierung der Sec-enthaltenden Gpx4-Isoformen des Zebrafisches. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die zfGpx4a Isoform 2 und die zfGpx4b bekannt, sodass sich alle experimentellen Versuche und Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit auf diese beiden Isoformen beschränken. Zur Expression der Sec-Enzyme wurde die von Borchert et al. (2018, (3)) etablierte und für die Expression der humanen SecGPX4 optimierte Methode genutzt. Entsprechend wurden Expressionsplasmide der WT-Enzyme mit SecCys-Mutation am aktiven Zentrum und CysAla-Mutationen aller weiteren Cys hergestellt. CysAla-Mutationen waren nur an der cDNA der zfGpx4b nötig, die drei Cys-Reste (Cys23, Cys58, Cys96) aufweist. Die WT-zfGpx4a Isoform 2 und die WT-zfGpx4b konnten

in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen sowohl in gesamter Länge als auch um eine N-terminale Sequenz von 16 bzw. 21 Aminosäuren verkürzt exprimiert werden. Eine Aufreinigung mit Elution von Protein war allerdings nur für die N-terminal verkürzten (trunkierten) WT-Proteine als Cys- und Sec-Varianten erfolgreich. Die nicht-trunkierten WT-Proteine waren im Lysatüberstand nicht nachweisbar. Stattdessen fanden sie sich zu > 95 % in Form unlöslicher Proteinaggregate im Lysatpellet wieder. Demgegenüber konnte Protein der N-terminal verkürzten zfGpx4-Isoformen im Lysatüberstand nachgewiesen werden. Diese löslichen Proteine wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose angereichert und gereinigt. Zwar zeigten sich auch hier im Pellet der bakteriellen Lysate deutliche Gpx4-Signale, aber die Menge des löslichen Proteinanteils war ausreichend, um mg-Mengen der rekombinanten Proteine präparieren zu können. In nachfolgenden Versuchen konnten neun verschiedene Mutanten der N-terminal verkürzten zfGpx4b ebenfalls erfolgreich als Selenoproteine exprimiert und gereinigt werden.



**Abb. 53: Cys-Reste der trunkierten WT-zfGpx4b (SecCys-Mutante).** Eine Modellierung des nicht-trunkierten WT-Enzyms war nicht möglich. Cys37 und Cys75 entsprechen Cys58 bzw. Cys96 des nicht-trunkierten WT-Enzyms. Cys-Reste sind rot markiert, die katalytische Tetrade ist schwarz markiert. (A) Ribbonmodell. (B) Oberflächendarstellung.

Essentiell für die gewählte Sec-Expressionsstrategie in Cys-auxotrophen *E. coli* BL21(DE3)*selB::kan cys51E* Zellen sind neben den SecCys-Mutationen am aktiven Zentrum Mutationen aller weiteren Cys-Reste (CysAla-Mutationen). Diese CysAla-Mutationen gewährleisten einen selektiven Sec-Einbau am aktiven Zentrum der Enzyme. Damit stellt auch die exprimierte Sec-WT-zfGpx4b mit CysAla-Mutationen aller drei Cys-Reste

(Cys23, Cys58, Cys96) im eigentlichen Sinne eine Mutante des WT-Enzyms dar (Abb. 53, A und B). Für die zfGpx4a Isoform 2 war dies nicht nötig, da diese keine Cys innerhalb ihrer Primärstruktur aufweist. Insofern bleibt offen, welche Effekte diese CysAla-Mutationen an der zfGpx4b auf die Proteinexpression und im Weiteren auf die proteinchemischen Eigenschaften der Sec- und Cys-WT-zfGpx4b und deren Mutanten haben. Die Expression einer Gpx4 ohne bzw. mit Cys-Resten erscheint bemerkenswert. Ursini et al. (1999, (49)) konnten zeigen, dass etwa 50 % der mitochondrialen Kapsel von Spermien aus katalytisch inaktiven Gpx4-Aggregaten besteht. Es wird vermutet, dass die Bildung solcher Gpx4-Aggregate u.a. auf die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Gpx4-Proteinen und Thiolgruppen anderer Proteine zurückzuführen ist (48) (49). Eine Cys-freie Gpx4 wie die zfGpx4a Isoform 2 dürfte demzufolge keine

Proteinaggregate bilden, während dies für die Cys-haltige zfGpx4b zu erwarten wäre. Tatsächlich produzieren auch männliche Zebrafische Spermien. Diese werden vor der weiblichen Eiablage in Form von Spermenspuren (sperm trails) in das Wasser abgesetzt. Dabei können die Spermien diese Spermenspuren aus adhäsiven Substanzen auch verlassen (145). Daten zur Expression der Gpx4-Paralogen in Spermien der Zebrafische fehlen bislang. Ob und inwieweit möglicherweise eine der beiden zfGpx4-Isoformen aufgrund ihrer vermeintlich ausgeprägteren Aggregationseigenschaften in Zebrafischspermien in höherem Maße exprimiert wird, bleibt spekulativ.

Das Vorkommen rekombinanter Proteine im Pellet der Zellysate, wie bei der Aufreinigung des exprimierten Proteins zu beobachten war, ist ein weitverbreitetes Phänomen und Ergebnis einer Proteinaggregation. In der Tat kommt es in vielen pro- und eukaryontischen Überexpressionssystemen zur Bildung von Inclusion bodies, die vorwiegend aus aggregierten rekombinanten Proteinen bestehen (146). Inclusion bodies sind überwiegend im Zytosol lokalisiert. Sollte das rekombinante Protein eine Exportsequenz enthalten, können sich auch im Periplasma solche Inclusion bodies bilden. Begünstigt werden entsprechende Proteinaggregationen durch die fehlende Interaktion mit Faltungsmotoren (138). Werden rekombinante Proteine in großer Menge gebildet, reichen die zellulären Faltungskatalysatoren nicht aus, um jedes translatierte Enzymmolekül in seine richtige Struktur zu zwingen. Möglicherweise hat auch die in der Literatur für die Gpx4 beschriebene Tendenz zur Ausbildung von Proteinpolymeren unter oxidierenden Bedingungen Einfluss auf die Proteinaggregation (48) (49) (61). Um ausreichende Mengen an rekombinanten zfGpx4-Isoformen präparieren zu können, sollte ausgeschlossen werden, dass die rekombinanten Proteine in das Periplasma exportiert werden, wo keine Faltungskatalysatoren vorhanden sind. Daher wurde nach möglichen Exportsequenzen in den N-terminalen Regionen der zfGpx4-Isoformen gesucht. In der Primärstruktur beider WT-zfGpx4-Isoformen fielen kurze N-terminale Peptidsequenzen auf, die Charakteristika von Sortierungssignalen aufwiesen. An diese Sequenzen schloss sich ein zweiter Met-Rest unmittelbar an. In Analogie zur m-Gpx4 von Mensch und Ratte erhärtete dies die Vermutung einer möglichen N-terminalen Sortierungssequenz. Sollte es sich bei den N-terminalen Peptidsequenzen der zfGpx4-Isoformen um Sortierungssignale handeln, könnte eine N-terminale Trunkation der zfGpx4-cDNAs eine effizientere Expression der rekombinanten Proteine erlauben. Tatsächlich ließen sich nach der N-terminalen Trunkation ausreichende Mengen an löslichem und katalytisch aktivem zfGpx4-Protein beider Isoformen präparieren. Trotzdem traten auch in diesem System ca. 50 % der rekombinant exprimierten Enzyme in Inclusion bodies auf. Insofern scheint

die beobachtete Proteinaggregation mehrere Ursachen zu haben. Zur Expression und Elution der WT-zfGpx4-Isoformen in gesamter Länge wären Modifikationen des Expressionsprozesses aber auch der Aufreinigung denkbar (147). Hierzu kämen beispielsweise die Wahl eines alternativen Vektors ohne N-terminales His-Tag, Abwandlungen der Aufreinigungsstrategie unter Einsatz solubilisierender Reagenzien oder Methoden zum Aufschluss der Inclusion bodies und Rückfaltung der Enzyme in natives Protein in Betracht (95). Beobachtungen, die auf eine unzureichende Bindung von Protein an die Ni-NTA-Agarose während der Inkubationsphase schließen lassen, wie das Auftreten entsprechender Proteinbanden im Durchfluss (DF), können Folge unpassender Bindungskondition oder fehlender, abgebauter oder unzugänglicher His-Tags sein (95).

### 4.2.2 Ausbeute und Seleneinbau

Für die Expression von Cys- und Sec-Varianten verschiedener zfGpx4-Isoformen wurden Hauptkulturvolumina von 50 ml bis 250 ml eingesetzt, die Proteinausbeuten von 3,9 mg bis 31,8 mg pro L Flüssigkultur lieferten. Größere Ausbeuten konnten bei gleichen Hauptkulturvolumina für die zfGpx4a Isoform 2 und die zfGpx4b-Mutanten Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn erzielt werden. Der Seleneinbau in die Sec-zfGpx4-Isoformen variierte zwischen 23,0 % und 64,8 %. Demgegenüber konnten Müller et al. (1994, (92)) einen Seleneinbau von 73,0 % bis 80,0 % erzielen. Borchert et al. (2018, (3)) erreichten für die Sec-hGPX4 einen durchschnittlichen Seleneinbau von 50,0 %.

Varianzen hinsichtlich Ausbeute und Seleneinbau sind wahrscheinlich bedingt durch methodische Faktoren, aber auch Folge der Interaktionen von Expressionssystem mit dem jeweiligen Protein. Vermutlich könnte eine Optimierung des Aufreinigungsprozesses beispielsweise durch Einsatz solubilisierender Reagenzien die Proteinausbeute erhöhen, da auch bei der Aufreinigung der N-terminal verkürzten zfGpx4-Isoformen mutmaßliche Proteinaggregate des interessierenden Proteins mit der Pelletfraktion für die weitere Aufreinigung verloren gegangen sind.

## 4.3 Biologische Relevanz der Gpx4-Isoformen im Zebrafisch

Das Gen der humanen *GPX4* kodiert für vier verschiedene hGPX4-Isoformen (A-D) mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen (57) (66). Diese Eigenschaft wird in der Literatur auch als „coding multiplicity“ beschrieben. Der Zebrafisch zählt zur übergeordneten Gruppe der

Knochenfische, deren gemeinsamer Vorfahr eine Duplikation seines gesamten Genoms erlebte (73). Duplizierte Gene können im Rahmen der Evolution wieder selektiert werden, Subspezialisierungen oder ganz neue Aufgaben übernehmen (68). Im Zebrafischgenom gibt es orthologe Gene für die folgenden humanen *GPX* Gene: *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX7*, *GPX8*. Zudem wird im Zebrafisch eine *Gpx9* beschrieben. Nur für die *zfgpx1* und die *zfgpx4* lassen sich zwei paraloge Gene nachweisen, die als Resultat der Genomduplikation die weitere Evolution des Zebrafisches überlebt haben. Aus diesen paralogenen Genen werden je zwei unterschiedliche *Gpx1*- bzw. *Gpx4*-Isoformen (*Gpx1a* und *Gpx1b* bzw. *Gpx4a* und *Gpx4b*) gebildet. Die paralogenen Enzyme dieser beiden *Gpx*-Isoformen (*Gpx1a* vs. *Gpx1b* und *Gpx4a* vs. *Gpx4b*) stimmen dabei hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz zu ca. 70-76 % überein. Für die Gene der anderen *zfGpx*-Isoformen (*zfgpx2*, *zfgpx3*, *zfgpx7*, *zfgpx8*, *zfgpx9*) scheinen die bei der Genomduplikation notwendigerweise entstandenen paralogenen Gene im weiteren Verlauf der Zebrafischevolution wieder eliminiert worden zu sein. Dies deutet darauf hin, dass auf den beiden paralogenen Genen der *zfGpx1* und der *zfGpx4* ein stärkerer Evolutionsdruck lastet als auf den Genen der anderen *Gpx*-Isoformen im Zebrafisch.

Bislang ist nur wenig zu den biologischen Funktionen der beiden *Gpx4*-Isoformen im Zebrafisch bekannt, obgleich Versuche zur Embryonalentwicklung des Zebrafisches eine wichtige Rolle der Enzyme vermuten lassen. Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten ein differenzielles Expressionsmuster der beiden *Gpx4*-Paralogen während der Embryonalentwicklung des Zebrafisches (74) (75). Dabei ließ sich die *zfgpx4a* innerhalb der ersten 24 Stunden nach Fertilisation in der *yolk syncytial layer* nachweisen, wohingegen die *zfgpx4b* im Blastoderm vorkam. Im Verlauf der ersten 24 Stunden nach Fertilisation wurde diese Isoform zunehmend im Myotom (Urmuskelsegment) nachgewiesen (75). Am fünften Tag nach Fertilisation konnten beide Isoformen im Darm und in der Leber, die *zfGpx4b* auch im Auge und im Gehirn beobachtet werden (74). Mendieta-Serrano et al. (2015, (75)) beschrieben zudem eine nukleäre Translokation der ursprünglich vorwiegend im Zytoplasma vorkommenden *zfGpx4* zwischen dem 128- und 512-Zellstadium. Beim Expressionsknockout der *zfGpx4b* wurde die Embryonalentwicklung in der Gastrulationsphase vorzeitig beendet. Ein Expressionsarrest der *zfGpx4a* führte hingegen erst während der Segmentationsperiode zu einer deutlichen Abnahme des exprimierten Proteins (75). Ein Rückschluss auf die biologische Funktion dieses Enzyms ist daher nicht sicher möglich. Um die biologische Bedeutung der beiden *Gpx4*-Isoformen im Zebrafisch weiter zu ergründen, wurden Untersuchungen zur Expression der *zfGpx4a* Isoform 2 und der *zfGpx4b* im Rahmen der

Zebrafiscentwicklung durchgeführt und die enzymatischen Eigenschaften der beiden Isoformen miteinander verglichen.

#### 4.3.1 Temporäre Expression der zfGpx4-Isoformen während der Zebrafiscentwicklung

Mittels qRT-PCR wurde die Expression des *zfgpx4a*- und des *zfgpx4b*-Gens zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Tag 1, 2, 3, 5, 14, 21, 24 nach Fertilisation) untersucht. Als Referenzgen diente *efl1a*, das für den eukaryontischen Elongationsfaktor EF1 $\alpha$  kodiert und ein relativ hohes Expressionsniveau aufweist (141). Zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten konnten die mRNAs der zfGpx4-Isoformen nachgewiesen werden. Tatsächlich wiesen die zfGpx4-mRNAs beider Isoformen zu jedem Zeitpunkt deutlich höhere Expressionsraten im Vergleich zur EF1 $\alpha$ -mRNA auf. Unterschiede in den Expressionshöhen zwischen den beiden zfGpx4-Isoformen fanden sich an den Tagen 1, 2, 14, 21 und 24 nach Fertilisation mit signifikant höheren Expressionsraten der *zfgpx4a*. Expressionsprofile der mRNA beider Isoformen ähnelten sich über das Beobachtungsintervall.

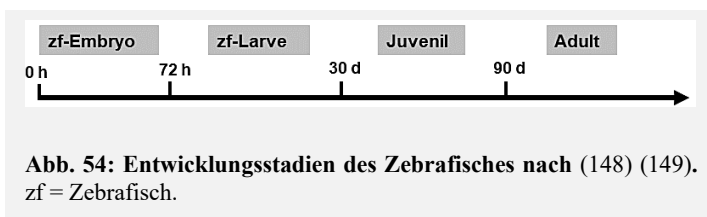


Abb. 54: Entwicklungsstadien des Zebrafisches nach (148) (149). zf = Zebrafisch.

In Übereinstimmung mit vorangehenden Untersuchungen ließen sich Expressionen beider zfGpx4-mRNAs zu verschiedenen

Entwicklungszeitpunkten nachweisen. Damit scheint beiden Isoformen eine gewichtige Rolle im sich entwickelnden Organismus zuzukommen. Dies gilt sowohl für die frühen Entwicklungsstadien (0 bis < 72 h) als auch für das Larvenstadium ( $\geq$  72 h) (Abb. 54). Dies belegen auch die vorgenannten Expressionsknockoutuntersuchungen von Mendieta-Serrano et al. (2015, (75)). Ein selektiver Expressionsknockout des *zfgpx4b*-Gens führte hierbei zu einem Entwicklungsabbruch während der Gastrulation. Früh embryonal konnte die zfGpx4a ausschließlich extraembryonale im yolk syncytial layer beobachtet werden (74) (75). Dabei wurde der Expressionsbeginn des *zfgpx4a*-Gens für das *shield*-Stadium festgelegt, einem Entwicklungsabschnitt der Gastrulation, der ca. 6 h nach der Fertilisation einsetzt (148). Demgegenüber konnte eine Expression des ausschließlich embryonal exprimierten *zfgpx4b*-Gens bereits im 16-32-Zellstadium (1,5-1,75 h nach Fertilisation) nachgewiesen werden (74) (75) (148). Dieses zeitlich genau definierte und räumlich begrenzte Expressionsprofil der beiden zfGpx4-Isoformen in der frühen Embryonalphase lässt eine differentielle, funktionelle Bedeutung der



beiden Isoenzyme vermuten. Bisher konnte jedoch noch nicht zweifelsfrei geklärt werden, welche biologischen Aufgaben den beiden Isoenzyme während der Zebrafischembryogenese zukommen. Ab dem 5. Entwicklungstag nach Fertilisation wird die zfGpx4a auch in der Larve exprimiert (74).

Über die embryonalen und larvalen Entwicklungstage fand sich ein dynamisches Expressionsmuster beider zfGpx4-Isoformen mutmaßlich angepasst an die jeweilige Entwicklungsphase mit spezifischen zellulären Anforderungen. Ein Vergleich der insbesondere während der Embryonalphase beobachteten Expressionsraten der *zfgpx4a* mit der *zfgpx4b* erscheint vor dem Hintergrund einer räumlich klar abgegrenzten Expression schwierig. Eine höhere Expressionsrate der *zfgpx4a* im Larvenstadium könnte auf eine größere Abhängigkeit der Zelle von der zfGpx4a hindeuten.

### 4.3.2 Subzelluläre Lokalisation der zfGpx4-Isoformen

In der Primärstruktur beider zfGpx4-Isoformen fielen N-terminale Sequenzen von 16 Aminosäuren bzw. 21 Aminosäuren auf, die Proteinsortierungssignale vermuten ließen. Einzelanalyse und computergestützte Vorhersagen dieser Peptidsequenzen assoziierten die N-terminale Sequenz der zfGpx4a Isoform 2 mit einem Signalpeptid für Exportproteine, während die N-terminale Sequenz der zfGpx4b als mitochondriales Transitpeptid gewertet wurde. Für experimentelle Untersuchungen wurden diese Sequenzen verwendet, um die Expression und Lokalisation von Reporterkonstrukten (rote bzw. grüne Fluoreszenzproteine) zu beeinflussen. Im Anschluss wurden COS7-Zellen mit diesen Reportergenkonstrukten transfiziert und die subzelluläre Lokalisation der Translationsprodukte analysiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Experimente erhärtete den Verdacht, dass das zfGpx4b-Protein vorwiegend ins Mitochondrium importiert wird. Die Vermutung, dass es sich bei der zfGpx4a Isoform 2 um ein Sekretionsprotein handelt, konnte durch diese Experimente nicht bewiesen werden. Die flächenhafte Lokalisation des Fluoreszenzsignals deutet eher auf eine zytosolische Lokalisation des Reportergenkonstruktes hin, schließt aber ein Vorkommen im ER und im Golgi nicht explizit aus.

Sollten die beiden zfGpx4-Isoformen tatsächlich in verschiedenen subzellulären Kompartimenten (zfGpx4b im Mitochondrium, zfGpx4a Isoform 2 im Zytosol) zu finden sein, könnte daraus abgeleitet werden, dass diese differentielle subzelluläre Lokalisation eine Ursache für das Überleben der beiden durch die Genomduplikation entstandenen paralogen Enzymvarianten darstellt. Bei Mensch und Maus, bei denen keine Genomduplikationen im Rahmen der

Phylogenese auftrat, kodiert das *GPX4*- bzw. *Gpx4*-Gen für vier bzw. drei verschiedene Gpx4-Isoformen (zytosolisch, mitochondrial, nukleär). Hier sorgen alternative Transkriptionsinitiationsorte und alternative Splicemechanismen für die Kodierungsvielfalt des humanen Gens. Im Gegensatz dazu scheinen beim Zebrafisch zwei unterschiedliche Gene, die im Rahmen der Genomduplikation der frühen Kochenfische entstanden sind, für zytosolische und mitochondriale Gpx4-Isoformen zu kodieren. Damit würde das Konzept der Kodierungsvielfalt der humanen und murinen *GPX4*- bzw. *Gpx4*-Gene durch eine genomische Vielfalt der Zebrafischgene ersetzt werden.

Die Diskrepanzen zwischen Vorhersagen und Experiment im Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisation der zfGpx4a Isoform 2 könnte einerseits Folge einer fehlerhaften Vorhersage bezüglich der Funktionalität des Signalpeptids, andererseits aber auch Folge einer Fehlinterpretation der erhaltenen Fluoreszenzsignale sein. So ist es eher schwierig, mit Hilfe einfacher Fluoreszenzmikroskopie die subzelluläre Lokalisation eines Proteins im Zytosol, im ER und im Golgi sicher voneinander abzugrenzen. Dazu wären elektronenmikroskopische Aufnahmen besser geeignet. Außerdem könnte das veränderte Molekulargewicht der Reporterproteine die intrazelluläre Verteilung beeinflussen. Vektorspezifische Eigenschaften, Überexpression oder Autofluoreszenz können ebenfalls die subzelluläre Lokalisation beeinträchtigen (150). Obwohl die vorliegenden Beobachtungen eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden zfGpx4-Isoformen nahelegen, werden erst weiterführende Untersuchungen diese Frage abschließend beantworten können. Darüber hinaus scheint die subzelluläre Lokalisation der beiden zfGpx4-Isoformen im Rahmen der Embryogenese veränderlich (75).

### 4.3.3 Enzymatische Charakterisierung der WT-zfGpx4-Isoformen

Da es bislang nicht möglich war die zfGpx4-Isoformen aus nativen oder rekombinanten Quellen zu präparieren, konnten die enzymatischen Eigenschaften der Proteine (Temperaturverhalten, pH-Profile, Substratspezifitäten) nicht untersucht werden. So wurde bisher auch noch nicht geprüft, inwieweit die entsprechenden WT-zfGpx4-Isoformen überhaupt katalytisch aktiv sind. Dies ist vor allem auch deshalb von großer Bedeutung, weil das UGA Stop-Codon, das für den Sec-Einbau kodiert, zu artifiziellen Translationsprodukten führen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die untersuchten WT-Sec-zfGpx4-Isoformen katalytisch aktiv sind und unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Die WT-Cys-zfGpx4-Isoformen

(SecCys-Mutation am aktiven Zentrum) zeigten deutlich reduzierte katalytische Aktivitäten. Übereinstimmend hatten vorangehende Arbeiten gezeigt, dass SecCys-Mutationen am aktiven Zentrum die katalytische Aktivität der Enzyme um mehrere Größenordnungen reduzierten (3) (80) (142). Tatsächlich fanden Borchert et al. (2018, (3)) bei Messungen bei 37 °C und gleichen Enzymkonzentrationen für die humane Cys-GPX4-Variante Restaktivitäten < 0,1 %.

### *Temperaturabhängigkeiten der Sec-zfGpx4-Isoformen*

Nachfolgende Untersuchungen über Temperaturbereiche von 2 °C bis 45 °C belegten eine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Sec-zfGpx4-Isoformen von der Temperatur. Beide Isoformen wiesen ähnliche, glockenförmige Temperaturprofile auf, wobei Isoform-spezifische Temperaturoptimum von 16 °C bzw. 20 °C bestimmt wurden. Der Abfall der katalytischen Aktivitäten weit jenseits der Temperaturoptima ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die einsetzende Hitzedenaturierung der Proteine zurückzuführen (139). Im Temperaturbereich zwischen 2 °C und 30 °C waren die spezifischen Aktivitäten der zfGpx4b durchgehend höher als die der zfGpx4a Isoform 2. Dieses Verhalten kehrte sich bei Temperaturen von > 30 °C um. Bei 35 °C wies die zfGpx4a Isoform 2 höhere Restaktivitäten als die zfGpx4b auf. Damit scheint die zfGpx4b sensitiver gegenüber Temperaturänderungen. Als wechselwarmer Organismus passt der Zebrafisch seine Körpertemperatur der Umgebungstemperatur an. Feldstudien fanden Zebrafische bei Wassertemperaturen von 6 °C bis 39 °C und bei pH-Werten zwischen 5,9 und 9,8 (69) (70) (71) (72). Beide zfGpx4-Isoformen scheinen damit über das gesamte Temperaturspektrum, dem der Zebrafisch in der Natur ausgesetzt ist, ihre katalytische Aktivität aufrecht erhalten zu können. Borchert et al. (2018, (3)) untersuchten das Temperaturprofil der humanen zytosolischen GPX4. Sie beobachteten eine Zunahme der katalytischen Aktivität im Temperaturbereich von 10 °C bis 35 °C und ein  $T_{opt}$  zwischen 35-40 °C. Oberhalb von 45 °C fanden sie Restaktivitäten  $\leq$  10 %. Der Mensch als gleichwarmer Organismus hält eine reguläre Körperkerntemperatur von 36,5 °C bis 37,0 °C aufrecht (151). Insofern verwundert das unterschiedliche Temperaturprofil der Gpx4-Aktivitäten von Zebrafisch und Mensch mit unterschiedlichen Temperaturoptima nicht. Vielmehr scheint das Temperaturverhalten der Enzyme auf die natürlichen Lebensbedingungen und Thermoregulationsprinzipien angepasst zu sein. Auch Aktivierungsenergien der Gpx4 von Zebrafisch und Mensch unterscheiden sich. Für die humane GPX4 konnte eine Aktivierungsenergie von 68,4 kJ·mol<sup>-1</sup> bestimmt werden (3). Die zfGpx4-Isoformen wiesen deutlich geringere Aktivierungsenergien auf. Die Energie, die zur Erreichung des katalytischen Übergangszustandes notwendig ist, scheint bei der humanen Gpx4 deutlich höher zu liegen als bei den Zebrafisch-Isoformen.

Zu beachten bleibt, dass die bestimmten Temperaturprofile und -optima der verschiedenen Präparationschargen beider WT-Sec-zfGpx4-Isoformen im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmen. Methodische Fehler wie Temperaturinkonstanz in Folge systematischer Fehler der Thermoeinheit oder unzureichender Vortemperierungen der Proben sind möglich. Andere Reaktionsparameter wie der pH-Wert, die Konzentrationen von Substrat und Cosubstraten beeinflussen ebenfalls die Lage des Temperaturoptimums (139). Diese Einflüsse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht.

### *pH-Abhängigkeiten der Sec-zfGpx4-Isoformen*

pH-Abhängigkeit der katalytischen Aktivitäten von Enzymen resultieren aus Dissoziations- bzw. Ionisationseigenschaften der funktionellen Gruppen des Proteinmoleküls und dem Dissoziationszustand von Substraten und Cofaktoren (139). Die pH-Profile der beiden Sec-zfGpx4-Isoformen wurden in Anlehnung an die Temperaturoptima bei 15,0 °C aufgenommen. Hierbei konnten für beide Isoformen glockenförmige pH-Profile mit ähnlichem Verlauf und pH-Optima von pH 8,4 und pH 8,9 beobachtet werden. In pH-Bereichen  $\leq 6$  wiesen beide Enzyme nur noch marginale Aktivitäten auf. Jenseits des isoform-spezifischen pH-Optimums war die zfGpx4a ab pH  $\geq 8,8$  katalytisch aktiver im Vergleich zur zfGpx4b.

Für die native Gpx4 aus Schweineherzen und die rekombinante Sec-enthaltende humane GPX4 finden sich in der Literatur pH-Optima von 8,2 bzw. 8,0 (3) (142). Die pH-Optima der zfGpx4-Isoformen sind damit vergleichsweise in basischere Bereiche verschoben. Wahrscheinlich sind auch pH-Profile evolutionär auf die entsprechenden physiologischen Bedingungen zugeschnitten, denen die verschiedenen Gpx4-Isoformen *in vivo* begegnen. Unabhängige Versuche aus der Embryonalentwicklung des Zebrafisches belegen ein paralleles, differenzielles und räumlich begrenztes, aber auch dynamisches Expressionsmuster der jeweiligen Gpx4-Isoform, in dessen Verlauf es passager zu einer nukleären Translokation der zfGpx4b kommt (74) (75). Vorliegende Untersuchungen lassen eine mitochondriale Lokalisation der zfGpx4b im adulten Zebrafisch vermuten. Ein dynamisches Expressionsmuster über verschiedene Zellkompartimente hinweg, wie für die Embryonalentwicklung beschrieben, erfordert ein breites pH-Spektrum, eine mutmaßliche Lokalisation der zfGpx4b in der basischen mitochondrialen Matrix würde dabei ein entsprechendes pH-Optimum im basischen Bereich durchaus passend erscheinen lassen (150). Warum die zfGpx4a Isoform 2 ein pH-Optimum in noch basischeren Bereichen aufweist, bleibt unklar.

### *Substratspezifitäten der Sec-WT-Gpx4-Isoformen*

Enzyme aus der Gpx-Familie katalysieren die Umwandlung von organischen und anorganischen Hydroperoxiden zu den entsprechenden Hydroxiden (17) (18). Herausragende Eigenschaft der Gpx4 ist dabei ihre Fähigkeit komplexe Phospholipid- oder Cholesterolhydroperoxide, auch als Bestandteile von Biomembranen oder Lipoproteinen, umzusetzen (41) (42) (45). Untersuchungen zu Substratspezifitäten der rekombinanten Sec-enthaltenden WT-Gpx4-Isoformen lieferten bei 15 °C ähnliche Spezifitätsprofile mit  $k_{\text{H}_2\text{O}_2} > k_{\text{PC-OOH}} > k_{\text{TBHP}}$ . Die Substratspezifitäten der rekombinanten WT-Sec-zfGpx4-Isoformen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Im Vergleich mit dem humanen Enzym zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede. Bei 37 °C wiesen die zfGpx4-Isoformen verhältnismäßig niedrigere katalytische Aktivitäten mit allen Substraten als bei 15 °C auf. Die hGPX4 war hingegen bei 37 °C aktiver. Bemerkenswerterweise zeigte die zfGpx4a Isoform 2 bei 37 °C eine ausgeprägte katalytische Aktivität mit PC-OOH, während Aktivitäten der zfGpx4b bei dieser Temperatur deutlich reduziert waren. Worauf die unterschiedlichen Substratspezifitäten zurückzuführen sind, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden. In anschließenden Thermal-Shift-Assays konnten für die WT-Gpx4-Isoformen signifikant verschiedene Schmelztemperaturen (WT-zfGpx4a Isoform 2: 61,5 °C; WT-zfGpx4b: 51,4 °C; WT-hGPX4: 56,7 °C) bestimmt werden.

Die beobachteten Substratspezifitäten ( $k_{\text{H}_2\text{O}_2} > k_{\text{PC-OOH}} > k_{\text{TBHP}}$ ) der rekombinanten Sec-enthaltenden WT-Gpx4-Isoformen (zfGpx4a Isoform 2, zfGpx4b, hGPX4) bei 15 °C und der hGPX4 bei 37 °C stimmen mit vorangegangenen Untersuchungen zur Substratspezifität von nativen Gpx4-Isoformen überein (3) (153) (154). Ein Vergleich experimentell ermittelter Substratspezifitäten mit entsprechenden Literaturwerten ist nur bedingt möglich. Schon geringe Unterschiede in den experimentellen Messsystemen (z.B. Abweichungen der Reaktiostemperatur, des pH-Wertes, An- bzw. Abwesenheit von Lösungsvermittlern, Enzym- und Substratkonzentrationen etc.) können die Substratspezifität und andere enzymatische Eigenschaften verändern. Da sich die vorliegenden Testbedingungen von denen in der Literatur beschriebenen Assays teils deutlich unterscheiden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Aktivitätsunterschiede zwischen den zfGpx4-Isoformen und der hGPX4 sind vermutlich auf die verschiedenen Temperaturprofile und -optima der jeweiligen Enzyme zurückzuführen. Die zfGpx4b verliert bei höheren Temperaturen (37 °C) ihre Fähigkeit komplexe Lipidhydroperoxide zu reduzieren, während die zfGpx4a Isoform 2 diese Fähigkeit aufrechterhält. Dieser Effekt ist nicht auf eine stärkere Enzymdenaturierung der zfGpx4b zurückzuführen, da die Messungen zur Thermostabilität zeigen, dass beide zfGpx4-Isoformen Schmelztemperaturen weit jenseits von

37 °C aufweisen. Mechanistisch könnten daher Interaktionen zwischen dem PC-OOH und der jeweiligen Enzymisoform, die für einen effizienten Katalysemechanismus nötig sind, in Folge der Temperatur beeinflusst werden. Wahrscheinlich werden diese Interaktionen durch die Primärstruktur der jeweiligen zfGpx4-Isoform vorgegeben, die zwar zu etwa 70 % übereinstimmen, sich aber auch zu 30 % unterscheiden. *In vivo* findet sich nur die zfGpx4a während der Embryonalentwicklung extraembryonal im yolk syncytial layer. Fraher et al. (2016, (155)) konnten zeigen, dass die Zellen des Dottersackes einen aktiven Lipidstoffwechsel betreiben, der im yolk syncytial layer fortgeführt wird. Dabei weist der Dotter auch einen hohen Phospholipidanteil auf (155). Ob hier der zfGpx4a eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Lipidperoxidationen zukommt, möglicherweise auch unter suboptimalen Temperaturbedingungen in Abhängigkeit von der Eiablage, bleibt spekulativ. Auch Disulfidbrücken können die Stabilität eines Proteins beeinflussen (156). Da die Cys-Reste in der Raumstruktur der zfGpx4b relativ weit entfernt liegen, ist fraglich, inwieweit diese intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden würden, die die Schmelztemperatur der WT-zfGpx4b beeinflussen würden.

### 4.4 Mutagenesestudien an zfGpx4-Isoformen

Die Funktionsunterschiede zwischen den beiden zfGpx4-Isoformen gaben Anlass mit Hilfe von Mutageneseuntersuchungen nach möglichen molekularen Ursachen zu suchen. Bei Aminosäurealignments konnten neun Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur der zfGpx4b identifiziert werden, die im Vergleich zur zytosolischen Gpx4 von Mensch und Maus und der zfGpx4a Isoform 2 unterschiedlich waren. So wurden neun Punktmutanten der Sec-zfGpx4b hergestellt, bei denen die jeweilige Aminosäure der zfGpx4b in die Aminosäure der zfGpx4a Isoform 2 an gleicher Stelle mutiert wurde. Die Sec-zfGpx4b-Mutanten waren alle sowohl bei 15 °C als auch bei 37 °C katalytisch aktiv. Ähnlich wie die Wiltypenzyme wiesen alle zfGpx4b-Mutanten bei 15 °C eine höhere katalytische Aktivitäten als bei 37 °C auf. Bei 15 °C ließen sich ähnliche Aktivitätsmuster (Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala) oder Steigerungen der katalytischen Aktivität für ein oder beide Substrate gegenüber der WT-Aktivität beider zfGpx4-Isoformen (Ala58Gln, Glu86Asn, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly, Asp157Gln) beobachten. Bei 37 °C wiesen einige Mutanten höhere katalytische Aktivitäten im Vergleich zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivität beider WT-zfGpx4 Isoformen und der PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4b auf. Keine Mutante wies höhere spezifische katalytische Aktivitäten für das PC-OOH im Vergleich zur zfGpx4a Isoform 2 auf. Nicht signifikant unterschieden sich die PC-OOH-Aktivitäten der zfGpx4a Isoform 2 und der zfGpx4b-Mutante Gly72Ala. Quotientenvergleiche deuteten bei 15 °C auf eine ausgeprägtere PC-

OOH-Aktivitätssteigerungen bei Mutation von Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly, Asp157Gln und auf eine allgemeine Aktivitätssteigerungen bei Mutation von Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn hin. Bei Untersuchungen zur Thermostabilität wiesen die zfGpx4b-Mutanten höhere bzw. niedrigere Schmelztemperaturen im Vergleich zur WT-zfGpx4b (Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala, Glu86Asn bzw. Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly, Asp157Gln) auf. Keine zfGpx4b-Mutante wies eine Schmelztemperatur in Größenordnungen der WT-zfGpx4a Isoform 2.

In der Aminosäureabfolge ist die spätere räumliche Anordnung eines Proteins determiniert, die dessen biologisch Funktion garantiert (103). Diese dreidimensionale Struktur ist das Resultat von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und kovalenten Bindungen von Aminosäuren innerhalb des Proteins, aber auch zwischen den Aminosäuren des Proteins und dem jeweiligen Lösungsmittel (157). Die meisten Punktmutationen hatten Auswirkungen auf die katalytische Aktivität, die Substratspezifität und Thermostabilität der Einfachmutanten im Vergleich zu den WT-zfGpx4-Isoformen. Insofern scheinen alle untersuchten Aminosäuren die Eigenschaften der zfGpx4-Paralogen zu prägen.

### *Thermostabilität*

Punktmutationen wie Val61Ala, Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn resultierten in thermisch stabileren zfGpx4b-Mutanten. Aminosäuren wie Valin, Threonin, Isoleucin, Serin, Aspartat, Asparagin und Prolin können in  $\alpha$ -Helices destabilisierend wirken, während Alanin, Methionin, Glutamat und Leucin Helices stabilisieren (103) (157). Darüber hinaus identifizierten Miotto et al. (2019, (158)) in Coulomb- und van-der-Waals-Netzwerken verschiedene thermostabile Aminosäuren darunter Arginin, Aspartat, Glutamat, Lysin, Leucin, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. Die in  $\alpha$ -Helices lokalisierten Mutationen Val61Ala und Thr62Lys könnten die native Proteinstruktur stabilisieren und damit möglicherweise auch die thermische Stabilität des Proteins erhöhen. Gly kommt im Vergleich zum Ala seltener in  $\beta$ -Faltblättern vor (103). Eine Substitution der polaren, geladenen Aminosäure Glu durch das polar, ungeladene Asn fällt aus dieser Theorie heraus, scheint aber in Folge mutmaßlich intramolekularer Wechselwirkungen in einem thermisch stabileren Enzym zu resultieren. Im Umkehrschluss könnten die Aminosäuren Ala61, Lys62, Ala72 und Asn86 einen entscheidenden Beitrag zur Thermostabilität der WT-zfGpx4a Isoform 2 leisten. Hitzelabilere Mutanten folgten aus den Punktmutationen Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly und Asp157Gln, die in  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern, aber insbesondere in

coils lokalisiert sind. Coils sind häufig beweglicher und Bestandteil von Regionen, in denen Strukturanpassungen für die Ligandenbindung erfolgen (157). Im Gesamtgefüge scheint damit jede einzelne WT-Aminosäure (Ala58, Leu102, Thr129, Asn133 und Asp157) an der Aufrechterhaltung der beobachteten Thermostabilität der WT-zfGpx4b beteiligt.

### *Substratspezifitäten*

Die zfGpx4b-Mutanten können im Hinblick auf ihre substratspezifischen Aktivitäten in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe umfasst Punktmutationen wie Ala58Glu, Leu102Met, Thr129Phe, Asn133Gly und Asp157Gln. Diese Mutanten zeigen bei 15 °C eine erhöhte PC-OOH-Reduktionskapazität. Bei 37 °C hingegen ist diese katalytische Aktivität vermindert oder nicht signifikant verändert im Vergleich zur WT-zfGpx4b. Eine zweite Gruppe von Enzymmutanten (Thr62Lys, Gly72Ala, Glu86Asn) weist bei 15 °C überwiegend ähnliche Aktivitäten wie die entsprechende Wildtypvariante auf. Bei 37 °C finden sich hingegen höhere PC-OOH-Reduktionsaktivitäten im Vergleich zum Wildtypenzym. Die experimentell ermittelten Schmelztemperaturen lassen eine Denaturierung als Ursache der temperaturabhängigen Substratspezifitäten der zfGpx4b-Mutanten bei 37 °C unwahrscheinlich erscheinen. Auch erlauben die differenziellen Auswirkungen der Einfachmutationen auf die Substratspezifität kaum Spekulationen zu möglichen Interaktionen dieser Aminosäuren mit den Enzymsubstraten. Punktmutationen wie Thr62Lys, Gly72Ala und Glu86Asn ermöglichen scheinbar eine Optimierung der spezifischen zfGpx4b-PC-OOH-Aktivität unter suboptimalen Temperaturbedingungen. Übrige Mutationen wirken sich zwar bei 15 °C positiv aus, haben aber bei 37 °C keine oder negative Effekte auf die spezifische PC-OOH-Aktivität. Eine Substitution der Aminosäuren Ala58, Leu102, Thr129, Asn133 und Asp157 durch zfGpx4a Isoform 2-gleiche Aminosäuren erweist sich für den Erhalt der katalytischen Aktivität der zfGpx4b über ein breites Temperaturspektrum in diesem Sinne als nicht vorteilhaft oder sogar nachteilig. Umso mehr verdeutlicht dies, wie sorgfältig die Evolution die Primärstruktur eines Proteins konstruiert und weiterentwickelt. Für die PC-OOH-Aktivität der zfGpx4a Isoform 2 bei 37 °C könnten insbesondere Lys62, Ala72 und Asn86 mit verantwortlich sein. Es fällt auf, dass zfGpx4b-Mutanten mit kleinerer Schmelztemperatur im Vergleich zur WT-zfGpx4b zumeist erst genannter Gruppe angehören, während zfGpx4b-Mutanten mit höherer Schmelztemperatur der zweiten Gruppe zuzuordnen sind. Ob dies zwei unabhängige Phänomene voneinander sind oder, ob die Thermostabilität tatsächlich die Fähigkeit stabile Bindungen zwischen Enzym und Substrat auf geringeren Temperaturniveaus bereits beeinflusst, bleibt offen. Durch einzelne Punktmutationen ist es nicht gelungen die katalytischen Eigenschaften der beiden zfGpx4-Isoformen einander



anzugleichen. Ein einzelner Aminosäureaustausch ist folglich nicht ausreichend, um dieses Ziel zu erreichen. Offen bleibt, ob eine Kombination von Punktmutationen zielführend wäre.

### 4.5 Perspektivische Betrachtungen

Untersuchungen zur Existenz Gpx4-ähnlicher Sequenzen in der gesamten irdischen Lebewelt und in Viren deuten auf eine Verteilung Cys- bzw. Sec-basierter Gpx4-ähnlicher Sequenzen über verschiedenste Lebensformen und Viren hin. In quantitativer Hinsicht fielen Gpx4-ähnliche Sequenzen allerdings nur in einer Minderheit der untersuchten Sequenzen auf. Weniger eng gefasste Einschlusskriterien für positive Sequenztreffer, vollständigere und umfassendere Datenbanken und eine differenziertere Suchstrategie unter Einbeziehung verschiedener Start- und Stop-Codons in offenen Leserahmen viraler Sequenzen könnten die Trefferanzahl und beobachteten Häufigkeiten deutlich nach oben korrigieren. Detailreichere Studien auch unter Berücksichtigung entsprechender Genomregionen könnten eine Möglichkeit bieten insbesondere Gpx4-negative Säugetiere zu verifizieren bzw. Gpx4-ähnliche Sequenzen in diesen Organismen zu identifizieren. Ebenso könnten phylogenetische Rekonstruktionen mit einer größeren Anzahl an Sequenzen aufschlussreicher ausfallen, wenn auch Fragen zu den Ursprüngen der Gpx4 bzw. der Gpx-Familie und deren zeitlicher Einordnung gerade in Folge möglicher horizontaler Gentransferprozesse auch zukünftig schwierig zu beantworten sein dürften.

Versuche zur zeitlichen, aber auch zellulären Expression sowie zur enzymatischen Charakterisierung des Gpx4-Paralogs aus dem Zebrafische legen eine Subspezialisierung beider Isoformen nahe, zu deren Aufklärung diese Arbeit nur einen kleinen Beitrag leisten konnte. Zukünftig denkbar wären Expressionsanalysen beider zfGpx4-Isoformen im Hinblick sowohl auf zeitliche als auch räumliche Expressionsmuster während der gesamten Zebrafischentwicklung. Weitergehende Untersuchungen zu Substratspezifitäten beider zfGpx4-Isoformen mit verschiedenen anderen komplexen Hydroperoxiden könnten genau wie Enzym-Substrat-Simulationen und eingehendere Strukturuntersuchungen Hinweise liefern, welche Mechanismen den beobachteten drastischen Abfall der spezifischen PC-OOH-Aktivität der WT-zfGpx4b bei 37 °C bedingen. In diesem Zusammenhang könnten Mutagenesestudien an Mehrfachmutanten Aufschluss bieten, da die vorliegenden Mutagenesestudien nahelegen, dass nicht eine Mutation alleine ausschlaggebend ist. Wesentlich beeinflusst werden die Experimente von dem Verfahren zur Sec-Expression der zfGpx4-Isoformen und -Mutanten, dessen Optimierung auch im Hinblick auf die Expression der tatsächlichen WT-Enzyme anzustreben wäre.

## Literaturverzeichnis

1. Brigelius-Flohé R, Petrides PE. Essentielle Spurenelemente. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014:736-744.
2. Koolmann J, Röhm KH. Biochemie des Menschen. 4.Auflage. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
3. Borchert A, Kalms J, Roth SR, Rademacher M, Schmidt A, Holzhutter HG, Kuhn H, Scheerer P. Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018; 1863(9):1095-1107.
4. Kryukov GV, Gladyshev VN. Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. *Genes Cells*. 2000; 5(12):1049-60.
5. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev*. 2014; 94(3):739-77.
6. Mariotti M, Ridge PG, Zhang Y, Lobanov AV, Pringle TH, Guigo R, Hatfield DL, Gladyshev VN. Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33066.
7. Shisler JL, Senkevich TG, Berry MJ, Moss B. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. *Science*. 1998; 279(5347):102-5.
8. Mix H, Lobanov AV, Gladyshev VN. SECIS elements in the coding regions of selenoprotein transcripts are functional in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(2):414-23.
9. Taylor EW, Bhat A, Nadimpalli RG, Zhang W, Kececioglu J. HIV-1 encodes a sequence overlapping env gp41 with highly significant similarity to selenium-dependent glutathione peroxidases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997; 15(5):393-4.
10. Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. *Med Klin (Munich)*. 1999; 94 Suppl 3:2-6.

11. Zhang W, Ramanathan CS, Nadimpalli RG, Bhat AA, Cox AG, Taylor EW. Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses. *Biol Trace Elem Res.* 1999; 70(2):97-116.
12. Zhao L, Cox AG, Ruzicka JA, Bhat AA, Zhang W, Taylor EW. Molecular modeling and in vitro activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(12):6356-61.
13. Zhong H, Taylor EW. Structure and dynamics of a predicted ferredoxin-like selenoprotein in Japanese encephalitis virus. *J Mol Graph Model.* 2004; 23(3):223-31.
14. Wang Y, Huang J, Sun Y, He J, Li W, Liu Z, Taylor EW, Rayman MP, Wan X, Zhang J. SARS-CoV-2 suppresses mRNA expression of selenoproteins associated with ferroptosis, ER stress and DNA synthesis. *BioRxiv*, 2020.
15. Stock T, Rother M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(11):1520-32.
16. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(5):3289-303.
17. Günzler WA, Vergin H, Müller I, Flohé L. Glutathion-Peroxidase, VI. Die Reaktion der Glutathion-Peroxidase mit verschiedenen Hydroperoxiden. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1972; 353(6):1001-4.
18. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305(2):541-5.
19. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(2):154-72.
20. Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 1501-14.
21. Tosatto SCE, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini L, Maiorino M. The Catalytic Site of Glutathione Peroxidases. *Antioxid. Redox Signal.* 2008; 10(9):1515-25.
22. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 1957;229:189–197.
23. SelenoDB Release 2.0. <http://selenodb.crg.eu/>. Eingesehen am 16.12.2020.

24. Castellano S, Gladyshev VN, Guigó R, Berry MJ. SelenoDB 1.0 : a database of selenoprotein genes, proteins and SECIS elements. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Database issue):D332-8.
25. Romagné F, Santesmasses D, White L, Sarangi GK, Mariotti M, Hübler R, Weihmann A, Parra G, Gladyshev VN, Guigó R, Castellano S. SelenoDB 2.0: annotation of selenoprotein genes in animals and their genetic diversity in humans. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue):D437-43.
26. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997; 18(15):2714-23.
27. Flohé L, Schlegel W. Glutathion-Peroxidase. IV. Intrazelluläre Verteilung des Glutathion-Peroxidase-Systems in der Rattenleber. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1971; 352(10):1401-10.
28. Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 340(1):59-63.
29. Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem.* 1993; 268(4):2571-6.
30. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohé R, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 35(6):639-50.
31. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, Brigelius-Flohé R. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res.* 2001; 35(6):655-63.
32. Burk RF, Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Yin D. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011; 301:G32–G38.
33. Roveri A, Maiorino M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1994; 233:202-12.
34. Ghyselinck NB, Jimenez C, Courty Y, Dufaure JP. Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil.* 1989; 85(2):631-9.

35. Dear TN, Campbell K, Rabbitts TH. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*. 1991; 30(43):10376-82.
36. Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, Alanen HI, Salo KE, Wang CC, Ruddock LW. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J Mol Biol*. 2011; 406(3):503-15.
37. Sadava D, Hillis D, Heller HC, Hacker S. *Purves Biologie*. 10. Auflage. Berlin, Deutschland: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2019.
38. Herbet S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*. 2007; 2163-80.
39. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J*. 2008; 3959-70.
40. Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide Glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1994; 7342-48.
41. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 710(2):197-211.
42. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 839(1):62-70.
43. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10):951-65.
44. Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4:12.
45. Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1045(3):252-60.

46. Godeas C, Tramer F, Micali F, Roveri A, Maiorino M, Nisii C, Sandri G, Panfili E. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) in rat testis nuclei is bound to chromatin. *Biochem Mol Med*. 1996; 59(2):118-24.
47. Maiorino M, Roveri A, Benazzi L, Bosello V, Mauri P, Toppo S, Tosatto SC, Ursini F. 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. *J Biol Chem*. 2005; 280(46):38395-402.
48. Mauri P, Benazzi L, Flohé L, Maiorino M, Pietta PG, Pilawa S, Roveri A, Ursini F. Versatility of selenium catalysis in PHGPX unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biol Chem*. 2003; 384(4):575-88.
49. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPX during sperm maturation. *Science*. 1999; 285(5432):1393-96.
50. Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPX gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305(2):278-86.
51. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*. 2006; 387(10-11):1329-35.
52. Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem*. 1993; 268(9):6288-92.
53. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem*. 1999; 274(41):29294-302.
54. Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*. 2020; 152:175-185.
55. Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki J, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem*. 2009; 284(47):32522-32.
56. Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabé de Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*. 2009; 23(9):3233-42.

57. Savaskan NE, Ufer C, Kühn H, Borchert A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biol Chem.* 2007; 388(10):1007-17.
58. Schneider M, Wortmann M, Mandal PK, Arpornchayanon W, Jannasch K, Alves F, Strieth S, Conrad M, Beck H. Absence of glutathione peroxidase 4 affects tumor angiogenesis through increased 12/15-lipoxygenase activity. *Neoplasia.* 2010; 12(3):254-63.
59. Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, Sakamoto T, Koumura T, Minagawa S, Hara H, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Fujita Y, Utsumi H, Hashimoto M, Wakui H, Numata T, Kaneko Y, Mori S, Asano H, Matsudaira H, Ohtsuka T, Nakayama K, Nakanishi Y, Imai H, Kuwano K. Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *J Immunol.* 2019; 203(8):2076-2087.
60. Maiorino M, Conrad M, Ursini F. GPx4, Lipid Peroxidation, and Cell Death: Discoveries, Rediscoveries, and Open Issues. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 29(1):61-74.
61. Scheerer P, Borchert A, Krauss N, Wessner H, Gerth C, Höhne W, Kuhn H. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry.* 2007; 46(31):9041-9.
62. Borchert A, Wang CC, Ufer C, Schiebel H, Savaskan NE, Kuhn H. The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J Biol Chem.* 2006; 281(28):19655-64.
63. Kelner MJ, Montoya MA. Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249(1):53-55.
64. Arai M, Imai H, Sumi D, Imanaka T, Takano T, Chiba N, Nakagawa Y. Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 227(2):433-9.
65. Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* 2001; 15(7):1236-8.
66. NCBI. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoform B precursor [Homo sapiens]. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001034936.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001034936.1). Eingesehen am 18.08.2020.

67. Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem.* 1983; 133(1):51-69.
68. Graw J. *Genetik*. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag; 2010.
69. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008; 83(1):13-34.
70. Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish.* 2007; 4(1):21-40.
71. Arunachalam M, Raja M, Vijayakumar C, Malaïammal P, Mayden RL. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish* 2013; 10(1):1-14.
72. Parichy DM. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife.* 2015; 4:e05635.
73. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthavadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong



- PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013 Apr 25;496(7446):498-503. doi: 10.1038/nature12111. Epub 2013 Apr 17. Erratum in: *Nature*. 2014; 505(7482):248.
74. Thisse C, Degraeve A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 2003; 3(4):525-32.
75. Mendieta-Serrano MA, Schnabel D, Lomeli H, Salas-Vidal E. Spatial and temporal expression of zebrafish glutathione peroxidase 4 a and b genes during early embryo development. *Gene Expr Patterns*. 2015; 19(1-2):98-107.
76. Graeve L, Müller M. Zellorganellen und Vesikeltransport. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014:157-173.
77. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme; 2015.
78. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc*. 2007; 2(4):953-71.
79. Bauer NC, Doetsch PW, Corbett AH. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*. 2015; 16(10):1039-61.
80. Schnurr K, Borchert A, Gerth C, Anton M, Kuhn H. Schnurr K, Borchert A, Gerth C, Anton M, Kuhn H. Bacterial and nonbacterial expression of wild-type and mutant human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and purification of the mutant enzyme in the milligram scale. *Protein Expr Purif*. 2000; 19(3):403-10.
81. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25(17):3389-402.
82. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*. 2005; 272(20):5101-9.

83. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011; 7:539.
84. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000; 302(1):205-17.
85. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010; 59(3):307-21.
86. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547-1549.
87. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Hedges SB. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol Biol Evol.* 2017; 34(7):1812-1819.
88. Müllhardt C. *Der Experimentator-Molekularbiologie Genomics*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2013.
89. pET System Manuel. 11 th edition. Novagen; 2006.
90. pEGFP-N1 Vector information. Clontech Laboratories; 2002.
91. pmCherry-N1 Vector information. Clontech Laboratories; 2008.
92. Müller S, Senn H, Gsell B, Vetter W, Baron C, Böck A. The formation of diselenide bridges in proteins by incorporation of selenocysteine residues: biosynthesis and characterization of (Se)<sup>2</sup>-thioredoxin. *Biochemistry.* 1994; 33(11):3404-12.
93. Sanchez JF, Hoh F, Strub MP, Aumelas A, Dumas C. Structure of the cathelicidin motif of protegrin-3 precursor: structural insights into the activation mechanism of an antimicrobial protein. *Structure.* 2002; 10(10):1363-70.
94. Strub MP, Hoh F, Sanchez JF, Strub JM, Böck A, Aumelas A, Dumas C. Selenomethionine and selenocysteine double labeling strategy for crystallographic phasing. *Structure.* 2003; 11(11):1359-67.
95. *The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. 5. Auflage. Hilden, Deutschland: Qiagen GmbH; 2003.

96. Rehm H, Letzel T. Der Experimentator-Proteinbiochemie/Proteomics. 6. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
97. Haken H, Wolf HC. Molekülphysik und Quantenchemie. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2006.
98. Renz H. Praktische Labordiagnostik: Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie. 3. aktualisierte und erweiterte Auflage. Berlin, Deutschland; Boston, USA: Walter De Gruyter GmbH & Co. KG; 2018.
99. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981; 23(1):175-82.
100. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37(8):911-7.
101. Mortimer CE, Müller U, Beck J. Chemie-Das Basiswissen der Chemie. 12. Auflage. Stuttgart; Deutschland: Georg Thieme Verlag KG; 2015.
102. Ingram CD, Brash AR. Characterization of HETEs and related conjugated dienes by UV spectroscopy. *Lipids*. 1988; 23(4):340-4.
103. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Stryer Biochemie. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2013.
104. Koolmann J, Röhm KH. Biochemie des Menschen. 4. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG; 2009:84-85.
105. Kriegel T, Schellenberger W. Enzyme-Grundkonzepte der Biokatalyse. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014:101-114.
106. Eichler HJ, Kronfeldt HD, Sahn J. Das Neue Physikalische Grundpraktikum. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2006.
107. Becker FM, Boortz G, Dietrich V, Engelmann L, Ernst C, Fanghänel G, Höhne H, Lenertat R, Liesenberg G, Meyer L, Pews-Hocke C, Schmidt GD, Stamm R, Weber K. Formeln und Tabellen für die Sekundarstufe I und II. 1. Auflage. Berlin, Deutschland: paetec Gesellschaft für Bildung und Technik mbH; 2014:11.

108. Reaction Biology Corporation. 2020. Thermal Shift Assay Service & Differential Scanning Fluorimetry. <https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa>. Eingesehen am 23.12.2020.
109. Zhang Y, Gladyshev VN. An algorithm for identification of bacterial selenocysteine insertion sequence elements and selenoprotein genes. *Bioinformatics*. 2005; 21(11):2580-9.
110. Mariotti M, Lobanov AV, Guigo R, Gladyshev VN. SECISearch3 and Seblastian: new tools for prediction of SECIS elements and selenoproteins. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(15):e149.
111. Almagro Armenteros JJ, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, von Heijne G, Eloffson A, Nielsen H. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance*. 2019; 2(5):e201900429.
112. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*. 2019; 37(4):420-423.
113. Lin JR, Hu J. SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One*. 2013; 8(10):e76864.
114. Brameier M, Krings A, MacCallum RM. NucPred-predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*. 2007; 23(9):1159-60.
115. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46(W1):W296-W303.
116. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TA, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(D1):D313-D319.
117. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. 2009; 30 Suppl 1:S162-73.
118. Studer G, Rempfer C, Waterhouse AM, Gumienny R, Haas J, Schwede T. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*. 2020; 36(6):1765-1771.

119. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011; 27(3):343-50.
120. Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, Bordoli L, Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep*. 2017; 7(1):10480.
121. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(12):4576-9.
122. Boenigk J, Wodniok S. *Biodiversität und Erdgeschichte*. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014.
123. Giotis ES, Skinner MA. Spotlight on avian pathology: fowlpox virus. *Avian Pathol*. 2019; 48(2):87-90.
124. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The genome of canarypox virus. *J Virol*. 2004; 78(1):353-66.
125. Meza-Romero R, Navarrete-Dechent C, Downey C. Molluscum contagiosum: an update and review of new perspectives in etiology, diagnosis, and treatment. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2019; 12:373-381.
126. Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, Henry D, De Brandt E, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Speert DP, Dowson C, Vandamme P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59(Pt 1):102-11.
127. Alnoch RC, Cardoso RLA, Guizelini D, Balsanelli E, Tadra-Sfeir MZ, de Oliveira Pedrosa F, Sasaki GL, Cruz LM, Mitchell DA, de Souza EM, Krieger N, Muller-Santos M. Genome sequencing of *Burkholderia contaminans* LTEB11 reveals a lipolytic arsenal of biotechnological interest. *Braz J Microbiol*. 2019; 50(3):619-624.
128. Gemperlein K, Zaburanyi N, Garcia R, La Clair JJ, Müller R. Metabolic and Biosynthetic Diversity in Marine Myxobacteria. *Mar Drugs*. 2018; 16(9):314.
129. Schäberle TF, Goralski E, Neu E, Erol O, Hölzl G, Dörmann P, Bierbaum G, König GM. Marine myxobacteria as a source of antibiotics-comparison of physiology, polyketide-type genes and antibiotic production of three new isolates of *Enhygromyxa salina*. *Mar Drugs*. 2010; 8(9):2466-79.

130. Rezny BR, Evans DS. *Vibrio Parahaemolyticus*. 2020 Jul 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
131. Nethe-Jaenchen R. Systematik und Phylogenie. In: Munk K. Taschenlehrbuch Biologie-Mikrobiologie. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG; 2008:59-105.
132. Sogodogo E, Drancourt M, Grine G. Methanogens as emerging pathogens in anaerobic abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019; 38(5):811-818.
133. Klein B, Wibberg D, Hallmann A. Whole transcriptome RNA-Seq analysis reveals extensive cell type-specific compartmentalization in *Volvox carteri*. *BMC Biol*. 2017; 15(1):111.
134. Schroda M. Good News for Nuclear Transgene Expression in *Chlamydomonas*. *Cells*. 2019; 8(12):1534.
135. Richard GF. Eukaryotic Pangenomes. In: Tettelin H, Medini D. *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes*. Cham (CH): Springer; 2020:253-291.
136. NCBI. *gpx4a* glutathione peroxidase 4a [*Danio rerio* (zebrafish)]. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/352928>. Eingesehen am 27.03.2021.
137. NCBI. *gpx4b* glutathione peroxidase 4b [*Danio rerio* (zebrafish)]. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/352929>. Eingesehen am 27.03.2021.
138. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004; 22(11):1399-408.
139. Kriegel T, Schellenberger W. Regulation der Enzymaktivität. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/ Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014:115-124.
140. SWISS-MODEL. SWISS-MODEL Help. <https://swissmodel.expasy.org/docs/help#qmean>. Eingesehen am 04.01.2021.
141. Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007; 39(5):384-90.

142. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohé L. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX). *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995; 376(11):651-60.
143. Guillin OM, Vindry C, Ohlmann T, Chavatte L. Selenium, Selenoproteins and Viral Infection. *Nutrients*. 2019; 11(9):2101.
144. Schultze, B. Viren. In: Munk K. Taschenlehrbuch Biologie-Mikrobiologie. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG; 2008:106-131.
145. Kemadjou Njiwa JR, Müller P, Klein R. Variations of sperm release in three batches of zebrafish. *Journal of Fish Biology*. 2004; 64: 475-482.
146. Rinas U, Garcia-Fruitós E, Corchero JL, Vázquez E, Seras-Franzoso J, Villaverde A. Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends Biochem Sci*. 2017; 42(9):726-737.
147. Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2005; 4(1):1.
148. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995; 203(3):253-310.
149. ZFIN. Zebrafish Developmental Staging Series. [https://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/](https://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/). Eingesehen am 12.01.2021.
150. Schmitz S, Desel C. *Der Experimentator Zellbiologie*. 1. Auflage. Berlin, Deutschland: Springer-Verlag GmbH; 2018.
151. Persson PB. Energie- und Wärmehaushalt, Thermoregulation. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag; 2010:835-853.
152. Oberleithner H. Grundlagen der Zellbiologie. In: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag; 2010:4-23.

153. Roveri A, Maiorino M, Nisii C, Ursini F. Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1208(2):211-21.
154. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*. 2002; 277(43):41254-8.
155. Fraher D, Sanigorski A, Mellett NA, Meikle PJ, Sinclair AJ, Gibert Y. Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Rep*. 2016; 14(6):1317-1329.
156. Pace CN. Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol*. 1990; 8(4):93-8.
157. Kalbitzer HR. Proteine- Struktur und Funktion. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg, Deutschland: Springer-Verlag; 2014:61-85.
158. Miotto M, Olimpieri PP, Di Rienzo L, Ambrosetti F, Corsi P, Lepore R, Tartaglia GG, Milanetti E. Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions. *Bioinformatics*. 2019; 35(15):2569-2577.



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophia Regina Roth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Mechanistische und evolutionäre Aspekte der Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) (Mechanistic and Evolutionary Issues about Glutathione peroxidase 4 (Gpx4)) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Lebenslauf

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## Publikationsliste

**Publikation 1:** Brütsch SH, Rademacher M, **Roth SR**, Müller K, Eder S, Viertel D, Franz C, Kuhn H, Borchert A. Male Subfertility Induced by Heterozygous Expression of Catalytically Inactive Glutathione Peroxidase 4 Is Rescued in Vivo by Systemic Inactivation of the Alox15 Gene. *J Biol Chem.* 2016; 291(45):23578-23588.

**Publikation 2:** Borchert A, Kalms J, **Roth SR**, Rademacher M, Schmidt A, Holzhutter HG, Kuhn H, Scheerer P. Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018; 1863(9):1095-1107.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn bedanken, sowohl für die Möglichkeit, Einblicke in die Laborarbeit zu erlangen als auch für die Bereitstellung dieses Promotionsthemas, dessen Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen und kritischen Anmerkungen vor allem auch bei der Verschriftlichung dieser Arbeit.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Astrid Borchert für die geduldige Einarbeitung, die vielen Hilfestellungen und die intensive Begleitung dieser Arbeit, aber auch der gesamten universitären Ausbildungsphase und darüber hinaus.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Kumar Reddy Kakularam für die große und flexible Unterstützung bei der Datenbankrecherche bedanken.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten AG Kühn und meinen lieben Mitdoktoranden und -doktorandinnen, die mir mit Rat und Tat oder aufmunternden Worten zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Familie, meinem Freund und meiner kleinen Tochter für die großartige, vehemente, auch tatkräftige Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen diese Arbeit zum Abschluss bringen zu können.