

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

## DISSERTATION

Funktionelle Bedeutung des Lipidperoxidstoffwechsels bei der  
Erythropoese

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marlena Rademacher

aus Helmstedt

Datum der Promotion: 04.03.2022

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

- **Rademacher, M.**, Kuhn, H., Borchert, A.. Systemic deficiency of mouse arachidonate 15-lipoxygenase induces defective erythropoiesis and transgenic expression of the human enzyme rescues this phenotype. *The FASEB Journal*. 2020; 34: 14318– 14335. <https://doi.org/10.1096/fj.202000408RR>  
[first published: 12.09.2020]

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter dem Titel „Expression silencing of glutathione peroxidase 4 in mouse erythroleukemia cells retards *in vitro* erythropoiesis“ zur Veröffentlichung eingereicht bei:

- International Journal of Molecular Sciences am 18.03.2021 [ID: ijms-1169035]

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	viii
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	x
1. Zusammenfassung.....	1
1.1. Abstract .....	3
2. Einleitung.....	5
2.1. Hämatopoese – die Synthese der Blutzellen.....	5
2.2. Grundzüge der Erythropoese .....	6
2.3. Murine Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen) .....	9
2.4. Glutathionperoxidasen .....	10
2.4.1. Überblick über die Glutathionperoxidasen .....	12
2.4.2. Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) – ein Repräsentant der Glutathionperoxidasen mit besonderen Eigenschaften .....	14
2.4.2.1. Struktur, Isoformen und Funktionen der Gpx4 .....	15
2.4.2.1.1. Struktur .....	15
2.4.2.1.2. Isoformen.....	16
2.4.2.1.3. Biologische Funktionen.....	17
2.4.2.1.4. Knockout-Modelle der Gpx4.....	19
2.5. Lipoxygenasen .....	21
2.5.1. Reaktion der Lipoxygenasen.....	24
2.5.2. Die Arachidonsäure-15-Lipoxygenase (Alox15) - ein Repräsentant der Lipoxygenasen mit besonderen Eigenschaften.....	25
2.5.2.1. Vorkommen, Struktur und Funktion der Alox15 .....	26
2.5.2.1.1. Vorkommen .....	26
2.5.2.1.2. Struktur .....	26
2.5.2.1.3. Funktion.....	29
2.5.2.2. Knockout Modell der Alox15 .....	31
2.6. Zusammenspiel von Alox15 und Gpx4 – Redoxstatus der Zelle .....	32

2.7.	Ziel der Arbeit .....	32
3.	Material und Methoden .....	35
3.1.	Material .....	35
3.1.1.	Geräte .....	35
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	35
3.1.3.	Kits .....	35
3.1.4.	Enzyme und Enzyminhibitoren .....	36
3.1.5.	Lösungen, Puffer und Chemikalien .....	36
3.1.6.	Primer .....	37
3.1.7.	Zelllinie.....	38
3.1.8.	Nährmedium .....	38
3.1.9.	Transfektionsvektor .....	38
3.2.	Methoden .....	39
3.2.1.	Herstellung der MEL-Zelltransfektanten.....	39
3.2.2.	Zellkultur.....	40
3.2.3.	Wachstumskurven .....	40
3.2.4.	Untersuchte Mausstämme.....	41
3.2.5.	Tierhaltung .....	43
3.2.6.	Genotypisierung der Mäuse .....	43
3.2.7.	Organentnahme und Isolation von Knochenmarkszellen .....	44
3.2.8.	Blutentnahme und Analyse der Blutparameter.....	45
3.2.9.	Isolation der Gesamt-RNA .....	45
3.2.10.	Reverse Transkription .....	46
3.2.11.	Quantitative Realtime PCR .....	47
3.2.12.	Herstellung der externen Amplifizierungsstandards für die qRT-PCR.....	48
3.2.13.	Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung .....	49
3.2.14.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot.....	50
3.2.15.	Aktivitätsmessung der Glutathionperoxidase 4.....	51

3.2.16.	Hämoglobinbestimmung .....	51
3.2.17.	Messung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten.....	52
3.2.18.	Isolation von Erythrozyten aus dem Blut und Analyse der <i>ex vivo</i> Lebensspanne .....	52
3.2.19.	Durchflusszytometrie.....	53
3.2.20.	Zellmikroskopie.....	53
3.2.21.	Aktivitätsassay der Alox15 .....	54
3.2.22.	HPCL Analyse der Reaktionsprodukte .....	55
3.2.23.	Statistik und Auswertung .....	55
4.	Ergebnisse.....	57
4.1.	Einfluss der Gpx4 auf die <i>in vitro</i> Erythropoese in MEL-Zellen .....	57
4.1.1.	Expression der Gpx4 in MEL-Zellen (MEL-745A cl. DS19) .....	57
4.1.2.	Allgemeine Charakterisierung von MEL-Zellen mit stabilem Knockdown der Gpx4 Expression.....	58
4.1.2.1.	mRNA- und Protein-Expression der Gpx4 in transfizierten MEL-Zellen.....	58
4.1.2.2.	Aktivität der Gpx4 in MEL-Zellen mit stabilem Knockdown .....	60
4.1.3.	Induktion der erythroiden Differenzierung in RNAi stabil transfizierten MEL- Zellen .....	61
4.1.3.1.	Induktion der <i>in vitro</i> Erythropoese in MOCK-transfizierten RNAi Zellen .....	62
4.1.3.2.	Induktion der <i>in vitro</i> Erythropoese in Gpx4 defizienten MEL-Zellen.....	63
4.1.3.3.	Vergleich der Induktion der erythroiden Differenzierung zwischen MOCK- und Gpx4 RNAi-transfizierten MEL-Zellklonen.....	64
4.2.	Hämoglobinbestimmung in MOCK- und Gpx4 RNAi-transfizierten MEL- Zellklonen .....	65
4.3.	Einfluss des Knockdowns der Gpx4-Expression auf das Proliferationsverhalten von MEL-Zellen .....	67
4.4.	Allgemeine Charakterisierung der Erythropoese in Mauslinien mit verändertem Alox15 und Gpx4 Genotyp .....	68
4.4.1.	Bedeutung des systemischen homozygoten Knockouts der Alox15 auf die Erythropoese der Maus .....	68

4.4.1.1.	Einfluss der systemischen homozygoten Inaktivierung der Alox15 auf die basalen Blutparameter der Maus .....	68
4.4.1.2.	Bestimmung der strukturellen Integrität von Erythrozyten in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15 .....	70
4.4.1.3.	Auswirkungen der diagnostischen Blutentnahme auf die Expression und Aktivität der Alox15.....	72
4.4.1.4.	Blutparameter der Maus nach diagnostischer Blutentnahme in Tieren mit systemischem Knockout der Alox15 .....	76
4.4.1.5.	Vergleich der Organgewichte sowie der Epo-Expression in Mäusen mit systemischen homozygoten Knockout der Alox15 .....	77
4.4.1.6.	Messung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten in Mäusen mit verändertem Alox15 Genotyp.....	79
4.4.2.	Bestimmung der <i>ex vivo</i> Lebensspanne von Erythrozyten in Tieren mit systemischen Alox15 Knockout.....	80
4.4.3.	Transgene Expression der humanen ALOX15 in Mäusen mit systemischen Knockout der endogenen Alox15.....	81
4.4.4.	Basale Blutparameter von Alox15 <sup>-/-</sup> +aP2-ALOX15 Mäusen .....	84
4.4.5.	Einfluss der heterozygoten Expression einer dysfunktionellen Gpx4 auf die basalen Blutparameter der Maus .....	85
4.4.5.1.	Vergleich der Organgewichte sowie der Expression von Erythropoetin in Mäusen mit heterozygotem Knockin einer dysfunktionellen Gpx4 .....	86
4.4.6.	Erythropoetische Parameter sowie Organgewichte bei Mäusen mit einer zusätzlichen homozygoten Inaktivierung der Alox15 in heterozygoten Gpx4 <sup>U46A/+</sup> Mäusen .....	87
5.	Diskussion.....	90
5.1.	Einfluss der Gpx4 auf die <i>in vitro</i> Erythropoese in MEL-Zellen .....	91
5.1.1.	Expression der Gpx4 MEL-Zellen (MEL-745A cl. DS19) .....	91
5.1.2.	Allgemeine Charakterisierung von MEL-Zellen mit stabilem Knockdown der Gpx4 Expression .....	92
5.1.3.	Induktion der erythroiden Differenzierung in RNAi stabil transfizierten MEL-Zellklonen.....	92
5.2.	Hämoglobinbestimmung in RNAi transfizierten MEL-Zellklonen .....	93

5.3.	Einfluss des Knockdowns der Gpx4 auf das Proliferationsverhalten von MEL-Zellen.....	94
5.4.	Allgemeine Charakterisierung der Erythropoese in Mauslinien mit verändertem Gpx4 und Alox15 Genotyp .....	94
5.4.1.	Einfluss der systemischen homozygoten Inaktivierung der Alox15 auf die basalen Blutparameter der Maus .....	95
5.4.2.	Bestimmung der strukturellen Integrität von Erythrozyten in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15 .....	95
5.4.3.	Auswirkungen der diagnostischen Blutentnahme auf die Aktivität und mRNA Expression der Alox15 in verschiedenen Geweben .....	96
5.4.4.	Blutparameter der Maus nach diagnostischer Blutentnahme in Tieren mit systemischem Knockout der Alox15 .....	97
5.4.5.	Vergleich der Organgewichte in Mäusen mit systemischen homozygoten Knockout der Alox15 .....	98
5.4.6.	Messung der osmotischen Stabilität der Erythrozyten von Mäusen mit Alox15 Defizienz.....	98
5.4.7.	Bestimmung der <i>ex vivo</i> Lebensspanne von Erythrozyten in Tieren mit systemischen Alox15 Knockout.....	99
5.4.8.	Transgene Expression der humanen ALOX15 in Tieren mit systemischen Knockout der endogenen Alox15.....	100
5.4.9.	Einfluss der heterozygoten Expression der Gpx4 auf die Erythropoese der Maus.....	100
5.4.10.	Vergleich der Organgewichte sowie der Epo Expression in Mäusen mit heterozygotem Knockin der Gpx4 .....	101
5.4.11.	Beurteilung verschiedener erythropoetischer Parameter sowie von Organgewichten bei Mäusen mit einer zusätzlichen homozygoten Inaktivierung der Alox15 in heterozygoten Gpx4 <sup>U46A/+</sup> -Mäusen.....	102
5.5.	Limitationen der Arbeit .....	102
5.5.1.	Allgemeine Limitationen.....	102
5.5.2.	Methodenkritik.....	103
5.6.	Ausblick .....	104
6.	Literaturverzeichnis .....	107
7.	Eidesstattliche Versicherung .....	128
8.	Anteilerklärung.....	129
9.	Lebenslauf .....	129
10.	Komplette Publikationsliste .....	133
11.	Danksagung .....	134

## Abkürzungsverzeichnis

5-H(p)ETE	5-Hydroxyperoxyarachidonsäure
12-H(p)ETE	12-Hydroxyperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
12-HETE	12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure
15-H(p)ETE	15-Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
15-HETE	15-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure
A	Alanin
Aifm2	apoptosis inducing factor 2; Apoptose-induzierender Faktor 2
Alas 2	δ-Aminolävulinat-Synthetase 2
Alox15	Lipoxygenase 15-1; 12/15-Lipoxygenase
BFU-E	burst forming unit-erythroid; frühe erythropoetische Vorläuferzellen
BMP4	bone morphogenetic protein 4; Wachstums- und Differenzierungsfaktor
bp	Basenpaare
C	Cystein
CD4	cluster of differentiation 4; Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Zelle	T-Helfer- / T-Suppressor-Zelle
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	colony-forming unit erythroid; frühe Erythrozyten Vorläufer
CLP	common lymphoid progenitor; gemeinsamer lymphoider Vorläufer
CML	chronisch myeloische Leukämie
c-myc	Protoonkogen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
Dok2	docking protein 2
E	Embryonaltag
E6 / E3 Gapdh	1 Million / 1000 Kopien Gapdh
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein (erweitertes grün fluoreszierendes Protein)
EKLF	<i>Erythroid Kruppel-like factor</i> ; Transkriptionsfaktor
EPA	Eicosapentaensäure
Epo	Erythropoetin



EpoR	Erythropoetin-Rezeptor
Fe <sup>2+</sup> / 3+	Eisen (zweiwertig / dreiwertig)
FOG1	friend of GATA1; Co-Faktor zu GATA1
Gapdh	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA 1/2	Transkriptionsfaktoren
Gpx4	Gluthationperoxidase 4
H.E. Färbung	Hämatoxylin Färbung
Hb	Hämoglobin
Hba-a1	Hämoglobin- $\alpha$ -Kette
Hbb	Hämoglobin- $\beta$ -Kette
Hkt	Hämatokrit
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
HSC	hematopoietic stem cell; hämatopoetische Stammzelle
LDL	low density lipoprotein
min	Minuten
MPP	multipotent progenitor; multipotente Vorläuferzellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
Oligo(dT)18	Oligo-Desoxythymidine
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RBC	red blood cell count (Anzahl der Erythrozyten)
rpm	rounds per minute
SCL	stem cell leukemia; Transkriptionsfaktor
siRNA	small interfering RNA
U	Selenocystein
VEGF	vascular endothelial growth factor (Endothelwachstumsfaktor)
Wnt	Wachstumsfaktor; Zusammensetzung aus <i>wingless</i> und Int-1

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vereinfachte schematische Übersicht der Hämatopoese mit Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungslinien. ....	6
Abb. 2:	Vereinfachte Darstellung der späten Schritte der Erythropoese. ....	9
Abb. 3:	Der Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen. ....	11
Abb. 4:	Möglicher alternativer Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen. ....	12
Abb. 5:	Kristallstruktur der Sec46Cys Mutante der humanen Gpx4. ....	16
Abb. 6:	Mechanismus der Lipoxigenasereaktion.....	24
Abb. 7:	Kristallstruktur der Alox15 des Kaninchens. ....	28
Abb. 8:	Quantifizierung der Expression der verschiedenen Gpx4 Isoformen in MEL-745A cl. DS19 Zellen. ....	57
Abb. 9:	Relative Expression der m+z Gpx4 mRNA in 3 verschiedenen stabilen MEL-Transfektanten. ....	58
Abb. 10:	Expression der Gpx4 Isoformen in siRNA transfizierten MEL-Zellen und entsprechenden MOCK-Kontrollen.....	59
Abb. 11:	Expression des Gpx4 Proteins in stabilen MEL-Zelltransfektanten. ....	60
Abb. 12:	Gpx4 Aktivitätsassay unter Verwendung von Lysatüberständen von Gpx4 RNAi sowie MOCK RNAi Zellen. ....	61
Abb. 13:	Expressionskinetiken von erythroid-spezifischen Markergenen und der Gpx4 bei der durch DMSO induzierten erythroiden Differenzierung von MOCK RNAi transfizierten MEL-Zellen. ....	62
Abb. 14:	Expressionskinetiken von erythroid-spezifischen Markergenen im Rahmen der durch DMSO induzierten erythroiden Differenzierung von Gpx4 RNAi transfizierten MEL-Zellen. ....	64
Abb. 15:	Relative Expressionsänderung der Markergene Hba-a1 und Alas2 bezogen auf die MOCK RNAi Transfektante.....	65
Abb. 16:	Hämoglobingehalt von Gpx4-defizienten (Gpx4 RNAi) und Gpx4-exprimierenden (MOCK RNAi) MEL-Zellen.....	66
Abb. 17:	Hämoglobingehalt (in µg/mg zelluläres Protein) in mit DMSO stimulierten und unstimulierten MEL- Zelltransfektanten. ....	66
Abb. 18:	Wachstumskurven von Gpx4-defizienten MEL-Zellen (Gpx4 RNAi) und entsprechenden Kontrolltransfektanten (MOCK RNAi). ....	67
Abb. 19:	Basale Blutparameter in Mäusen mit systemischem homozygoten Knockout der Alox15. ....	69

Abb. 20:	Hellfeldmikroskopie von Erythrozyten aus Alox15 <sup>-/-</sup> Tieren und entsprechenden Wildtypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie die relative prozentuale Veränderung der Anzahl morphologisch auffälligen Zellen.....	70
Abb. 21:	Fluoreszenzmikroskopie sowie FACS-Analyse von Erythrozyten in Alox15 <sup>-/-</sup> Tieren. ....	71
Abb. 22:	Expression der Alox15 mRNA in verschiedenen hämatopoetischen Geweben.....	73
Abb. 23:	Oxygenierungsprodukte in verschiedenen murinen Geweben nach Inkubation mit Arachidonsäure.....	74
Abb. 24:	Menge an 12(S)-HETE in murinen Geweben vor und nach diagnostischer Blutentnahme.....	75
Abb. 25:	Vergleich verschiedener Blutparameter vor und nach diagnostischer Blutentnahme in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15 (Alox15 <sup>-/-</sup> ).....	76
Abb. 26:	Vergleich der Organgewichte sowie der Epo-Expression in Wildtypmäusen und Tieren mit systemischem Knockout der Alox15 (Alox15 <sup>-/-</sup> ).....	78
Abb. 27:	Darstellung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten von Tieren mit systemischem Knockout der Alox15 (Alox15 <sup>-/-</sup> ).....	80
Abb. 28:	Darstellung der Hämolyse in Erythrozyten von Alox15 <sup>-/-</sup> Mäusen und den korrespondierenden Wildtypen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.....	81
Abb. 29:	Expression verschiedener Lipoxygenase mRNA in Knochenmarkszellen von Alox15 <sup>-/-</sup> +aP2-ALOX15 Mäusen. ....	82
Abb. 30:	<i>In vitro</i> Bildung von ALOX Produkten aus Arachidonsäure aus Knochenmarkszellen von Alox15 <sup>-/-</sup> +aP2-ALOX15 Mäusen und Wildtypkontrolltieren.....	83
Abb. 31:	Basale Blutparameter von Alox15 <sup>-/-</sup> +aP2-ALOX15 Mäusen.....	84
Abb. 32:	Osmotische Resistenz von Erythrozyten, die aus Mäusen verschiedener Genotypen isoliert wurden.....	85
Abb. 33:	Vergleich ausgewählter Erythrozytenparameter zwischen Gpx4 <sup>U46A/+</sup> Mäusen und entsprechenden Wildtypkontrollen.....	86
Abb. 34:	Vergleich der Organgewichte von Mäusen mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx (Gpx4 <sup>U46A/+</sup> ) und den zugehörigen Wildtyptieren. ....	87
Abb. 35:	Basale Erythrozytenparameter von Mäusen mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx und gleichzeitigem homozygotem Knockout der Alox15 (Gpx4 <sup>U46A/+</sup> +Alox15 <sup>-/-</sup> ) und zugehörigen Wildtyptieren.....	88
Abb. 36:	Relative Organgewichte und Epo mRNA Expression in Tieren mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx und gleichzeitigem homozygoten Knockout der Alox15 (Gpx4 <sup>U46A/+</sup> +Alox15 <sup>-/-</sup> ).....	89

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der verschiedenen Isoformen der humanen Glutathionperoxidasen .....	14
Tabelle 2: Funktionelle humane und murine Lipoxygenase-Isoformen.....	23
Tabelle 3: Charakterisierung der verwendeten Mausstämmе .....	43
Tabelle 4: PCR-Programm der Genotypisierung.....	44
Tabelle 5: qRT-PCR Programm.....	47
Tabelle 6: Programm der Endpunkt-PCR.....	48

### 1. Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) und die 12/15 Lipoxygenase (Alox15) sind funktionelle Gegenspieler im Stoffwechsel oxygenierter Lipide. Durch die Reduktion von Hydroperoxylipiden, die als Aktivatoren der Alox15 essenziell für deren katalytische Aktivität sind, wirkt die Gpx4 als indirekter Alox15 Hemmstoff. Gleichzeitig fungiert die Gpx4 auch als Strukturprotein, welches eine wichtige Rolle bei der Bildung der mitochondrialen Kapsel im Rahmen der Spermatogenese spielt. Beide Proteine wurden in früheren Untersuchungen mit der Reifung und Differenzierung roter Blutzellen (Erythropoese) in Verbindung gebracht. Während ein erythroid-spezifischer Knockout des Gpx4 Gens deutliche phänotypische Veränderungen bei der Entwicklung roter Blutzellen induzierte, zeigten Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse keine markanten hämatopoetischen Veränderungen.

**Methodik:** Um die Auswirkungen der beiden Enzyme auf die Erythropoese bei Mäusen weiter zu erforschen, nutzten wir im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst ein stabiles RNAi-Zellmodell, bei dem die Expression des Gpx4 Gens deutlich verringert wurde. Um die Rolle von Alox15 und Gpx4 für die *in vivo* Erythropoese zu testen, verwendeten wir im zweiten Teil der Arbeit verschiedene Mausmodelle. So untersuchten wir die Hämatopoese in homozygoten Alox15 Knockout Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>). Zudem analysierten wir Gpx4 Knockin Mäusen (Gpx4<sup>U46A/+</sup>), die heterozygot eine katalytisch inaktive Mutante des Enzyms exprimierten. Weiterhin untersuchten wir Mäuse mit einem zusätzlichen homozygoten Alox15 Knockout (Gpx<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>) sowie Tiere, die neben dem homozygoten Alox15 Knockout (Alox15<sup>-/-</sup>) transgen die humane ALOX15 (Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15) exprimierten.

**Ergebnisse:** *In vitro* führte ein stabiler Knockdown der Gpx4 Expression in murinen Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen) zu einer verminderten Expression Erythropoese relevanter Gene und zu einer reduzierten Hämoglobinsynthese. *In vivo* zeigten Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikante Reduktion der Erythrozytenzahl mit kompensatorischem Anstieg der Retikulozytenzahl. Weiterhin waren die Erythrozyten dieser Tiere hyperchrom und wiesen neben vermehrten Echinozyten/Akanthozyten auch eine reduzierte osmotische Stabilität sowie eine verringerte *ex vivo* Überlebensrate auf. Während Gpx4<sup>U46A/+</sup> Mäuse keine Auffälligkeiten im hämatopoetischen System zeigten, konnten ähnliche Veränderungen auch bei Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen aufgezeigt werden.

**Schlussfolgerung:** Aus diesen Daten kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass die Reduktion der Gpx4 Expression in MEL-Zellen zu einer defekten Erythropoese führt. Im Gegensatz dazu konnte bei Gpx4<sup>U46A/+</sup> Mäusen keine defekte Erythropoese nachgewiesen werden. Eine systemische Inaktivierung des Alox15 Gens induzierte einen defekten erythropoetischen Phänotyp, der durch strukturelle und funktionelle Abnormalitäten der roten Blutzellen gekennzeichnet war. Ähnliche Auffälligkeiten wurden auch bei Alox15 defizienten Mäusen gezeigt, in die eine funktionelle Gpx4 Defizienz (Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>) eingekreuzt wurde. Die transgene Expression der humanen ALOX15 in Tieren mit homozygotem Alox15 Knockout hingegen (Alox15<sup>-/-</sup>+aP2 ALOX15) führt zu einem *rescue* des erythroiden Phänotyps.

### 1.1. Abstract

**Introduction:** The Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and the 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) are functional adversaries in the metabolism of oxygenated lipids. Hydroperoxylipids are essential activators for the catalytic activity of ALOX15. Since Gpx4 reduces the peroxides, it indirectly inhibits ALOX15. Gpx4 plays a dual biological role. It functions as catalytically active enzyme but it is also a structural protein. ALOX15 and Gpx4 have been implicated in the maturation and differentiation auf the red blood cells. Conditional knock-out of the Gpx4 gene in hematopoietic cells induced defective erythropoiesis. In contrast, *Alox15*<sup>-/-</sup> mice develop normally and all major hematopoietic parameters were normal.

**Methodology:** In order to further investigate the potential roles of the two enzymes in erythropoiesis we developed a cellular *in vitro* model, in which the expression of Gpx4 was significantly reduced employing the RNAi strategy. To test the *in vivo* role of *Alox15* and Gpx4 during erythropoiesis we developed different genetically modified mouse models. First we analysed the impact of systemic homozygous inactivation of the *Alox15* gene (*Alox15*<sup>-/-</sup>) on *in vivo* erythropoiesis. We also analysed Gpx4 knock-in mice (*Gpx4*<sup>U46A/+</sup>) that heterozygously expressed an inactive mutant of the enzyme. Next, we explored the erythropoiesis of mice carrying a defective *Alox15* gene and in addition Gpx4 knock-in allele (*Alox15*<sup>-/-</sup>+*Gpx4*<sup>U46A/+</sup>). Finally, we expressed a transgenic human ALOX15 in *Alox15*<sup>-/-</sup> mice under the control of the  $\alpha$ P2 promoter and tested the erythropoiesis of these animals.

**Results:** A stable knockdown of the Gpx4 expression in MEL cells *in vitro* leads to a reduced mRNA expression of selected erythroid specific genes including hemoglobin. *In vivo* *Alox15*<sup>-/-</sup> mice exhibit significantly reduced erythrocyte counts with compensatory increase in reticulocyte number. Erythrocytes were hyperchromic and the share of echinocytes/acanthocytes was increased. Osmotic resistance was impaired and the *ex vivo* life span reduced. While *Gpx4*<sup>U46A/+</sup> mice presented no abnormalities in the hematopoietic system, similar changes were observed in *Gpx4*<sup>U46A/+</sup>+*Alox15*<sup>-/-</sup> mice.

**Conclusions:** Taken together this data suggests that a reduction of the Gpx4 expression in MEL cells leads to defective *in vitro* erythropoiesis. *In vivo* heterozygous expression of catalytically inactive Gpx4 is not sufficient to compromise erythropoiesis. On the other hand, systematic inactivation of the *Alox15* gene (*Alox15*<sup>-/-</sup> mice) induces a

## Zusammenfassung

---

defective erythroid phenotype characterized by structural and functional defects of red blood cells. Similar abnormalities were shown in  $Alox15^{-/-}+Gpx4^{U46A/+}$  mice. Transgenic expression of human ALOX15 in  $Alox15^{-/-}$  mice ( $Alox15^{-/-}+aP2$  ALOX15) rescues the defective erythroid phenotype shown for  $Alox15^{-/-}$  mice.



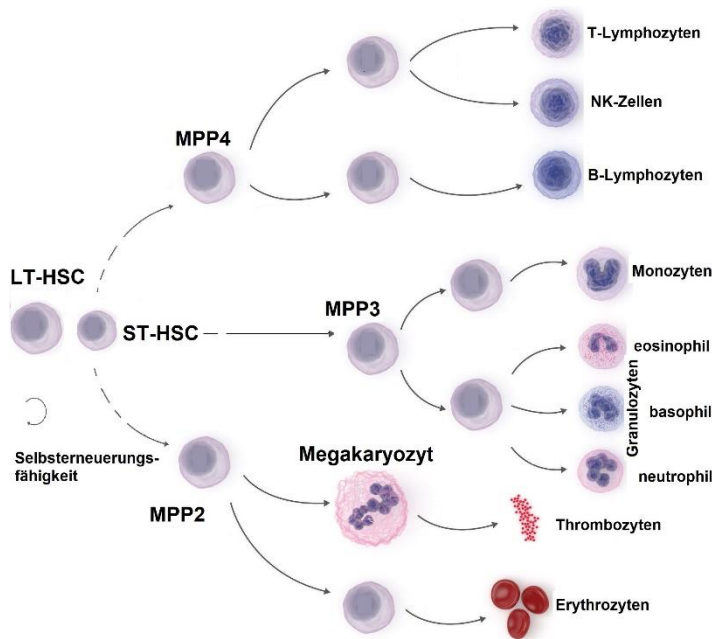
## 2. Einleitung

### 2.1. Hämatopoese – die Synthese der Blutzellen

Der erwachsene Mensch produziert innerhalb von 7 Jahren sein Körpergewicht in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Bei der adulten Maus wird 60% des Körpergewichts in 2 Jahren reproduziert (5). Täglich werden somit circa  $3,5 \times 10^{11}$  Erythrozyten gebildet, deren Lebensdauer ungefähr 120 Tage beträgt. Die Lebensdauer von Thrombozyten beläuft sich hingegen nur auf 10 Tage (6).

Verantwortlich für die Bildung der unterschiedlichen zellulären Blutbestandteile sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Sie sind in der Lage, sich zu allen Zellen des peripheren Blutes zu differenzieren (7). Der Hauptproduktionsort der hämatopoetischen Zellen ist das Knochenmark. In der sogenannten „*hämatopoetischen Nische*“ bilden sich unterschiedliche Vorläuferzellen (8-10). Aus den sich selbsterneuernden pluripotenten *longterm* HSC (11) entstehen unter dem Einfluss bestimmter Transkriptionsfaktoren die multipotenten *shortterm* HSC sowie die weiter differenzierten multiplen Vorläuferzellen (*multiple progenitors*; MPP) (12). Die MPPs werden in 4 Gruppen unterteilt. Die MPP1 Zellpopulation fungiert dabei als letzter gemeinsamer Vorfahre aller Zellen des strömenden Blutes aus denen sich die Populationen der MPP2-4 entwickeln (13). Die MPP4 Zellen zeigen ein lymphatisches Proliferationspotential (CLP) (14, 15). Aus ihnen entstehen B- und T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie gehören zu den lymphatischen Leukozyten und sind Bestandteil des Immunsystems (14). Während NK-Zellen zur angeborenen Immunantwort gehören und, z.B. Virus-infizierte Zellen erkennen und abtöten (16), sind T-Zellen Teil des adaptiven Immunsystems und wandern nach ihrer Bildung in den Thymus, wo sie zu CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>- T-Zellen ausreifen (17). B-Lymphozyten entwickeln sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (18). MPP2 und MPP3 untergliedern sich entlang der myeloischen Reihe und werden deshalb häufig als *common myeloid progenitors* (CMP) zusammengefasst (15, 19). Aus den MPP3 Zellen differenzieren sich myeloische Leukozyten, hauptsächlich Granulozyten und Monozyten. Sie sind zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Anhand ihres Färbeverhaltens können die Granulozyten in 3 Gruppen untergliedert werden: **i)** neutrophile Granulozyten, **ii)** eosinophile Granulozyten sowie **iii)** basophile Granulozyten (20). Monozyten gehören zu den größeren Typen der Leukozytenarten. Sie können die Strombahn verlassen (Diapedese) und differenzieren

sich im peripheren Gewebe zu Makrophagen. Diese phagozytieren Pathogene und präsentieren Pathogenbruchstücke über den MCH II Proteine (*major histocompatibility complex II*) für T-Zellen (21-23). Die megakaryozytäre-erythrozytäre Zellreihe entsteht aus der MPP2 Zellpopulation. Aus diesen Zellen gehen sowohl die Thrombozyten als auch die Erythrozyten hervor (19). Auf die Erythropoese wird im folgenden Abschnitt (2.2.) näher eingegangen. Thrombozyten sind bei der Hämostase, der Wundheilung sowie der Angiogenese beteiligt (24, 25).



**Abb. 1: Vereinfachte schematische Übersicht der Hämatopoese mit Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungslinien.**

Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema der Hämatopoese ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen (LT-/ST-HSC) über die multiplen Vorläuferzellen (MPP2-4) hin zu den reifen Zellen des strömenden Blutes. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

LT-HSC: longterm hematopoietic stem cells, ST-HSC: shortterm hematopoietic stem cells; MPP2-4: multiple progenitors; NK-Zellen: natürliche Killerzellen. Die Abbildung wurde modifiziert nach (2).

## 2.2. Grundzüge der Erythropoese

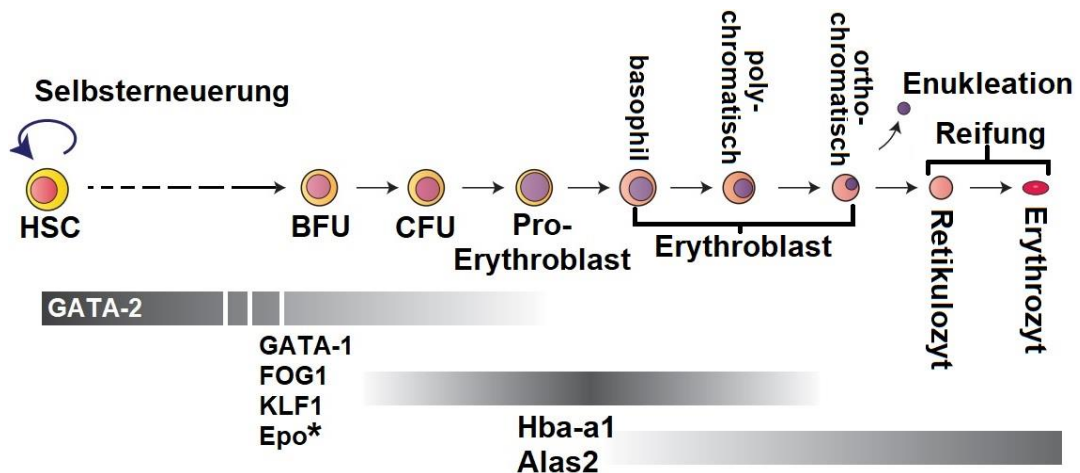
Der Begriff *Erythropoese* stammt aus dem Griechischen und beschreibt die Bildung der Erythrozyten (rote Blutzellen). Das menschliche Blut beinhaltet ca.  $5 \cdot 10^6$  Erythrozyten pro Mikroliter. Bezogen auf das gesamte Blutvolumen eines einzelnen Menschen von ca. 6 L bedeutet dieser Wert, dass ein Mensch  $3,6 \times 10^{13}$  Erythrozyten in sich trägt (26). Damit sind die Erythrozyten nicht nur die häufigsten Zellen im strömenden Blut, sondern stellen auch die häufigsten Körperzellen des menschlichen Organismus dar. Die durchschnittliche Lebensdauer eines Erythrozyten beträgt 115 - 120 Tage (27). Reife menschliche Erythrozyten sind kernlos, haben einen Durchmesser von ungefähr 6 – 8  $\mu\text{m}$  und sind durch eine bikonkave Form charakterisiert. Diese Form führt zu einer großen Oberfläche, was für den Austausch der Atemgase besonders vorteilhaft ist. Sie sind passiv elastisch verformbar, was es ihnen erlaubt, engere Blutkapillaren zu passieren (26).

Aus ontogenetischer Sicht beginnt die Erythropoese als *primitive Erythropoese* in den *blood islands* des Dottersacks. Bei der Maus geschieht dies am Tag 7.5 (E7.5) (28), beim Menschen ungefähr am 16. – 20. Tag nach Befruchtung (29, 30). Die ersten im Dottersack entstehenden megaloblastären Erythrozyten werden als *primitive Erythrozyten* beschrieben. Es handelt sich vornehmlich um kernhaltige Zellen mit embryonalem Hämoglobin (31, 32). Mit Beginn der ersten Herzschläge (~E8.25 bei der Maus) kommt es zur Verbreitung der primitiven Erythroblasten im embryonalen murinen Blutstrom (33). In dem als „zweite Welle“ der Hämatopoese beschriebenen Entwicklungsschritt erfolgt die Bildung der Erythro-Myeloiden-Vorläuferzellen (*erythro-myeloid-progenitors*, EMP) in der embryonalen Leber. Hier beginnt bei Mäusen die *definitive Erythropoese* (34, 35). Beim Menschen lassen sich erste EMPs am Tag 23 detektieren. Nach Ausreifung und Migration der hämatopoetischen Stammzellen in die Leber bilden sich dann die *definitiven Erythrozyten* (36, 37). Im Gegensatz zu den *primitiven Erythrozyten* des Dottersacks ist die *definitive Erythropoese* abhängig von der Induktion durch das Glykoprotein Erythropoetin (Epo). Beide Formen benötigen Epo jedoch zur weiteren Entwicklung (38, 39).

Die *definitive Erythropoese* beginnt in der fetalen Leber und setzt sich dann nach der Geburt im Knochenmark fort (40). Es kommt sowohl in der Maus als auch beim Menschen zum Wechsel der Hämoglobin-Ketten (engl: *switch*). Im murinen hämatopoetischen System erfolgt ein *switch* von der embryonalen ( $\alpha_2\gamma_2$ ) zur adulten ( $\alpha_2\beta_2$ ) Form des Hämoglobins (41, 42), während beim Menschen ein *switch* vom embryonalen zum fetalen Hämoglobin ( $\alpha_2\gamma_2$ ; HbF) zwischengeschaltet ist (43). Dies ermöglicht eine effizientere Sauerstoffbindung (26). Von der Geburt bis etwa zum 6. Lebensmonat findet beim Menschen ein erneuter *switch* vom fetalen zum adulten Hämoglobin ( $\alpha_2\beta_2$ ; HbA) statt (44). Die Stammzellen migrieren kurz vor der Geburt von der Leber ins Knochenmark, dem adulten Sitz der Hämatopoese/Erythropoese. In der Maus erfolgt zudem die Migration der Zellen in die Milz (40). Die Erythropoese im adulten Knochenmark setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors GATA-2 zu den *multiple progenitors*, den MPPs (45, 46). Die MPP2 Population stellt dabei die Vorläufer mit erythrozytären-megakarzyotären Potential (common myeloid progenitor) dar (15). Durch die Aktivierung des Zinkfinger-Motivs von GATA-1 kommt es zur Differenzierung entlang der erythropoetischen Reihe (47-49). Zusammen mit FOG1 (*friend of GATA 1*) hemmt

GATA-1 die Expression von GATA-2 und initiiert so den Beginn der Erythropoese (50, 51). Aus den MPP2 Zellen entstehen die *burst forming units-erythrocyte* (BFU-E) sowie die *colony-forming-unit-erythrocyte* (CFU-E). Unter dem gemeinsamen Einfluss von GATA-1 und Erythropoetin (Epo) bilden sich Erythroblasten-Kolonien (auch: *erythroblastic islands*), die ersten Vorläufer der Erythrozyten (52). Die *erythroblastic islands* bestehen aus zentralen Makrophagen und einer Anzahl von umgebenden Erythroblasten (meist 5 – 20), die unterschiedliche Reifungsstadien repräsentieren (53). Die Proerythroblasten reifen zu Erythroblasten heran. In den darauffolgenden Entwicklungsschritten kommt es zu einer progredienten Abnahme des Zellvolumens. Die initial basophilen Zellen werden zunehmend azidophil, das Chromatin kondensiert und der Nucleus wird zusammen mit einem Teil der den Zellkern umgebenden Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Ribosomen) ausgestoßen. Nach der Ausstoßung des Zellkerns verbleiben jedoch eine große Anzahl von Mitochondrien in den Zellen, die im weiteren Verlauf der Erythropoese durch zytosolische Prozesse abgebaut werden. Beteiligt an dieser intrazellulären Degradation der Mitochondrien in den ausreifenden Zellen ist auch die Alox15 (54). Der ausgestoßene Zellkern und die ihn umgebenden Zellorganellen werden von Makrophagen phagozytiert (55, 56). Mit zunehmender Reifung der Erythroblasten kommt es zur Anreicherung von Hämoglobin (57). Der Transkriptionsfaktor EKLF (*Erythroid Kruppel-like factor*) ist hierbei wichtig für die Expression der  $\beta$ -Globin Gene (58). Weitere Gene, die hierbei exprimiert werden, sind die  $\delta$ -Aminolävulat-Synthetase 2 (Alas2), welche den initialen Schritt der Hämsynthese katalysiert (59). Außerdem wird die Expression der Hämoglobin alpha Kette (Hba-a1) initiiert (60). Nach der E nukleation werden die entstandenen Zellen als Retikulozyten bezeichnet. Sie sind die unmittelbaren Vorläuferzellen der Erythrozyten und verbleiben noch rund 3 Tage im Knochenmark, bevor sie ins strömende Blut abgegeben werden. Hierbei verlieren sie weiterhin an Volumen durch den Abbau weiterer Zellorganellen (61). Der gesamte Reifungsprozess vom Retikulozyten zum Erythrozyten beträgt somit rund 4 – 5 Tage (62, 63). Zusammen mit dem Zellkern werden bei der Reifung der Erythroblasten zu Retikulozyten auch die meisten Mitochondrien aus der Zelle entfernt. Trotzdem verfügen junge Retikulozyten noch über funktionelle Mitochondrien und Kaninchenretikulozyten synthetisieren noch bis zu 80 % ihres ATP über die mitochondriale Atmung. Alte Retikulozyten und reife Erythrozyten besitzen keine funktionellen Mitochondrien mehr und sind für ihre ATP Synthese vollständig auf die ineffiziente Glykolyse angewiesen. Die Prozesse, die zum intrazellulären Abbau der

Mitochondrien im Rahmen der Retikulozyten-Erythrozyten-Transition beitragen, sind von Rapoport und Mitarbeitern intensiv untersucht (64, 65) worden und führten zur Entdeckung der erythroid-spezifischen ALOX15, die als wichtiges Enzym im Rahmen der späten Erythropoese identifiziert wurde. Dieses Enzym ist in der Lage, die Lipide der Mitochondrienmembran zu oxygenieren, was zum Funktionsverlust der Zellorganellen führt (66) und die Membranen suszeptibel für einen proteolytischen Abbau macht (67).



**Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der späten Schritte der Erythropoese.**

Dargestellt sind die einzelnen Schritte der späten Erythropoese. Ausgehend von den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) kommt es über mehrere Differenzierungsschritte (nicht dargestellt) zur Bildung von BFU und CFU über die verschiedenen Stufen zum reifen Erythrozyten. Die grauen Balken repräsentieren die Zeitabschnitte in denen die Transkriptionsfaktoren (**fett**) sowie Zytokine (\*) aktiv sind.

HSC: hematopoietic stem cell; BUF: burst forming unit; CFU: colony forming unit; FOG1: friend of GATA-1; KLF1: Kruppel-like factor 1; Epo: Erythropoetin; Hba-a1: Hämoglobin alpha 1 Kette; Alas2:  $\delta$ -Aminolävulatsynthetase 2. Die Abbildung wurde modifiziert nach (26, 68).

### 2.3. Murine Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen)

Bei murinen Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen) handelt es sich um eine permanent erythroide Zelllinie, bei der erythroide Vorläuferzellen der murinen Milz mit dem murinen Leukämie-Virus (auch *Friend Virus*) infiziert wurden. Die Erstbeschreibung erfolgt durch Charlotte Friend im Jahr 1957. Friend untersuchte hierbei die Theorie, dass leukämische Erkrankungen viral übertragen werden können (69). Das *Friend Virus* gehört zu den Retroviren und wird zur Konstruktion replikationskompetenter Vektoren verwendet. Unter anderem ist es Modell-Virus zur Untersuchung von Leukämieerkrankungen (70). Nach Gewinnung der ersten kultivierbaren Zellklone aus der Milz infizierter Tiere konnten konfluente Zellkulturen angelegt werden (71). Diese konnten sich spontan entlang der erythroiden Reihe bis hin zum Erythroblasten differenzieren (72). In den kommenden Jahren stellte sich heraus, dass das *Friend Virus* zwei Phänotypen in den infizierten Zellen hervorbringen kann. Die Arbeitsgruppe um Mirand konnte zeigen, dass der 1957

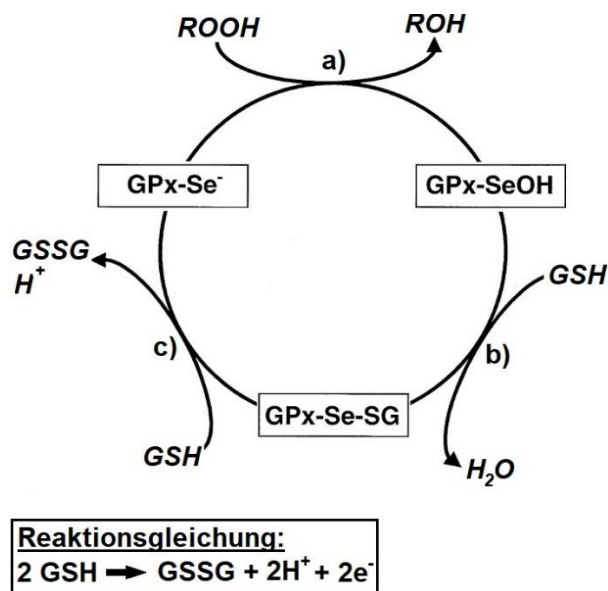
von Friend beschriebenen Stamm eine Anämie in den infizierten Tieren induziert. Sie betitelten den Stamm somit mit FV A (*friend virus anemia*). Andere Zellfiltrate hingegen wiesen eine vermehrte Polyzythämie (FV P) auf (73, 74). Eine grundlegende Unterscheidung der Stämme resultierte aus der Reaktion auf das Glykoprotein Erythropoetin (Epo). Während der FV A Stamm Epo-sensibel ist, zeigen Zellen, die mit FV P infiziert wurden, eine Epo-unabhängige Erythropoese (74, 75). Anstatt mit Erythropoetin können diese Zellen mit Hilfe verschiedener Chemikalien, z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) (76), Hexamethylen Bisacetamid (HMBA) (77) sowie durch Fettsäuresalze wie Buttersäure (78) oder auch Retinsäure (79), zur Differenzierung entlang der erythroiden Reihe angeregt werden. Die Zellen verlassen durch die Induktion das Stadium der Vorläuferzellen und es kommt zur Bildung von Hämoglobin, einer vermehrten Aufnahme von Eisen (Friend, Schere, 1971), einer vermehrten Expression von Globin mRNA (80, 81), der Expression der  $\delta$ -Aminolävulats-Synthetase (82) sowie der Ausbildung von Erythrozyten-spezifischen Membranproteinen wie Spectrin (83). Da diese Stadien auch während der *in vivo* Erythropoese durchlaufen werden, wurde dieses Zellmodell für mechanistische Untersuchungen zur erythroiden Differenzierung eingesetzt. Durch die *in vitro* Kultivierung der MEL-Zellen unter bestimmten experimentellen Bedingungen kann ein Reifungsstadium erreicht werden, welches dem murinen orthochromatischen Normoblasten (Erythroblasten) sehr ähnlich ist (84).

Auch in der jüngeren Zeit wurden MEL-Zellen zum Verständnis der morphologischen Veränderungen, die bei der terminalen erythroiden Differenzierung auftreten, herangezogen (85, 86). So konnten die Mechanismen näher untersucht werden, welche der Wirkung der Transkriptionsfaktoren GATA-1 und PU.1 im Rahmen der Erythropoese zugrunde liegen (87, 88). Neben der Erforschung von Erythropoese-bezogenen Themen dienen die Zellen auch zur Entwicklung eines allogenen Maus-Modells in der Krebsforschung und somit auch bei der Entwicklung von Medikamenten (89).

### 2.4. Glutathionperoxidasen

Glutathionperoxidasen bilden eine Familie von Oxidoreduktasen von denen einige Isoformen Selenoproteine sind. Das humane Genom enthält 8 verschiedene GPX Gene, wobei die GPX1, GPX2, GPX3 und GPX4 Gene für Enzyme kodieren, die ein Selenion am aktiven Zentrum tragen. Die humanen GPX5, GPX7 und GPX8 Gene kodieren für Cystein enthaltene Enzyme. Die menschliche GPX6 ist ebenfalls ein Selenoprotein,

während das orthologe Enzym der Maus Cystein enthält. Das Spurenelement Selen ist hierbei eine wichtige funktionelle Komponente des aktiven Zentrums und liegt dort als Selenocystein vor (90). Selenoproteine sind in verschiedenen Lebewesen zu finden. Sie spielen eine Rolle bei der zellulären Redox-Homöostase sowie als Modulatoren der Redox-regulierten Signaltransduktion in Zellen (91). Bislang konnten 25 humane und 24 murine Selenoproteine identifiziert werden. Sie werden in vielen Geweben exprimiert und sind evolutionär hochgradig konserviert (92). Glutathionperoxidasen katalysieren die Reduktion von organischen sowie anorganischen Hydroperoxiden, wobei hauptsächlich Glutathion als Reduktionsmittel fungiert. So unterstützen diese Enzyme z.B. die Reduktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Wasser (93). Die Gpx-Reaktion lässt sich in mehrere Schritte unterteilen (Abb.3). Im ersten Schritt wird das Spurenelement Selen, welches dissoziiert als Selenol im Enzym ( $Gpx-Se^-$ ) vorliegt, zu Selenensäure ( $SeOH$ ) oxidiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Reduktion durch einen Elektronendonator, meist Glutathion. Es kommt zur Bildung eines gemischten Selendisulfid ( $Gpx-Se-SG$ ), welches von einem zweiten Glutathion gespalten wird. Hierbei wird das Selendisulfid zum Selenol ( $Gpx-Se^-$ ) rückreduziert, wobei oxidiertes Glutathiondisulfid ( $GS-SG$ ) entsteht (94-97).

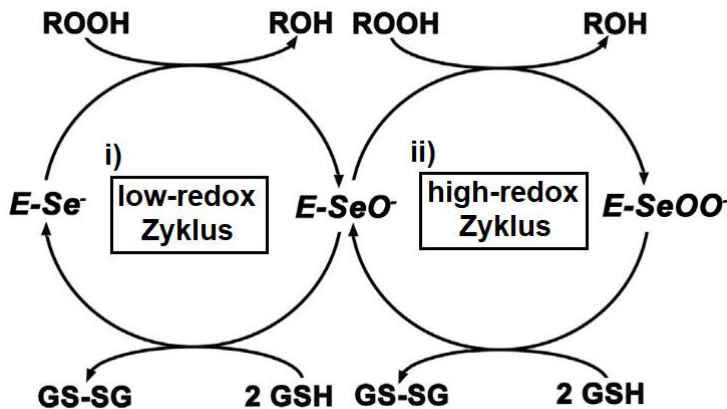


**Abb. 3: Der Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen.**

a) Im ersten Schritt der Reaktion wird das Hydroperoxid (**ROOH**) zu einem Alkohol (**ROH**) reduziert, wobei das dissoziierte Selenol (**GPx-Se<sup>-</sup>**) intermediär zur Selensäure (**GPx-SeOH**) oxidiert wird. b) Der Elektronendonator Glutathion (**GSH**) bindet unter Wasserabspaltung (**H<sub>2</sub>O**) das Selensäure-Derivat unter Bildung eines gemischten Selendisulfids (**GPx-Se-SG**). c) Das gemischte Selendisulfid wird durch ein zweites Molekül Glutathion wieder zum Selenol reduziert, wobei oxidiertes Glutathion (**GSSG**) entsteht. Die dabei entstehende Selenolform der Gpx kann nun einen weiteren katalytischen Zyklus initiieren. Die Reduktion des bei der Gpx-Reaktion entstandenen oxidierten Glutathions erfolgt durch die Glutathion-Reduktase unter NADPH/H<sup>+</sup>-Verbrauch. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kühn und Borchert (98).

Erst vor Kurzem konnte die Kristallstruktur der Selenocystein-enthaltenen humanen GPX4 aufgeklärt werden (99). Hierbei stellte man fest, dass das Selen weder als Selenol (S-H) noch als Selensäure (S-OH) vorliegt, sondern auf der Redoxstufe der Seleninsäure (S-OOH). Aus diesen Daten wurde ein möglicher alternativer Reaktionsmechanismus

abgeleitet (Abb.4), der aus zwei miteinander verbundenen katalytischen Zyklen besteht. Dabei repräsentiert der *low-redox* Zyklus den oben gezeigten „konventionellen“ Reaktionsmechanismus. Dieser ist über die Selenensäure-Form der Gpx (Gpx-SeOH) mit dem *high-redox* Zyklus verbunden, in dem das Enzym zwischen seiner Selenensäure- und seiner Seleninsäure-Form hin und her shuttled, je nach zellulärem Redoxstatus (99).



**Abb. 4: Möglicher alternativer Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen.**

i) Der *low-redox* Zyklus entspricht in den Abläufen dem in Abb.3 gezeigten konventionellen Reaktionsmechanismus, während der ii) *high-redox* Zyklus unter zellulären oxidativem Stress ablaufen könnte. Es wird postuliert, dass das Enzym, je nach zellulärem Redoxstatus, zwischen Selenensäure (Se-O<sup>-</sup>) und Selenol (Se<sup>-</sup>) [*low-redox* Zyklus] und zwischen Selenensäure (Se-O<sup>-</sup>) und Seleninsäure (Se-OO<sup>-</sup>) hin- und her shuttled kann. E: Abkürzung für das Gpx4 Enzym; GSH: Glutathion; GS-SG: oxidiertes Glutathion, ROOH: Hydroperoxid; ROH: Alkohol. Die Abbildung wurde modifiziert nach (99).

### 2.4.1. Überblick über die Glutathionperoxidasen

Zum jetzigen Zeitpunkt sind beim Menschen 8 Glutathionperoxidasen identifiziert (100). Die Glutathionperoxidase 1 (Gpx1) wurde im Jahr 1957 bei der Untersuchung der Auswirkung von oxidativem Stress auf Hämoglobin erstmals beschrieben. Sie bildet zusammen mit der Katalase einen Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems der Erythrozyten (101). Neben den Erythrozyten erfolgte ein Nachweis des Enzyms auch in der Leber sowie den Mitochondrien der Ratte (102). Weitere Untersuchungen zeigten, ein Vorkommen des Enzyms vor allem im Zytoplasma, so dass die Gpx1 in der veralteten Nomenklatur auch als cytosolische Glutathionperoxidase (cGpx4) bezeichnet wurde. Sie ist Teil des antioxidativen Schutzsystems fast aller Zellen und reguliert gemeinsam mit der Katalase den zellulären Spiegel an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (103-105). Bei Versuchen zu Allergen-induzierten Atemwegsinfektionen ließ sich eine veränderte T-Zell-Differenzierung nachweisen (106), was auf eine Rolle der Gpx1 bei der Immunregulation hindeutet.

Die Glutathionperoxidase 2 (Gpx2) wird auch als gastrointestinale-Gpx (Gpx-GI) bezeichnet, da sie hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt sowie im Ösophagusepithel exprimiert wird. Beim Menschen ist sie zudem in der Leber nachgewiesen worden (107).



Neben der Funktion als Schutz gegen Hydroperoxide scheint die Gpx2 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase einzunehmen (108). Eine Überexpression kann jedoch auch die Bildung kolorektaler Karzinome oder die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus begünstigen (108). Im hierarchischen Vergleich der Selenoproteine nimmt sie einen hohen Stellenwert ein, da sie auch bei starkem Selenmangel auf hohem Niveau exprimiert wird (109). Die Glutathionperoxidase (Gpx3) wird auch als plasmatische (pGpx) oder extrazelluläre Glutathionperoxidase (EGpx) bezeichnet. Anders als die Gpx1 und Gpx2 handelt es sich hierbei um ein sekretiertes Glykoprotein (110). Der Hauptexpressionsort der Gpx3 ist der proximale Tubulus der Niere sowie die Parietalzellen der Bow'man'schen Kapsel (111-113). Weiterhin wurde die Gpx3 im männlichen Reproduktionstrakt der Maus (114), in Thyreozyten (115), im Fettgewebe (116) sowie im Gastrointestinaltrakt (117) nachgewiesen. Als sezernierendes Protein konnte die Gpx3 während der Embryogenese im Dottersack sowie in der Amnionflüssigkeit detektiert werden (118). Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4 oder Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase, phGpx) ist im Jahr 1982 im Zytoplasma der Schweineleber erstmalig beschrieben worden (119). Das Enzym wird im folgenden Kapitel eingehender besprochen. Die Glutathionperoxidase 5 (Gpx5) wurde im Jahr 1990 bei der Transkriptomanalyse von murinen Nebenhoden entdeckt. In anderen Geweben war das zugehörige Transkript nur in Spuren nachweisbar (120). Kurze Zeit später ist die Zugehörigkeit des entsprechenden Enzyms zu den Glutathionperoxidasen bestätigt worden (121). Sie gehört zu den Cys- enthaltene Gpx Isoformen und repräsentiert bei Ratten, Schweinen, Mäusen, Affen und Menschen mehr als 90 % der epididymalen Gpx Isoformen. Sie reguliert die Hydroperoxidkonzentration im *Caput epididymis* (122). Die Glutathionperoxidase 6 (Gpx6) ist Bestandteil des olfaktorischen Systems und ist in der *Glandula olfactoriae* auf hohem Niveau exprimiert. In dieser Region werden Geruchsstoffe abgebaut, nachdem sie ihre Signaltransduktion ausgelöst haben (123). Sie ist, wie die plasmatische Gpx (Gpx3), ein Homotetramer. Bei Mäusen und Ratten trägt die Gpx6 ein Cystein (Cys) anstatt eines Selenocysteins (Sec) (92). Weiterhin zeigt sich eine vermehrte Expression der Gpx6 in der Cochlea von Nagern und wird mit dem altersbedingten Hörverlust in Verbindung gebracht (124). Die Glutathionperoxidase 7 (Gpx7) entdeckte man im Jahr 2004. Sie enthält ein Cystein (Cys) anstatt eines Selenocysteins (Sec) und wurde initial als zytoplasmatisches Protein beschrieben. Durch die starke Ähnlichkeit mit der Gpx4 wurde die Gpx7 initial als Non-Selenocystein PHGpx (NPGPx) bezeichnet (125). In den letzten Jahren konnte das

Funktionsspektrum der Gpx 7 eingehender untersucht werden. So führt eine Verminderung der Expression der Gpx7 zur vermehrten Karzinogenese beim Ösophagus- und Magenkarzinoms (126-128). In einer phylogenetischen Studie zu den verschiedenen Angehörigen der Gpx-Familie entdeckte man 2008 die Glutathionperoxidase 8 (Gpx8). Sie zeigte eine enge Verwandtschaft zur Gpx7, jedoch konnte ihre funktionelle Rolle bislang noch nicht genau festgelegt werden (100).

**Tabelle 1: Auflistung der verschiedenen Isoformen der humanen Glutathionperoxidasen**

<b>Isoform</b>	<b>weiterer Name</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Erstbeschreibung</b>
Gpx 1	cytosolische Gpx (cGpx)	Erythrozyten; Zytoplasma, Mitochondrien (ubiquitäres Vorkommen; murin und human)	(101, 103)
Gpx 2	gastrointestinale Gpx (GI-GPX)	GI-Trakt (murin und human)	(107)
Gpx 3	plasmatische Gpx (pGPx) auch: extrazelluläre Gpx (EGpx)	Blutplasma; proximaler Tubulus der Niere; Lunge; Fettgewebe, GI-Trakt; Epididymis	(110-112, 114-116, 129)
Gpx 4	Phospholipid-Hydroperoxid-Gpx (phGpx)	Leber; männlicher Reproduktionstrakt; Retina; hämatopoetisches System; ...	(119, 130-132)
Gpx 5	epididymale Gpx	männlicher Reproduktionstrakt	(120)
Gpx 6		olfaktorisches Epithel; Cochlea	(123, 124)
Gpx 7	non-Seleno-PH-Gpx	Brustdrüse, Magen, Ösophagus	(125)
Gpx 8		endoplasmatisches Retikulum	(133)

Tabellarische Darstellung der verschiedenen Isoformen der Glutathionperoxidasen und deren Lokalisation. GI: gastrointestinal.

Im Jahr 2011 wurden sowohl die Gpx7 als auch die Gpx8 als sezernierte Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) identifiziert. Beide Peroxidasen sollen eine Rolle bei der Bildung von Disulfid-Bindungen von Exportproteinen und bei der Proteinfaltung spielen. Weiterhin wird der Einfluss der Gpx8 auf den Calciumfluss diskutiert (133, 134). Zudem spekuliert man über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von Gpx7 und Gpx8 in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 (135).

#### **2.4.2. Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) – ein Repräsentant der Glutathionperoxidasen mit besonderen Eigenschaften**

Schon bald nach ihrer Entdeckung im Zytosol von Schweinehepatozyten im Jahr 1982 wurde klar, dass die Phospholipid-Hydroperoxid Glutathionperoxidase (phGpx oder

Gpx4) eine Sonderstellung unter den Glutathionperoxidasen einnimmt. Das monomere Enzym ist in der Lage, neben Wasserstoffperoxid, auch komplexere Hydroperoxide zu reduzieren und wurde initial als „Lipidperoxidation inhibierendes Protein“ (lipid peroxidation inhibiting enzyme, PIP) bezeichnet (119). Im Verlauf zeigt sich, dass auch komplexe Hydroperoxyfettsäuren aus Biomembranen sowie Peroxide von Cholesterol und Cholesterolestern als Substrate der pHGpx fungieren (119, 136). Eine weitere Besonderheit des Enzyms wurde bei Untersuchungen der Spermatogenese festgestellt. Für diese Gpx-Isoform dient nicht nur das Tripeptid Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel, sondern auch andere Thiole können als Elektronendonatoren genutzt werden (137, 138). Als dritte Besonderheit sollte an dieser Stelle der *moonlighting* Charakter der Gpx4 erwähnt werden. Obwohl die Gpx4 als effizientes Peroxid-reduzierendes Enzym in Erscheinung tritt, wirkt sie gleichzeitig als Strukturprotein, welches bei der Bildung der mitochondrialen Kapsel im Mittelstück von Spermien eine wichtige Rolle spielt (138).

### **2.4.2.1. Struktur, Isoformen und Funktionen der Gpx4**

#### **2.4.2.1.1. Struktur**

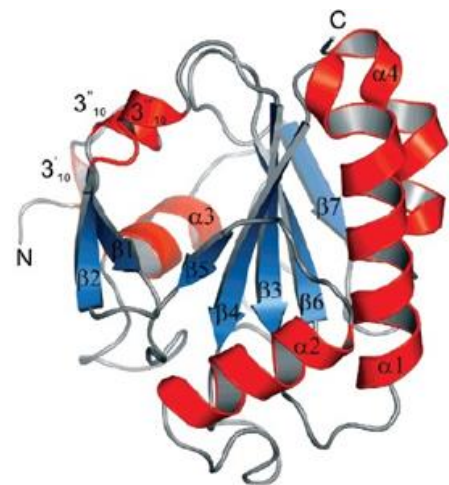
Die Glutathionperoxidase 4 wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Dazu gehören Leber, Herz, Nieren, Lunge sowie Gehirn und braunes Fettgewebe. Die höchste Expression zeigt die Gpx4 jedoch im Testis (139-141). Beim Menschen ist das GPX4 Gen auf Chromosom 19 lokalisiert. Das orthologe murine Gen wurde in einer synthenischen Region auf dem Chromosom 10 lokalisiert (105). Entgegen der Tetramerstruktur der anderen Glutathionperoxidasen liegt die Gpx4 als Monomer mit einem Molekulargewicht von 18 kD vor (142). Durch Homologiemodelle, die auf Basis der Röntgenstrukturkoordinaten der Gpx1 erstellt werden, konnten erste Informationen zur Raumstruktur der humanen GPX4 und zur räumlichen Lage katalytisch relevanter Aminosäuren erhalten werden (143-145). Weiterhin halfen Mutationsanalysen die katalytische Triade aus Selenocystein, Glutamin sowie Tryptophan zu beschreiben (146). Genauere Daten zur Raumstruktur dieses Enzyms ergaben sich, als die katalytisch aktive Sec46Cys Mutante der humanen GPX4 kristallisiert und hinsichtlich ihrer Raumstruktur aufgeklärt wurde. Die Gpx4 kommt als monomeres Enzym vor und besteht aus 170 Aminosäuren (1). Durch die direkten Strukturdaten wurde das postulierte Thioredoxin-Motiv, das aus 7  $\beta$ -Faltblättern und 4  $\alpha$ -Helices besteht (147), bestätigt. Die katalytische

Triade befindet sich in einer flachen Grube an der Enzymoberfläche (1). Im Vergleich zu anderen Gpx-Isoformen, insbesondere zur Gpx1, zeigte sich, dass die Gpx1 um 120 Aminosäuren größer ist. Einige dieser zusätzlichen Aminosäuren bilden eine Ringstruktur, welche die katalytische Triade teilweise abschirmt. Die Gpx4 weist diesen Ring nicht auf, wodurch das katalytische Zentrum frei liegt, so dass auch komplexere Substrate binden können. Diese strukturelle Besonderheit könnte die breitere Substratspezifität der Gpx4 erklären (1). Zudem wird diese Ringstruktur als bedeutsam für die Oligomerisierung der anderen Gpx-Isoformen diskutiert (148).

In neueren Untersuchungen ist es zudem gelungen, die Kristallstruktur der Selen-enthaltenden Gpx4 zu identifizieren. Die Gpx4 stellt sich hier als monomeres Enzym mit einem Gewicht von 23,3 kDa dar (99). Trotz einiger kleinerer Differenzen präsentiert sich die Selen-enthaltende Gpx4 ähnlich dem von Scheerer et al. mit Sec46Cys substituierte Protein (1). Ein struktureller Unterschied zwischen den beiden Gpx4-Varianten zeigte sich jedoch am aktiven Zentrum. Im Gegensatz zu der Selen-enthaltenden Variante scheint es bei der Sec46Cys Mutante der humanen Gpx4 zu einem größeren Abstand zwischen den Aminosäuren der katalytischen Triade zu kommen. Weiterhin stellt sich das katalytische Selen als Seleninsäure (SeOOH) dar und nicht, wie vorerst angenommen, als Selenol (S-H) oder als Selenensäure (S-OH) (99). Diese Erkenntnis deckt sich mit früheren Ergebnissen bei der Analyse der Gpx1, wo ebenfalls ein Shuttle zwischen Selenensäure und Seleninsäure postuliert wurde (149). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Entstehung der Seleninsäureform der Gpx4 um einen Kristallisationsartefakt handelt, der *in vivo* nicht vorkommt.

### 2.4.2.1.2. Isoformen

Insgesamt wurden 3 Isoformen der Gpx4 beschrieben. Sie werden alle vom gleichen Gen kodiert, wobei auf mRNA Ebene verschiedene Transkripte gebildet werden (150). Pushpa et al. konnten zeigen, dass für die Translation zwei unterschiedliche



**Abb. 5: Kristallstruktur der Sec46Cys Mutante der humanen Gpx4.**

Die peripheren  $\alpha$ -Helices sind rot, die zentralen  $\beta$ -Faltblätter sind blau markiert. Die Sekundärelemente sind konsekutiv durchnummeriert. Die Abbildung wurde modifiziert nach (1).

Startregionen auf der cDNA existieren. Die eine kodiert für die aus 170 Aminosäuren bestehende cytosolische Gpx4 (cGpx4) (151). Dieses Enzym hat ein Molekulargewicht von 18 kD (152) und wird sowohl in embryonalem als auch somatischen Gewebe exprimiert (153). Das Transkript, welches für die mitochondriale Isoform der Gpx4 (mGpx4) kodiert, besteht initial aus 197 Aminosäuren (151). Die 27 zusätzlichen Aminosäuren der mGpx4-Isoform enthalten eine Signalsequenz, die für den Import des Enzyms in die Mitochondrien verantwortlich ist (154). Diese Sequenz wird nach dem Import des Proteins in das Mitochondrium abgespalten, so dass sich die Molekülmasse von initial 23 auf ca. 20 kDa reduziert (152). Die mitochondriale Gpx4 wird hauptsächlich im Testis und während der embryonalen Entwicklung exprimiert (155, 156). Die dritte beschriebene Isoform der Gpx4 ist die nukleäre Isoform (nGpx4). Über ein alternatives erstes Exon wird eine Signalsequenz für den nukleären Import kodiert. Die nGpx4 hat eine Masse von ca. 34 kDa und ist vornehmlich im männlichen Reproduktionstrakt nachweisbar (132).

### **2.4.2.1.3. Biologische Funktionen**

Die Expression von Selenoproteinen im Allgemeinen wird u.a. durch das alimentäre Selenangebot reguliert und das gilt auch für die selenhaltigen Gpx-Isoformen. Vergleicht man die Expressionsniveaus der verschiedenen Gpx-Isoformen unter Selendefizienz miteinander zeigt sich eine Hierarchie. So wird die Gpx4 bei einem systemischen Selenmangel weiter auf normalem Niveau exprimiert, während die Expression der Gpx1 deutlich zurück geht (157). Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die Gpx4 im Gegensatz zur Gpx1 bei Selenmangel kaum herunterreguliert wird. Unter allen Gpx4-Isoformen nimmt nur die Gpx2 einen noch höheren Stellenwert in der Selenhierarchie ein (158). Neben dem breiten Substratspektrum weist die Gpx4 weitere funktionelle Besonderheiten auf, die sie eine Sonderstellung unter den Gpx-Isoformen einnehmen lässt. So spielt sie eine Rolle während der murinen Embryogenese und kann ab Tag 7.5 (E 7.5) im Dottersack nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass das Enzym sowohl eine Rolle beim anti-oxidativen Schutz von Membranen in dieser vulnerablen Zeit der Ontogenese spielt. Weiterhin scheint das Enzym bei der Zelldifferenzierung und bei der Regulation der Apoptose nicht mehr benötigter Zellen eine Rolle zu spielen (159, 160). In sich entwickelnden Mausembryonen können 10 Tage nach Befruchtung (E 10.5) alle drei Gpx4-Isoformen nachgewiesen werden. Wobei es deutliche Unterschiede im Expressionsniveau der verschiedenen Isoformen gibt. Diese

Unterschiede setzen sich auch im Verlauf der Embryogenese fort (156). Die präzise biologische Funktion der verschiedenen Gpx4 Isoformen im Rahmen der Ontogenese konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden (156). Es gibt jedoch überzeugende Hinweise darauf, dass das Enzym für die frühe Entwicklung des zentralen Nervensystems eine wichtige Funktion spielt (161). Bereits im Jahr 1991 konnte die Expression der Gpx4 im Zytoplasma, den Zellkernen sowie den Mitochondrien reifender Spermien nachgewiesen werden (142). Hierbei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Testosteronmenge in der Pubertät und der Menge des Enzyms (162). Im Verlauf fand man heraus, dass die Gpx4 neben ihrer Funktion als lösliche Peroxidase auch als Strukturprotein im Mittelstück der reifen Spermien zu finden ist. In diesen Zellen ist das Protein beim Aufbau der mitochondrialen Kapsel beteiligt (138), wobei vor allem die mitochondriale Isoform der Gpx4 involviert zu sein scheint. Neben ihrer enzymatischen Funktion sorgt sie als Bestandteil des Mittelstücks für die Motilität der Spermien (*moonlighting* Charakter = doppelte Funktion). Ein Knockout der mitochondrialen Gpx4 führt zur Infertilität (155). Man geht davon aus, dass dieser Defekt von mGpx4 defizienten Tieren auf erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen ist, was eine verminderte Motilität der Spermien zur Folge hat (163). Für die Stabilisierung des Chromatins während der Kondensation in den Spermien ist die nukleäre Isoform der Gpx4 verantwortlich. Ein isolierter Knockout führt jedoch nicht zur Infertilität (164). Verantwortlich hierfür ist vermutlich die gleichzeitige Expression der Gpx5 (122). Weiterhin hat die Gpx4 einen Einfluss auf den Arachidonsäurestoffwechsel. Die katalytischen Aktivitäten der Alox5 (165) sowie Alox15 (166) werden durch die Expression der Gpx4 reguliert. Der molekulare Mechanismus dieser Aktivitätsregulation beruht darauf, dass die Gpx4 den zellulären Peroxidspiegel reduziert und damit einen essenziellen Aktivator (Hydroperoxide) aller ALOX-Isoformen beseitigt. Damit kontrolliert die Gpx4 indirekt die katalytische Aktivität der ALOX-Isoformen (165, 167). So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der Gpx4 zu einer Hemmung der Alox5 führt, was durch eine verminderte Leukotrienbiosynthese nachgewiesen werden konnte (168). Im Umkehrschluss erkannte man, dass ein Mangel an Gpx4 zu einer erhöhten Aktivität der Alox15 führt. Die gesteigerte Lipidperoxidation bewirkt über die Aktivierung von AIF (apoptosis-inducing factor) dann den Zelltod (169).

Ein Selenmangel bei Mäusen führt zu einer vermehrten Denaturierung von Hämoglobin, einem Anstieg der Lipidperoxidation sowie einer erhöhten osmotischen

Fragilität der Erythrozyten (170). Da Selen jedoch Bestandteil mehrerer verschiedener Selenoproteine ist, ließ sich aus den Daten nicht ableiten, welche Proteine für diesen Effekt verantwortlich sind. Trotzdem wurde eine mögliche Beteiligung der Gpx4 bei der Erythropoese diskutiert (170). Bestätigt wurde diese Hypothese durch einen induzierbaren Gpx4 Knockout im erythropoetischen System (130). Der Verlust der Gpx4 führte zu einer Anämie sowie zu einem kompensatorischen Anstieg der Retikulozyten. Weiterhin zeigten sich Hinweise für die Zunahme der extramedullären Erythropoese. Weitere Untersuchungen deuteten an, dass die Gpx4 darüber hinaus an der Retikulozytenreifung sowie der Stresserythropoese beteiligt ist (171). In den letzten Jahren tauchten in der Literatur vermehrt Berichte darüber auf, dass die Gpx4 eine Schlüsselrolle bei der Ferroptose spielt. Bei diesem Prozess handelt es sich um eine Eisen-abhängige Form des programmierten Zelltods, welche durch einen Funktionsverlust der Gpx4 und die Anhäufung von Lipidhydroperoxiden charakterisiert ist (172). Über die Ferroptose kann die Gpx4 in Zusammenhang mit anderen physiologischen und pathologischen Prozessen gebracht werden. So verhindert die Gpx4 das vermehrte Auftreten von Neurodegenerationen im Vorderhirn, die mit der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden (173). Weiterhin hemmt sie die Degeneration von Motorneuronen (174) sowie von Leberzellen (175) und wirkt protektiv beim akuten Nierenversagen (176). Derzeit wird international verstärkt an der Entwicklung spezifischer Hemmstoffe für die Gpx4 geforscht. Diese sollen dann, z.B. in der Krebstherapie eingesetzt werden. Da die Gpx4 anti-apoptotisch wirkt, könnten diese Hemmstoffe die Apoptose verstärkt induzieren, um so Krebszellen gezielt zu zerstören. Aufgrund der Komplexität der Apoptose und dem großen Gewicht, die dem physiologischen Ablauf des programmierten Zelltods zukommt, kann heute noch nicht abschließend eingeschätzt werden, ob sich dieses Konzept als tragfähig erweist (177).

#### **2.4.2.1.4. Knockout-Modelle der Gpx4**

Viele der oben beschriebenen Erkenntnisse konnten durch die gezielte gentechnische Veränderung (Knockout, Knockin) des Gpx4 Gens erhalten werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es eine Vielzahl verschiedener Tiermodelle, die für die Beantwortung spezifischer Fragestellungen zur biologischen Rolle der Gpx4 hergestellt wurden. Mäuse mit einer systemischen Inaktivierung des Gpx4 Gens in der Keimbahn (Gpx4<sup>-/-</sup> Mäuse) sind nicht lebensfähig und sterben zum Entwicklungszeitpunkt E 7.5 (159). Heterozygote Merkmalsträger (Gpx4<sup>+/-</sup> Mäuse) sind hingegen lebensfähig, auch wenn sie nur 50 % der

katalytischen Aktivität der Gpx4 aufweisen. Sie zeigen jedoch eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativen Stress (160, 178). Ohne zusätzliche Stimulation zeigten Gpx4<sup>-/+</sup> Mäuse keine gravierenden phänotypischen Veränderungen im Vergleich mit Wildtyptieren. Auch die Anzahl der Nachkommen war nicht signifikant verändert (159, 160, 178). Ein weiteres Modell ist der induzierbare Knockout der Gpx4 in Fibroblasten. Diese Tiere wurden so konstruiert, dass durch die Zugabe von Tamoxifen die Expression der Gpx4 abgeschaltet werden kann. Bereits 24 Stunden nach Zugabe des Knockout-Induktors kam es zur Abnahme der Gpx4 Transkripte. Weiterhin nahm die Apoptose der Zellen zu (169). Ein induzierbarer systemischer Knockout der Gpx4 in adulten Mäusen zeigte einen signifikanten Rückgang der Enzymkonzentrationen in verschiedenen Geweben (Gehirn, Leber, Lunge oder Niere). Weiterhin wiesen die Tiere einen Neuronenverlust im Hippocampus sowie eine Reduktion des Körpergewichtes auf, was zum Tod der Tiere führte (179). Der Knockout einzelner Gpx4 Isoformen konnte die Bedeutung dieser Enzymvarianten nachweisen. Ein gezieltes Ausschalten der nukleären Isoform der Gpx4 führte zu lebensfähigen fertilen Nachkommen. Jedoch wiesen die Spermien der Tiere eine deutliche Chromatin-Instabilität auf (164). Der gezielte Knockout aller Gpx4 Isoformen in murinen Spermatozyten resultiert in Infertilität sowie einer verminderten Spermienanzahl (180). Ein Verlust der GPX4 konnte auch bei Männern mit Oligoasthenozoospermie nachgewiesen werden. Ungefähr 10 % der untersuchten Männern zeigten eine defekte GPX4 (181). Wird hingegen nur die mitochondriale Isoform der Gpx4 in Spermien ausgeschaltet, waren die Embryogenese als auch die postnatale Entwicklung ohne Auffälligkeiten. Die männlichen Tieren waren jedoch infertil. Diese war bedingt durch eine geminderte Qualität der Spermien sowie strukturelle Veränderungen der Spermienmittelstücke. Weiterhin zeigten die Versuche, dass vor allem die cytosolische Gpx4 für die erfolgreiche embryonale Entwicklung bedeutsam ist (155, 182).

Um die Funktionen der Gpx4 auf einzelne Organe oder Organsysteme besser untersuchen zu können, wurden Zell- bzw. Organ-spezifische induzierbare Knockout-Modelle etabliert. So zeigt ein konditioneller Knockout der Gpx4 in der Retina, dass ein Verlust des Enzyms zu einer zunehmenden Degradation der Stäbchen und Zapfen führt (131). Ein Knockout der Gpx4 in der Großhirnrinde von adulten Mäusen ergab einen zunehmenden Verlust der Gedächtnisfunktion sowie eine vermehrte Neurodegeneration im Hippocampus. Diese morphologischen Veränderungen korrelieren mit denen, die bei Menschen mit Alzheimer-Demenz auftreten (173). Hinweise auf eine Funktion von



Selenoproteinen bei der Hämatopoese lieferte der Versuch von Kaushal et al. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Selen-defiziente Diät bei Mäusen zu veränderten Blutparametern und zu einer verminderten Stresserythropoese führte (170). Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde ein konditioneller Knockout der Gpx4 in erythropoetischen Zellen entwickelt. 4 Wochen nach Induktion des Knockouts kam es zu einer deutlichen Abnahme der Erythrozyten im peripheren Blut und zu einem kompensatorischen Anstieg der Retikulozyten. Weiterhin wurde eine verringerte Anzahl von Erythroblasten im Knochenmark beobachtet. Ursächlich dafür ist eine vermehrte Nekroptose der Zellen im Knochenmark. Eine Vergrößerung der Milz deutet auf einen zusätzlichen Anstieg der extramedullären Erythropoese hin (130). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden die Versuche fortgeführt und es konnte gezeigt werden, dass neben der verminderten Erythroblastenzahl im Knochenmark auch eine defekte Ausreifung der Retikulozyten zu intakten Erythrozyten nachzuweisen war. Verstärkt wurde dieser Effekt durch eine Vitamin E defiziente Diät. Weiterhin scheint sich der erythroid-spezifische Knockout der Gpx4 auf den Eisenstoffwechsel auszuwirken (171). Durch die Punktmutation des Selenocysteins zum Alanin im aktiven Zentrum kommt es zur katalytischen Inaktivierung der Gpx4 (1). Dieses Prinzip haben sich Brutsch et al. sowie Ingold et al. bei der Herstellung von Knockin Mäusen mit katalytisch inaktiver Gpx4 Mutanten zunutze gemacht (182, 183). Mit Hilfe der homologen Rekombination haben Brutsch et al. in murinen embryonalen Stammzellen das Selenocystein Codon in ein Alanin umgewandelt. Homozygote Träger dieses Allels (U46A-Gpx4) waren nicht lebensfähig, heterozygote Tiere hingegen waren lebensfähig (183). Ingold et al. tauschten Selenocystein mit Serin aus und erhielten ähnliche Ergebnisse (182). Beide Arbeitsgruppen konnten belegen, dass der Verlust der katalytischen Aktivität zu einer Subfertilität sowie verringerten Motilität der Spermien in den Mäusen führt. Weiterhin zeigten sich veränderte Mitochondrien in den Mittelstücken der Spermien betroffener Tiere (182, 183).

### **2.5. Lipoxygenasen**

Lipoxygenasen (ALOX) sind Fettsäuredioxygenasen, die als Substrate mehrfach ungesättigte Fettsäuren bevorzugen (184). Erstmals nachgewiesen wurde das Enzym vor fast 90 Jahren in Sojabohnen. Seitdem konnten ALOX-Isoformen in vielen Pflanzen, Tieren und Einzellern nachgewiesen werden (185, 186). Das bedeutet aber nicht, dass diese Enzyme in allen irdischen Organismen vorkommen. Obwohl das Vorkommen von ALOX-Isoformen in verschiedenen Bakterien belegt wurde, tragen weniger als 0,5 % aller

bisher sequenzierten Bakteriengenome ALOX-ähnliche Sequenzen. Ein Beispiel für ein ALOX-tragendes Bakterium ist *Pseudomonas aeruginosa*. Dieses gram-negative Bakterium, welches beim Menschen unter anderem zu opportunistischen Infektionen führt (187), exprimiert eine sekretierbare Lipoxygenase, die in der Lage ist Membranlipide von eukaryotischen Zellen zu oxygenieren (188). Der erste Nachweis einer humanen Lipoxygenase gelang 1974 in Thrombozyten. Hier konnte festgestellt werden, dass humane Thrombozyten exogene Arachidonsäure am Kohlenstoffatom 12 der Fettsäurekette oxygenierten, woraufhin das Enzym als 12-LOX (ALOX12) benannt wurde (189). Kurz darauf erfolgte der Nachweis einer weiteren Isoform, die 15-Lipoxygenase (ALOX15), aus Kaninchen-Retikulozyten (66). Dieses Enzym war im Gegensatz zur ALOX12 aus Thrombozyten in der Lage, das Kohlenstoffatom 15 der Arachidonsäure zu oxygenieren. Aus diesen Daten ging hervor, dass die klassische Nomenklatur der Lipoxygenasen sich an der Positionsspezifität der Arachidonsäureoxygenierung orientiert. Wenn die Oxidation der Arachidonsäure am Kohlenstoffatom C15 der Kohlenwasserstoffkette erfolgte, wurde das entsprechende Enzym als Arachidonsäure-15-LOX (ALOX15) bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Forschung erkannte man jedoch, dass diese Art der Klassifikation zu Verwirrungen führte. Zum einen war Arachidonsäure kein gutes Substrat für eine große Anzahl von ALOX-Isoformen, zum anderen berücksichtigte die Positionsspezifität-basierte Nomenklatur nicht die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse der Enzyme. Vergleicht man zum Beispiel die humane ALOX15, welche Arachidonsäure am 15. Kohlenstoffatom oxygeniert (190), mit der murinen Alox15 zeigt sich, dass diese das gleiche Substrat am 12. Kohlenstoffatom oxygeniert (191). Ursächlich für diese unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten der orthologen Enzyme sind subtile strukturelle Unterschiede. So konnte nachgewiesen werden, dass die simultane Mutation der großen Aminosäuren Ile418 und Met419 der Arachidonsäure 15-lipoxygenierenden humanen ALOX15 zu zwei kleinen Valinresten zu einem Arachidonsäure 12-lipoxygenierenden Enzym führt (192). Auch evolutionär zeigt sich, zum Beispiel bei den Primaten, ein Wechsel der Enzymtätigkeit von 12-lipoxygenierenden zu 15-lipoxygenierenden Enzymen (193, 194). Weiterhin gibt es eine Vielzahl von ALOX-Isoformen in einer großen Anzahl irdischer Lebensformen. So finden sich im Genom der Sojabohnen bis zu 13 verschiedene Lipoxygenasegene. Das Reis-Genom weist sogar bis zu 20 unterschiedliche ALOX Gene auf (184). Obwohl es heute noch keine einheitlichen Richtlinien zur Klassifizierung von Lipoxygenasen gibt, sollten die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse bei künftig auszuarbeitenden

## Einleitung

Klassifizierungssystemen eine wichtigere Rolle spielen, als ausgewählte Enzymeigenschaften.

Das menschliche Genom enthält 6 verschiedene ALOX Gene, mehrere ALOX Pseudogene sowie ein ALOX12 Antisensegen (195). Als funktionelle Gene wurden das *ALOX5*, *ALOX12*, *ALOX12B*, *ALOX15*, *ALOX15B* sowie *ALOXE3* Gen identifiziert (siehe Tabelle 2). Mit Ausnahme des *ALOX5*-Gens, welches sich auf Chromosom 10 befindet, liegen alle anderen ALOX-Gene in einem gemeinsamen Gencluster auf Chromosom 17 (195). Bei der Maus finden sich 7 funktionelle Lipoxygenasen (*Alox5*, *Alox12*, *Alox12a*, *Alox15*, *Alox15b*, *Aloxe3* und *Alox12e*; siehe Tabelle 2). Die entsprechenden Genlokalisierungen im murinen Genom sind Chromosom 6 für die *Alox5* sowie Chromosom 11 für die restlichen Lipoxygenasen (196).

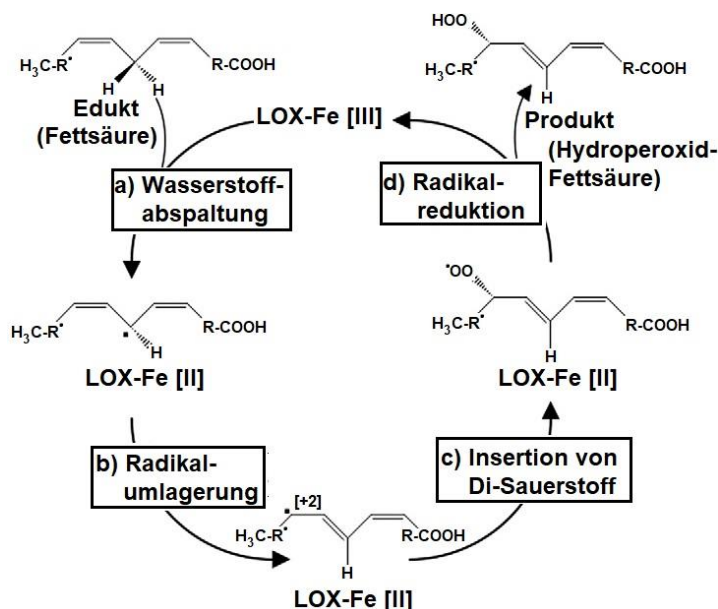
**Tabelle 2: Funktionelle humane und murine Lipoxygenase-Isoformen**

	Hauptsubstrat	Hauptprodukte	Gewebsverteilung	Literatur
<b>humane Lox-Formen</b>				
ALOX5	Arachidonsäure	5(S)-HPETE	Leukozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten	(197-199)
ALOX12	Arachidonsäure	12(S)-HPETE	Thrombozyten, Leukozyten, Haut	(200, 201)
ALOX15	Arachidonsäure	15(S)-HPETE 12(S)-HPETE	eosinophile Granulozyten, Retikulozyten, Bronchialepithel, Peritonealmakrophagen	(202-204)
	Linolsäure	13(S)-HPODE		
ALOX15B	Arachidonsäure Linolsäure	15(S)-HPETE 13(S)-HPODE	Haarfollikel, Epidermis, Prostata	(205)
ALOX12B	Arachidonsäure Linolsäure	12(R)-HPETE 9(R)-HPODE	Epidermis	(206, 207)
ALOXE3	Arachidonsäure Linolsäure	12(R)-HPETE 9(R)-HPODE	Epidermis	(208)
<b>murine Lox-Formen</b>				
Alox5	Arachidonsäure	5(S)-HPETE	Leukozyten, Mastzellen, dendritische Zellen	(209, 210)
Alox12	Arachidonsäure	15(S)-HPETE 12(S)-HPETE	Thrombozyten, Leukozyten	(211, 212)
Alox15	Arachidonsäure	15(S)-HPETE 12(S)-HPETE	eosinophile Granulozyten, Retikulozyten, Mastzellen	(191)
Alox15b	Arachidonsäure Linolsäure	8(S)-HPETE 9(S)-HPODE	Haarfollikel, Epidermis	(213)
Alox12b	Arachidonsäure Linolsäure	12(R)-HPETE 9(R)-HPODE	Epidermis	(214)
Aloxe3	Arachidonsäure Linolsäure	12(R)-HPETE 9(R)-HPODE	Epidermis	(215, 216)
Alox12e	methylierte Polyenfettsäuren	12(R)-HPETE Methylester	Epidermis	(196)

Tabellarische Darstellung der funktionellen humanen und murinen Lipoxygenaseformen mit jeweiliger Bezeichnung, Hauptsubstrat, Hauptprodukt und Gewebsverteilung sowie dem jeweiligen Literaturnachweis. Die Tabelle wurde modifiziert nach (217). 5-H(p)ETE: 5-Hydroxyperoxyarachidonsäure; 12-H(p)ETE: 12-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure; 13-H(p)ODE: 13-Hydroxyoctadecadiensäure; 9-H(p)ODE: 9-Hydroxyoctadecadiensäure; 8-HPETE: 8-Hydroxyperoxyarachidonsäure; R/S: Enantiomere der entsprechenden Hydroperoxyderivaten.

### 2.5.1. Reaktion der Lipoxygenasen

Lipoxygenasen katalysieren die Umwandlung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ihren entsprechenden Hydroperoxyderivaten. Diese können anschließend zu einer großen Anzahl von Sekundärprodukten umgewandelt werden. Diese, als Lipidmediatoren bezeichneten Produkte, üben unterschiedliche biologische Funktionen aus (218, 219). Zu den am häufigsten vorkommenden Fettsäuren in Säugetieren zählen die  $\omega$ 6 ungesättigten Polyenfettsäuren Linol-säure ( $C_{18}:\Delta 2$ ) und Arachidonsäure ( $C_{20}:\Delta 4$ ). Sie dienen den verschiedenen ALOX-Isoformen als wichtigste Substrate. Daneben fungieren auch weitere  $\omega$ 6- (z.B.  $\gamma$ -Linolensäure ( $C_{18}:\Delta 3$ )), bzw.  $\omega$ 3-Fettsäuren (z.B.  $\alpha$ -Linolensäure ( $C_{18}:\Delta 3$ ), Eicosapentaensäure ( $C_{20}:\Delta 5$ ), Docosaheaxensäure ( $C_{22}:\Delta 6$ )) als ALOX Substrate (220). Für die Bereitstellung der meist in Membranen integrierten Fettsäuren sorgt die Phospholipase A2. Durch hydrolytische Spaltung stellt sie den Lipoxygenasen ihre Substrate als freie Fettsäuren zur Verfügung (221). Ein wichtiger Bestandteil des katalytischen Zentrums von ALOX-Isoformen ist das zentrale Nichteisen. Im inaktiven Zustand des Enzyms präsentiert es sich als zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ) (222). Für die Funktionalität der Lipoxygenase wird das Eisen zur aktiven Form ( $Fe^{3+}$ ) oxidiert (223). Die Lipoxygenasereaktion besteht aus vier aufeinanderfolgenden Teilschritten (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Mechanismus der Lipoxygenasereaktion.**

Dargestellt sind die 4 Elementarreaktionen der Fettsäureoxidation durch Lipoxygenasen: **a)** Abspaltung von Wasserstoff als geschwindigkeitsbestimmender Schritt von einer bisallylständigen Methylgruppe der Fettsäure und Reduktion des 3-wertigen Enzymeisens ( $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ ). **b)** Umlagerung des radikalischen Elektrons. Diese Umlagerung erfolgt entweder um 2 Kohlenstoffatome in Richtung Methylende des Fettsäuresubstrates [+2] oder in Richtung des Carboxylendes der Fettsäure [-2]. **c)** Anlagerung von molekularem Sauerstoff, wobei ein Sauerstoff-zentriertes Peroxyradikal entsteht. **d)** Reduktion des Peroxyradikals unter Bildung eines Peroxyanions. Das für die Reduktion der

Peroxyradikals nötige Elektron wird von zweiwertigen Enzymeisen zur Verfügung gestellt, welches dabei wieder in seine katalytisch aktive dreiwertige Form übergeht ( $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ ). Die Abbildung wurde modifiziert nach (184).

Im ersten Schritt erfolgt die stereoselektive Wasserstoffabspaltung von einer doppelallylständigen Methylgruppe der Fettsäure. Dabei wird stereoselektiv ein

Wasserstoffatom in Form eines Protons und eines Elektrons abgespalten. Das Proton geht in den zellulären Protonenpool ein, während das dabei entstehende Elektron vom 3-wertigen Eisen des Enzyms aufgenommen wird. Dadurch wird das Enzym zu seiner 2-wertigen Form reduziert. Die Abspaltung des Wasserstoffs ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (224, 225) der gesamten ALOX Reaktion. Der zweite Schritt der Gesamtreaktion wird als „Radikalumlagerungs-Reaktion“ bezeichnet. Dabei wird das bei der Wasserstoffabstraktion entstandene Fettsäureradikal so umgelagert, dass das radikalische Elektron um zwei Kohlenstoffatome in Richtung des Methylendes der Fettsäure [+2 Umlagerung] oder in Richtung des Carboxylendes [-2 Umlagerung] verschoben wird. Bei dieser Radikalverschiebung kommt es zur cis-trans Isomerisierung der verschobenen Doppelbindung. Im Anschluss daran erfolgt die Insertion von molekularem Sauerstoff in die Verbindung. Diese erfolgt antarafacial (d.h. auf der gegenüberliegenden Seite der Doppelbindung) und führt zur Umwandlung eines kohlenstoffzentrierten Fettsäureradikals in ein sauerstoffzentriertes Peroxyradikal. Beim abschließenden Teilschritt der Gesamtreaktion wird ein Elektron vom 2-wertigen Enzyseisen auf das Peroxyradikal übertragen, so dass eine Hydroperoxyfettsäure entsteht. Das Enzyseisen geht dadurch wieder in seine katalytisch aktive 3-wertige Form zurück und kann den nächsten katalytischen Zyklus beginnen (184, 226).

Zwischen verschiedenen ALOX-Isoformen bestehen erhebliche Unterschiede in der Substratspezifität. Während die humane ALOX15 präferentiell mit Linolsäure reagiert, oxygeniert die ALOX15B bevorzugt Arachidonsäure (227). Die Alox15 des Kaninchens oxygeniert natürlich vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäuren vorwiegend an der n-6 Position. Linolsäure wird zu 13-HpODE umgewandelt (228). Die humane ALOX15 sowie das Alox15-Ortholog des Kaninchens wandeln Arachidonsäure vornehmlich zu 15S-H(p)ETE um. 12S-H(p)ETE wird nur in geringen Mengen gebildet (228, 229).

### **2.5.2. Die Arachidonsäure-15-Lipoxygenase (Alox15) - ein Repräsentant der Lipoxygenasen mit besonderen Eigenschaften**

Unter den bislang untersuchten Lipoxygenasen nimmt die Alox15 (auch 12/15-Lipoxygenase) eine Sonderstellung ein. Sie ist in der Lage, neben freien Polyenfettsäuren, auch komplexe Esterlipide in Biomembranen und Lipoproteinen zu oxygenieren (97, 230). Diese Fähigkeit konnte zumindest in einem vergleichbaren Ausmaß weder für Cyclooxygenasen noch für andere ALOX Isoformen nachgewiesen

werden (66, 231, 232). Weiterhin konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die spezifischen Metaboliten der Alox15 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen spielen (217).

### **2.5.2.1. Vorkommen, Struktur und Funktion der Alox15**

#### **2.5.2.1.1. Vorkommen**

Die Alox15 ist bei einer Anzahl von Säugetieren weit verbreitet. In weniger hoch entwickelten Säugetieren, wie zum Beispiel in Mäusen (191), Ratten (233), Kaninchen (234), Kühen (235) und Schweinen (236) kommen Arachidonsäure 12-lipoxygenierende ALOX15-Orthologe vor. Ähnlich verhält es sich bei Pavianen oder Rhesusaffen (194). In phylogenetisch höher klassifizierten Säugern, wie Schimpansen, Orang-Utans (194) oder auch beim Menschen (202), handelt es sich um eine Arachidonsäure 15-lipoxygenierendes Ortholog. Beim Menschen wird die ALOX15 in eosinophilen Granulozyten (202), in Retikulozyten (54), im Epithel des Respirationstraktes (237) sowie im Myometrium des Uterus (238) exprimiert. In Monozyten kann die Expression der ALOX15 durch Zugabe von Interleukin-4 (IL-4) induziert werden (204). Die größte Menge an Alox15 mRNA zeigt sich in der Maus in den Peritonealmakrophagen. Hier ist die Expression rund 1000-fach höher als in anderen untersuchten Geweben (239). Untersuchungen humaner Peritonealmakrophagen erbrachte keinen Nachweis der ALOX15 (240). Weiter bestätigt werden konnte die murine Alox15 in Lunge, Leber, Milz und Herz (241). Darüber hinaus kann die ALOX15 im männlichen Reproduktionstrakt von Maus, Mensch und Pferd nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sie sich sowohl im Corpus und in der Cauda des Nebenhodens als auch in reifen Spermien (242). Auch beim Hund konnte das Enzym in Neuronen und Gliazellen im Cerebrum, den Basalganglien sowie im Hippocampus festgestellt werden (243).

#### **2.5.2.1.2. Struktur**

Im Jahr 1990 gelang erstmalig die Kristallisation der Kaninchen ALOX15 (244). Es war die erste Darstellung einer Säugetier-Lipoxygenase rund 40 Jahre nach der Kristallisation der Lipoxygenase in der Sojabohne (245). Leider waren weder die Kristalle des Sojabohnenenzym noch die der Kaninchen-ALOX15 für eine detaillierte Röntgenstrukturanalyse geeignet. Um die Qualität der Proteinkristalle zu verbessern, wurde der Kristalllösung ein kompetitiver Enzymhemmstoff zugesetzt. Dieser stabilisierte

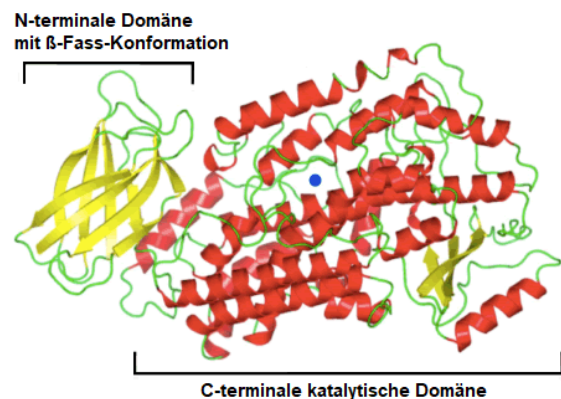
die Enzymstruktur und erlaubte die Identifizierung des aktiven Zentrums (246). Die Auswertung der Röntgendaten ergab, dass sich das Enzym ähnlich wie die Sojabohnen-LOX1 aus zwei Domänen zusammensetzte, die über ein unstrukturiertes Verbindungspeptid miteinander verbunden waren. Diese N-terminale Domäne des Enzyms bestand aus mehreren  $\beta$ -Faltblättern und wurde von 120 N-terminalen Aminosäuren gebildet (184, 246, 247). Ähnlich strukturierte Regionen kamen auch bei anderen Proteinen (Polycystin-1, Lipoxygenasen, Alpha-Toxin) vor, weshalb sie auch PLAT-Domäne genannt wurden. Funktionell scheint diese Domäne bei der Membranbindung von Proteinen eine Rolle zu spielen (248). Die C-terminale Region beinhaltet auch die U-förmige Substratbindungstasche des Enzyms, die auch das katalytische Nichthämeisen enthält. Diese Tasche wird von den Seitenketten von 23 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren begrenzt (184, 246, 247, 249). Für die Fettsäureoxygenierung wird molekularer Sauerstoff benötigt, der über mehrere offene Kanäle von der Oberfläche des Enzyms in das aktive Zentrum diffundieren kann. Die Sauerstoffbindung erfolgt an einem sauerstoffaffinen Areal am aktiven Zentrum, gegenüber dem Nichthämeisen (250). Als direkte proteinogene Eisenliganden fungieren die Aminosäuren His361, His366, His541 und His545, sowie ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe des C-terminalen Isoleucins (251).

Lange Zeit wurde die von Gilmore et al. aufgeklärte Struktur der Kaninchen-ALOX15 als Grundlage für Strukturmodelle anderer ALOX15-Isoformen verwendet. Im Jahr 2008 erfolgte eine Re-Interpretation der Daten durch die Arbeitsgruppe um J. Choi. Hierbei ergab sich, dass die gemessene Elektronendichteverteilung nicht von einem homogenen Protein herrührte, sondern dass zwei strukturell ähnliche Proteinvarianten (ALOX15 mit leerem aktiven Zentrum sowie ALOX15 mit Hemmstoff im aktiven Zentrum) für das Muster der Röntgenbeugung verantwortlich waren. Durch die Bindung des Inhibitors zeigte sich eine stabile kondensierte Konformation, wobei die Bindungstasche durch die  $\alpha 2$  Helix blockiert ist. Beim nicht-ligandierten Enzym war die Substratbindungstasche weit geöffnet und weniger tief. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die ALOX15 einer Ligand-induzierten Konformationsänderung unterliegt (219, 247).

Wie bereits erwähnt, ist die Alox15 nicht nur in der Lage freie Fettsäuren zu oxygenieren, sondern auch komplexere Esterlipide, die in Biomembranen bzw. Lipoproteinen gebunden sind. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Membranbindung der ALOX15 und der N-terminalen PLAT-Domäne vermutet. Ein

wichtiger Hinweis auf einen solchen Zusammenhang lieferte ein Strukturvergleich der N-terminalen ALOX15 Domäne mit einer ähnlich Domäne der Säugetierlipase (252). Dieses Strukturelement war als Membranbindungsdomäne der Lipase identifiziert worden. Trunkationsexperimente, bei denen die PLAT-Domäne der humanen ALOX15 durch ortsgerichtete Mutagenese eliminiert wurde, haben gezeigt, dass die trunkierte ALOX15 auch weiterhin an Membranen binden kann. Obwohl der relative Anteil des membrangebundenen Enzyms für das trunkierte Protein deutlich geringer war als bei der vollständigen ALOX15 musste geschlussfolgert werden, dass eine effiziente Membranbindung nicht nur von der Anwesenheit der PLAT-Domäne abhängt, sondern dass auch oberflächenexponierte hydrophobe Aminosäuren der katalytischen Region zur Membranbindung beitragen (253-255). Obwohl die Membranbindung der ALOX15 durch  $\text{Ca}^{2+}$  verbessert werden kann, besitzt die PLAT-Domäne der ALOX15 im Unterschied zum entsprechenden Strukturmotiv der ALOX15 keine spezifischen Calciumbindungsstellen. Deshalb wurde postuliert, dass die positiv geladenen Calciumionen die negativ geladenen Membranphospholipide elektrisch neutralisieren und somit elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen negativ geladenen Oberflächenaminosäuren und den Membranphospholipiden verringern (256).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass ALOX15 Orthologe verschiedener Spezies als monomere Enzyme vorliegen. Neuere Untersuchungen konnten jedoch bestätigen, dass die Enzyme in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, vom pH-Wert und von der vorhandenen Salzkonzentration dimerisieren können. Weiterhin zeigen sie in wässriger Lösung einen hohen Grad struktureller Flexibilität, der bedeutsam für ihre katalytische Aktivität zu sein scheint (257, 258). Das Temperaturoptimum der Fettsäureoxygenierung sowohl für die humane als auch die Kaninchen ALOX15 weist eine große Spannweite auf. Das Kaninchenenzym zeigt dabei eine große



**Abb. 7: Kristallstruktur der Alox15 des Kaninchens.**

In Gelb ist die N-terminale PLAT-Domäne des Enzyms dargestellt. Sie ist durch eine strukturell flexible Loopregion mit der katalytischen Domäne verbunden und kann unter bestimmten Bedingungen von der katalytischen Domäne wegschwingen (3). In Rot sind die  $\alpha$ -Helices der katalytischen Domäne symbolisiert. In Grün zeigen sich die flexiblen Loopregionen, welche aufeinander folgende Sekundärelemente miteinander verbinden. Das katalytisch aktive Nichteisenatom wird durch einen blauen Punkt im Zentrum der katalytischen Domäne repräsentiert. Die Abbildung wurde modifiziert nach (4).



strukturelle Flexibilität und erlaubt eine größere Beweglichkeit von Substratfettsäuren im aktiven Zentrum (259, 260).

Als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Reaktionsspezifitäten von Alox15-Orthologen verschiedener Säugetiere dient das Triadenkonzept. Nach diesem Konzept gibt es eine Triade von Aminosäuren, welche für die unterschiedliche Positionsspezifität der Lipoxygenasen verantwortlich ist (261). Am Beispiel der Kaninchen-Alox15 konnte gezeigt werden, dass die zu oxygenierenden Fettsäuren mit ihrem Methylenende voran in die Substratbindungstasche eintauchen. Am Boden dieser Tasche befinden sich die Aminosäuren Phe353 (Borngräber 1 Determinante) (262), Ile418/Met419 (Sloane Determinante) (190, 263) sowie Ile593 (Borngräber 2 Determinante) (264). Die Größe der Seitenketten dieser Aminosäuren bestimmen das Volumen der Substratbindungstasche und legen auf diese Weise fest, wie tief die Fettsäuren in diese eintauchen können und an welcher Stelle die Wasserstoffabstraktion möglich wird (261). Das Triadenkonzept, welches vorhersagenden Charakter hat, konnte bisher für 50 verschiedene ALOX15 Orthologen von Säugetieren bestätigt werden. Dazu gehören auch die Arachidonsäure 15-lipoxygenierenden ALOX15 Orthologen von Mensch und Kaninchen (264), sowie die 12-lipoxygenierenden Enzyme des Schweins (265), der Ratte (233) und des Gibbons (194). ALOX15 Orthologen, die sich nicht an das Triadenkonzept halten, konnten bislang nicht identifiziert werden (195).

### **2.5.2.1.3. Funktion**

Durch die Umwandlung von Arachidonsäuren und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu oxygenierten Fettsäurederivaten ist die Alox15 an der Bildung verschiedener Signalmoleküle beteiligt. Hierzu zählen unter anderem Lipoxine (266), Hepoxilline (267), Maresine (268), Resolvine (269) sowie Eoxine (270, 271). Für Produkte des Alox15 Weges konnten sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden (240). So zeigen z.B. Lipoxine anti-inflammatorische Wirkungen. Sie blockieren die Induktion der Chemotaxis von Entzündungszellen und verringern die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an Gefäßendothel (272, 273). Nach neueren Erkenntnissen spielen die Lipoxine auch eine Rolle in der Entwicklung von T-Helferzellen in Lymphknoten (274). Einen anti-inflammatorischen Einfluss hat die Alox15 auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Arthritis (275). Andererseits wirken die primären

Reaktionsprodukte des ALOX15-Weges (z.B. 15-H(p)ETE Isomere) pro-inflammatorisch. So kommt es bei dermalen Applikation zu einer vermehrten Exsudation von Plasma ins Gewebe (276). Bei der akuten Lungenschädigung (acute lung injury, ALI), verursacht durch Pneumonie oder Sepsis, führt ein Knockout des Alox15 Gens zu einer verbesserten Überlebensrate sowie zu einer verminderten Gefäßpermeabilität (277). Auch im bronchialen Epithel von Asthma-Patienten zeigt sich eine erhöhte Anzahl von Alox15 in eosinophilen Granulozyten (278). Neuere Experimente deuteten zudem daraufhin, dass weibliche Mäuse, die Alox15-defizient waren, vor einer DSS-induzierten Colitis (Dextran Natrium Sulfat; dextran sodium sulfate) geschützt sind (279). Ein phylogenetischer Vergleich der Alox15 in Säugetieren lässt vermuten, dass phylogenetisch höher klassifizierte Tiere aufgrund der vornehmlich 15-lipoxygenierenden Funktion, eine verbesserte Reaktion auf Entzündungen zeigen als niedriger klassifizierte Tiere (194).

Eine weitere mögliche Funktion der Alox15 ist deren Beteiligung an der Beseitigung apoptotischer Zellen, die während der akuten Phase einer Entzündungsreaktion entstehen. Das Enzym wird hierbei von gewebespezifischen Makrophagen exprimiert. Ein Knockout der Alox15 führt hierbei zur ineffektiven *Clearance* (280). Findet diese *clearance* nicht statt, kommt es zur Ablagerung von Zelltrümmern, welche im Verlauf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. systemischen Lupus erythematoses (SLE), führen können (281). Auch bei der Pathogenese der Atherosklerose scheint die ALOX15 beteiligt zu sein. So führen die Reaktionsprodukte 15(S)-HpETE und 15-(S)-HETE je nach Konzentration entweder zu einer Vasokonstriktion oder zu einer Vasodilatation. Damit werden diese Produkte als Regulatoren des systemischen Blutdrucks angesehen (282, 283). Da Hypertonie als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen in den Gefäßen anzusehen ist, tragen diese Produkte zur Atherogenese bei (283). Weiterhin reguliert die ALOX15 die Proliferation der glatten Muskulatur in den Arterien (284), was ein wichtiger Prozess im Rahmen der frühen Atherogenese ist. Der Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität der ALOX15 und der Atherogenese manifestiert sich auch bei der Induktion der endothelialen Dysfunktion (285). Hierbei oxygeniert die ALOX15 die ungesättigten Fettsäuren von low density Lipoproteine (LDL), wodurch diese vermehrt von Makrophagen aufgenommen werden. Hierdurch kommt es zur Bildung von Schaumzellen (*foam cells*) (286-288). Eine vermehrte ALOX15 Expression im Rahmen der

Atherogenese konnte sowohl in verschiedenen Tiermodellen als auch beim Menschen nachgewiesen werden (289).

Durch die katalytische Aktivität der Alox15 kommt es zu einer Modifizierung des zellulären Redoxstatus. Dieser ist unter anderem wichtig für die Expressionsregulation redoxsensitiver Gene und spielt auch eine Rolle bei epigenetischen Veränderungen (290). Weitere biologische Funktionen der ALOX15 wurden im zentralen Nervensystem beschrieben. Die Hemmung der ALOX15 durch Baicalein hat einen protektiven Effekt beim ischämischen Schlaganfall in der Maus (291). Leider ist Baicalein kein spezifischer Hemmstoff der murinen ALOX15 und wirkt überdies als Antioxidant. Ein systemischer Knockout der Alox15 führte zu verringerten neuronalen Läsionen und einem besseren klinischen outcome der Mäuse (292, 293). Auf der Basis dieser Ergebnisse werden Inhibitoren der Alox15 zur Behandlung der Folgeschäden eines akuten Schlaganfalls diskutiert (292, 294). Andere Forschungsgruppen zeigten eine vermehrte Expression der ALOX15 bei Patienten mit Alzheimer-Demenz. Vor allem in den betroffenen Regionen, wie dem Frontal- oder Temporallappen, ist das Enzym in erhöhten Konzentrationen nachweisbar (295). Die Alox15 reguliert hier nicht nur die Entstehung der typischen Alzheimer Plaques, sondern ist auch bei der Phosphorylierung des Tau-Proteins sowie bei der Bildung des Beta-Amyloids beteiligt (296, 297). Auch im Rahmen der Spermatogenese scheint die Alox15 eine wesentliche Rolle zu spielen. So führt der Knockout des Enzyms in Mäusen zu einer beeinträchtigten Spermienreifung, was zu einer Subfertilität der männlichen Tiere führt (298). Eine wichtige Bedeutung hat die Alox15 auch bei der Erythropoese (299). Das Enzym wird in einem schmalen Zeitfenster der Retikulozyten-Erythrozyten Transition exprimiert und initiiert durch die Oxygenierung von Membranlipiden den zytosolischen Abbau der Mitochondrien sowie eine Umstrukturierung der Plasmamembran (234, 300). In reifen Erythrozyten kann keine Alox15 mehr nachgewiesen werden (301). Untersuchungen an Alox15 Knockout Mäusen zeigten jedoch weder Veränderungen der peripheren Blutparameter noch Abnormalitäten der inneren Organe (191). Neuere Untersuchungen lassen einen Einfluss der Alox15 auf die Instandhaltung der *longterm* hämatopoetischen Stammzellen vermuten (302).

### **2.5.2.2. Knockout Modell der Alox15**

Im Jahr 1996 wurde das erste Knockout-Modell der Alox15 durch Sun und Funk vorgestellt (191). Mit Hilfe der homologen Rekombination (Einbau einer

Neomycinkassette in Exon 3) wurde das Alox15 Gen so verändert, dass die Synthese einer funktionellen Alox15 nicht mehr möglich war (191). Bei einer ersten phänotypischen Analyse zeigten sich die Knockout-Mäuse gegenüber den Wildtypen in Bezug auf innere und äußere Merkmale nicht verändert. Auch histologische Untersuchungen wiesen keine deutlichen Hinweise auf Veränderungen im Pankreas, in der Milz sowie in den Nebennieren auf. Das Knochenmark produzierte weder abnormale Vorläuferzellen der myeloischen noch der lymphatischen Reihe (191). Aufgrund der Expression der Alox15 in vielen Geweben wird das Alox15 Knockout Modell heutzutage bei der Erforschung unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt. Dazu zählen beispielsweise Atherosklerose, Diabetes mellitus, Übergewicht, Arthritis sowie neurologische Erkrankungen (217). So trat bei den Alox15<sup>-/-</sup> Tieren nach der Destabilisierung des medialen Meniskus eine erhöhte Knorpelzerstörung gegenüber den verglichenen Wildtypmäusen auf (303). Bei übergewichtigen Mäusen führt der systemische Knockout der Alox15 zu einer Reduktion der Insulinresistenz sowie zur reduzierten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Fettgewebe (304). Ein Verlust der Alox15 erweist sich somit als protektiv gegenüber der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II sowie von Atherosklerose (305).

### **2.6. Zusammenspiel von Alox15 und Gpx4 – Redoxstatus der Zelle**

Sowohl die Gpx4 als auch die ALOX15 sind wichtige Enzyme bei der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase (226, 306). In diesem Gleichgewicht wirkt die Alox15 pro-oxidativ (184, 219), während die Gpx4 als anti-oxidatives Enzym fungiert (306). Aufgrund ihrer antagonistischen Nettowirkung werden die beiden Enzyme auch als „funktionelle Gegenspieler“ im Rahmen des oxidativen Lipidstoffwechsels bezeichnet (97). Ein dauerhaftes Überwiegen pro-oxidativer Reaktionen führt zur intrazellulären Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese können einen Funktionsverlust der Zelle induzieren, was zu einer beschleunigten Zellalterung und auf einen akuten Zelltod hinauslaufen kann (307).

### **2.7. Ziel der Arbeit**

Das Modellsystem der murinen Erythroleukämiezellen (MEL) ist ein seit Jahrzehnten häufig genutztes zelluläres *in vitro* Modell zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen Hämatopoese. Durch die Zugabe von Stimulantien, wie zum Beispiel DMSO, kann die Differenzierung der Zellen entlang der erythroiden Reihe bis hin zum Stadium der Erythroblasten induziert werden. Mit Hilfe von quantitativer Realtime PCR

kann die Expression Erythropoese-relevanter Gene quantifiziert werden. Weiterhin ist die Messung des Hämoglobingehaltes der Zellen als verlässlicher Marker der erythroiden Differenzierung möglich. *In vivo* Untersuchungen mit gentechnisch veränderten Mäusen zur Rolle der Glutathionperoxidase 4 (Gpx4) haben in der Vergangenheit darauf hingedeutet, dass das Enzym eine wichtige Rolle bei der Erythropoese spielt. Ein gewebespezifischer Knockout der Gpx4 induziert eine defekte medulläre Erythropoese, was sich durch veränderte periphere Erythrozytenparameter manifestiert.

Im ersten Abschnitt meiner Dissertation habe ich die Rolle der Gpx4 bei der *in vitro* Erythropoese von MEL-Zellen untersucht. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurde zunächst mittels RNAi Technologie eine permanent Gpx4-defiziente MEL-Zellvariante hergestellt. Mit Hilfe dieses *in vitro* Modells sollen folgende Fragen beantwortet werden: **i)** Führt ein stabiler Knockdown der Gpx4 Expression in MEL-Zellen zu einem veränderten Differenzierungsverhalten der Zellen entlang der erythroiden Reihe? **ii)** Hat eine verringerte Gpx4 Expression Einfluss auf die Expression anderer Erythropoese-relevanter Gene? **iii)** Wirkt sich der Knockdown der Gpx4 auf andere basale Zellfunktionen (z.B. Zellproliferation) aus?

Neben der Gpx4 wird auch für die 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) eine Funktion bei der Erythropoese diskutiert. Durch Oxidation der Phospholipide der Mitochondrienmembran und der Plasmamembran kommt es zum reifungsabhängigen Abbau der Mitochondrien und zur Umstrukturierung der Plasmamembran während der Retikulozyten-Erythrozyten Transition. Obwohl homozygote Alox15 Knockout Mäuse lebensfähig sind und keinen ausgeprägten erythropoetischen Phänotyp aufweisen, habe ich im zweiten Teil meiner Arbeit untersucht, ob bei Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen erythropoetische Veränderungen nachgewiesen werden können. Sollte dies bei unstimulierten Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen nicht der Fall sein, wird das erythropoetische System dieser Tiere durch zusätzliche Manipulationen (z.B. einem Knockdown der Gpx4 Expression) angeregt. Weiterhin werden verschiedene gentechnisch (Alox15<sup>-/-</sup>, Gpx4<sup>U46A/+</sup>, Alox15<sup>-/-</sup>+Gpx4<sup>U46A/+</sup>) veränderte Mäuse verwendet, wobei deren basale erythroide Blutparameter als *readout* Parameter vor und nach einer diagnostischen Blutentnahme quantifiziert werden. Mit diesen Experimenten sollen folgende Fragen beantwortet werden: **i)** Zeigen Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse vor und nach einer diagnostischen Blutentnahme erythropoetische Veränderungen? Sollte dies der Fall sein, wird geprüft, ob das Ausmaß der Veränderungen nach Blutentnahme vergrößert ist. **ii)** Weiterhin soll geschaut werden,

ob die Expression der humanen ALOX15 in Alox15 defizienten Tieren zu einem Rescue des Phänotyps führt. **iii)** Da ein homozygoter Knockdown der Gpx4 Expression in erythroiden Zellen einen deutlichen erythropoetische Phänotyp induziert, soll hier untersucht werden, ob die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 (Gpx4<sup>U46A/+</sup> Mäuse) ausreicht, einen defekten erythroiden Phänotyp zu induzieren. **iv)** Da sowohl der Alox15 als auch der Gpx4 eine Rolle bei der Erythropoese zugeschrieben wird, soll im Rahmen meiner Arbeit untersucht werden, ob sich die erythroiden *readout* Parameter, die für die beiden gentechnisch veränderten Mauslinien (Alox15<sup>-/-</sup> und Gpx4<sup>U46A/+</sup>) quantifiziert wurden, addieren, wenn beide gentechnischen Veränderungen in einer Mauslinie (Alox15<sup>-/-</sup>+Gpx4<sup>U46A/+</sup>) zusammengekreuzt werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Axioskop Mikroskop	Zeiss Axiocam; D-Oberkochen
BioPhotometer plus	Eppendorf; D-Hamburg
FASC Calibur Flowcytometer	BD Biosciences; D-Heidelberg
Liquid-Chromatograph LC-20 AD	Shimadzu; Kyoto, Japan
Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad Laboratories; US-Hercules
MP FastPrep®-24	MP Biomedicals; D-Eschwege
Photometer (UV-2102)	SHIMADZU; JPN-Kyoto
Rotor Gene 3000	Corbett Research; AUS-Mortlake
TECAN Sunrise - 96-well Microplate Reader	Tecan; CH-Männedorf
Thermomixer 5436	Eppendorf; D-Hamburg

##### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Firma</b>
Lysing-Tubes, Matrix D (1,4 mm; 2 ml)	MP Biomedicals; D-Eschwege
Microtubes	Sarstedt; D-Nürnbrecht
Nitrozellulosemembran	Amersham; UK-Buckunghamshire
Petrischalen	Falcon by Corning Science; MEX-Tamaulipas
Pipetten	Eppendorf; D-Berlin
STRIP Tubes 0,1 ml (für RotorGene 3000)	LTF Labortechnik; D-Wasserburg
Zellkulturflaschen	Falcon by Corning Science; MEX-Tamaulipas
96-well Platte	Falcon by Corning Science; MEX-Tamaulipas

##### 3.1.3. Kits

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
NucleoSpin® RNA Plus	Machery-Nagel; D-Düren
QIAamp® RNA Blood	QIAGEN; D-Hilden
RevertAid™ Premium First Strand cDNA	ThermoFisher Scientific; D-Dortmund
Synthese Kits	
SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT	Bioline; D-Luckenwalde

### 3.1.4. Enzyme und Enzyminhibitoren

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
Glutathion Reduktase	ThermoFisher Scientific; D-Dortmund
RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase (20 U/μl)	ThermoFischer Scientific; US-Waltham
RiboLock RNase Inhibitor (40 U / μl)	Bioline; D-Luckenwalde
2x MyTaq Red Mix	Bioline; D-Luckenwalde

### 3.1.5. Lösungen, Puffer und Chemikalien

<b>Lösungen</b>	<b>Firma</b>
RNAlater®	Sigma-Aldrich; D-Steinheim
Ponceau S Lösung	AppliChem; D-Darmstadt
FITC konjugiertes Annexin V Ringerlösung	ImmunoTools GmbH; D-Friesoythe 125 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> ; 32 mM HEPES; 5 mM Glucose; 1 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,4

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Genotypisierung	
– Lyse-Puffer	25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA; pH 12
– Neutralisations-Puffer	40 mM Tris-HCl; pH 5
PBS	137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 12 mM Dinatriumhydrogenphosphat; pH 7,4
RT-Puffer (für qPCR)	10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 15 mM KCl; 0,6 mM Magnesiumchlorid
RP-HPLC Laufmittel	Methanol (85 %); Wasser (15 %); Essigsäure (0,05 %)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 2 % SDS
TAE	Tris (40 mM); 37,22 g EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz (2 mM); 57 ml Essigsäure; pH 8,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 2 % SDS
Waschpuffer	1x PBS, 0,1 % Tween20
1x TBS	150 nM NaCl, 500 nM Tris
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris/HCl; 1,92 M Glycine; 1 % SDS; pH 8,3
Bindungspuffer	10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,4

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Promega; D-Mannheim
Arachidonsäure	Cayman Chemicals; US-Ann Arbor
Bradford Reagenz	Roth; D-Karlsruhe



## Material und Methoden

bovines Serumalbumin (BSA)	PanBiotech; D-Aidenbach
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Roth; D-Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem; D-Darmstadt
Essigsäure	Roth; D-Karlsruhe
Ethanol	Roth; D-Karlsruhe
Geneticin	PanBiotech; D-Aidenbach
Glutathion	Sigma; D-Dreisenhofen
HPCL-Standard:	Cayman Chemicals; US-Ann Arbor
- 15-Hydroxyeicosatetrasäure	
- 12-Hydroxyeicosatetrasäure	
- 5-Hydroxyeicosatetrasäure	
Isofluran (Forene®)	AbbVie; D-Ludwigshafen
Methanol	VWR Chemicals; US-Radnor
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)	Merck; D-Darmstadt
Natriumborhydrid	Serva; D-Heidelberg
n-Hexan	Baker; NL-Deventer
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva; D-Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck; D-Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich; D-Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth; D-Karlsruhe

### 3.1.6. Primer

#### Primer – Genotypisierung Gpx4

Maus-Primer	UP (5' → 3')	DOWN (5' → 3')
	GAC AGA TGG CTC TGG ACC TGG GTG	TAA TCT GGC GTG GTA GGG GCA GAC

#### Primer – Genotypisierung Alox15

Maus-Primer	UP (5' 3')	DOWN (3' 5')
oIMR0013 Neo // oIMR0014 Neo	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC
oIMR0862-Exon3 // oIMR0863- Exon4	CGT GGT TGA AGA CTC TCA AGG	CGA AAT CGC TGG TCT ACA GG

#### Primer – Genotypisierung ALOX15

Maus-Primer	UP (5' 3')	DOWN (3' 5')
aP2 promotor up	AGTCAAACAGG-AACCTTTAAAATACTC	
ALOX15 do		TACTCCACCTTGAATTCTGT-CTCCTT

**Primer - qRT-PCR**

Maus-Primer	UP (5'→3')	DOWN (5'→3')
Alas2	ATGGTGGCAGCAGCTATGTTGCTA	CTTGAACCTTCTGGAGCTGCCCTC
Alox15	GCTGCACCGTGGTTGAAGACTCT	CTGTACAGACTCCTCCTTTCTTCC
Alox12	GCGGCCATGTTTCAGTTGCTTAC	CATCGTCACGTCGTCCTTGCTG
Alox5	TCG-AGTTCCCATGTTACCGCT	CTGTGGTCACTGGGAGCTTCG
ALOX15	ACTGAAATCGGG-CTGCAAGGGG	TGGCCACAGCCACCATAACGG
Epo	CACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTT	CTTCTGCACAACCCATCGTGACAT
Gapdh	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG
Hba-a1	ATGGTGCTCTCTGGGGAAGACAAA	TCATCGAGGTGGCCTGCAGCATT
m+z Gpx4	CGCCTGGTCTGGCAGGCACCA	ACGCAGCCGTTCTTATCAATGAGAA
m-Gpx4	GAGATGAGCTGGGGCCGTCTGA	ACGCAGCCGTTCTTATCAATGAGAA
n-Gpx4	AGTTCCTGGGCTTGTGTGCATCC	ACGCAGCCGTTCTTATCAATGAGAA
z-Gpx4	Kein eigenständiger Primer vorhanden; Kopienzahl wurde rechnerisch nach folgender Formel bestimmt: [z-Gpx4] = [m+z-Gpx4] – [m-Gpx4]	

**3.1.7. Zelllinie**

---

<b>Zelllinie:</b>	murine erythroleukämische Zellen (MEL-745A cl.DS19) Leibniz-Institut DSMZ; D-Braunschweig
-------------------	---

**3.1.8. Nährmedium**

---

Nährmedium	Zusammensetzung
MEL-745A Zellkulturmedium	RPMI-Medium 1640 mit L-Glutamin; PanBiotech; D-Aidenbach; 10 % fetales Kälberserum; Geneticin (G418); PanBiotech; D-Aidenbach

**3.1.9. Transfektionsvektor**

---

<b>Vektor:</b>	pSUPER.neo+gfp; OligoEngine; US-Seattle
<b>Transfektanten:</b>	MOCK-Transfektante (MOCK RNAi) siGpx4-Transfektante (Gpx4 RNAi)

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Herstellung der MEL-Zelltransfektanten

In dieser Arbeit wurde der DMSO-sensitive Klon der MEL-745A cl. DS19 verwendet. Die Zellen stammen aus dem Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (D-Braunschweig).

Um den Einfluss einer verminderten Gpx4 Expression auf die Erythropoese untersuchen zu können, wurden stabil transfizierte MEL-Zellklone verwendet, bei denen mittels RNAi Technologie die Expression der Gpx4 zu mehr als 60 % vermindert wird (hergestellt in der AG Kühn). Für die Zelltransfektion fand das pSUPER.neo+gfp System (OligoEngine, US-Seattle) Verwendung. Der Transfektionsvektor enthielt eine Antisense-Sequenz gegen die murinen Gpx4 (5'-TGG TCT GCC TGG ATA AGT A -3') und wurde von der Arbeitsgruppe um Savaskan getestet (161). Die Integration der Antisensesequenz ins zelluläre Genom und deren Expression führte zu einem Knockdown der Gpx4 Expression auf der mRNA Ebene, wobei alle Isoformen der Gpx4 betroffen waren (156). Die beschriebene Sequenz wurde in das pSUPER Vektorsystem (Gpx4-280 pSUPER) kloniert und die MEL-Zellen im Anschluss mit diesem Konstrukt transfiziert. Analog dazu entstand eine Negativkontrolle (MOCK Transfektante; MOCK pSUPER siRNA) mit einem Leervektor. Der Vektor überträgt neben der Antisensesequenz bzw. MOCK-Sequenz auch ein Gen für die Resistenz gegenüber Aminoglykosidantibiotika sowie eine Sequenz eines grün fluoreszierenden Proteins (EGFP), so dass transfizierte Zellen leicht erkannt werden können. Die Selektion der Zellen erfolgte über die Zugabe eines Aminoglykosid-Antibiotikums (Geneticin [400 µg/ml]) über 3 Tage. Im Anschluss wurde eine zweite Selektionskontrolle mit Hilfe von EGFP-Fluoreszenz Detektion durchgeführt. Es folgte eine Subklonierung aus EGFP-positiven Klonen. Diese wurden einzeln eingesät (in je 200 µl Selektionsmedium) und bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Von diesen subklonierten Zellen wurden anschließend jeweils eine Zelle in eine Vertiefung einer 96-well Platte umgesetzt und mit 2 ml Selektionsmedium versehen. Im Anschluss erfolgte die Entnahme von 0,5 ml dieser homogenen Zellen zur RNA-Isolierung sowie zur Durchführung der qRT-PCR (siehe 3.2.11.). Der Rest der transfizierten Zellen (Gpx4 RNAi sowie MOCK RNAi) wurde mit fetalem Kälberserum (FCS) und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff gesichert. Die Einsaat in die Zellkultur erfolgte wie in 3.2.2. beschrieben.

### 3.2.2. Zellkultur

Die Kultivierung der stabil transfizierten MEL-Zellklone erfolgte in RPMI-Medium plus L-Glutamin mit 10 % fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum unter Zusatz von Geneticin (400 µg/ml) im Brutschrank bei 37° C unter 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Bei allen Arbeitsschritten mit Zellen wurde darauf geachtet unter sterilen Bedingungen zu arbeiten. Die konfluenten Zellen der Gpx4 Knockdown- sowie der MOCK-Transfektante wurden in 10 cm Petrischalen mit einer Zellzahl von 10<sup>4</sup> Zellen/ml in 10 ml Medium eingesät. Nach 3 Tagen fand die Subkultivierung der Zellen statt. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des Hämocytometers (Neubauer Zählkammer) gezählt. Die Vitalitätsprüfung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von Trypanblaulösung (308).

Nach der Zählung wurden sowohl die Gpx4 Knockdown-Transfektanten (Gpx4 RNAi) als auch die MOCK Transfektanten (MOCK RNAi) in je 2 Schalen à 10<sup>4</sup> Zellen/ml in 10 – 20 ml aufgeteilt. Nach 24 h wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und jeweils eine der Schalen mit 2 % DMSO (Endkonzentration: 20 µl/ml Kulturmedium) behandelt. Die weitere Bestimmung der Zellzahl erfolgte bis zum Ende des Versuches. Um die im Datenblatt<sup>1</sup> vermerkte kritische Zelldichte von 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml nicht zu überschreiten, erfolgte am Tag 5 eine erneute Subkultivierung der Zellen mit erneuter Zugabe von Dimethylsulfoxid in die zuvor behandelten Zellen. Jeweils am Tag des Versuchsbeginns sowie an den Tagen 3, 5 und ggf. 6 wurden von jeder Zellpopulation 1 Million Zellen abgenommen und die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Zur späteren Durchführung von biochemischen Untersuchungen wurde das Zellpellet anschließend in 350 µl RA1/β-Mercaptoethanol gemäß den Kit-Vorschriften aufgenommen und bei -80° C eingefroren. Zellen, die nach der Subkultivierung übrigblieben, wurden für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1.000 rpm) und Abnahme des Überstandes ist das Zellpellet bei -80°C eingefroren worden. Der Zellversuch endete jeweils an den Tagen 5 bzw. 6.

### 3.2.3. Wachstumskurven

Für die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte die Einsaat der Zellen (Gpx4 Knockdown und MOCK-Transfektanten) in jeweils 3 Petrischalen mit einer Zellzahl von jeweils 10<sup>4</sup> Zellen/ml in 5 ml Medium. Die Kultivierung der Zellen fand über 5 Tage

---

<sup>1</sup> <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-501> [25.01.2021]

statt, wobei die Zellzahl jeden Tag zur gleichen Zeit mit Hilfe des Hämocytometers bestimmt wurde. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe von Trypanblaulösung kontrolliert. Der Wechsel bzw. die Zugabe von neuem Medium erfolgte bei Abfall des pH-Wertes, was durch die Farbänderung des Mediums detektiert wurde. Im Anschluss wurde am 7. Tag eine abschließende Zählung durchgeführt. Bei der Erstellung der Wachstumskurven wurden die absoluten Zellzahlen gemittelt, logarithmiert ( $\log_{10}$ ) und gegen die Kultivierungszeit in Tagen aufgetragen. Die Ermittlung der Verdopplungszeit (td) der Zellpopulationen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen.

### 3.2.4. Untersuchte Mausstämme

Für die Untersuchung zur Rolle der Alox15 und der Gpx4 in der *in vivo* Erythropoese wurden verschiedene gentechnisch veränderte Mauslinien verwendet. Gentechnisch veränderte Mäuse mit einer systemischen Inaktivierung des Gpx4 Gens sind nicht lebensfähig und sterben zwischen dem siebten und achten Tag nach der Befruchtung. Heterozygote Tiere hingegen sind überlebensfähig und zeigen ohne weitere Stimulation keine phänotypischen Auffälligkeiten (159). Für unsere Arbeiten verwendeten wir heterozygote Sec46Ala Gpx4 Knockin Mäuse ( $Gpx4^{U46A/+}$ ). Bei diesen Tieren wurde der Gpx4 Genort so verändert, dass die Tiere heterozygot die katalytisch inaktive Mutante Sec46Ala der Gpx4 exprimieren. Das Knockin Allel des Gpx4-Gens beinhaltet dabei zwei Punktmutationen (TGA→GCA), die an der Position 46 der Proteinsequenz der GPX4 das katalytisch aktive Selenocystein (Sec) zu einem katalytisch inerten Alanin (U46A) umwandelt. Dieser Austausch resultiert in einer funktionellen Inaktivierung des Proteins (1). Die Generierung der heterozygoten U46A Gpx4 Knockin-Maus wurde von Brusch et al. beschrieben (183). Die Verpaarung der entstandenen Chimäre erfolgte mit C57BL/6N-FLP-Mäusen (Jackson-Laboratories; US-Bar Harbor) für mehrere Generationen. Die Auswahl der Tiere erfolgte im Anschluss über Genotypisierung. Als nicht-transgene Kontrolle wurden C57BL/6N Mäuse (Jackson-Laboratories; US-Bar Harbor) verwendet.

Die heterozygote Expression der katalytisch inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) führt bei Männchen zu einer leichten Subfertilität. Durch das Einkreuzen einer homozygoten Defizienz der Alox15 ( $Gpx4^{U46A/+}+Alox15^{-/-}$ ) kann diese Subfertilität normalisiert werden (309). Um den Einfluss des beschriebenen Rescue-Effekts auf die Erythropoese zu

untersuchen, wurden die von Brusch et al. beschriebenen doppelt gentechnisch veränderten Tiere ebenfalls für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Weiterhin wurden homozygote Alox15 Knockout-Mäuse (Alox15<sup>-/-</sup>) mit in den Versuch eingeschlossen. Diese Tiere sind erstmals 1996 von C. Funk generiert und charakterisiert worden (191). Die Mäuse wurden von den Jackson Laboratories bezogen unter der Bezeichnung B6.129S2-Alox15<sup>tm1<sup>Fun</sup>/J</sup>. Als Wildtypkontrolle dienten hier C57BL/6J Mäuse (Jackson-Laboratories; US-Bar Harbor).

Als weiteren transgenen Mausstamm haben wir Tiere ausgewählt, welche neben einem systemischen Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) die humane ALOX15 überexprimieren. Die Tiere wurden in der AG Kühn generiert und charakterisiert. Obwohl noch keine publizierten Daten zu diesen Mäusen vorliegen, zeigten Aktivitätsuntersuchungen die Expression des Transgens in verschiedenen Zellen und Geweben, u.a. im Knochenmark. Zur Herstellung der Mäuse klonierten wir ein Minigenkonstrukt der Kaninchen ALOX15 hinter den murinen  $\alpha$ P2 Promotor. Danach wurden murine embryonale Stammzellen mit dem Konstrukt transfiziert. Im Anschluss erfolgte der Transfer der transgenen Stammzellen in murine Blastozysten. Die entstandenen männlichen Chimären wurden anschließend mit nichtgenetisch veränderten weiblichen Tieren verpaart. Unter zu Hilfenahme der Genotypisierung und nachdem gesichert werden konnte, dass das Transgen an die nächste Generation weiter gegeben wird, erfolgte im Anschluss die Kreuzung heterozygoter Tiere. Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte gezeigt werden, dass das Transgen nur einmal ins Mausgenom integriert wurde (Chromosom 3) und dieses Ergebnis wurde durch eine komplette Genomsequenzierung bestätigt. Weiterhin wurde durch die Sequenzdaten gezeigt, dass das Transgen in einem nicht-kodierenden Bereich des murinen Genoms integriert wurde. Für alle hier beschriebenen Versuche sind ausschließlich männliche Tiere im Alter von 10 – 25 Wochen worden.

**Tabelle 3: Charakterisierung der verwendeten Mausstämmen**

Bezeichnung des Mausstammes	Genotypen der Gpx4 sowie Alox15 in den Mausstämmen	Kurzbezeichnung des Mausstammes
C57BL/6N bzw. /6J	Gpx4 <sup>+/+</sup> +Alox15 <sup>+/+</sup>	wt.6N bzw. wt.6J
U46A Gpx4 Knockin	Gpx4 <sup>U46A/+</sup> +Alox15 <sup>+/+</sup>	Gpx4 <sup>U46A/+</sup>
Alox15 Knockout	Gpx4 <sup>+/+</sup> +Alox15 <sup>-/-</sup>	Alox15 <sup>-/-</sup>
U46A Gpx4 Knockin Alox15 Knockout	Gpx4 <sup>U46A/+</sup> +Alox15 <sup>-/-</sup>	Gpx4 <sup>U46A/+</sup> +Alox15 <sup>-/-</sup>
Alox15 Knockout + aP2 ALOX15 Knockin	Alox15 <sup>-/-</sup> +aP2 ALOX15	Alox15 <sup>-/-</sup> + aP2 ALOX15

### 3.2.5. Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in spezifisch pathogenfreien Einrichtungen der FEM Charité Berlin nach FELASA beschriebenen Bedingungen mit konstantem 12:12 h Hell-Dunkelzyklus. Die Tiere wurden zu zweit oder dritt in Käfigen gehalten. Wasser und Futter stand *ad libitum* zur Verfügung.

### 3.2.6. Genotypisierung der Mäuse

Für die Genotypisierung der Tiere wurden die bei der Kennzeichnung anfallenden Ohrstanzen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Truett et al. (310). Das Gewebe wurde mit 50 µl Lysepuffer bei 90°C für 60 Minuten im Thermoblock lysiert. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und mit 50 µl Neutralisationspuffer versehen. Für die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die MyTaq Polymerase (Bioline; D-Luckenwalde) nach Herstellerangaben sowie die unter 3.1.6. aufgelisteten Primer für den Gpx4 Genlokus verwendet. Das Amplifizierungsprodukt des U46-Wildtyp-Allels (U46A-Gpx4<sup>-/-</sup>+Alox15<sup>+/+</sup>) hat eine Länge von 412 bp, das des U46A-Gpx-Knockin-Allels (Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>+/+</sup>) eine Länge von 587 bp. Das PCR-Programm ist in Tab.4 aufgeführt. Im Anschluss an die PCR wurden 10 µl des PCR-Produkts der jeweiligen Proben auf ein 2%-iges Agarosegel zusammen mit Ethidiumbromid aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte bei ca. 100 V für ungefähr 15 – 20 Minuten. Zur Bestimmung der Größe einzelner Fragmente wurde ein 100 bp Marker am Rand des Gels mitgeführt. Bei einem Wildtyp zeigte sich eine Bande, während das heterozygote Knockin-Tier zwei Banden aufwies.

Analog wurden auch Ohrstanzen von Tieren mit dem Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) aufgearbeitet und genotypisiert. Es wurden die entsprechenden von den Jackson Laboratory empfohlenen Primer verwendet (siehe 3.1.6.). Das PCR-Produkt des Wildtypallels ist 229 bp lang, während die Bande des Knockout Allels eine Länge von 417 bp hat.

Die Genotypisierung der aP2 ALOX15 Mäuse (Alox15<sup>-/+</sup>aP2 ALOX15) erfolgte ebenfalls mit oben beschriebenen Primern (siehe 3.1.6.). Eine Bande bei 450 bp zeigt das Vorhandensein des durch den aP2 Promotor eingeführten ALOX15 Gens an (311). Eine Unterscheidung von homozygoten bzw. heterozygoten Merkmalsträgern ist mittels PCR nicht möglich. Es wird hier nur das Vorhandensein des Transgens nachgewiesen. Die Zuchttiere werden durch eine Testverpaarung mit Wildtypen ausgewählt und neue Zuchtpaare werden erneut getestet.

**Tabelle 4: PCR-Programm der Genotypisierung**

Dauer	Temperatur
5 min	95° C
15 sec	95° C
15 sec	60° C
30 sec	72° C
5 min	72° C

40x

### 3.2.7. Organentnahme und Isolation von Knochenmarkszellen

Die Tötung der Tiere erfolgte durch primäre Inhalationsnarkose mittels Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation. Der Tod des Tieres wurde durch Prüfung des Reflexausfalls festgestellt. Im Anschluss erfolgte die Gewichtsbestimmung der einzelnen Tiere. Für die Organentnahmen wurde das Abdomen samt Peritoneum eröffnet und die Milz sowie die Nieren entnommen. Nach sorgfältiger Präparation und Gewichtsbestimmung der einzelnen Organe wurden diese, bis zur weiteren Bearbeitung, im flüssigen Stickstoff schockgefroren oder für RNA-Isolation mit RNALater® versehen und bei -80° C eingefroren. Für die Präparation des Knochenmarks wurden jeweils beide Femurknochen freipräpariert und in PBS bei 4°C gespült. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung des Femurkopfes sowie der Kondylen. Mit Hilfe einer Kanüle (26 G) wurde der Markraum mit PBS ausgespült und die Zellsuspension in einem weiteren Gefäß aufgefangen. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet erneut in 4 ml PBS resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Abnahme von 50 µl der Suspension. Die Zellsuspension wurden hierfür 1:50 verdünnt. 1 ml der gewonnenen Menge wurde erneut für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in



750 µl RNA-Lysepuffer (Machery-Nagel; D-Düren) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Alox15 wurde der Rest der Suspension zentrifugiert (10 min; 1000 rpm), der Überstand abgenommen und das Zellpellet für die Aktivitätsmessung, wie in 3.2.15. beschrieben verwendet.

### **3.2.8. Blutentnahme und Analyse der Blutparameter**

Zur Grundcharakterisierung der genetisch veränderten Mauslinien erfolgte eine einmalige diagnostische Blutentnahme aus dem fazialen Venenplexus der Mäuse. Um die Koagulation zu verhindern wurden mit EDTA beschichtete Eppendorfgefäße verwendet. Es wurden rund 150 – 200 µl Blut entnommen. Diese Menge entspricht ca. 6 % des totalen Blutvolumens der Tiere und liegt unter der maximalen Menge, die Tieren entnommen werden kann, ohne ihnen zu schaden (312).

Im Anschluss erfolgte der Transport in das Labor. Dort wurden 24 h nach Tötung der Tiere für die weitere Grundcharakterisierung die Organe sowie das Blut entnommen. Hierfür wurde der Thorax eröffnet und das Herz mit einer in EDTA-gespülten Kanüle punktiert. Es konnten so 300 – 500 µl Blut entnommen und in ein mit EDTA beschichtetes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt werden. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden 200 µl des EDTA Blutes für die Analyse der Blutparameter entnommen. Die Analyse des Blutes erfolgte durch das Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik GmbH. Die Blutbilder wurden dort mit Hilfe eines Durchflusszytometers (XT 2000i; Sysmex; JPN-Kobe) bestimmt. Bei Abweichungen der Zellmorphologie erfolgte zusätzlich eine manuelle Auszählung mit Hilfe des Mikroskops. Das restliche Blut wurde bei 4° C mit 4.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und im Anschluss das Plasma abpipettiert. Plasma und zelluläre Bestandteile wurden im nächsten Schritt separat voneinander bei -80° C gelagert.

### **3.2.9. Isolation der Gesamt-RNA**

Für die Aufarbeitung der Gesamt-RNA der stabilen MEL-Zelltransfektanten wurden die Zellen mit Hilfe von RA1-Puffer und β-Mercaptoethanol sowie anschließendes mehrfaches Pipettieren lysiert. Zur Isolation der Gesamt-RNA aus den Organen wurden die Proben, die im RNALater® aufbewahrt wurden, aufgetaut und 25 – 30 mg des Gewebes eingewogen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Gewebes im Lysepuffer in Homogenisierungsröhrchen (Lysing-Tubes; MP Biomedicals; D-Eschwege) mittels des FastPrep-24® Homogenisators (MP Biomedical; D-Eschwege) für

40 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s. Der Vorgang wurde unter Sichtkontrolle 2 – 3 Mal wiederholt, bis das Gewebe vollständig homogenisiert war. Zwischen den Homogenisierungsvorgängen erfolgte eine Lagerung auf Eis von 5 Minuten, um eine Überwärmung zu vermeiden. Die RNA aus dem Knochenmark wurde mit Hilfe des Lysepuffers (Machery-Nagel; D-Düren) lysiert. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des Kits nach Angaben des Herstellers.

Die Isolierung der RNA aus dem Blut wurde mit Hilfe des QIAamp RNA Blood Kit (QIAGEN, D-Hilden) durchgeführt. Das Ziel der RNA-Isolation aus dem Blut ist die RNA der Leukozyten, da Erythrozyten als kernlose Zellen keine RNA enthalten.

Im Anschluss an die Lyse der jeweiligen Zellen bzw. Gewebe und der Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte der Bindungs- und Elutionsprozess nach Anleitung des RNA-Isolations-Kits (NucleoSpin® RNA; Machery-Nagel; D-Düren). Die RNA wird hierbei mit einem Ethanol-haltigen Puffer gewaschen, der ihre Bindungsfähigkeit an der Membran der Reaktionsröhrchen erhöht. Es folgen mehrere Waschschrte mit anschließender Zentrifugation, um verbliebene Verunreinigungen durch Zellreste zu entfernen. Zur abschließenden RNA-Elution von der Membran wurden 40 – 60 µl des mitgelieferten RNA-freien Wassers verwendet. Die Bestimmung der RNA-Konzentration sowie die Bestimmung der Reinheit erfolgte im Anschluss an die Isolierung photometrisch durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm bzw. 280 nm. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

### **3.2.10. Reverse Transkription**

Die für die reverse Transkription verwendete Gesamt-RNA wurde wie in 3.2.9. beschrieben isoliert. Während der reversen Transkription wird die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die reverse Transkription erfolgte nach der Vorschrift des RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthese Kits. Insgesamt wurden im Versuchsansatz 2.000 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die entsprechende Menge RNA sowie die Oligo(dT)-Primer (100 pmol) und die Nukleosidtriphosphate (dNTPs) wurden mit RNAfreiem Wasser auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzuspalten. Im Anschluss wurden die Proben für 3 min auf Eis gestellt und Reaction Buffer (5x), RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl) sowie RevertAid Premium Reverse Transcriptase (200 U/µl) nach Herstellerangaben zum Reaktionsmix dazugegeben. Für die reverse Transkription wurden die Proben im

Anschluss für 1 h bei 50 °C inkubiert. Ein Erhitzen für 5 min auf 85 °C sorgte für den Stopp der Reaktion durch Denaturierung der reversen Transkriptase.

Für den Einsatz in der quantitativen RealTime PCR wurden die Proben mit RT-Puffer im Verhältnis 1:10 für Zellen sowie 1:3 für Gewebeproben verdünnt und eingefroren. Die unverdünnte cDNA wurde bei -80° C eingefroren.

### 3.2.11. Quantitative Realtime PCR

Zur quantitativen Bestimmung der gewonnenen cDNA wurde eine quantitative RealTime PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde das SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT (D-Luckenwalde) sowie der RotorGene 3000-System (Corbett Research; Mortlake; Australia) unter Einsatz der jeweiligen Gen-spezifischen Primer (beschrieben in Abschnitt 3.1.6.) verwendet. Jeweils 1 µl der verdünnten cDNA wurde mit 9 µl des Mastermix (5 µl SensiFast Mix™, 1 µl des jeweiligen Primers und 3 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O) in das Reaktionsgefäß gegeben und das aufgeführte PCR-Programm durchgeführt (siehe Tab.5). Für jede Probe erfolgte die Messung in Triplikaten. Bei jeder Messung wurde eine Negativkontrolle ohne RT-Produkt sowie ein definierter Standard des jeweilig untersuchten Gens mitgeführt. Dieses *in vitro* hergestellte Transkript des Genes wurde in Form einer Verdünnungsreihe mit definierter Konzentration eingesetzt. Dadurch konnte eine Kalibrierkurve für jedes Transkript generiert werden, die der Extrapolation der Konzentration des Target-Gens diene. Der *Sybr-Green* Fluoreszenzfarbstoff, der im SensiMix™ enthalten ist, interkaliert in die entstehende DNA, wodurch die Fluoreszenz nach jedem Zyklus ansteigt. Über die Messung der Emission kann diese Zunahme quantifiziert werden.

Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierdurch können unspezifische Primer-Dimere in Abgleich mit dem Standard vom gewünschten spezifischen DNA-Produkt unterschieden werden.

**Tabelle 5: qRT-PCR Programm**

Temperatur	Dauer	Prozess	
95 °C	2 Minuten	Aktivierung der Polymerase	
95 °C	5 Sekunden	Denaturierung der cDNA	40 Zyklen
65 °C	10 Sekunden	Annealing der Primer	
72 °C	20 Sekunden	Verlängerung der Zielsequenz	

Durch die ansteigende Temperatur kommt es zu einer Denaturierung der Doppelstränge und somit zur Freisetzung des *Sybr-Green* Farbstoffs, was eine Abnahme der Fluoreszenz zur Folge hat. Der Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA liegt über der von

einfachen Primer-Dimeren, so dass hier eine Unterscheidung möglich ist. Zur Quantifizierung der Genprodukte wurde zudem die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) als Referenzgen mitgeführt. Nach vorangegangenen Versuchen konnte eine konstante Expression in diesen Versuchen verifiziert werden. Somit bietet sie eine Möglichkeit der Normierung. Die Auswertung erfolgte mit Rotor-Gene Monitor Software (Version 5.0).

### 3.2.12. Herstellung der externen Amplifizierungsstandards für die qRT-PCR

Wie oben beschrieben wurden zur quantitativen Bestimmung der Produkte ein genspezifischer Amplifikationsstandard mitgeführt. Hierfür wurde eine Zielsequenz des jeweils entsprechenden Gens mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert. Die mRNA wurde aus entsprechenden, in der Literatur ausgewiesenen, Gewebeproben extrahiert. Das Gewebe wurde homogenisiert und mit sterilem Wasser, 2-fachen Biomix Red (Bioline; D-Luckenwalde) sowie den spezifischen Primern auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die PCR im Thermocycler, wo die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde (siehe Tab.6).

Das entstandene PCR-Produkt wurde im Anschluss auf ein 1,5 %iges Agarosegel pipettiert und eine Gelelektrophorese (siehe 3.2.14.) durchgeführt. Mit Hilfe von Ethidiumbromid wurde das Produkt angefärbt und die Gelbande im Molekulargewichtsbereich ausgeschnitten

Tabelle 6: Programm der Endpunkt-PCR

Temperatur	Dauer
95° C	2 Minuten
95° C	30 Sekunden
86° C	1 Minute
72° C	1 Minute
72° C	10 Minuten

30x

und eine Gelextraktion mit Hilfe des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermofischer, US-Waltham) durchgeführt. Nach Extraktion wurde das gewünschte PCR-Produkt in den Klonierungsvektor (TOPO TA Cloning 2.1; Thermofischer; US-Waltham) nach Angaben des Herstellers inkloniert. Für die Transformation dienten kompetente E.coli Zellen (XL1 Blue; Thermofischer; US-Waltham). Die transformierten Zellen wurden auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten über Nacht bei 37° C inkubiert und eine Auswahl der Klone im Anschluss in einer Flüssigkeitskultur mit 2,5 ml LB-Medium sowie 2,5 µl Ampicillin bei 37° C für rund 17 h angezchtet. Mit Hilfe des GeneJet Plasmid Kits wurden die Plasmide im Anschluss isoliert und es erfolgte eine Probenspaltung mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRI. Positive Klone wurden zur Sequenzierung an die Firma

Eurofins Genomics (D-Ebersberg) geschickt. Nach Überprüfung der Sequenzen der entstandenen Amplikons, wurden die Plasmide in größeren Bakterienkulturen amplifiziert und mit Hilfe des Kits NucleoBond Xtra MIDI Plus gereinigt. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte mit Hilfe des Restriktionsenzym HIndIII für 1 h bei 37° C. Eine Kontrolle erfolgte abermals mit Hilfe einer Gelelektrophorese. Hierbei ergab sich eine einzelne Bande, welche dann erneut mit dem GeneJET Purification Kit aufgereinigt wurde. Die so entstandenen externen Amplifikationsstandards (Amplikons) wurden im Anschluss in einer definierten Konzentration von Wasser gelöst (Urlösung, UL). Aus dieser Urlösung wurden im Verlauf die Standardlösungen (SL1-3) hergestellt. Hierfür muss initial die Konzentration der doppelsträngigen DNA-Moleküle (Molekül/µl) in der Urlösung errechnet werden. Dies erfolgt über folgende Formel:

$$\left[ \frac{\text{Konzentration UL} / 10^9}{\text{Fragmentgröße (Vektor + Insert)} * 660} \right] * 6,022 * 10^{23}$$
 . Ziel ist es, dass aus der UL eine SL1 entsteht, welche eine Konzentration von  $10^{10}$  einzelsträngige DNA-Moleküle pro µl enthält. Zur Herstellung für eine SL1 mit einem Volumen von 100 µl wurde diese Berechnung herangezogen:  $\left[ \frac{10^{10} * 100}{\text{ds DNA-Molekül} / \mu\text{l}} \right]^{1/2}$  . Für die weitere Verdünnung zur SL2 sowie SL3 wurde RT-Puffer genutzt. Die SL2 hatte somit eine Konzentration von  $10^8$  einzelsträngigen Molekülen/µl. Die finale SL3 Lösung wurde mit Hilfe des RT-Puffers so verdünnt, dass sie je nachdem um welches Gen es sich handelte, 2 bis 40 Millionen Kopien enthielt. Diese Standardlösungen wurden dann für die qRT-PCR eingesetzt.

### 3.2.13. Herstellung von Proteinlysaten und Proteinbestimmung

Für die Herstellung von Proteinlysaten und die anschließende Proteinbestimmung wurden die präparierten Zellen verwendet. Die Zellen der MEL-Transfektanten wurden in 300 µl des Zellyse-Puffers (Zusammensetzung: 50 mM Tris-HCL (pH 7,5); 0,3 M KCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerol; 5 mM TCEP; 1 % Triton X-100; Protease-Inhibitor; MilliQ) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Homogenisierung der Proben durch den MP FastPrep24© bei 6 m/sec für 2x 30 sec. Das entstandene Homogenisat wurde bei 1.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss abgenommen. Es folgte die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (313). Hierfür wurde eine Eichkurve mit Hilfe einer 1:10 Verdünnung der BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit entionisiertem Wasser hergestellt. Im Anschluss wurden je Ansatz 10 µl der Probe zugegeben und mit Wasser auf ein Endvolumen von 800 µl aufgefüllt. Dann wurden

200 µl des Farbreagens hinzugefügt. Die Konzentration des Proteins in der jeweiligen Probe wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt.

### 3.2.14. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Um untersuchen zu können, ob Veränderungen nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Protein-Ebene zu finden sind, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli durchgeführt (314). Hierbei werden Proteine durch das angelegte elektrische Feld ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Für die Durchführung wurden die Proben bei 95 °C für 5 – 10 min denaturiert. Anschließend wurden das Trenn- und Sammelgel für die Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet. Hierfür wurde ein 12,5 %iges polyacrylamidhaltiges Trenngel in die Kammer pipettiert. Nach dem Aushärten wurde ein Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. In diesem pH-neutralen Gel werden die Proteine konzentriert und wandern im Anschluss weiter in das basische Trenngel. Je Kammer wurden 16 µl bis 30 µl Probe mit je 70 - 100 µg Protein pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden 4 - 7 µl des Markers (Precision Plus Protein Standards, Dual Color; Bio-Rad; US-Hercules) verwendet. Das Elektrophoressystem war von der Firma Bio-Rad (US-Hercules). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 Volt für ungefähr 45 Minuten. Für den Nachweis des gewünschten Proteins wurde die Western-Blot Methode angewendet. Hierfür werden die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Es wurde das Tank Blotting-Verfahren angewandt, bei dem die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose (Amersham, UK-Buckinghamshire) transferiert werden. Der sog. *blotting process* dauerte 60 min bei 250 mA. Um die Transfer-Effizienz zu visualisieren, wurde die Blotmembran in einer Schale mit 0,2 %iger Ponceau-Lösung bedeckt. Hierdurch kommt es zu einer Anfärbung der übertragenen Proteine auf der Membran. Nach dem Anfärben wurde die Membran mit Aqua dest. gewaschen und für 1 Stunde in 5 % Magermilch mit 1x PBS – 0,1 % Tween20 behandelt, um nicht besetzte Stellen der Membran zu blockieren. Im Anschluss erfolgte die Detektion der spezifischen Proteine durch die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Antikörper. Als erste Antikörper wurden der MAK Gpx4 (anti-Gpx4: Mab63-1 (315)), in einer Verdünnung von 1:5000 gelöst in 5 % Magermilch/PBS-Tween20, sowie der PAK Gpx4 (polyklonaler anti-phGpx4-AK; Santa Cruz Biotechnology; D-Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:500 in 5 % Magermilch/PBS-Tween20 aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zur Detektion eines Referenzproteins wurde zudem ein anti-Gapdh Antikörper (Sigma; D-Steinheim)

eingesetzt. Auch hier erfolgte die Inkubation über Nacht. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Waschprozess mit 1x PBS-0,3%Tween20. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur zu den Membranen zugesetzt (anti-Maus POD; Verdünnung 1:10.000 sowie Anti-rabbit POD; 1:10.000; Sigma-Aldrich; D-Taufkirchen). Danach wurde die Membran in 1x PBS-0,3%Tween20 gewaschen.

Zur Detektion der Banden erfolgte die Behandlung mit den Luminol-Reagenzien nach Herstellerangaben des Western Blot Chemilumineszenz HRP Substrat Kits (Serva-Electrophoresis; D-Heidelberg). Im Anschluss wurde ein Vergleich der Intensität und Größe der Banden anhand des mitgeführten Markers durchgeführt.

### **3.2.15. Aktivitätsmessung der Glutathionperoxidase 4**

Für die Messung der Enzymaktivität der Glutathionperoxidase 4 wurde ein gekoppelter optischer Test mit dem Substrat Phosphatidylcholin-Hydroperoxide durchgeführt. Von allen Gpx-Isoformen ist nur die Gpx4 in der Lage, dieses Substrat zu reduzieren (316). Für die photometrische Messung der Proteinaktivität wurden die Zellen der MEL-Zell-Transfektanten lysiert und die Proteine isoliert (Zusammensetzung: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,3 M KCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerol; 5 mM TCEP; 1 % Triton X-100; Protease Inhibitor Mix; MilliQ) und im Anschluss die Proteinmenge bestimmt (siehe 3.2.12.). Anschließend wurden 45 µl der zu analysierenden Proteinlösung in 445 µl Reaktionspuffer (Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl (pH 7,6); 5 mM EDTA; 10 % Triton X-100; 20 mM NADPH; 0,105 M NaHCO<sub>3</sub>; 300 mM Glutathion; 0,1 mM HCl; Glutathion Reduktase) aufgenommen, gemischt und in eine Glasküvette (Gesamtvolumen 0,5 ml) überführt. Die Vorinkubation fand für 5 min bei 37 °C im Photometer statt, bis sich keine Extinktionsveränderung bei 340 nm mehr zeigte. Der Start der Reaktion wurde durch Zugabe von 15 µl Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PCOOH; Endkonzentration: 1mM) gewährleistet. Die Messung erfolgte für 1 min bei 37 °C und 340 nm. Die Aktivität der Gpx4 wurde aus dem Verbrauch von NADPH im Reaktionsansatz pro Minute berechnet. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von NADPH beträgt  $6,3 \times 10^3 \text{ (mol/l)}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.16. Hämoglobinbestimmung**

Die Hämoglobinbestimmung wurde nach dem modifizierten Versuchsprotokoll von Hafid-Medheb et al durchgeführt (86). Für den Versuch wurden die Zellpellets der

stimulierten sowie nicht stimulierten MEL-Zell Transfektanten verwendet. Die Pellets wurden mit 5 %iger Essigsäure lysiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min mit 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Es wurde mit dem Überstand weiter gearbeitet. Es folgte eine Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode (siehe 3.2.13). Die Proben wurden auf einer 96-well Mikrotiterplatte zusammen mit 200 µl MilliQ, 25 µl der Standardlösung, 50 µl TMD sowie 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und im Anschluss für 10 – 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Kalibrierkurve diente eine Standardlösung mit lyophilisiertem Hämoglobin mit einer Konzentration von 16 µg/ml.

### **3.2.17. Messung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten**

Der Test auf osmotische Stabilität von Erythrozyten bewertet die Resistenz von Erythrozyten gegenüber Hämolyse und kann so zur Diagnostik verschiedenster erythrozytärer Funktionsstörungen angewandt werden (317). Für die Messung der osmotischen Stabilität in diesem Versuchen wurden ca. 5 µl des gewonnenen Mausblutes mit 0,5 ml NaCl-Lösung in ansteigender Konzentration (0,0 – 0,85 %) verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bestimmung des Basiswertes wurde eine Probe mit 0,85 % NaCl-Lösung versetzt und ohne Inkubation weiter mit den restlichen Proben behandelt. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die photometrische Messung erfolgte bei 540 nm. Die Auswertung erfolgte prozentual bezogen auf die komplette Hämolyse.

### **3.2.18. Isolation von Erythrozyten aus dem Blut und Analyse der *ex vivo* Lebensspanne**

Die Tiere (Alox15<sup>-/-</sup> und C57BL/6J) wurden wie oben beschrieben getötet und das Blut durch eine kardiale Punktion entnommen (siehe 3.2.7. und 3.2.8.). Im Anschluss erfolgte die Isolation und Kultivierung der Erythrozyten nach dem Protokoll von Bigdelou et al. (318). 500 µl des Blutes wurden bei 700 g für 5 min zentrifugiert. Es folgte die Abnahme des Überstandes sowie des entstandene Buffy Coats (Zellschicht aus Leukozyten und Thrombozyten<sup>2</sup>). Die übriggebliebenen Erythrozyten wurden zweimal mit 1 ml Ringerlösung gewaschen. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 700 g für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend resuspendierten wir 40 µl des Erythrozytenpellets mit 10 ml glucosefreier Ringerlösung, um so eine Suspension mit einem Hämatokrit von

---

<sup>2</sup>DocCheck Flexikon (2015): Buffy Coat [online] [https://flexikon.doccheck.com/de/Buffy\\_Coat](https://flexikon.doccheck.com/de/Buffy_Coat) [14.01.2021]



0,4 % herzustellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte so über verschiedene Zeitspannen bis zu einer maximalen Spanne von 11 Tagen. Für die Hämolysemessung entnahmen wir 500 µl der Zellsuspension und zentrifugierten diese abermals bei 700 g für 5 min. Der Überstand enthielt nun das durch die Hämolyse frei werdende Hämoglobin. Die Zellen wurden auf eine 96-well Platte pipettiert und anschließend im Mikrotiterplatten-Lesegerät photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert. Die Absorptionswerte der unterschiedlichen Proben rechneten wir im Anschluss prozentual auf die komplette Hämolyse an. Eine komplette Hämolyse (100%) wurde durch die Inkubation der Zellen in Wasser erreicht. Das übrigbleibende Zellpellet verwendeten wir im weiteren Verlauf für die Durchflusszytometrie.

### 3.2.19. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine einfache Methode, um z.B. Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden (319). Bei der hier eingesetzten FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) werden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Zellen unterschiedliche Subpopulationen von Zellen differenziert (320). Als Fluoreszenzmarker diente in diesen Versuchen an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gebundenes Annexin V. Annexin V bindet an bei der Apoptose von Erythrozyten exprimierte Phosphatidylserine (321), wodurch es zu einer Fluoreszenzreaktion kommt, die über die FACS-Analyse quantifizierbar ist. Das in 3.2.18. entstandene Erythrozytenpellet wurde mit FITC-konjugiertem Annexin V in einer Verdünnung von 1:1000 behandelt. Es folgte eine vor Licht geschützte Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen bei 700 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nach einem Waschdurchgang wurde das resuspendierte Zellpellet in Bindungspuffer aufgenommen und nach vorsichtigem Vermischen 250 µl für die Messung im Durchflusszytometer abgenommen. Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde das FASC Calibur Flowcytometer (BD Biosciences; D-Heidelberg) verwendet. Es wurde mit einer Excitationswellenlänge von 488 nm sowie einer Emissionswellenlänge bei 530 nm gemessen. Als Grenzwert wurde sowohl in den Alox15<sup>-/-</sup> Tieren als auch in den Wildtypen ein Marker (M1) gesetzt.

### 3.2.20. Zellmikroskopie

Wenn Erythrozyten in Apoptose (auch Eryptose genannt) übergehen, kommt es zu einer Veränderung der Zellmembran. Die Zellen werden kleiner und die Plasmamembran

verliert ihre Phospholipidasymmetrie (322). Diese resultiert aus einer Translokation von Phosphatidylserin, einem Lipid, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Membran befindet (323). Phosphatidylserin, welches sich an der äußeren Membran befindet, ist ein Signal für die Makrophagen die Zelle zu phagozytieren und aus dem Blutfluss zu entfernen (324). Für die Kontrolle der Apoptose kann dieser „Flip“ des Phosphatidylserins sichtbar gemacht werden. Eine Färbung mit Annexin V, welches an Phosphatidylserin bindet, sorgt, in gekoppelter Reaktion mit Fluorescein, unter einem Fluoreszenzmikroskop für eine Färbung (325). 50 µl murinen Erythrozyten wurden hierfür in 150 µl Bindungspuffer in gekammerte Objektträger (chambered coverslips; Thermo Fisher Scientific; D-Schwerte) gegeben. Nach einer Zeitspanne von 15 – 20 Minuten erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie. Diese Methode steht dem konventionellen Blutausschrieb gegenüber, der viel Erfahrung bedarf, um Zellen nicht zu zerstören (326). Zur Darstellung der fluoreszierenden Bilder wurde ein Axioskop Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung genutzt. Zur Auswertung wurde die Axiovision Software (SE64 Rel.4.9, Zeiss; D-Jena) verwendet. Als Kontrolle diente eine Hellfeldmikroskopie. Hier konnte die Zellmorphologie besser beurteilt werden. Die Bildausschnitte wurden zufällig ausgewählt und gezählt. Pro Inkubationszeit wurden zwischen 1000 – 1500 Erythrozyten gezählt.

### 3.2.21. Aktivitätsassay der Alox15

Die Aktivitätsmessung der Alox15 wurde an verschiedenen Geweben durchgeführt. Das entnommene Blut der Mäuse wurde in mit EDTA beschichtete Eppendorfgefäße aufgenommen und im Anschluss 10 min bei 800 g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und die roten Blutzellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen des Knochenmarks wurden wie in 3.2.7. beschrieben gewonnen und in PBS gewaschen. Für das Aktivitätsassay wurden  $10^7$  Zellen verwendet. Jeweils 10 µl und 100 µl gepackte Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert und mit Arachidonsäure versetzt (Endkonzentration: 100 µM). Das Gemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Reduktion von Hydroperoxiden durch die Zugabe von 1 mg Natriumborhydrid (Reduktion zu korrespondierenden Alkoholen) sowie die Ansäuerung mit 35 µl konzentrierter Essigsäure. Die Lipide wurden 2-mal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert, die Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel verdampft. Die zurückgebliebenen Lipide wurden in 700 µl Methanol aufgelöst. Dann wurden 300 µl Wasser und 1 µl Essigsäure dazu gegeben. 0,3 ml dieser Lösung wurde in die Umkehrphasen (reverse phase; RP) -HPLC injiziert, um die Menge an 12S-HETE,

15S-HETE sowie 5S-HETE, die Hauptprodukte der murinen Alox15 und Alox5 sowie der humanen ALOX15, zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Aktivität der Alox15 in der Milz wurden 50 mg des Gewebes mit 0,5 ml PBS mit Arachidonsäure (Endkonzentration: 100  $\mu$ M) versetzt. Mit Hilfe des FastPrep-24 Homogenisators (MP-Biomedicals; D-Eschwege) wurde die Probe homogenisiert und im Anschluss für 10 min bei RT inkubiert. Zur Normierung der Produkte wurden Standards der Firma Cayman Chemicals (US-Ann Arbor) verwendet.

### 3.2.22. HPCL Analyse der Reaktionsprodukte

Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC; Shimadzu LC-20) mit einem Dioden-Array Detektor (1040 A) der Firma Hewlett-Packard (US-Palo-Alto). Die Messung der Hydroxyfettsäuren (HETE) erfolgte bei einer Absorption von 235 nm bei einer Flussrate der mobilen Phase von 1 ml/min. Für die *Reverse Phase* (RP-) HPLC wurde eine Nucleosil C18 Säule (Marchery-Nagel; D-Düren; KS-System, 250 x 4 mm; Partikelgröße: 5  $\mu$ m) sowie eine Vorsäule (30 x 4 mm; Partikelgröße: 5  $\mu$ m) verwendet. Als Laufmittel diente ein Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch im Verhältnis von 85/15/0,1 Volumenprozent. Für die kombinierte Normal-Phase/Chiralphasen-HPCL wurde eine Chiralpak AD-H Säule (250 x 4,6mm; Partikelgröße: 5  $\mu$ m; Daicel Chem.; JPN-Osaka) verwendet, die mit einer Nucleosil Vorsäule (30 x 4 mm; Partikelgröße: 5  $\mu$ m) gekoppelt wurde. Das Laufmittel setzt sich hier zusammen aus einem n-Hexan/Methanol/Ethanol/Essigsäure-Gemisch (96/3/1/0,1 Volumenprozent). Die Absorption wurde abermals bei 235 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum der konjugierten Diene.

### 3.2.23. Statistik und Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der IBM SPSS Statistic Software (Version 25; US-Armonk) unter Beratung des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité. Die Daten der Zellexperimente wurden überwiegend als Balkendiagramme dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. Aufgrund der überprüften Normalverteilung der Daten erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe des ungepaarten *Student's T-Tests*. Das

Signifikanzniveau wurde wie folgt angenommen: \* $p \leq 0,05$  und \*\* $p \leq 0,005$ . Beim Vergleich des Proliferationsverhaltens wurde der *Vorzeichen-Test* angewandt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den untersuchten Daten der Mäuse um eine Normalverteilung handelt, wurde der *Kolmogorova-Smirnova-Anpassungstest* durchgeführt. Bei Experimenten, wo sowohl normal- als auch nicht-normalverteilte Daten vorlagen, wurden für alle Proben nicht-parametrische Tests angewandt. Hauptsächlich wurde hier bei zwei zu vergleichenden Proben der *Mann-Whitney-U-Test* eingesetzt. Die verwendete Methode wurde jeweils in der Legende vermerkt. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt angenommen: \* $p \leq 0,05$  und \*\* $p \leq 0,005$ . Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte zum überwiegenden Teil mit Hilfe von Boxplots. Die untere Grenze zeigt hierbei die 25. Perzentile, die obere Grenze die 75. Perzentile an. Der schwarze Balken kennzeichnet die Lage des Medians (oder auch der 50. Perzentile).

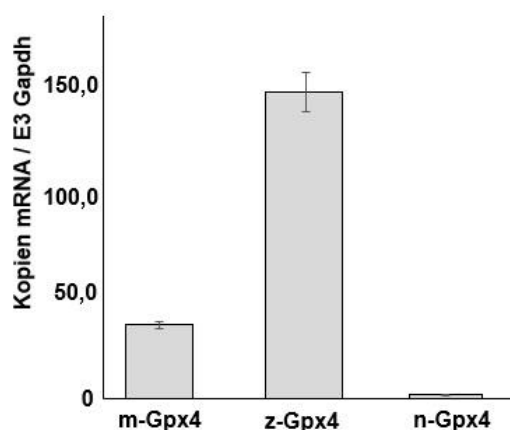
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss der Gpx4 auf die *in vitro* Erythropoese in MEL-Zellen

#### 4.1.1. Expression der Gpx4 in MEL-Zellen (MEL-745A cl. DS19)

Um herauszufinden, ob sich MEL-Zellen für die Untersuchungen zur Rolle der Gpx4 bei der Erythropoese eignen, musste zuerst bestimmt werden, ob die Gpx4 in diesen Zellen exprimiert wird. Somit haben wir initial Realtime PCR (qRT-PCR) Untersuchungen durchgeführt, um die Expression der drei Isoformen (mitochondrial, zytosolisch, nukleär) in diesen Zellen (MEL-745A cl. DS19) zu quantifizieren. Hierfür wurde aus den Zellen zunächst die Gesamt-RNA extrahiert und die Anzahl der Gpx4 mRNA Kopien quantifiziert, die für die drei Isoformen kodieren. Aktuell gibt es keine Möglichkeit, die zytosolische Gpx4 mRNA durch selektive Primerauswahl separat zu quantifizieren, wie das z.B. für die n-Gpx4 möglich ist. Deshalb wurden zuerst die Summen aus z-Gpx4 mRNA und m-Gpx4 mRNA bestimmt. Im Anschluss daran bestimmten wir die m-Gpx4 mRNA separat. Die Berechnung der z-Gpx4 mRNA Expression erfolgte dann nach folgender Formel:  $[z\text{-Gpx4}] = [m+z \text{ Gpx4}] - [m\text{-Gpx4}]$  (156). Als Referenzgen diente die Gapdh.

Es zeigte sich, dass alle Isoformen der Gpx4 in MEL-Zellen exprimiert werden, wobei sich die Expression der nukleären Form (n-Gpx4) an der Nachweisgrenze befindet (Abb.8).



**Abb. 8: Quantifizierung der Expression der verschiedenen Gpx4 Isoformen in MEL-745A cl. DS19 Zellen.**

Expression der mRNA der verschiedenen Gpx4-Isoformen wurde auf das Referenzgen Gapdh (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) bezogen. MEL-745A cl. DS19: murine Erythroleukämie-Zellen Clon 19 DMSO sensitiv; m-Gpx4: mitochondriale Gpx4; z-Gpx4: zytosolische Gpx4; n-Gpx4: nukleäre Gpx4; n=3.

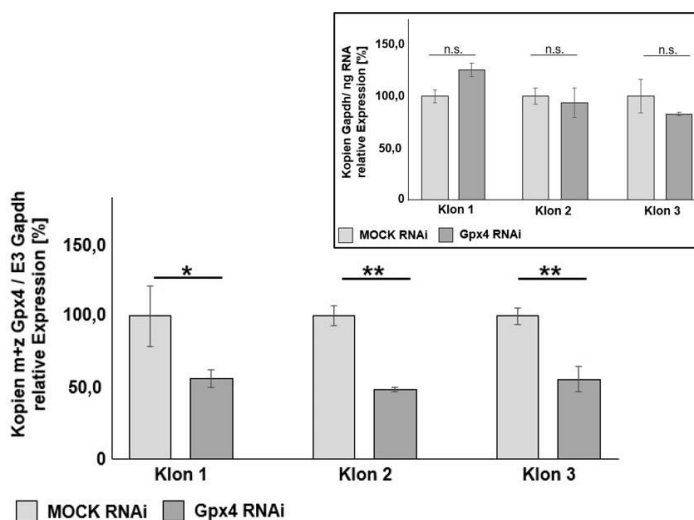
**Zusammenfassung:** MEL-754 cl. DS19 Zellen exprimieren alle 3 Isoformen (mitochondrial, zytosolisch und nukleär) der Gpx4 mRNA.

#### 4.1.2. Allgemeine Charakterisierung von MEL-Zellen mit stabilem Knockdown der Gpx4 Expression

Um den Einfluss der Gpx4 auf die *in vitro* Erythropoese untersuchen zu können, etablierten wir ein zelluläres Gpx4 Knockdown Modell (3.2.1.). Hierfür wurde das pSUPER RNAi-System genutzt. Durch die Integration eines Expressionsvektors (pSuper.neo+gfp), der die genetische Information für eine Gpx4-Antisense-RNA trägt, in das nukleäre Genom von MEL-Zellen, kommt es dazu, dass diese Zellen kontinuierlich die Gpx4 siRNA exprimieren. Dies führt zu einer starken Reduktion der Gpx4 Expression. Der Knockdown ist nicht isoformspezifisch und betrifft alle drei Isoformen (161). Nach durchgeführter Transfektion und einer mehrstufigen Zellselektion untersuchten wir ausgewählte Zellklone hinsichtlich ihrer Gpx4 Expression auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene.

##### 4.1.2.1. mRNA- und Protein-Expression der Gpx4 in transfizierten MEL-Zellen

Für die Quantifizierung der Gpx4 mRNA in 3 ausgewählten MEL-Kontroll- sowie 3 Gpx4 Knockdown-Klonen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert und nach erfolgter reverser Transkription die Expression der Gpx4 mRNA mittels qRT-PCR gemessen. Im Anschluss bestimmten wir die relative Expression der mRNA. Da die Expression der Gapdh (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durch den Knockdown nicht reguliert wurde, diente die mRNA dieses Enzyms als endogener Referenzwert (Abb.9, Inset). Da sich die Expression der nukleären Gpx4-Isoform im vorangegangenen Versuch (Abb.9) an der Nachweisgrenze befand, wurde zunächst auf deren Quantifizierung verzichtet und lediglich die Summe von m+z-Gpx4 bestimmt.



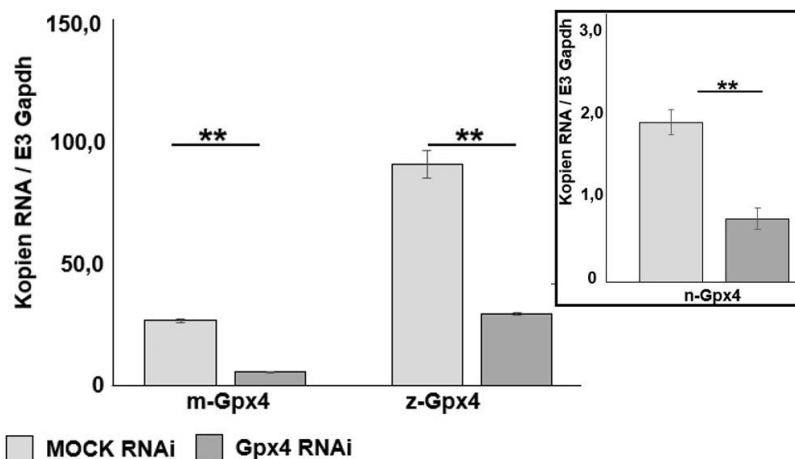
**Abb. 9: Relative Expression der m+z Gpx4 mRNA in 3 verschiedenen stabilen MEL-Transfektanten.**

mRNA Expression der m+z Gpx4 bezogen auf Gapdh in 3 verschiedenen stabilen Kontrollzell- sowie Gpx4 Knockdownzellklonen (qT-PCR). Hierbei wurde die Expression in den Gpx4 RNAi Zellen auf die Gpx4 Expression in den MOCK RNAi Zellen (100%) bezogen.

Inset: relative Expression der Gapdh mRNA pro Nanogramm [ng] RNA in % in 3 verschiedenen stabilen Transfektanten. MOCK RNAi 1-3: Klon 1 - 3 der Kontroll-MEL-Zelle (hellgraue Balken); Gpx4 RNAi 1-3: Klon 1 - 3 der Gpx4 Knockdownzelle (dunkelgraue Balken); m+z Gpx4: mitochondriale & zytosolische Gpx4 Isoform. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* bestimmt. n= 3-4.

Bei allen untersuchten MEL-Zellklonen zeigte sich eine signifikant geringere Expression der Gpx4 in den Knockdownzellen (Gpx4 RNAi) gegenüber den Kontrollzellen (MOCK RNAi; Abb.9). Der Expressionsknockdown betrug bei allen untersuchten MEL-Zellklonen ca. 50 % (Abb.9). Die weiteren Versuche wurden im Anschluss mit jeweils einem der drei Klonkombinationen (MOCK vs. Gpx4 RNAi) durchgeführt.

Im Anschluss wurde die Höhe der mRNA Expression der 3 Isoformen der z-Gpx4, m-Gpx4 und n-Gpx4 mit Hilfe von qRT-PCR (siehe 3.2.11.) bestimmt (Abb.10). Dabei zeigte sich bei allen 3 Isoformen eine signifikant (\*\* $p \leq 0,005$ ) verringerte Expression in den Gpx4 RNAi Zellen. Auch hier war die Expression der n-Gpx4 vergleichsweise gering (Abb.10), so dass auf deren Quantifizierung in weiteren Experimenten verzichtet wurde.



**Abb. 10: Expression der Gpx4 Isoformen in siRNA transfizierten MEL-Zellen und entsprechenden MOCK-Kontrollen.**

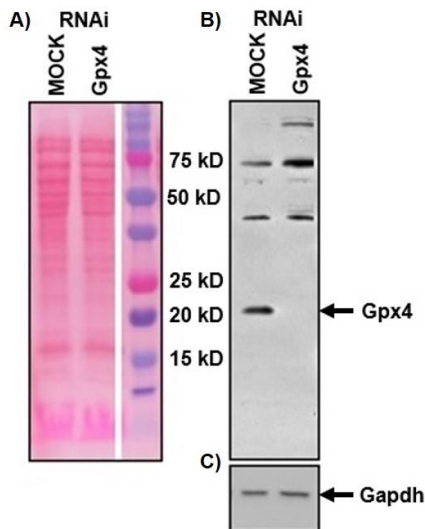
Aus Gpx4 RNAi und aus entsprechenden MOCK RNAi Zellen isolierten wir Gesamt-RNA. Mit Hilfe der reversen Transkription wurden insgesamt 2000ng mRNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte eine qRT-PCR mit isoformspezifischen Primern (3.2.11.). Als Referenzgen diente die Gapdh. MOCK RNAi: MEL-Kontrollzelle (hellgrau); Gpx4 RNAi:

MEL-Zelle mit stabilem Knockdown der Gpx4 (dunkelgrau); m-Gpx4: mitochondriale Gpx4; z-Gpx4: cytosolische Gpx4; n-Gpx4 (Inset): nukleäre Gpx4. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* bestimmt. Es erfolgte eine 3-fach Bestimmung der Werte.

Zur Bestätigung des Expressionsknockdowns der Gpx4 auf Proteinebene führten wir eine Western Blot-Analyse durch. Hierfür wurden Proteinextrakte der Zelllysate von MOCK RNAi und Gpx4 RNAi Zellen hergestellt, die Proteine in SDS Ladungspuffer aufgekocht und im Anschluss in einem 12,5 %igen Acrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.2.13. und 3.2.14.). Die spezifische Färbung der Gpx4 erfolgte mit Hilfe eines monoklonalem Anti-Gpx4 Antikörpers (315).

Zur Überprüfung des Proteintransfers vom Acrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran wurde eine Prozesskontrolle mittels Ponceau-Färbung durchgeführt (Abb.11;A). Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Proteinfärbung (327). Der Westernblot mit dem monoklonalen Anti-Gpx4 Antikörper zeigte bei den

MOCK RNAi-Zellen eine immunreaktive Bande im Molekulargewichtsbereich von 19 kDa (Abb.11;B). Dies entspricht der erwarteten Größe für die Gpx4 (150). Im Lysat der Gpx4 RNAi-Zellen war hingegen keine Bande in diesem Molekulargewichtsbereich zu sehen. Weiterhin zeigten sich einige höhermolekulare Banden, die durch den Antikörper erkannt wurden. Die chemische Natur dieser kreuzreagierenden Proteine ist nicht weiter untersucht worden. Die Gapdh diente als interne Beladungskontrolle. Die detektierten Signale sind in beiden Zelllysaten von ähnlicher Intensität (Abb.11;C).



**Abb. 11: Expression des Gpx4 Proteins in stabilen MEL-Zelltransfektanten.**

**A)** Prozesskontrolle mittels Ponceaufärbung der aufgetragenen Proteinlysate (100µg/Spur). **B)** Expressionsnachweis des Gpx4 Proteins mittels monoklonalem Antikörper. **C)** Expression der Gapdh mittels monoklonalem Antikörper.

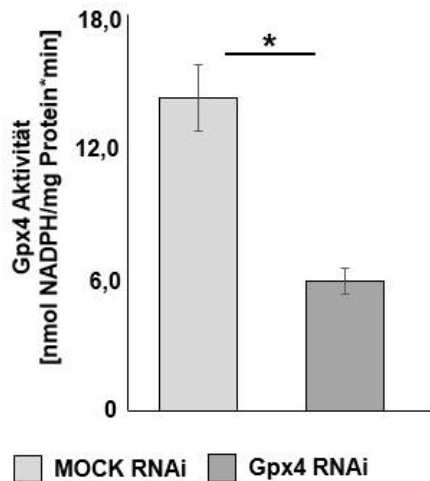
MOCK RNAi: MEL-Kontrollzelle; Gpx4 RNAi: Gpx4 Knockdownzelle; Gapdh: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Pfeil: Bande bei 19 kDa.

**Zusammenfassung:** Die stabile Integration eines Gpx4 RNAi Vektors in das Genom von MEL-754 cl. DS19 Zellen führt zu einem signifikanten Knockdown der Gpx4 Proteinexpression.

#### 4.1.2.2. Aktivität der Gpx4 in MEL-Zellen mit stabilem Knockdown

Nachdem der Knockdown der Gpx4 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene (4.1.2.1.) gezeigt werden konnte, wurde im weiteren Verlauf die Enzymaktivität der Gpx4 überprüft. Da die Gpx4 als einzige Glutathionperoxidase in der Lage ist Phosphatidylcholin-Hydroperoxid (PCOOH) zu reduzieren (328), ist dieses Substrat zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt worden. Gpx4 RNAi Zellen und die entsprechenden MOCK RNAi Kontrollzellen wurden hierfür im Lysepuffer homogenisiert. Nach erfolgter Zentrifugation setzten wir ein Aliquot des Lysatüberstandes zur Aktivitätsmessung (gekoppelter optischer Test) ein. Dabei zeigte sich eine signifikant (\*p=0,005) geringere Enzymaktivität in den Gpx4 RNAi Zellen gegenüber den MOCK RNAi Kontrollen. Die Aktivität war bei den Gpx4 RNAi Zellen um 41,5 % verringert (Abb.12). Das entspricht in etwa den Reduktionsniveaus, die bei der mRNA (Abb.9) und Proteinquantifizierung (Abb.11) ermittelt wurden.





**Abb. 12: Gpx4 Aktivitätsassay unter Verwendung von Lysatüberständen von Gpx4 RNAi sowie MOCK RNAi Zellen.** Gpx4 RNAi und MOCK RNAi Zellen wurden homogenisiert und die Lysatüberstände als Enzympräparate zur Messung der Gpx4 Aktivität eingesetzt. Die Berechnung der katalytischen Aktivität erfolgte aus der Absorptionsabnahme bei 340 nm. Die Signifikanz ermittelten wir mit Hilfe des *Student's* T-Tests. Das Experiment, auf dem diese Daten basieren, wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n=3.

**Zusammenfassung:** Der siRNA induzierte stabile Knockdown der Gpx4 Expression in MEL-Zellen zeigte im Vergleich zu MOCK-transfizierten Kontrollzellen eine signifikante Reduktion der katalytischen Aktivität der Gpx4.

#### 4.1.3. Induktion der erythroiden Differenzierung in RNAi stabil transfizierten MEL-Zellen

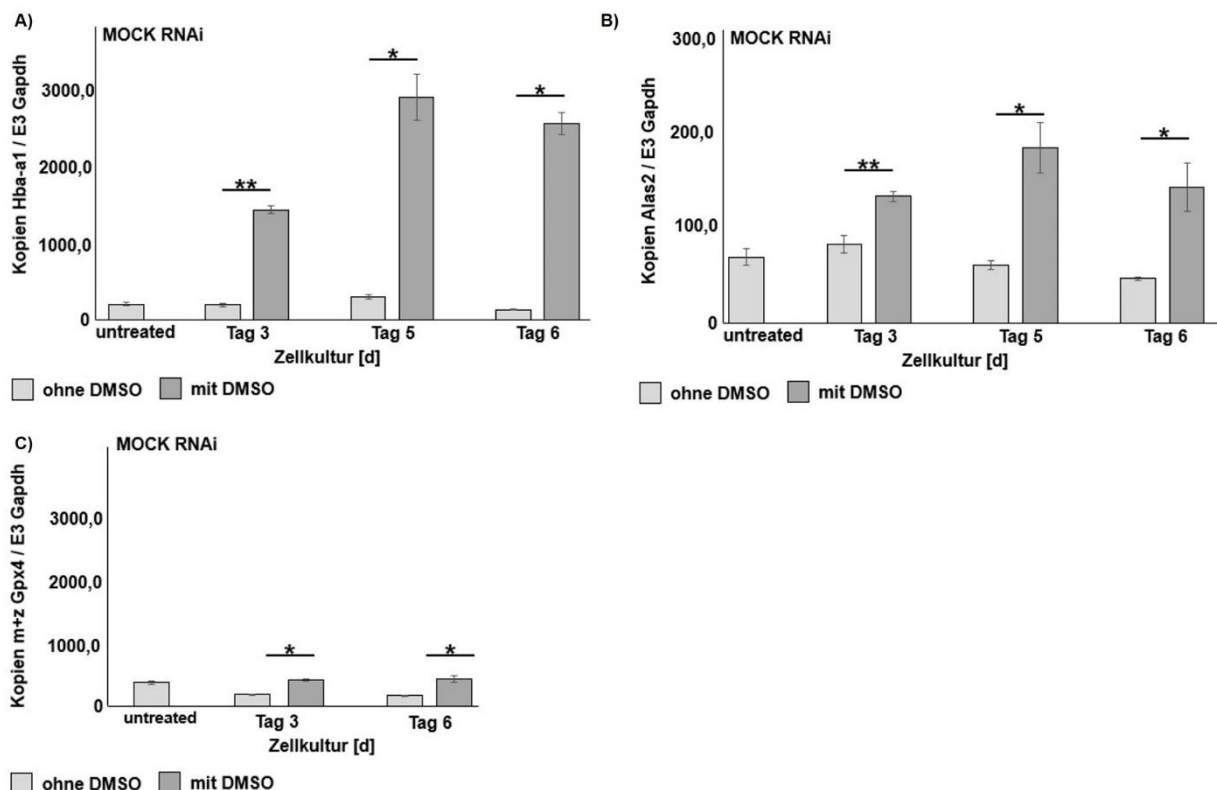
MEL-Zellen stellen ein etabliertes *in vitro* Modell für Untersuchungen der erythroiden Differenzierung dar (329, 330). Um zu untersuchen, ob die von uns hergestellten mit Gpx RNAi stabil transfizierten MEL-Zellklone zur Differenzierung entlang der erythroiden Reihe fähig sind, wurden verschiedene Erythropoese-relevante Gene ausgewählt und deren Expression mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert.

Die Delta-( $\delta$ )-Aminolävulat-Synthetase (Alas) ist neben der Ferrochelatase ein Schlüsselenzym der Häm-Synthese. Es katalysiert die Kondensation von Glycin und Succinyl CoA zu  $\delta$ -Aminolävulat (331). Die Alas kommt in verschiedenen Isoformen vor. So kann z.B. eine erythroid-spezifische ALAS E (ALAS 2), die überwiegend in roten Blutzellen zu finden ist, von der ALAS N (ALAS 1) abgegrenzt werden, die sich vor allem in nicht-erythroiden Zellen zeigt (59, 332). In MEL-Zellen konnte sowohl ALAS 2 als auch ALAS 1 mRNA nachgewiesen werden. Nach Stimulation von MEL-Zellen mit DMSO war eine Abnahme der ALAS 1 und eine Zunahme der erythroid-spezifischen ALAS 2 zu sehen (333). Deshalb wurde in den von uns durchgeführten Untersuchungen die Expression der erythroid-spezifischen ALAS 2 quantifiziert. Bereits 1975 konnten Orkin et al. aufzeigen, dass in DMSO induzierten MEL-Zellen die Synthese von mRNA nachzuweisen war, die für die Hämoglobin alpha- und beta-Ketten kodieren (334). Adultes Hämoglobin setzt sich aus jeweils zwei alpha- und beta-Ketten zusammen, wobei

jede Globinkette eine Hämgruppe trägt (335). Das Hämoglobin, das ausschließlich in unreifen roten Blutzellen exprimiert wird, bindet den Sauerstoff in der Lunge, transportiert ihn im Blut und gibt ihn in den peripheren Geweben wieder ab. Im Rahmen der Hämoglobinsynthese kodiert die Hba-1a mRNA für eine der verschiedenen Hba-1a Ketten (60). In unseren Versuchen haben wir als Marker der erythroiden Differenzierung diese mRNA quantifiziert.

#### 4.1.3.1. Induktion der *in vitro* Erythropoese in MOCK-transfizierten RNAi Zellen

Für die Induktion der Erythropoese in den MOCK RNAi Plasmid transfizierten MEL-Zellen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen/ml eingesät. Es erfolgte im Anschluss die Inkubation mit bzw. ohne die Zugabe von DMSO (2 % Endkonzentration), wie in 3.2.2. beschrieben. Für die Analyse der ausgewählten Markergene wurden am Tag der Einsaat, Tag 3 sowie Tag 5 und Tag 6 der Kultivierungsperiode Zellen entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Im Anschluss fand die Umschreibung der mRNA zur cDNA statt. Das Expressionsniveau der Gene wurde mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Als Referenzgen diente wiederum die Gapdh.



**Abb. 13: Expressionskinetiken von erythroid-spezifischen Markergenen und der Gpx4 bei der durch DMSO induzierten erythroiden Differenzierung von MOCK RNAi transfizierten MEL-Zellen.**

Für alle mRNA Spezies wurde zu jedem Zeitpunkt (3., 5. und 6. Tag der Differenzierungsperiode) das Verhältnis der Kopienzahl der Ziel-mRNA zur Gapdh mRNA bestimmt. **A)** Expressionskinetik der Hba-a1 mRNA. **B)** Expressionskinetik der Alas 2 mRNA. **C)** Expressionskinetik der m+z Gpx4 mRNA. untreated: unbehandelte Zellen. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test bestimmt. n=3.

Initial konnte bestätigt werden, dass sowohl Hba-a1, Alas2 als auch die Gpx4 (Abb.13;**A-C**) in den MOCK RNAi Zellen exprimiert werden. Die Zugabe von DMSO zu den mit dem MOCK RNAi Plasmid transfizierten MEL-Zellen führte bei beiden erythroid-spezifischen Markergenen (Hba-a1, Alas 2) zu einer Erhöhung des Expressionsniveaus (Abb.13;**A+B**). Diese Daten belegen, dass durch die Zugabe von DMSO zu den Kontrollzellen eine erythroide Differenzierung induziert wurde. Parallel dazu stieg auch die Expression der m+z Gpx4 an, was darauf hindeutet, dass auch die Gpx4 Bestandteil dieses Prozesses ist (Abb.13;**C**). Die Expression von Hba-a1 (Abb.13;**A**) war an allen 3 Messtagen der Differenzierungsperiode in den mit DMSO stimulierten Zellen deutlich erhöht (\*\* $p \leq 0,005$ ). Auch die Alas2 zeigte an allen Tagen nach Zugabe von DMSO einen signifikanten Anstieg der mRNA (Abb.13;**B**).

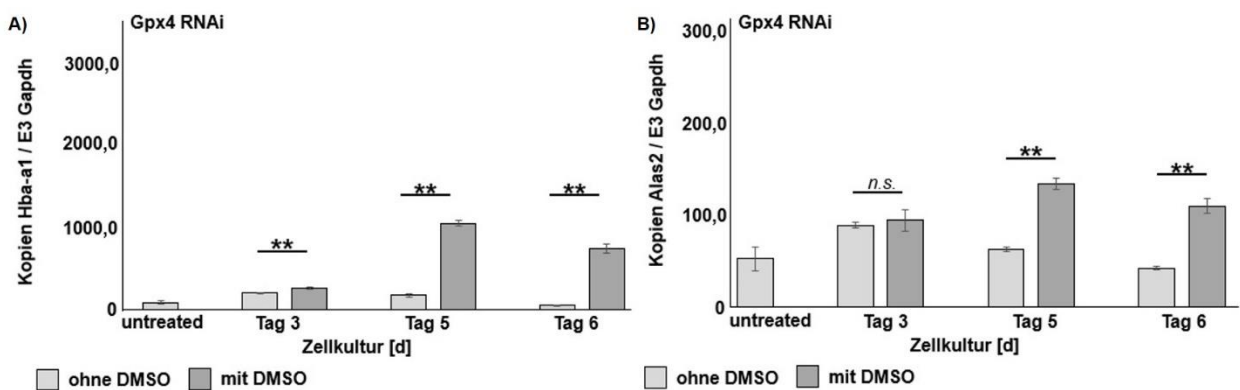
Zusammengenommen belegen diese Daten, dass durch die Zugabe von DMSO die erythroide Differenzierung in den MOCK RNAi Zellen eingeleitet werden konnte. Obwohl die Gpx4 nicht zu den erythroid-spezifischen Genprodukten gehört, wird deren Expression durch Zugabe von DMSO ebenfalls stimuliert. So konnten an den Tagen 3 und 6 der Differenzierungsperiode signifikant erhöhte Konzentrationen von Gpx4 mRNA in den MOCK RNAi Zellen nachgewiesen werden (\* $p \leq 0,05$ ; Abb.13;**C**).

**Zusammenfassung:** Durch DMSO-Zugabe kommt es in MOCK RNAi Zellen zu einer Induktion der erythroiden Differenzierung. Die Gpx4 wird dabei verstärkt exprimiert.

#### 4.1.3.2. Induktion der *in vitro* Erythropoese in Gpx4 defizienten MEL-Zellen

Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gpx4 Teil der erythroiden Differenzierung ist, die durch DMSO induziert wird. Um zu erforschen, ob diese Hochregulation der Gpx4 Expression funktionell bedeutsam für die Erythropoese ist, wurden ähnliche Differenzierungsuntersuchungen mit Gpx4-defizienten MEL-Zellen (Gpx4 RNAi) durchgeführt. Ähnlich wie beim Versuch der MOCK RNAi Kontrollzellen wurde ein Klon selektiert, die Erythropoese mittels DMSO induziert und die Gleichgewichtskonzentrationen der verschiedenen mRNAs als Triplikate bestimmt. Dabei sollte initial geprüft werden, ob in Gpx4 defizienten Zellen überhaupt eine erythroide Differenzierung durch DMSO eingeleitet werden kann oder ob diese Fähigkeit mit dem Gpx4 Knockdown verloren gegangen ist.

Auch bei diesem Versuch konnte die Expression von Hba-a1 und Alas2 initial nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von DMSO zu den Gpx4 Knockdownzellen (Gpx4 RNAi) kam es, wie bei den MOCK RNAi Kontrollzellen, zu einer signifikant erhöhten Expression der erythroiden Markergene Hba-a1 und Alas2 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb.14;**A+B**). Die Expression von Hba-a1 war an allen 3 Messtagen in den mit DMSO stimulierten Zellen signifikant erhöht (\*\* $p \leq 0,005$ ; Abb.14;**A**). Die Expression der Alas2 war an den Tagen 5 und 6 des Versuchs signifikant erhöht (\*\* $p \leq 0,005$ ; Abb.14;**B**).



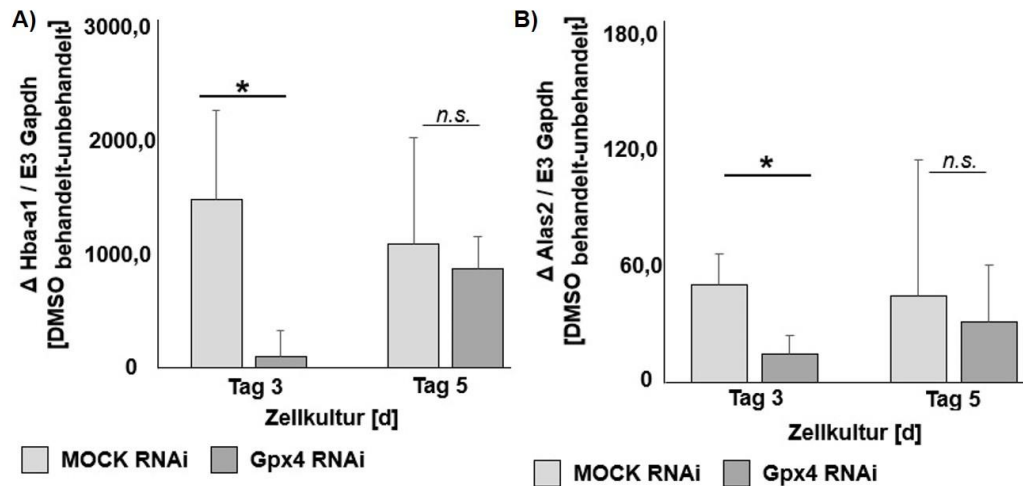
**Abb. 14: Expressionskinetiken von erythroid-spezifischen Markergenen im Rahmen der durch DMSO induzierten erythroiden Differenzierung von Gpx4 RNAi transfizierten MEL-Zellen.**

Für alle mRNA Spezies wurde zu jedem Zeitpunkt (3., 5. und 6. Tag der Differenzierungsperiode) das Verhältnis der Kopienanzahl der Ziel-mRNA zur Gapdh mRNA bestimmt. **A)** Expressionskinetik der Hba-a1 mRNA **B)** Expressionskinetik der Alas 2 mRNA. n.s.: nicht signifikant. untreated: unbehandelte Zellen. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte mit dem *Student's* T-Test. n=3.

**Zusammenfassung:** Die Zugabe von DMSO zu Gpx4 RNAi Zellen führt zur Initiation der erythroiden Differenzierung.

#### 4.1.3.3. Vergleich der Induktion der erythroiden Differenzierung zwischen MOCK- und Gpx4 RNAi-transfizierten MEL-Zellklonen

In 4.1.3.1. sowie 4.1.3.2. konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von DMSO zu MOCK RNAi und Gpx4 RNAi Zellen zu einer erythroiden Differenzierung mit Anstieg erythroid-spezifischen Markergene führt. Um zu überprüfen, ob sich der Knockdown der Gpx4 Expression auf das Ausmaß der erythroiden Differenzierung auswirkt, wurde in zusätzlichen Experimenten die Expression der Markergene in den beiden Zellarten miteinander verglichen. Hierfür erfolgte eine Wiederholung der Differenzierungsversuche mit einer Dauer von 5 Tagen.



**Abb. 15: Relative Expressionsänderung der Markergene Hba-a1 und Alas2 bezogen auf die MOCK RNAi Transfektante.**

Dargestellt ist ein Vergleich der relativen mRNA Expression der erythroiden Markergene Hba-a1 und Alas 2 durch die Zugabe von DMSO in MOCK RNAi und Gpx4 RNAi Zellen bezogen auf die MOCK RNAi Zelle. **A)** Relative Expressionsänderung des Markergens Hba-a1. **B)** Relative Expressionsänderung des Markergens Alas 2. n.s.: nicht signifikant. *Student's* T-Test. n=4.

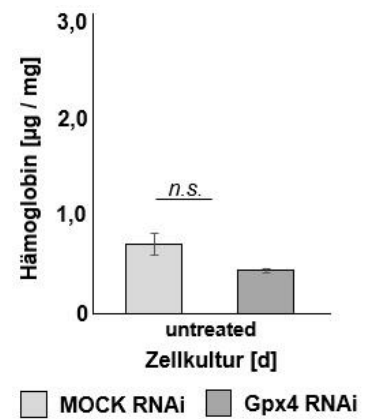
Um das Ausmaß der Expressionsänderung der erythroiden Markergene (Hba-a1 und Alas 2) bestimmen zu können, fassten wir alle Ergebnisse der n=4 Versuche zusammen, ermittelten wir die Differenz ( $\Delta$ ) zwischen den behandelten und unbehandelten MEL-Zell Transfektanten. Hierbei zeigte sich eine signifikant größere Induktion von sowohl Hba-a1 (\*p=0,034) als auch Alas 2 (\*p=0,011) an Tag 3 in den MOCK RNAi Zellen (Abb.15;**A+B**). An Tag 5 war dieser Unterschied noch sichtbar, aber sowohl für Hba-a1 (p=0,67) als auch für Alas 2 (p=0,75) nicht signifikant (Abb.15;**A+B**).

**Zusammenfassung:** Ein stabiler Knockdown der Gpx4 in murinen Erythroleukämie Zellen führt zu einer verzögerten Induktion der Hba-a1 sowie Alas 2 mRNA.

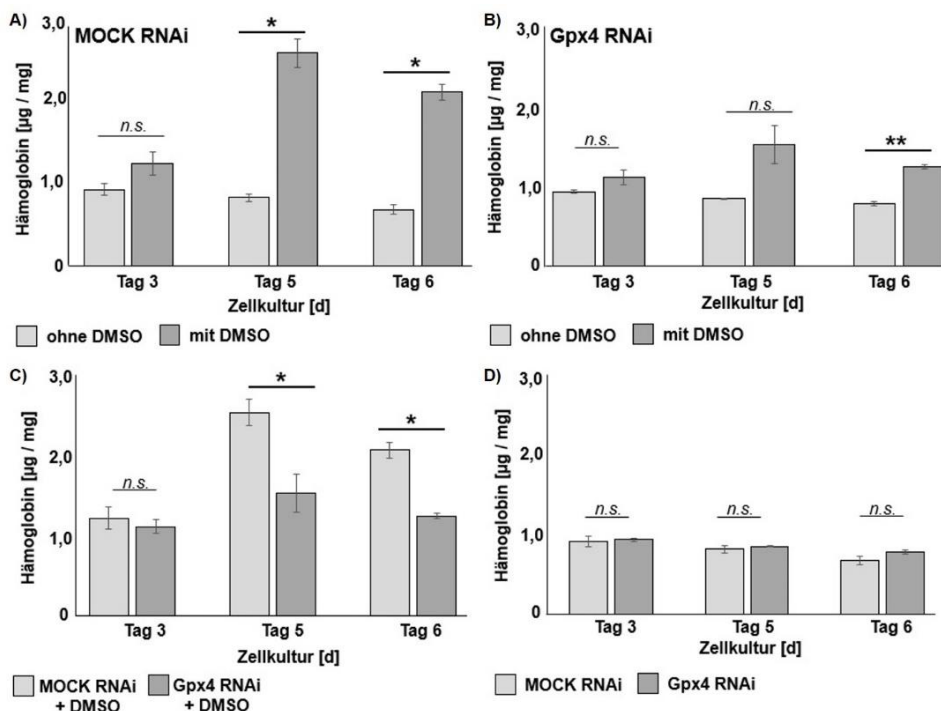
#### 4.2. Hämoglobinbestimmung in MOCK- und Gpx4 RNAi-transfizierten MEL-Zellklonen

MEL-Zellen exprimieren in Abwesenheit von DMSO kein funktionales Hämoglobin (80). Nach DMSO Stimulation setzt die Hämoglobinsynthese jedoch ein. Da Hämoglobin aufgrund seiner Eigenfärbung sehr einfach nachweisbar ist (die Zellen färben sich rot an), kann die Hämoglobinsynthese als erythroider Differenzierungsparameter angewendet werden. Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir bestätigen, dass sowohl unbehandelte MOCK RNAi als auch Gpx4 RNAi Zellen nur geringe Mengen an Hämoglobin enthalten und dass kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen besteht (Abb.16).

Wurde die Erythropoese in den MOCK RNAi Zellen durch DMSO Zugabe stimuliert, stieg der zelluläre Hämoglobingehalt deutlich an. Diese Veränderung war an Tag 5 (\*p=0,033) und 6 (\*p=0,009) nach DMSO Zugabe statistisch signifikant (Abb.17;A). In den Gpx4 defizienten RNAi Zellen war ebenfalls ein geringer Anstieg des Hämoglobingehalts nachweisbar, der aber erst an Tag 6 (\*\*p=0,004) nach DMSO Zugabe statistische Signifikanz erreichte (Abb.17;B). Diese Daten deuten darauf hin, dass in Abwesenheit der Gpx4 die DMSO induzierte Erythropoese verzögert wird. Wurden MOCK RNAi Zellen und Gpx4 RNAi Zellen parallel mit DMSO stimuliert, konnten wir an den Tagen 5 (\*p=0,047) und 6 (\*p=0,039) eine signifikante verringerte Menge an Hämoglobin in den Gpx4 RNAi Zellen nachweisen (Abb.17;C). Diese Daten bestätigen die oben gezogene Schlussfolgerung, dass in Abwesenheit der Gpx4 die DMSO induzierte Erythropoese verzögert abläuft. Erfolgte ein Vergleich des Hämoglobingehalts von nicht stimulierten Gpx4 RNAi Zellen und entsprechenden Kontrolltransfektanten (MOCK RNAi Zellen), waren deutlich geringere Mengen an Hämoglobin nachweisbar, und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb17,D).



**Abb. 16: Hämoglobingehalt von Gpx4-defizienten (Gpx4 RNAi) und Gpx4-exprimierenden (MOCK RNAi) MEL-Zellen.** Dargestellt ist die Menge an Hämoglobin (in µg/mg Gesamtprotein) in den beiden Zelltypen ohne DMSO Stimulation. n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's T-Test durchgeführt.



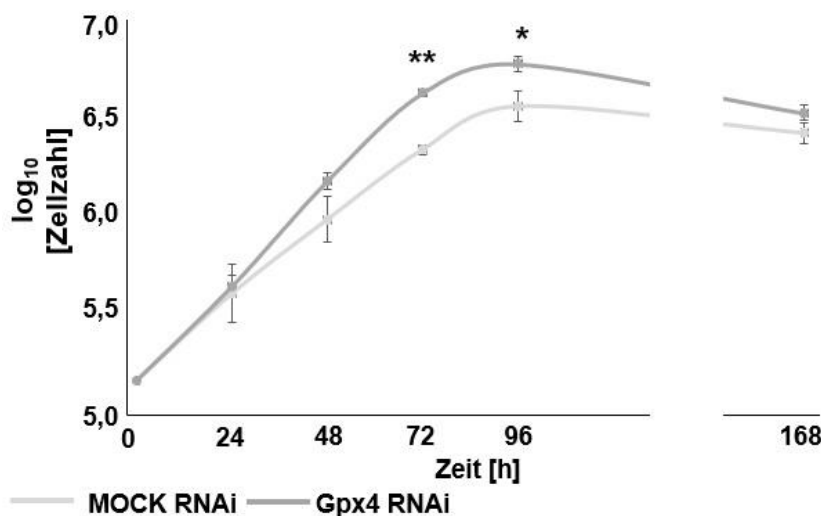
**Abb. 17: Hämoglobingehalt (in µg/mg zelluläres Protein) in mit DMSO stimulierten und unstimulierten MEL-Zelltransfektanten.** A) DMSO stimulierte und unstimulierte MOCK RNAi Zellen. B) DMSO stimulierte und unstimulierte Gpx4 RNAi Zellen. C) DMSO stimulierte MOCK- und Gpx4 RNAi Zellen. D) Unstimulierte MOCK- und Gpx4 RNAi Zellen. n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's T-Test bestimmt. Die

Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n=2.

**Zusammenfassung:** Bei MOCK RNAi Zellen konnte durch DMSO Stimulation die erythroide Differenzierung, gemessen am zellulären Hämoglobingehalt, initiiert werden. Dies war bei Gpx4-defizienten Zellen erst zeitverzögert der Fall.

### 4.3. Einfluss des Knockdowns der Gpx4-Expression auf das Proliferationsverhalten von MEL-Zellen

Die Proliferation von kultivierten Zellen durchläuft 3 Phasen. In der *lag*- oder Latenz-Phase, die sich unmittelbar an die Aussaat anschließt, vermehren sich die Zellen kaum (336). Auf die Latenz-Phase folgt die sog. *log*- oder auch exponentielle Wachstumsphase. Hier kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation. Die Länge dieser Phase ist u.a. abhängig von der Teilungsratesowie von der Dichte der Einsaat. Am Ende der exponentiellen Phase schließt sich die stationäre Phase an. Hier teilen sich die Zellen kaum noch, was u.a. auf einen Platzmangel und/oder auf ein Nährstoffdefizit zurückgeführt werden kann (337). Für MEL-Zellen wurde beim Beginn der erythroiden Differenzierung ein Proliferationsstopp beschrieben (338).



**Abb. 18: Wachstumskurven von Gpx4-defizienten MEL-Zellen (Gpx4 RNAi) und entsprechenden Kontrolltransfektanten (MOCK RNAi).**

Die Einsaat der Zellen erfolgte jeweils in 5 ml Medium mit einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/ml. Es fand eine tägliche Zählung der Zellen statt. Die Signifikanz wurde mittels *Student's T-Test* für die einzelnen Zeitpunkte bestimmt. Der Vergleich über den gesamten Zeitraum wurde mittels *Vorzeichentest* ermittelt.  $n=3$ .

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein Knockdown der Gpx4 Expression zu einer Verzögerung der DMSO-induzierten erythroiden Differenzierung führt, stellte sich die Frage, ob dieser Expressionsknockdown auch einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Wachstumskurven von Gpx4-defizienten MEL-Zellen (Gpx4 RNAi) und entsprechenden Kontrolltransfektanten (MOCK RNAi) aufgenommen. Hierfür erfolgte die Einsaat der Zellarten mit einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/ml. Die Zellzahlen wurden jeden Tag zur

selben Zeit bestimmt und gemittelt. Nach Angaben des Leibniz-Instituts (DSMZ) beträgt die Verdopplungszeit der MEL-745A cl. DS19 ca. 20 Stunden<sup>1</sup>. Um zu kontrollieren, ob diese Werte auch für die in diesem Versuch verwendeten transfizierten MEL-Zellen zutreffen, wurde die Verdopplungszeit bestimmt. Die Gpx4-defizienten Zellen (Gpx4 RNAi) verdoppeln sich rund alle 14,9 h, während die Kontrollzellen (MOCK RNAi) eine Verdopplungszeit von 18,84 h aufweisen. Dieser Unterschied war statistisch gesehen signifikant (\*p=0,024). Ein Vergleich der gesamten Wachstumskurven der beiden Zelltypen mit Hilfe des Vorzeichentests zeigte, dass Gpx4 RNAi MEL-Zellen signifikant schneller wuchsen als die MOCK RNAi Zellen (Vorzeichentest: \*\*p=0,001). Zu den einzelnen Zeitpunkten 72 h (\*\*p=0,000) sowie 96 h (\*p=0,026) zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen (Abb.18).

**Zusammenfassung:** Gpx4 defiziente MEL-Zellen (Gpx4 RNAi) zeigen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate als entsprechende Kontrolltransfektanten (MOCK RNAi).

#### **4.4. Allgemeine Charakterisierung der Erythropoese in Mauslinien mit verändertem Alox15 und Gpx4 Genotyp**

##### **4.4.1. Bedeutung des systemischen homozygoten Knockouts der Alox15 auf die Erythropoese der Maus**

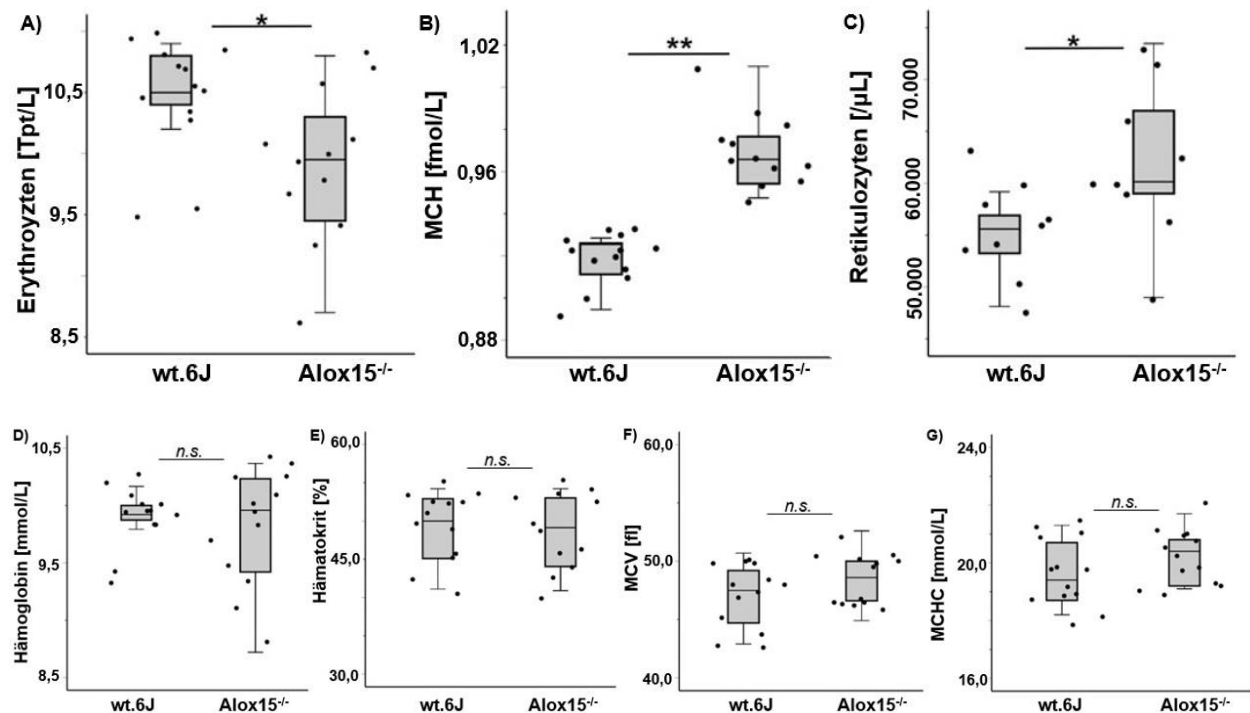
###### **4.4.1.1. Einfluss der systemischen homozygoten Inaktivierung der Alox15 auf die basalen Blutparameter der Maus**

Der Einfluss der Alox15 auf die Erythrozytenreifung wurde bereits in den 70er Jahren diskutiert. Hier erfolgte erstmalig der Nachweis des Enzyms in den Retikulozyten von Kaninchen. Die Alox15 führte *in vitro* zur Lyse intakter Rattenlebermitochondrien, wenn diese *in vitro* mit der gereinigten ALOX15 inkubiert wurden (66). Weiterhin zeigten Untersuchungen der Atmungskapazität von unreifen Retikulozyten eine progressive Abnahme der zellulären Atmung bei steigender Enzymaktivität im Verlauf der *in vitro* Zellreifung (301). Im Verlauf der Jahre konnte die Alox15 in Retikulozyten weiterer Tieren nachgewiesen werden, darunter Ratten (339), Mäusen (340) sowie beim Menschen (54). Untersuchungen an Alox15-defizienten Mäusen (Alox15<sup>-/-</sup>) wiesen jedoch keine phänotypischen Auffälligkeiten im hämatopoetischen System dieser Tiere auf (191, 196). Im Jahr 2010 zeigten allerdings detaillierte Untersuchungen an hämatopoetischen Stammzellen von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen eine mögliche Rolle der Alox15 bei der Hämatopoese



(302). Anknüpfend an diese Befunde wurden im zweiten Teil meiner Dissertation die basalen Blutparameter von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen mit denen von Wildtypmäusen mit identischem Hintergrund verglichen, um den Einfluss der Alox15 auf die Hämatopoese weiter zu untersuchen.

Hierbei zeigte sich, dass ein homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einer signifikanten Reduktion der Erythrozyten (\*p=0,022) mit konsekutivem signifikanten Anstieg der Retikulozyten (\*p=0,05) führt (Abb.19;**A,C**). Weiterhin kommt es durch den Verlust der Alox15 zu einer signifikanten Hyperchromie (\*\*p=0,000) der Erythrozyten gegenüber Wildtypkontrolltieren (wt.6J) (Abb.19;**B**). Die weiteren untersuchten Blutparameter (Hb, HK, MCV, MCHC) zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb.19;**D-G**), wenn die beiden genotypisch unterschiedlichen Mausstämme miteinander verglichen wurden.

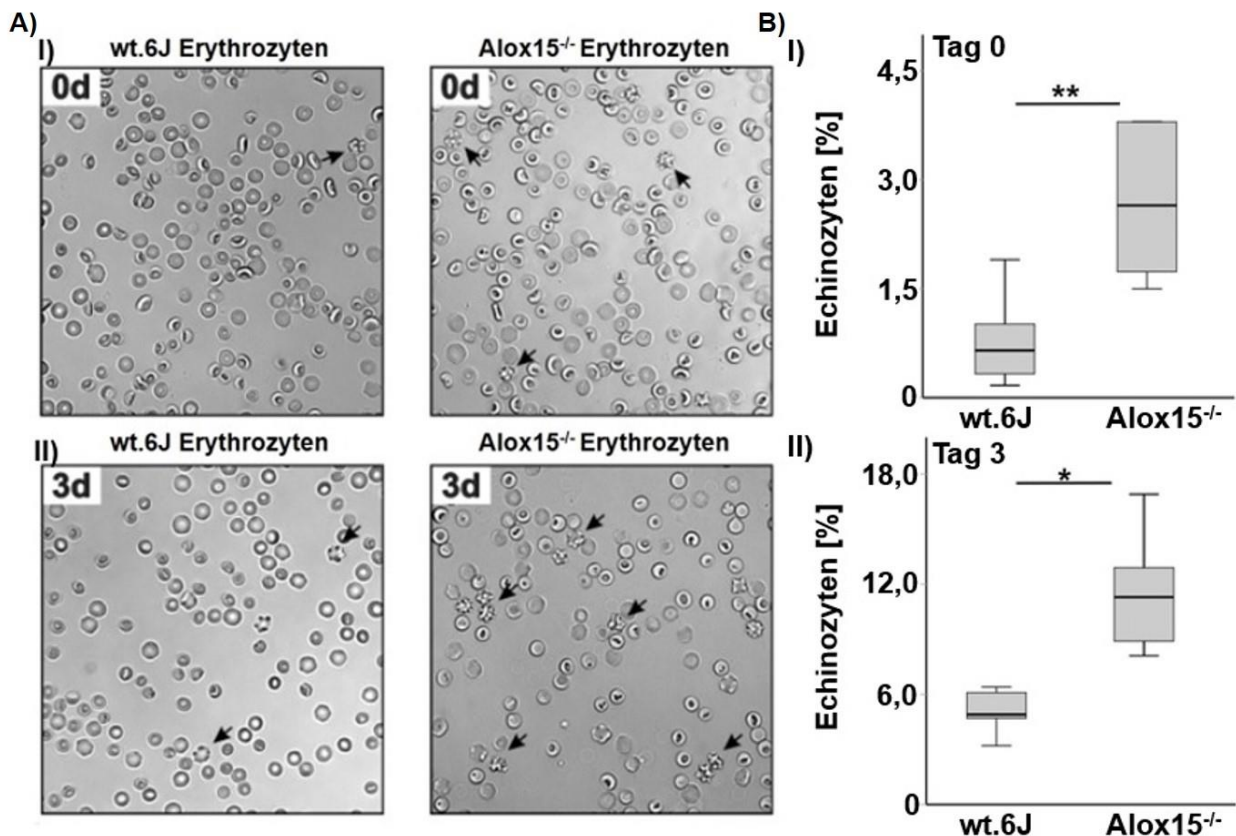


**Abb. 19: Basale Blutparameter in Mäusen mit systemischem homozygoten Knockout der Alox15.** Den Tieren wurde wie in 3.2.8. beschrieben ca. 200  $\mu$ l Blut entnommen und analysiert. Mit Hilfe von EDTA wurde die Koagulation verhindert. Untersucht wurden **A**) die Erythrozytenzahl in Tera-Partikel pro Liter, **B**) mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH), **C**) Retikulozytenanzahl pro Microliter, **D**) Hämoglobin in Millimol pro Liter, **E**) Hämatokritwert in Prozent **F**) mittleres korpuskuläres Volumen (MCV) in Femtoliter, **G**) mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC). wt.6J: C57BL/6J Wildtyp; Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>; n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-U*-Tests berechnet. n=9-13.

**Zusammenfassung:** Ein systemischer homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) führt zu einer signifikanten Reduktion der Erythrozyten, einer Hyperchromie sowie einem konsekutivem Anstieg der Retikulozyten.

#### 4.4.1.2. Bestimmung der strukturellen Integrität von Erythrozyten in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen festgestellt werden konnte, dass ein systemischer homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einer leichten Hyperchromie sowie Retikulozytose führt, sollte im nächsten Schritt die Morphologie der peripheren Erythrozyten untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und im Anschluss in gekammerte Objektträger gegeben. Mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie erfolgte die Auszählung unterschiedlicher Bildausschnitte der lebenden Zellen direkt nach der Zellpräparation sowie nach 3 Tagen in einer *in vitro* Kultur (siehe 3.2.20.).

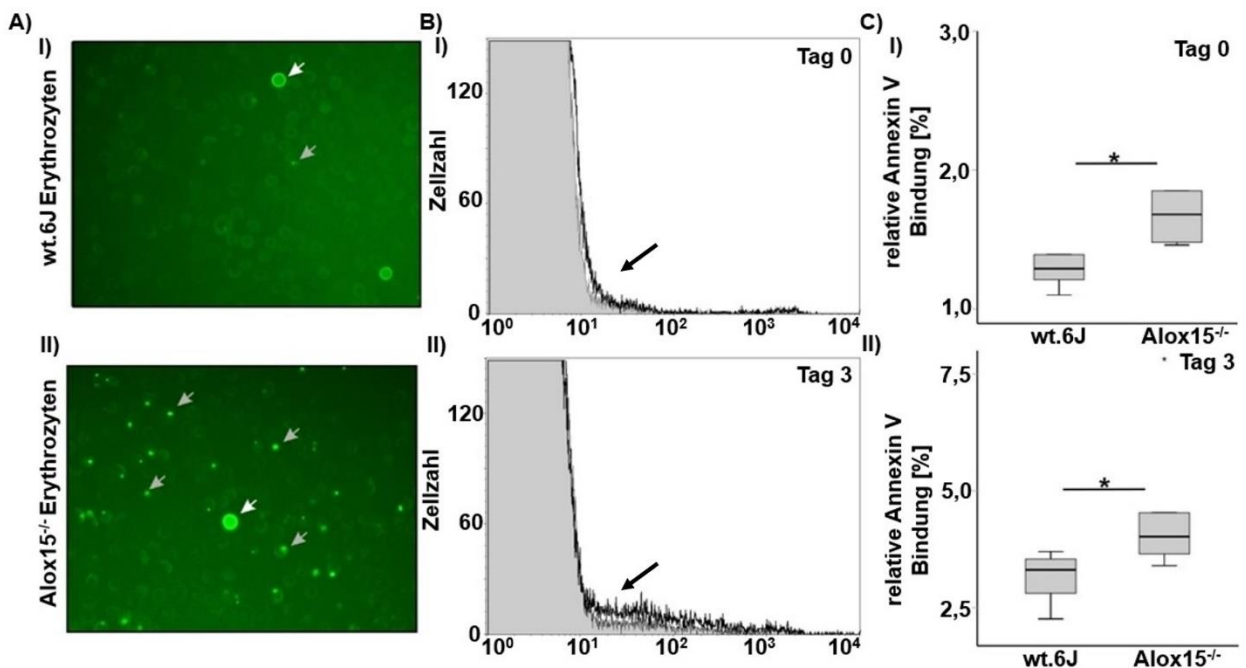


**Abb. 20: Hellfeldmikroskopie von Erythrozyten aus Alox15<sup>-/-</sup> Tieren und entsprechenden Wildtypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie die relative prozentuale Veränderung der Anzahl morphologisch auffälligen Zellen.**

Dargestellt ist die Hellfeldmikroskopie (A) mit Auszählung der morphologisch auffälligen Echinozyten/Akanthozyten (Pfeile) sowie deren relativer Anteil (B). wt.6J: C57BL/6J Wildtyp; Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests berechnet. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 5-8.

In Wildtypmäusen (wt.6J) zeigten sich am Tag 0 der Kultivierungsperiode überwiegend regulär geformte, bikonkave Erythrozyten (Abb.20;A,I). Weniger als 1 % der Zellen konnten als Echinozyten (Stechapfelzellen) oder Akanthozyten (Stachelzellen) identifiziert werden. In den untersuchten peripheren Blutzellen der Alox15<sup>-/-</sup> Tiere war der

relative Anteil der irregulär geformter Erythrozyten deutlich höher (Abb.20;B,I) und die Differenz war statistisch signifikant (\*\* $p=0,002$ ). Anschließend wurden die Zellen für 3 Tage *in vitro* kultiviert und die morphometrische Analyse im Anschluss wiederholt. Die Anzahl der morphologisch veränderten Zellen war nach dieser Periode sowohl in den Wildtypen als auch in den Alox15<sup>-/-</sup> Tieren erhöht (Abb.20;A,II). Der relative Anteil der Echinozyten/Akanthozyten in den Alox15 Knockout Tieren war jedoch weiterhin signifikant erhöht (\* $p=0,009$ ) gegenüber den Wildtypen (Abb.20;B,II). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Verlust der funktionellen Alox15 zu einer Veränderung der Struktur in Erythrozyten führt.



**Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopie sowie FACS-Analyse von Erythrozyten in Alox15<sup>-/-</sup> Tieren.**

Dargestellt ist die Fluoreszenzmikroskopie von Erythrozyten, die mit FITC-konjugiertem Annexin V angefärbt wurden (A,I+II). Die Zellen wurden im Anschluss mit Hilfe der FACS-Analyse im Durchflusszytometer untersucht (B,I+II). Abschließend erfolgte die Darstellung der relativen Bindung von Annexin V in Erythrozyten vom Wildtypen (C57BL/6J) sowie dem Alox15<sup>-/-</sup> Tier (Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>) (C,I+II). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests berechnet. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 5.

Um die molekulare Basis für die beobachteten morphologischen Veränderungen besser zu verstehen, wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin V angefärbt. Hierbei handelt es sich um ein zelluläres Protein, welches an Phosphatidylserin bindet. Ist die Membranstruktur der Zellen gestört, transloziert dieses Phospholipid, welches bei intakten Zellmembranen vor allem in der inneren Halbschicht der Phospholipiddoppelschicht lokalisiert ist, in die äußere Halbschicht und ist damit dem Annexin V zugänglich (325). Die Plasmamembran verliert ihre Asymmetrie, was ein

frühes Zeichen für funktionelle Membranveränderungen darstellt. Durch die Kopplung mit Fluorescein an Annexin V kommt es zu einer Fluoreszenz der Zellen.

Nach der immunhistochemischer Anfärbung und Inkubation der Zellen (siehe 3.2.19.) wurden in der Fluoreszenzmikroskopie unterschiedliche Gesichtsfelder willkürlich ausgesucht und die Annexin V positiven Zellen ausgezählt. Hierbei zeigte sich, dass im Blut von Alox15<sup>-/-</sup> Tieren ein größerer Anteil von angefärbte Zellen vorhanden war als im Blut von Wildtypen (Abb.21;**A,I+II**). Für eine genauere Quantifizierung der Ergebnisse wurde im Anschluss eine FACS-Analyse der Zellen durchgeführt (Abb.21;**B,I+II**). Diese konnte den subjektiven Eindruck, der bei der Fluoreszenzmikroskopie entstanden ist, bestätigen. Eine statische Analyse der Messwerte zeigte eine signifikant größere Annexin V Anfärbung sowohl an Tag 0 (\*p=0,028) als auch an Tag 3 (\*p=0,047) in den Alox15 Knockout Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>) gegenüber den Kontrollen (Abb.21;**C,I+II**). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Alox15, wie bereits erwähnt, während der Transition von Erythrozyten zu Retikulozyten, involviert ist.

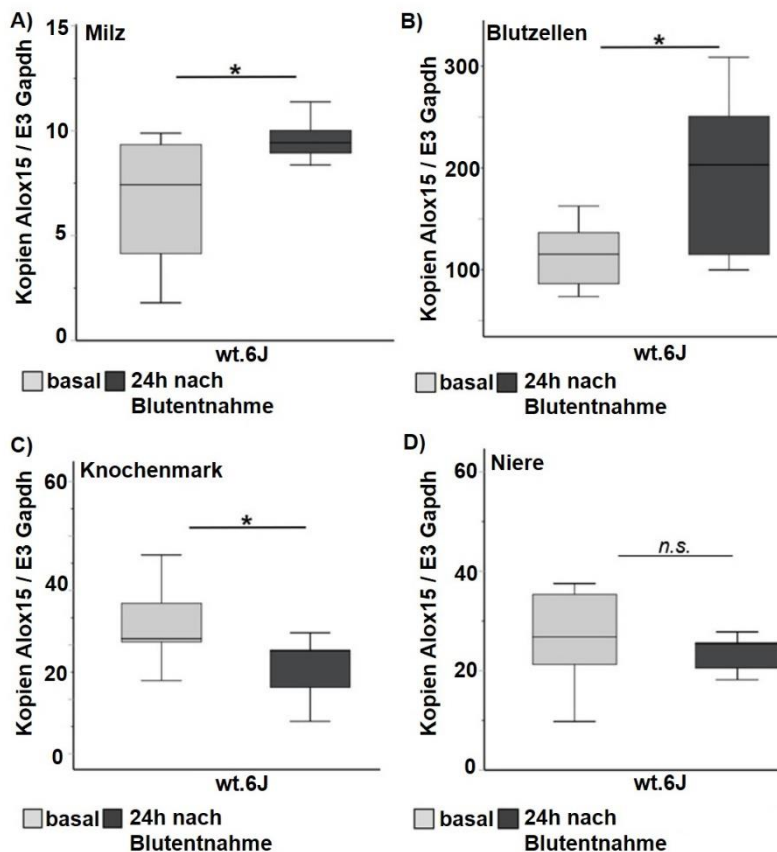
**Zusammenfassung:** Ein homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) führt zur Bildung von strukturell beeinträchtigten Erythrozyten. Diese weisen eine veränderte Plasmamembran mit reduzierter Asymmetrie der Lipiddoppelschicht auf.

### 4.4.1.3. Auswirkungen der diagnostischen Blutentnahme auf die Expression und Aktivität der Alox15

Eine regelmäßige Blutentnahme induziert beim Kaninchen eine experimentelle Anämie, welche sich neben der erhöhten Retikulozytenzahl auch in einer erhöhten Expression der Alox15 manifestiert (301). Diese geht mit einer erhöhten Enzymaktivität in den unreifen Retikulozyten einher (341).

Um zu untersuchen, ob eine einmalige diagnostische Blutentnahme von rund 200 µl (ca. 6% des Blutvolumens bezogen auf das Körpergewicht der untersuchten Mäuse) einen Einfluss auf die Expression der Alox15 in verschiedenen Geweben hat, wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J) 24 Stunden nach Blutentnahme getötet und verschiedene Organe untersucht. Die Milz und Nieren wurden wie in 3.2.7. herauspräpariert. Zur Analyse des Knochenmarks verwendeten wir beide Femora der Maus. Weiterhin erfolgte eine Analyse der peripheren Blutzellen der Tiere. Die RNA aller beschriebenen Gewebe wurde wie in 3.2.9. dokumentiert isoliert und im Anschluss an die reverse Transkription

eine qRT-PCR durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass durch die diagnostische Blutentnahme die Expression der Alox15 sowohl in der Milz (\*p=0,034) als auch in den peripheren Blutzellen (\*p=0,045) signifikant ansteigt (Abb.22;A+B). Weiterhin konnte ein leichter, jedoch signifikanter Abfall in den Zellen des Knochenmarks (\*p=0,038) nachgewiesen werden (Abb.22;C). In der Niere zeigte sich keine Veränderung der Alox15 Expression durch die diagnostische Blutentnahme (Abb.22;D).



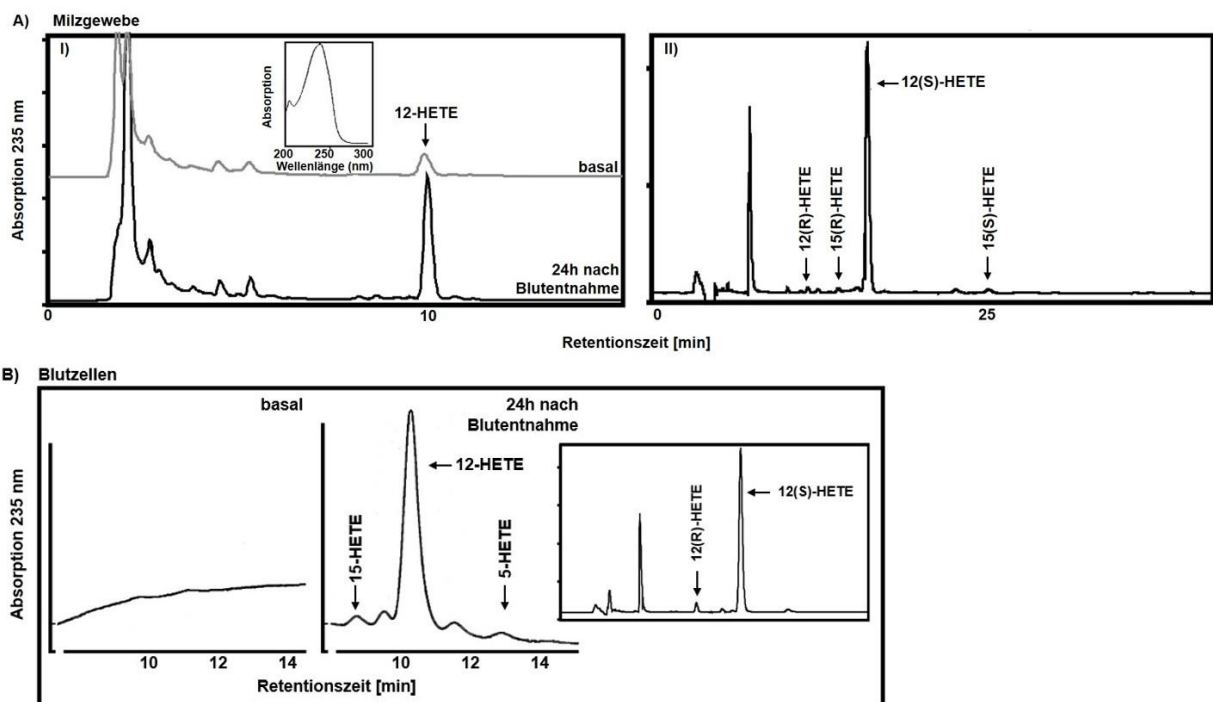
**Abb. 22: Expression der Alox15 mRNA in verschiedenen hämatopoetischen Geweben.**

Dargestellt ist die mRNA Expression der Alox15 bezogen auf das Referenzgen Gapdh in verschiedenen hämatopoetischen Geweben basal und 24 h nach Blutentnahme in Wildtypmäusen (wt.6J; C57BL/6J). Die verschiedenen Gewebe wurden wie in Material und Methoden beschrieben entnommen, aufgearbeitet und mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. **A)** Expression der Alox15 mRNA in der Milz **B)** Expression der Alox15 mRNA in den Blutzellen **C)** Expression der Alox15 mRNA im Knochenmark **D)** Expression der Alox15 mRNA in der Niere Alox15: 12/15-Lipoxygenase; Gapdh: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; untersuchte Gewebe: Blutzellen, Knochenmark, Milzgewebe sowie Nierengewebe. Die Signifikanz wurde mittels *Mann-Whitney-U* Test bestimmt. Das Experiment wurde von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 6-9.

Um zu überprüfen, ob die vermehrte Expression der Alox15 auch mit einer veränderten Enzymaktivität des Enzyms einhergeht, wurden im nächsten Schritt die katalytischen Aktivitäten mit Hilfe eines Aktivitätsassays bestimmt. Hierfür verwendeten wir sowohl die peripheren Blutzellen als auch das Milzgewebe von Wildtypmäusen nach erfolgter diagnostischer Blutentnahme. Im Anschluss injizierten wir jeweils 0,3 ml der Lipidpräparation in den RP-HPLC und quantifizierten die Menge an 12-HETE (12-Hydroxyeicosatetraensäure), die während der Inkubationszeit gebildet wurde. Aus den Umkehrphasenchromatogrammen der HPCL geht hervor, dass sich im Lysat der Milz eine katalytische Aktivität nachweisen lässt, die *in vitro* Arachidonsäure zu 12-HETE umwandeln kann (Abb.23;A, oberes Chromatogramm). Wenn ein vergleichbares Aktivitätsassay durchgeführt wurde, bei dem an Stelle von Milzlysat die gleiche Menge

## Ergebnisse

PBS eingesetzt wurde (Nichtenzymkontrolle), konnte keine 12-HETE Bildung nachgewiesen werden (Chromatogramm nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde ein Aktivitätsassay durchgeführt, bei dem ein Milzlysate der Mäuse nach diagnostischer Blutentnahme verwendet wurde (Abb.23;A, unteres Chromatogramm). Hier konnte ein deutlicher Anstieg der 12-HETE Bildung nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Diodenarraydetektors wurde das UV-Spektrum des 12-HETE Peaks aufgenommen. Dieses Spektrum (Abb.23;A, Inset) ist charakterisiert durch ein konjugiertes Diensystem mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm. Dieses UV-Spektrum belegt die chemische Struktur des erwarteten Oxygenierungsproduktes. Zur weiteren Analyse wurde das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung (12-HETE) mittels RP-HPLC präpariert und anschließend die Enantiomerenzusammensetzung mittels kombinierter Normalphasen-/Chiralphasen-HPCL ermittelt (Abb.23;A, II). Dabei konnte festgestellt werden, dass die gebildeten Oxygenierungsprodukte zu mehr als 95 % 12S-HETE darstellen. Nur geringe Mengen an 12R-HETE und andere HETE-Isomeren (15S- bzw. 15R-HETE) konnten nachgewiesen werden.

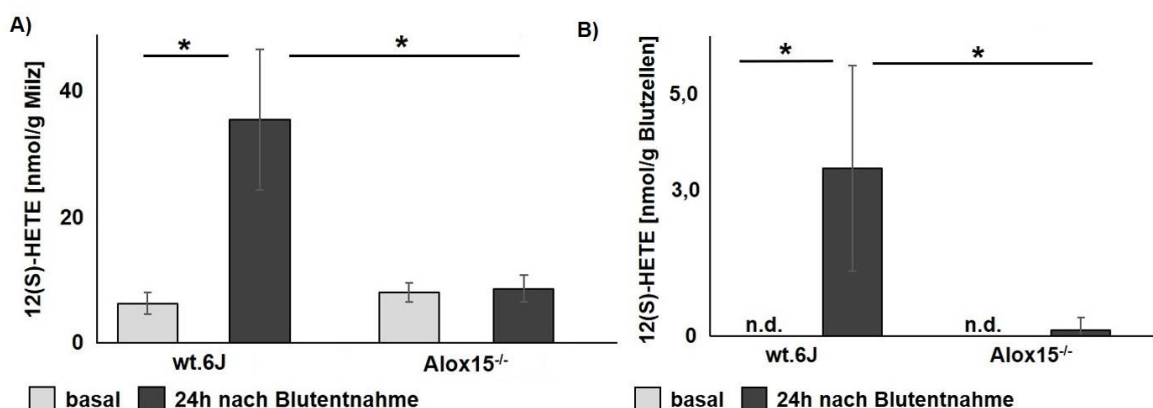


**Abb. 23: Oxygenierungsprodukte in verschiedenen murinen Geweben nach Inkubation mit Arachidonsäure.**

Die Gewebe wurden den Mäusen wie in 3.2.18. entnommen und für die HPLC-Analyse entsprechend aufgearbeitet. Die Produkte wurden anhand der Retentionszeit der HPLC-Standards charakterisiert. **A)** HPLC Analyse des Milzgewebes mit **I)** RP-HPLC Chromatogramm und **Inset**: Negativprobe sowie **II)** Chiralphasen HPLC mit Nachweis von Lipoxygenierungsprodukten. **B)** HPLC Analyse von Blutzellen mit **I)** RP-HPLC Chromatogramm sowie **II)** Chiralphasen HPLC. 12-HETE: 12-Hydroxy-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraensäure; R/S: Enantiomere der 12-HETE; 5-HETE: 5-Hydroxyeicosatetraensäure; 15-HETE: 15-Hydroxyeicosatetraensäure. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. sowie H.K. gemeinsam durchgeführt. n=4.

Ähnliche Aktivitätsassays wurden mit peripheren Blutzellen der Alox15 Quelle durchgeführt. Wurden die Aktivitätsassays roter Blutzellen verwendet, konnte keine 12-HETE Bildung nachgewiesen werden (Abb.23;B, linkes Chromatogramm). Wurden hingegen rote Blutzellen von Mäuse nach Blutentnahme verwendet, konnten signifikante Mengen an 12-HETE als dominantes Arachidonsäureoxygenierungsprodukt nachgewiesen werden (Abb.23;B, rechtes Chromatogramm). Auch hier zeigte eine kombinierte Normalphasen-/Chiralphasen-HPLC zeigen, dass es sich dabei fast ausschließlich um 12S-HETE handelte (Abb.23;B, Inset).

Aus den Ergebnissen der HPLC geht ein Anstieg der 12(S)-HETE Produktion sowohl in den peripheren Blutzellen sowie dem Milzgewebe hervor. Im nächsten Schritt quantifizierten wir die Menge an 12(S)-HETE in Tieren mit und ohne diagnostischer Blutentnahme (Abb.24). Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Produkts sowohl in der Milz (\*p=0,012) als auch den peripheren Blutzellen (\*p=0,046) von Wildtypen (wt.6J) nach diagnostischer Blutentnahme (Abb.24;A+B). Dieser Anstieg ist im Vergleich mit dem gebluteten Alox15<sup>-/-</sup> Tier signifikant größer (Milz: \*p=0,012; Blutzellen \*p=0,050). Bei Tieren mit einem systemischen Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) hingegen, zeichnet sich keine Änderung der Menge an 12(S)-HETE ab (Abb.24;A+B). Ein Vergleich zwischen Wildtypen ohne Blutentnahme und Alox15<sup>-/-</sup> Tieren mit diagnostischer Blutentnahme erbrachte keinen Unterschied in der 12(S)-HETE Menge. Hieraus lässt sich schließen, dass bereits eine diagnostische Blutentnahme ausreichend ist, um die Expression der Alox15 in Milz und peripheren Blutzellen zu induzieren.

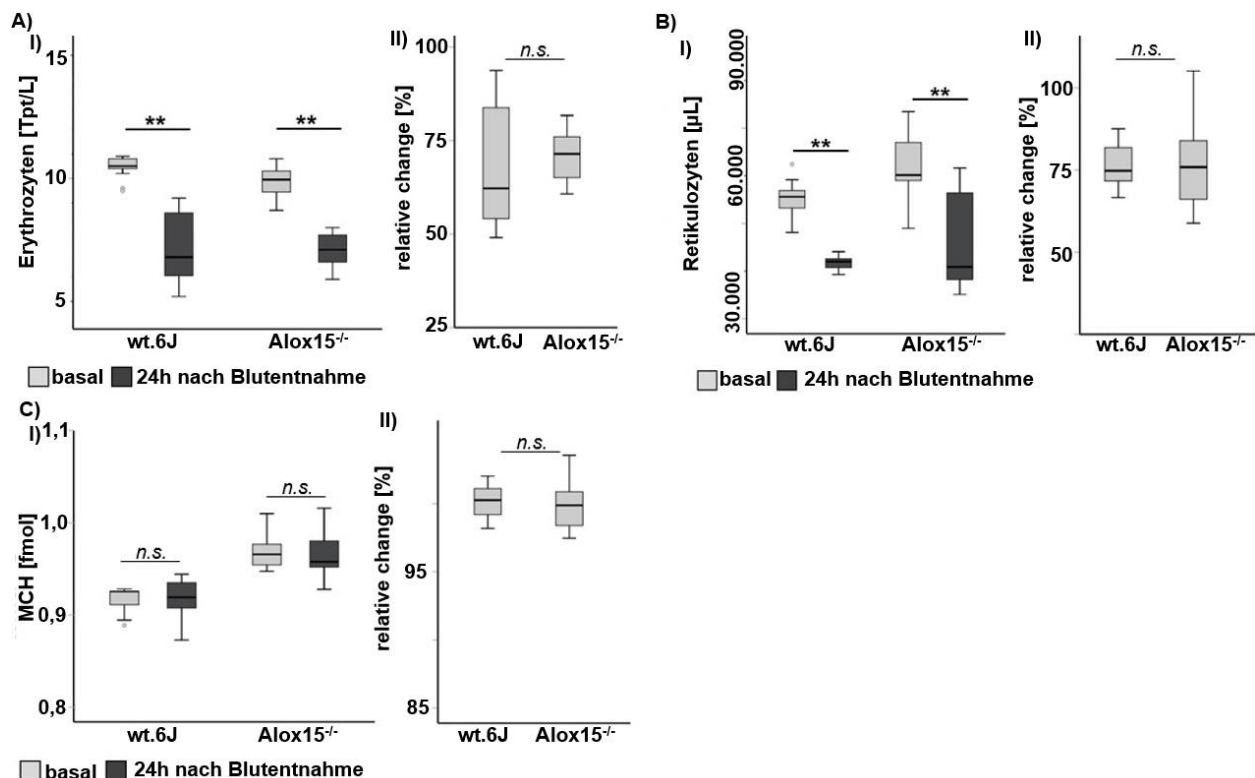


**Abb. 24: Menge an 12(S)-HETE in murinen Geweben vor und nach diagnostischer Blutentnahme.** Die Menge an 12(S)-HETE in nmol/g wurde mit Hilfe der RP-HPLC bestimmt. **A)** Menge an 12(S)-HETE im Milzgewebe. **B)** Menge an 12(S)-HETE in peripheren Blutzellen. 12(S)-HETE: 12-Hydroxyeicosatetraensäure; wt.6J: Wildtyp (C57BL/6J); Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>; n.d.: nicht detektierbar. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n=4.

**Zusammenfassung:** Eine diagnostische Blutentnahme führt zu einer signifikant erhöhten Expression von Alox15 mRNA sowohl in der Milz als auch in peripheren Blutzellen. Diese geht einher mit einem konsekutivem Anstieg der katalytischen Aktivität des Enzyms mit signifikant erhöhter 12(S)-HETE Bildung.

#### 4.4.1.4. Blutparameter der Maus nach diagnostischer Blutentnahme in Tieren mit systemischem Knockout der Alox15

Sowohl der systemische homozygote Knockout der Alox15 als auch die diagnostische Entnahme von Blut führen zu signifikanten Veränderungen im hämatopoetischen System der Maus (siehe 4.4.1.1 und 4.4.1.3). Um zu schauen, ob sich die regulatorischen Fähigkeiten des hämatopoetischen Systems zwischen Wildtypmäusen C57BL/6J (wt.6J) und Alox15<sup>-/-</sup> Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>) unterscheiden, haben wir das Ausmaß der hämatopoetischen Veränderungen von Wildtyptieren und Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen in Beantwortung eines Blutungsreizes verglichen.



**Abb. 25: Vergleich verschiedener Blutparameter vor und nach diagnostischer Blutentnahme in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>).**

Dargestellt sind die Erythrozytenzahl (A), die Retikulozyten (B) sowie der mittlere Hämoglobingehalt (MCH) (C) in Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen (Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>) sowie den zugehörigen Wildtypen (wt.6J; C57BL/6J) vor und 24 Stunden nach diagnostischer Blutentnahme. n.s.: nicht signifikant Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests bestimmt. n=7 – 17.

Wenn die Alox15 eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese spielt, sollte erwartet werden, dass die hämatopoetischen Veränderungen bei den Alox15<sup>-/-</sup> Tieren aufgrund



der beeinträchtigten Regenerationskapazität deutlicher ausfallen. Wir haben beobachtet, dass eine einmalige diagnostische Blutentnahme sowohl in Wildtypmäusen (wt.6J) als auch in Alox15<sup>-/-</sup> Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einer signifikanten Reduktion der Erythrozyten (\*\*p<sub>≤</sub>0,005) als auch der Retikulozytenzahl (\*\*p<sub>≤</sub>0,005) führt (Abb.25;A+B,I). Ein Vergleich des Ausmaßes dieser Abnahme jedoch erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Abb.25;A+B,II). Der mittlere Hämoglobingehalt (MCH) zeigte in beiden Genotypen sowohl vor als auch nach diagnostischer Blutentnahme keine signifikanten Veränderungen (Abb.25;C,I+II).

**Zusammenfassung:** Die einmalige diagnostische Blutentnahme führt sowohl in Alox15<sup>-/-</sup> Tieren als auch in Wildtypen zu einer signifikanten Reduktion der Erythrozytenzahl. Es kann geschlossen werden, dass die regenerative Kapazität des hämatopoetischen Systems durch die Inaktivierung des Alox15 Gens unter den gegebenen experimentellen Bedingungen kaum beeinflusst wird.

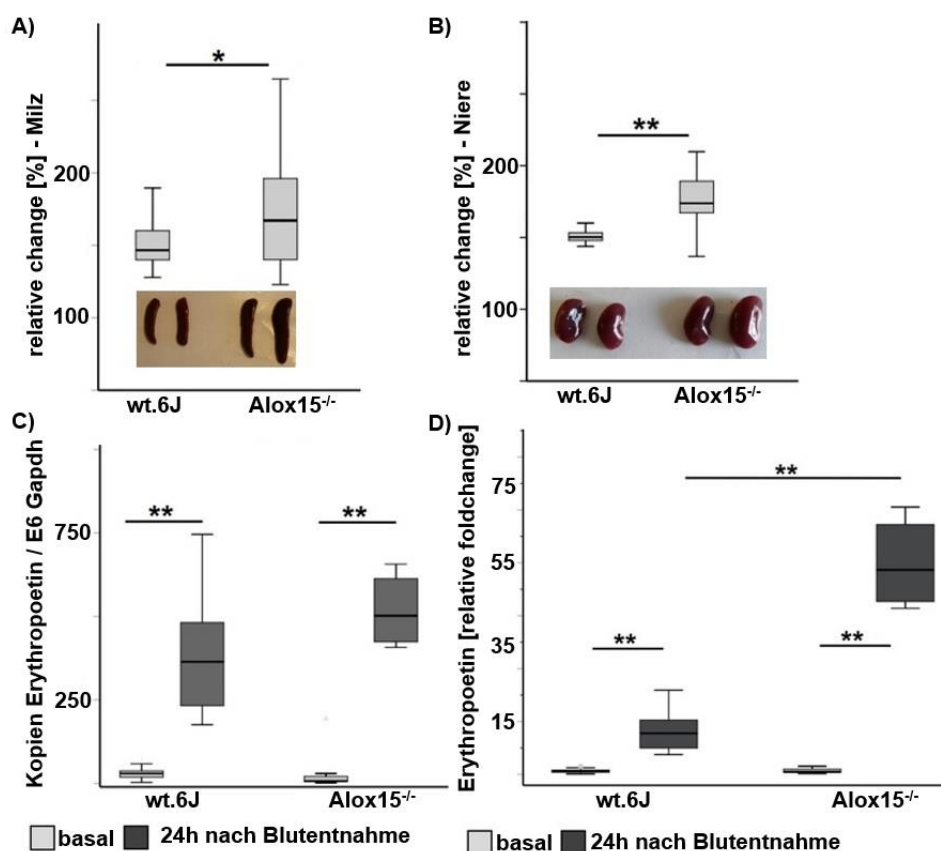
#### 4.4.1.5. Vergleich der Organgewichte sowie der Epo-Expression in Mäusen mit systemischen homozygoten Knockout der Alox15

Der Hauptproduktionsort der Erythropoese im humanen und murinen System ist das Knochenmark. Hämatopoetische Stammzellen sorgen für die kontinuierliche Bereitstellung von peripheren Blutzellen (342). In extremen Situationen, wie durch eine Anämie oder hypoxischen Stress in der Peripherie, muss eine schnelle Bereitstellung von Erythrozyten erfolgen. Dieser Prozess wird als Stresserythropoese bezeichnet (343). Es kommt hierbei zu einer starken Ausdehnung der erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark mit schnellem Anstieg der Retikulozytenzahlen im Blut (344). Beim Menschen findet dieser Prozess primär im Knochenmark statt. Im adulten murinen System findet die Stresserythropoese extramedullär in der Milz sowie anteilig auch in der Leber statt (345-347). Kommt es zu einer dauerhaften Anämie, zum Beispiel im Rahmen einer chronischen Entzündung, kann eine Expansion der erythroiden Vorläuferzellen in der Milz beobachtet werden. Weiterhin zeigt sich eine Splenomegalie in den betroffenen Tieren (348).

Da auch ein systemischer Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) einen milden erythroiden Stressreiz darstellt, haben wir im Folgenden die Gewichte der Nieren und der Milz von Wildtypmäusen sowie von Alox15<sup>-/-</sup> Tieren untersucht. Das Gewicht wurde im Anschluss auf das Körpergewicht der einzelnen Tiere bezogen. Hierbei zeigte sich, dass ein

## Ergebnisse

systemischer homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einer leichten, aber signifikanten Gewichtszunahme in der Milz (\*p=0,044) der Tiere führt (Abb.26;A). Ein permanenter systemischer Knockouts der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) stellt eine chronische Herausforderung an das erythroide System dar. Einer der wichtigsten Regulatoren der Erythropoese ist das Glykoprotein-Hormon Erythropoetin (Epo), welches in den peritubulären Zellen der Niere gebildet wird (349). Durch Blutverlust oder verminderte Oxygenierung des peripheren Gewebes, kommt es zur vermehrten Sekretion des Hormons. Es bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) der erythroiden Vorläuferzellen und induziert somit die terminale Differenzierung zu Erythrozyten (350).



**Abb. 26: Vergleich der Organgewichte sowie der Epo-Expression in Wildtypmäusen und Tieren mit systemischem Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>).**

**A)** Relatives Milzgewicht bezogen auf das Körpergewicht von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyptieren. **B)** Relatives Gewicht der Nieren bezogen auf das Körpergewicht von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyptieren. **C)** Basale Expression von Epo-mRNA in Wildtyptieren von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen. **D)** Vorher-Nachher Vergleich der relativen Epo-Expression in Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen und Wildtyptieren. wt.6J: C57BL/6J; Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>+/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-U-Test* bestimmt. n=5-22

Um zu untersuchen, ob sich die Produktion des Erythropoetins durch die genetischen Veränderungen der Tiere verändert, verglichen wir initial das Organgewicht der Nieren zwischen Wildtyptieren und Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen. Hier zeigte sich, dass Mäuse mit Alox15-Defizit (Alox15<sup>-/-</sup>) signifikant größere Nieren (\*\*p≤0,000) gegenüber den

Wildtypmäußen (wt.6J) aufweisen (Abb.26;B). Im Anschluss daran wurde die basale mRNA Expression von Erythropoetin in den Nieren von Alox15<sup>-/-</sup> Tieren und Wildtypen bestimmt. Hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen nachweisbar (Abb.26;C). Es zeigte sich jedoch, dass eine diagnostische sowohl in Alox15<sup>-/-</sup> Tieren als auch in Wildtypmäusen zu einem signifikanten Anstieg (\*\*p≤0,005) der Erythropoetin Expression führt. Im nächsten Schritt verglichen wir die relative Expressionsänderung von Erythropoetin 24 Stunden nach diagnostischer Blutentnahme zwischen Alox15<sup>-/-</sup> Tieren entsprechenden Wildtypmäusen (wt.6J). Dabei konnte festgestellt werden, dass die relative Epo-mRNA Expression (vorher/nachher Verhältnis) in den Alox15-defizienten Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>) signifikant (\*\*p≤0,005) größer war als in den Vergleichstieren (Abb.26;D).

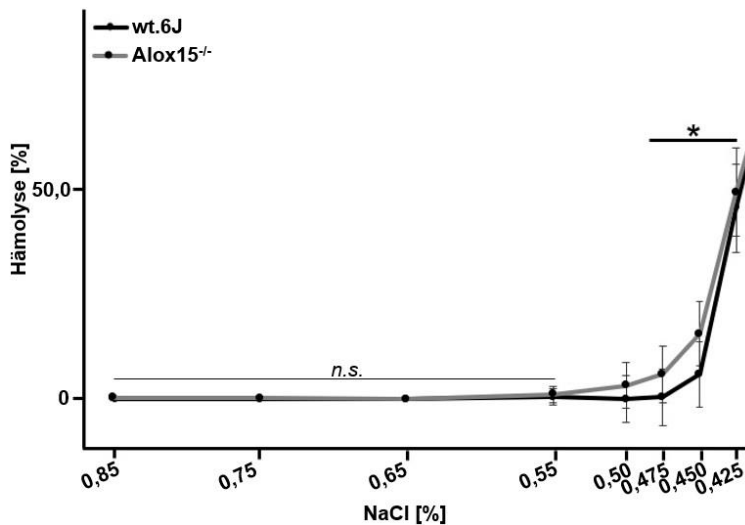
**Zusammenfassung:** Die systemische Inaktivierung des Alox15 Gens zeigt basal keine Hochregulation der Epo-Expression. Ein zusätzlicher Stimulus, z.B. in Form einer diagnostischen Blutentnahme, führt zu einem signifikant unterschiedlichen kompensatorischen Expressionsanstieg von Erythropoetin zwischen Alox15<sup>-/-</sup> Tieren und Wildtypmäusen.

#### 4.4.1.6. Messung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten in Mäusen mit verändertem Alox15 Genotyp

Die Bestimmung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten ist ein häufig eingesetztes Verfahren zur Testung der Qualität der Erythrozytenmembran. Das Verfahren findet Anwendung beispielsweise in der Diagnostik seltener hereditärer Erkrankungen, die mit einer hämolytischen Anämie einhergehen (351, 352).

Um zu testen, ob sich die Erythrozyten von Wildtypmäusen sowie von Alox15<sup>-/-</sup> Tieren hinsichtlich ihrer osmotischen Stabilität unterscheiden, wurden die Zellen in einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlich konzentriertem Natriumchlorid (NaCl) inkubiert und der Hämolysegrad bestimmt (Abb.27). Die Konzentration des Salzes variierte zwischen 0,85 bis 0,4%. Im Bereich von 0,85 bis 0,55% Natriumchlorid gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen und die Kurve der Hämolyse verläuft fast identisch (p=0,108). Ab einer Konzentration von 0,5% begannen sich die beiden Kurven voneinander zu abzuweichen. Bei dieser NaCl-Konzentration war der Unterschied jedoch noch nicht statistisch signifikant (p=0,389). Im Bereich der NaCl-Konzentration von 0,450 % zeigten sich eine signifikant größere Hämolyse (\*p=0,028) in den Alox15<sup>-/-</sup> Tieren

(Abb.27). Im NaCl-Konzentrationsbereich von 0,475 % bis 0,425 % zeigte der Vorzeichentest eine signifikant erhöhte Hämolyse (\*p=0,027) der Alox15 Knockout Erythrozyten.



**Abb. 27: Darstellung der osmotischen Stabilität von Erythrozyten von Tieren mit systemischen Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>).**

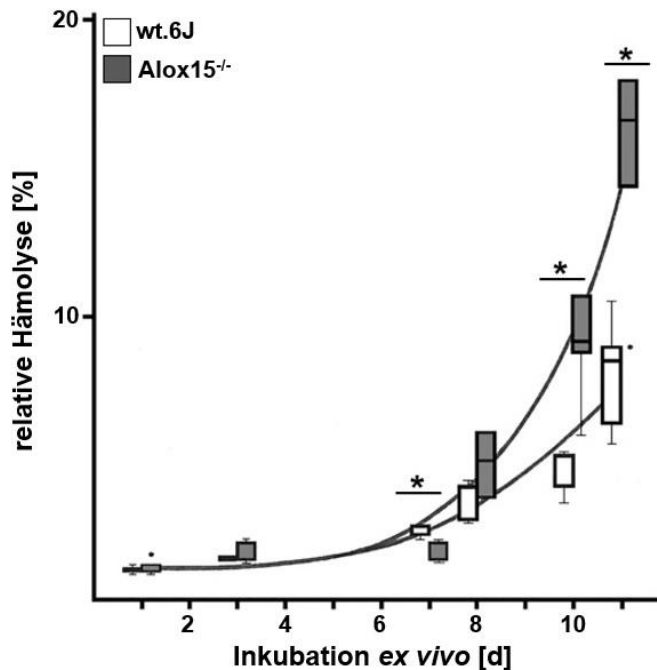
Die Blutzellen wurden gewaschen und mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen versetzt (siehe Material und Methoden). NaCl: Natriumchlorid; wt.6J: C57BL/6J (Wildtyp); Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>+/+</sup>-Alox15<sup>-/-</sup>. n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student's T-Test sowie dem Vorzeichentest bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 7.

**Zusammenfassung:** Ein systemischer homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) führt zu einer signifikant geringeren osmotischen Stabilität der roten Blutzellen.

#### 4.4.2. Bestimmung der *ex vivo* Lebensspanne von Erythrozyten in Tieren mit systemischen Alox15 Knockout

Die reduzierte osmotische Stabilität der Alox15 Knockout Erythrozyten deutet darauf hin, dass die Plasmamembran der Zellen eine verminderte Stabilität aufzeigt. Wäre dies der Fall, sollten die Erythrozyten *ex vivo* eine reduzierte Lebensdauer aufweisen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine *in vitro* Kultur von Erythrozyten angelegt. Dazu wurden die peripheren Blutzellen von Tieren mit unterschiedlichem Genotyp entnommen (3.2.8.). Kultivierung erfolgte nach der Vorschrift von Bigdelou (318). Die Kultivierungsdauer lag bei insgesamt 11 Tagen, wobei Proben an unterschiedlichen Tagen des Kultivierungsintervalls entnommen und der Grad der *ex vivo* Hämolyse getestet wurde. Es zeigte sich, dass die Erythrozyten von Wildtyptieren und von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen nur ein geringes Maß an spontaner Hämolyse aufweisen, wenn sie bis zu 7 Tagen *ex vivo* kultiviert werden (Abb.28). In diesem Zeitintervall gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Ab dem 8. Tag kommt es bei den Alox15 Knockout Erythrozyten (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einer vermehrten Hämolyse. Dieser Unterschied zu den Wildtypzellen ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht statistisch signifikant (p=0,175). Am Tag 10 (\*p=0,009) und an Tag 11 (\*p=0,021) des Versuches wurde jedoch bei den Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten eine signifikant erhöhte Hämolyse verglichen

mit den Wildtypzellen gemessen. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Tiere mit systemisch homozygotem Knockout der Alox15 *ex vivo* eine reduzierte Lebensspanne ihrer Erythrozyten aufweisen. Ob ähnliche Veränderungen auf für die *in vivo* Lebensdauer der Erythrozyten nachweisbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.



**Abb. 28: Darstellung der Hämolyse in Erythrozyten von Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen und den korrespondierenden Wildtypen zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.** Dargestellt ist die Hämolyse in [%] in Erythrozyten von Alox15<sup>-/-</sup> Tieren (Gpx4<sup>+/+</sup>+ Alox15<sup>-/-</sup>) und den entsprechenden Wildtypen (wt.6J, C57BL/6J). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* sowie dem Vorzeichentest bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 5.

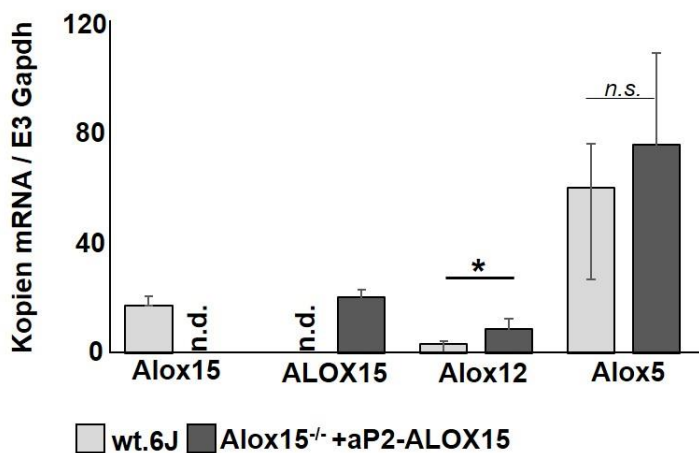
**Zusammenfassung:** Ein systemischer Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) führt zu einer verminderten *ex vivo* Lebensdauer der Erythrozyten.

#### 4.4.3. Transgene Expression der humanen ALOX15 in Mäusen mit systemischen Knockout der endogenen Alox15

Der systemische homozygote Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) führt in Mäusen zu einem erythroiden Phänotyp mit veränderten basalen Blutparametern, veränderter Epo-Expression sowie veränderter Morphologie und Lebensspanne der Erythrozyten. Um zu testen, ob die transgene Expression des humanen ALOX15 Gens in diesen Tieren den fehlerhaften Phänotyp ausgleichen kann, wurden im weiteren Verlauf aP2 ALOX15 Mäuse untersucht. Zu diesem Zweck sind Tiere mit homozygotem Knockout der endogenen Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) mit transgenen Tieren gekreuzt worden, die unter der Kontrolle des aP2 Promotors das humane ALOX15 Gen exprimieren (aP2 ALOX15). Im Folgenden werden diese Tiere (Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15) charakterisiert.

Initial überprüften wir, ob das humane ALOX15 Transgen in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Hierfür wurden Knochenmarkszellen präpariert (siehe 3.2.7.) und im

Anschluss eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Dabei wurden die zellulären Gleichgewichtskonzentrationen der murinen Alox15 und der humanen ALOX15 quantifiziert. Weiterhin wurde die Expression anderer ausgewählter muriner Lipoxygenaseparaloge (Alox12 und Alox5) gemessen. Die Untersuchungen ergaben, dass in den Knochenmarkszellen der Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen die humane ALOX15 exprimiert wird. Erwartungsgemäß konnte im Gegensatz dazu die Expression der endogenen murinen Alox15 nicht nachgewiesen werden. Bei den Wildtypkontrolltieren hingegen war Expression der endogenen murinen Alox15 mRNA darstellbar (Abb.29). Die humane ALOX15 mRNA konnte jedoch nicht detektiert werden. Die endogene murine Alox12 wird in den Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen in signifikant größeren Mengen (\*p=0,019) exprimiert als in den entsprechenden Wildtypzellen, während es bei der Expression der endogenen murinen Alox5 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gab (Abb.29).

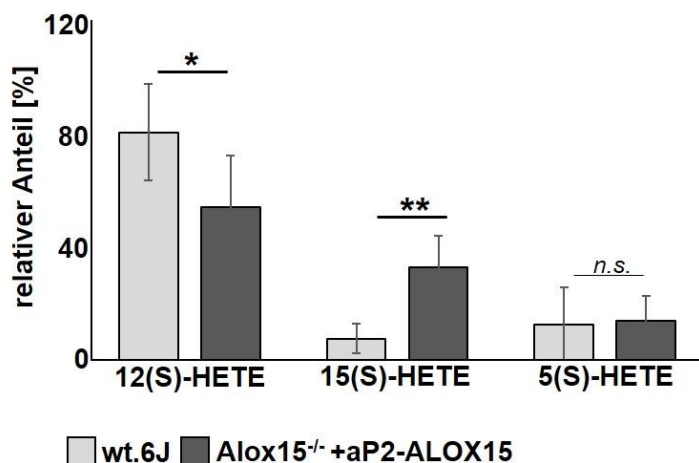


**Abb. 29: Expression verschiedener Lipoxygenase mRNA in Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen.**

Dargestellt sind die Expressionsniveaus der mRNAs von muriner Alox15, humaner ALOX15, muriner Alox12 sowie muriner Alox5 bezogen auf das Referenzgen murine Gapdh in Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen sowie in Knochenmarkszellen von Wildtypkontrolltieren (wt.6J, C57BL/6J). Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15: transgene Mäuse. n.d.: nicht detektierbar. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. sowie H.K. gemeinsam durchgeführt. n= 6-7.

Nachdem mittels PCR auf der mRNA Ebene gezeigt werden konnte, dass Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäuse die humane ALOX15 exprimieren, wurde im nächsten Schritt eine Aktivitätsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden Knochenmarkszellen *in vitro* mit Arachidonsäure für 15 Minuten inkubiert und nach der Inkubation die Menge der entstandenen ALOX-Produkte mit Hilfe der HPCL quantifiziert. Dabei erfolgte die Quantifizierung von 15-HETE (Hauptoxydationsprodukt der humanen ALOX15), 12-HETE (Hauptoxydationsprodukt der murinen Alox12 und Alox15), sowie 5-HETE (Hauptoxygenierungsprodukt der murinen Alox5).

Bei Wildtyptieren konnte 12-HETE als dominantes Alox Produkt nachgewiesen werden. Dieses wird durch die kombinierte Wirkung von muriner Alox12 und muriner Alox15 gebildet. 5-HETE (katalytische Aktivität der endogenen murinen Alox5) und 15-HETE (Nebenprodukt der katalytischen Aktivität der endogenen murinen Alox15) wurden nur in geringen Mengen gebildet (Abb.30). Bei der Untersuchung des Produktmusters von Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen zeigten sich deutliche Unterschiede. Der relative Anteil an 12-HETE an der Gesamtproduktbildung war signifikant (\*p=0,02) geringer als bei den Wildtypzellen und dieses Ergebnis kann auf den Knockout der endogenen Alox15 zurückgeführt werden. Trotzdem war 12-HETE immer noch das Hauptprodukt, was mit der katalytischen Aktivität der murinen Alox12 zu erklären ist (Abb.30). Der relative Anteil von 15(S)-HETE war bei den Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant (\*p=0,002) erhöht. Dies kann durch die katalytische Aktivität der transgenen humanen ALOX15 erklärt werden. Die 5-HETE Bildung, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die katalytische Aktivität der endogenen murinen Alox5 zurückzuführen ist, wurde durch die genetischen Manipulationen nicht verändert. Zusammengefasst deuten die ermittelten Aktivitätsdaten daraufhin, dass der systemische Knockout des murinen *Alox15* Gens die Expression des Enzyms in Knochenmarkszellen ausschaltet, und dass das Transgen (humane ALOX15) in Knochenmarkszellen exprimiert wird.



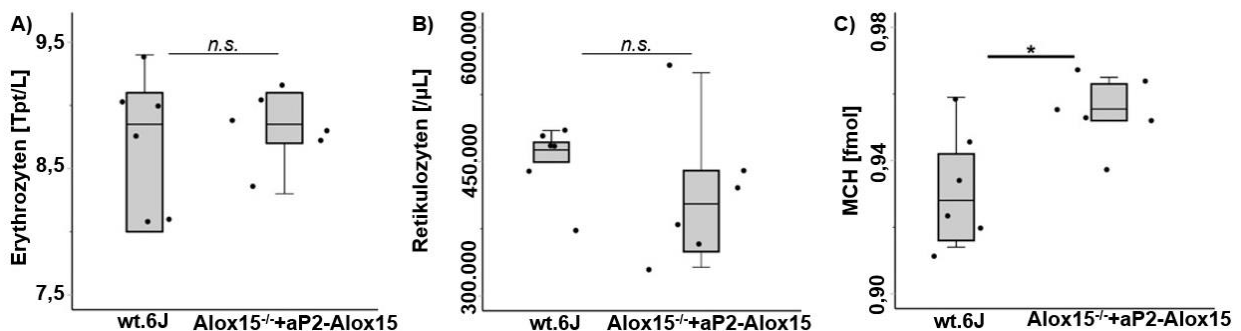
**Abb. 30: *In vitro* Bildung von ALOX Produkten aus Arachidonsäure aus Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen und Wildtypkontrolltieren.**

Die Mengen an HETE-Isomeren (12-HETE, 15-HETE, 5-HETE), die während einer 15-minütigen *in vitro* Inkubation von Knochenmarkszellen (10<sup>7</sup> Zellen pro Ansatz) mit Arachidonsäure gebildet wurde, ließ sich mit Hilfe der RP-HPLC quantifizieren. Die Gesamtmenge der gebildeten HETE Isomeren wurde 100 % gesetzt und der relative Anteil der einzelnen Isomeren (15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) wurde berechnet. wt.6J: C57BL/6J. Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15: transgene Mäuse. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. sowie H.K. gemeinsam durchgeführt. n=6-8.

**Zusammenfassung:** Knochenmarkszellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen exprimieren keine murine Alox15, dafür aber die transgene humane ALOX15. Das Transgen (humane ALOX15) wird auf ähnlichem Niveau exprimiert, wie die endogene Alox15 in Wildtypzellen.

#### 4.4.4. Basale Blutparameter von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen

Um zu untersuchen, ob die transgene Expression der humanen ALOX15 (Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15) in Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen den defekten erythroiden Phänotyp dieser Tiere (Alox15<sup>-/-</sup>) kompensiert, haben wir die basalen Blutparameter der Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Tiere untersucht. Das Blut wurde wie in 3.2.8. beschrieben entnommen und die Analyse mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass weder die Erythrozyten- (Abb.31;A) noch die Retikulozytenzahl (Abb.31;B) sich signifikant zwischen den beiden Genotypen unterschieden hat. Der mittlere Hämoglobingehalt (MCH) zeigte jedoch weiterhin einen signifikant erhöhten Wert (Hyperchromie) bei den genetisch modifizierten Tieren (Abb.31;C).



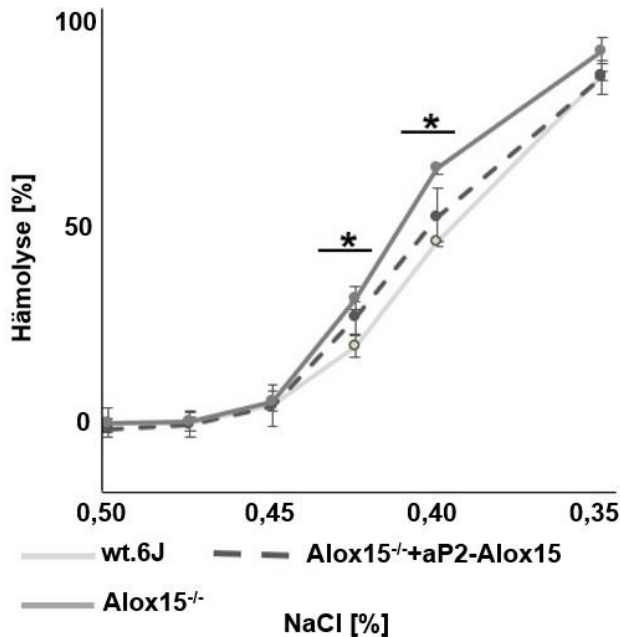
**Abb. 31: Basale Blutparameter von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen.**

Den Tieren wurden ca. 200 µl Blut entnommen und analysiert. **A)** die Erythrozytenzahl (Terapartikel/Liter), **B)** Retikulozytenanzahl pro Microliter **C)** mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH). wt.6J: C57BL/6J Wildtyp; Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15: transgene Mäuse. n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney-U*-Tests berechnet. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt. n= 6.

Neben den basalen Blutparametern haben wir die osmotische Resistenz der Erythrozyten untersucht (Abb.32). Auch hier war die Frage, ob die Expression der humanen ALOX15 zu einer Normalisierung der verminderten osmotischen Resistenz von Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten führt. Die Untersuchung wurde wie in 3.2.18. beschrieben durchgeführt. Analysiert wurden jeweils zwei Wildtypmäuse (wt.6J), zwei Alox15<sup>-/-</sup> Tiere sowie zwei Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäuse. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Initial konnte bei dieser Untersuchung die verminderte osmotische Resistenz von Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten gegenüber Wildtypzellen bestätigt werden. Durch die zusätzliche



Expression der humanen ALOX15 (Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15) in den Zellen, kam es zu einem deutlichen Rückgang dieser Veränderung, so dass zwischen Wildtyperythrozyten und roten Blutzellen von Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15 Mäusen kein signifikanter Unterschied mehr bestand. Diese Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass die transgene Expression der humanen ALOX15 die Alox15 Defizienz der Alox15<sup>-/-</sup> Tiere funktionell kompensiert.



**Abb. 32: Osmotische Resistenz von Erythrozyten, die aus Mäusen verschiedener Genotypen isoliert wurden.**

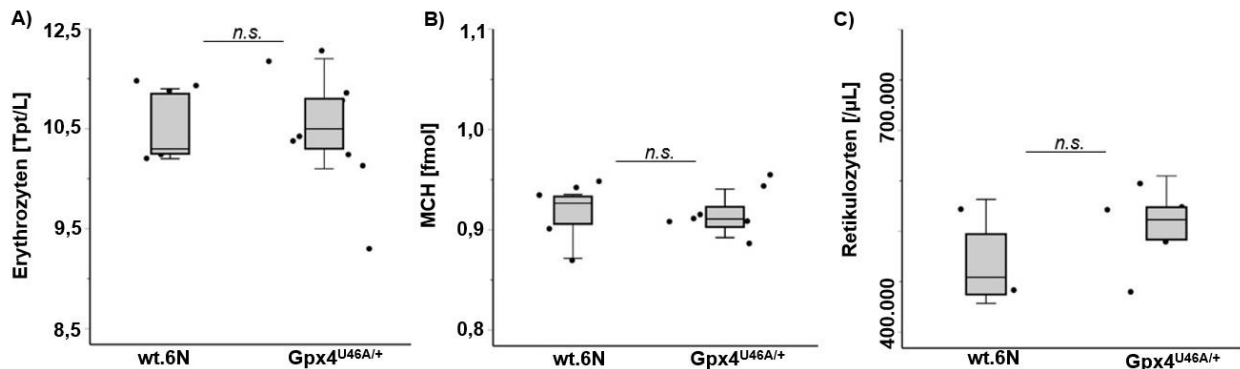
Rote Blutzellen wurden präpariert und in NaCl-Lösung unterschiedlicher Konzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Hämoglobinkonzentration im Überstand der Zellen gemessen und der Hämolysegrad errechnet (siehe Material und Methoden). wt.6J: C57BL/6J (Wildtyp); Alox15<sup>-/-</sup>: Gpx4<sup>U46A/+</sup>-Alox15<sup>-/-</sup>. Alox15<sup>-/-</sup>+aP2-ALOX15: transgene Mäuse. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Student's T-Test* sowie dem Vorzeichentest bestimmt. Die Experimente auf denen diese Daten basieren wurden von mir und A.B. gemeinsam durchgeführt.

**Zusammenfassung:** Alox15<sup>-/-</sup> Tiere zeigen einen defekten erythropoetischen Phänotyp und eine verminderte osmotische Resistenz der roten Blutzellen. Durch die transgene Expression der humanen ALOX15 können diese Veränderungen aufgehoben werden.

#### 4.4.5. Einfluss der heterozygoten Expression einer dysfunktionellen Gpx4 auf die basalen Blutparameter der Maus

Im ersten Abschnitt meiner Arbeit konnte in den *in vitro* Untersuchungen mit stabil transfizierten MEL-Zellen ein Einfluss der Gpx4 auf die erythroide Differenzierung festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen, wurde im Folgenden ein Mausmodell mit heterozygoter Expression der katalytisch inaktiven Gpx4 (Gpx4<sup>U46A/+</sup>) herangezogen. Als Vergleichsgruppe dienten entsprechende Wildtypmäuse (C57BL/6N). Für die Bestimmung der erythroiden Blutparameter wurde den Tieren, wie in 3.2.8. beschrieben nach der Tötung Blut entnommen und dieses mit Hilfe des Durchflusszytometers (XT 2000i; Sysmex; JPN-Kobe) analysiert. Zu den untersuchten Parametern gehören die Erythrozytenzahl, der

Hämoglobingehalt und Hämatokritwert, die Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) sowie die Retikulozytenzahl. Es konnte gezeigt werden, dass die heterozygote Expression der katalytisch inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) im Vergleich zum zugehörigen Wildtypen zu keiner signifikanten Veränderung der Erythrozytenparameter führt (Abb.33;A-C).



**Abb. 33: Vergleich ausgewählter Erythrozytenparameter zwischen  $Gpx4^{U46A/+}$  Mäusen und entsprechenden Wildtypkontrollen.**

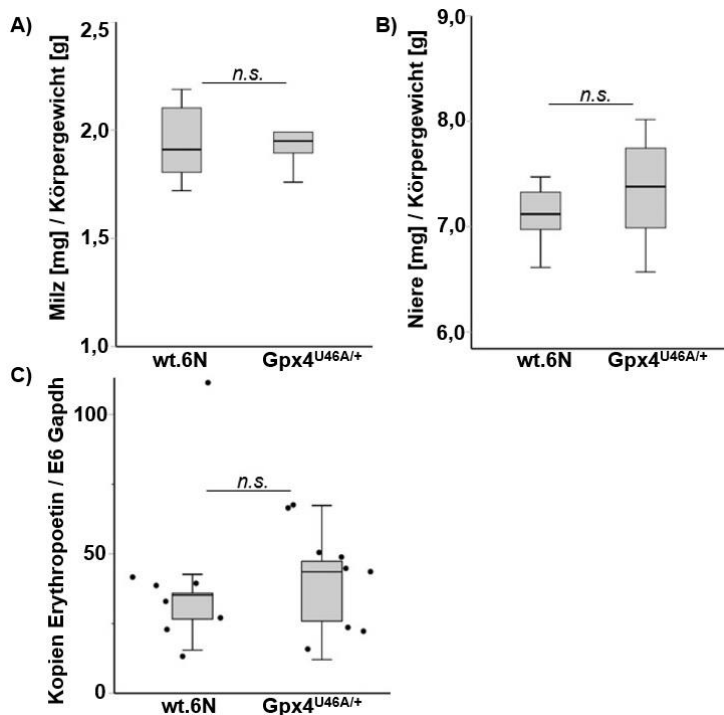
**A)** Anzahl der Erythrozyten. **B)** MCH: mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt. **C)** Anzahl der Retikulozyten. wt.6N: Wildtyp; C57BL/6N;  $Gpx4^{U46A/+}$ :  $Gpx4^{U46A/+}+Alox15^{+/+}$ . n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des *Mann-Whitney U* Tests bestimmt. n= 4-9.

**Zusammenfassung:** Die heterozygote Expression der katalytischen inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) ist nicht ausreichend, einen erythropoetischen Phänotyp zu induzieren.

#### 4.4.5.1. Vergleich der Organgewichte sowie der Expression von Erythropoetin in Mäusen mit heterozygotem Knockin einer dysfunktionellen Gpx4

Andere Arbeitsgruppen konnten beobachten, dass ein Verlust von Selen und Selenoproteinen zu einer veränderten Stresserythropoese sowie zu einem vermehrten Gewicht der Milz führen. Weiterhin zeigten sich veränderte Erythropoetinspiegel im Blut (353). Es stellte sich somit die Frage, ob auch eine heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 Mutante (*Sec46Ala Gpx4<sup>U46A/+</sup>* Tiere) einen ähnlichen Effekt induziert. Um diese Frage zu klären, wurden die  $Gpx4^{U46A/+}$  Tiere getötet, Nieren und Milz entnommen und gewogen. Das Organgewicht wurde auf das Körpergewicht der Tiere bezogen und die Erythropoetin mRNA mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert (siehe 3.2.7. und 3.2.11). Sowohl die Milz ( $p=0,874$ ) als auch die Nieren ( $p=0,315$ ) von  $Gpx4^{U46A/+}$  Tieren wiesen keine signifikanten Unterschiede im Gewicht gegenüber den Wildtyptieren auf (Abb.34;A+B). Weiterhin wurde auch die basale Expression der Epo mRNA der Nieren bestimmt. Hier zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden

Genotypen (Abb.34;C). Ein heterozygoter Knockin der katalytisch inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) induziert somit keinen auffälligen erythroiden Phänotyp.



**Abb. 34: Vergleich der Organgewichte von Mäusen mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) und den zugehörigen Wildtypen.**

Die relativen Organgewichte (bezogen auf das Körpergewicht) von Milz (A) und Niere (B) wurden bestimmt. Die relative Expressionshöhe der Erythropoetin (Epo) mRNA (bezogen auf das Expressionsniveau der Gapdh mRNA) wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. wt.6N: Wildtyp; C57BL/6N;  $Gpx4^{U46A/+}$ :  $Gpx4^{U46A/+}Alox15^{+/+}$ . n.s.: nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. n= 7-9.

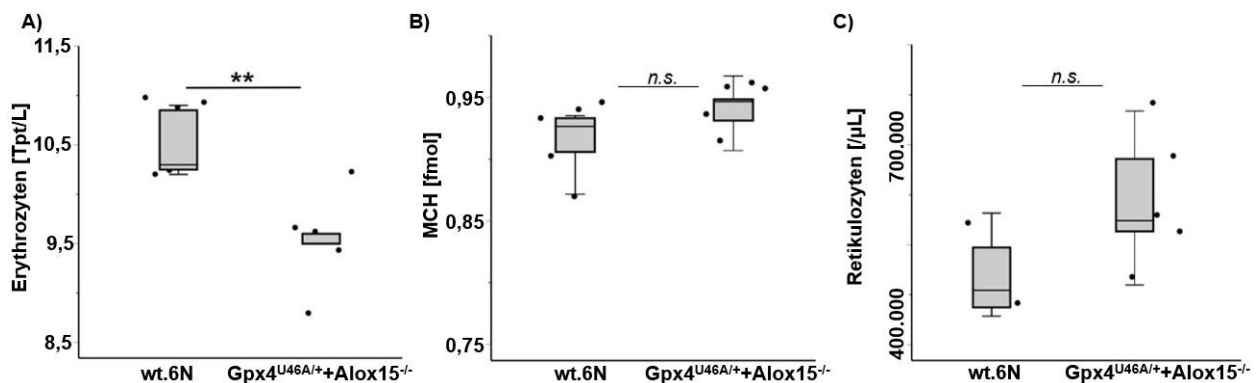
**Zusammenfassung:** Die heterozygote Expression der katalytischen inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) beeinflusst nicht die relativen Organgewichte von Milz und Nieren. Die renale Expression von Erythropoetin wird ebenfalls nicht beeinflusst.

#### 4.4.6. Erythropoetische Parameter sowie Organgewichte bei Mäusen mit einer zusätzlichen homozygoten Inaktivierung der Alox15 in heterozygoten $Gpx4^{U46A/+}$ Mäusen

Wird das Alox15 Gen systematisch homozygot ausgeschaltet ( $Alox15^{-/-}$ ) induziert diese genetische Manipulation einen defekten erythroiden Phänotyp (Abb.19). Diese Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen (302). Der alleinige heterozygote Knockout der katalytisch inaktiven Gpx4 Variante ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) hingegen induziert keinen auffälligen erythroiden Phänotyp (Abb.33), obwohl die Reduktion der Gpx4 Expression in MEL-Zellen zu einer zeitlichen Verzögerung der erythroiden Differenzierung führt (Abb.15).

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob der erythroide Phänotyp der  $Alox15^{-/-}$  Mäuse verstärkt wird, wenn zusätzlich die Expression der katalytisch aktiven Gpx4 (z.B. durch die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 Mutante)

reduziert wird. Die Basis für eine solche Vermutung besteht darin, dass beide Enzyme Gegenspieler im Lipidperoxidstoffwechsel sind. Die Inaktivierung der Gpx4 führt *in vitro* zu einer Aktivierung der Alox15, sodass bei inaktivierter Gpx4 der Alox15 mehr aktivierenden Lipidperoxide zur Verfügung stehen (166). Um diese Frage zu beantworten, haben wir Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse mit Gpx4<sup>U46A/+</sup> Tieren verpaart und die basalen erythropoetischen Parameter bei ausgezuchteten Alox15<sup>-/-</sup>+Gpx4<sup>U46A/+</sup> untersucht.



**Abb. 35: Basale Erythrozytenparameter von Mäusen mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx und gleichzeitigem homozygotem Knockout der Alox15 (Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>) und zugehörigen Wildtypieren.**

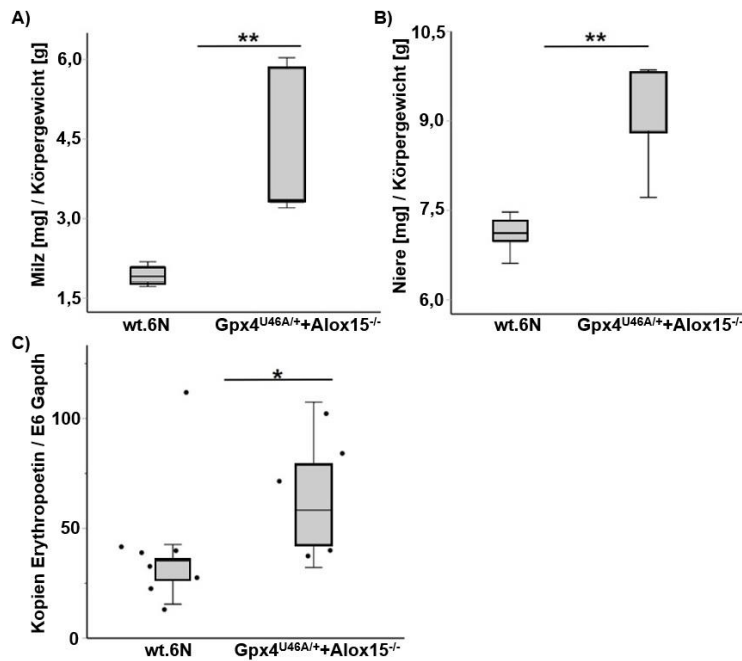
**A)** Erythrozytenzahl, **B)** mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH) **C)** Retikulozytenanzahl. n.s.: nicht signifikant. wt.6N: Wildtyp; C57BL/6N; Gpx4<sup>U46A/+</sup>: Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>+/+</sup>. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests bestimmt. n= 4-9

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein heterozygoter Knockin der katalytisch inaktiven Gpx4 mit einem zusätzlichen homozygoten Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>+Gpx4<sup>U46A/+</sup>) zu einer signifikant geringeren Erythrozytenanzahl (\*\*p=0,004) führt (Abb.35;A). Weiterhin wurde ein signifikant verminderter Hämoglobinwert (\*\*p=0,034) und eine erhöhte Anzahl an Retikulozyten gemessen. Der Anstieg der Retikulozytenzahl (Abb.35;C) war jedoch statistisch nicht signifikant (p=0,142). Andere Erythrozytenparameter (z.B. MCH) waren ebenfalls nicht signifikant verändert. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass ein systemischer Knockout des *Alox15* Gens auch im Gpx4-defizienten Background einen defekten erythropoetischen Phänotyp induziert. Das Ausmaß der erythropoetischen Veränderungen wurde jedoch durch den zusätzlichen Defekt nicht verstärkt.

Vergleicht man die relativen Organengewichte (bezogen auf das Körpergewicht) von Milz und Nieren zwischen den beiden Genotypen, zeigten sich signifikant erhöhte Organengewichte (Nieren, \*\*p=0,004; Milz, \*\*p=0,004) in den genetisch veränderten Alox15<sup>-/-</sup>+Gpx4<sup>U46A/+</sup> Tieren (Abb.36;A+B). Bei der Quantifizierung der Epo Expression

## Ergebnisse

zeigt sich durch den zusätzlichen homozygoten Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) ein signifikanter Anstieg der Epo Expression (\*p=0,034) in der Niere (Abb.36;C).



**Abb. 36: Relative Organgewichte und Epo mRNA Expression in Tieren mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx und gleichzeitigem homozygotem Knockout der Alox15 (Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>-/-</sup>).** (A) Relatives Organgewicht der Milz, (B) relatives Organgewicht der Nieren, (C) Epo-mRNA Expression. wt.6N: Wildtyp; C57BL/6N; Gpx4<sup>U46A/+</sup>: Gpx4<sup>U46A/+</sup>+Alox15<sup>+/+</sup>. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. n= 5-7.

**Zusammenfassung:** Werden ein homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) sowie ein heterozygoter Knockin einer katalytisch inaktiven Gpx4 Mutante (Gpx4<sup>U46A/+</sup>) zusammengekreuzt, kommt es nicht zu einer Verstärkung des erythropoetischen Phänotyps der Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse.

### 5. Diskussion

Die Gpx4 ist ein Selenoprotein, welches als anti-oxidatives Enzym fungiert, gleichzeitig aber auch als Strukturprotein bedeutsam ist (138). Zudem spielt das Enzym eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung (183) sowie bei der Reifung von Spermatozyten (180, 309). Weiterhin wird auch ein Zusammenhang mit Arteriosklerose diskutiert (354). Erst kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass das Selenoprotein auch einen Einfluss auf die murine Erythropoese hat. Durch die Reduktion von Lipidhydroperoxiden sorgt sie für den normalen Ablauf der Erythropoese. Ein Verlust ihrer katalytischen Funktion führt zum induzierten Zelltod von erythroiden Vorläuferzellen (130). Weiterhin scheint sie an der Ausreifung der Retikulozyten sowie der Stresserythropoese beteiligt zu sein (171).

Murine Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen) sind mit dem *Friend-Virus* infizierte Zellen der murinen Milz. Sie wachsen als Suspensionskultur und können durch verschiedene Stimuli zur Differenzierung entlang der erythropoetischen Reihe bis zum Erythroblastenstadium gebracht werden (71, 76). Während der Differenzierung exprimieren die Zellen Erythropoese-relevante Gene, wie Spectrin (83), Alas2 (82) oder Hämoglobin (355, 356).

Die Alox15 sorgt zusammen mit der Gpx4 für die Regulation der intrazellulären Redox-Homöostase (219, 357). Des Weiteren wird das Enzym im Zusammenhang mit der Erythropoese diskutiert (64, 339). So konnte die Alox15 im Lysat von Retikulozyten vom Kaninchen nachgewiesen werden (66). Ein Nachweis in reifen Erythrozyten blieb jedoch aus (301). Auch zeigten Alox15 Knockout Tiere keine phänotypischen Auffälligkeiten (191, 358). Neuere Forschungen legen jedoch einen Einfluss des Enzyms bei der hämatopoetischen Stammzellfunktion nahe (302).

Im ersten Abschnitt meiner Arbeit ging es um die Frage, welchen Einfluss die Gpx4 auf die *in vitro* Erythropoese in MEL-Zellen hat. Im zweiten Abschnitt ist untersucht worden, wie sich ein homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) sowie die transgene Expression der humanen ALOX15 in diesen Alox15-defizienten Tieren auf die murine Erythropoese *in vivo* auswirken. Zudem wurde untersucht, ob der heterozygoter Knockin einer katalytisch inaktiven Gpx4 Mutante (Gpx4<sup>U46A/+</sup>) die *in vivo* Erythropoese beeinflusst.

### 5.1. Einfluss der Gpx4 auf die *in vitro* Erythropoese in MEL-Zellen

#### 5.1.1. Expression der Gpx4 MEL-Zellen (MEL-745A cl. DS19)

Seit der Entdeckung der murinen Erythroleukämie-Zellen (MEL) in den 60er Jahren, stellen diese Zellen ein etabliertes zellulärer Modell für die Erforschung der Erythropoese dar (69). Durch Behandlung der Zellen mit DMSO kommt es zur Induktion der erythroiden Differenzierung, was durch die Expression erythroidspezifischer Genprodukte (z.B. Hämoglobin) zum Ausdruck kommt (71). Je nachdem zu welchem Zeitpunkt des Induktionsprozesses die Zellen untersucht wurden, konnte eine unterschiedliche Expression von Erythropoese-relevanten Genen beobachtet werden (333, 359). Daneben wurden auch die Funktionen unterschiedlicher Proteine, wie Dok2 (Docking protein2) oder Aifm2 (Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 2) mit Hilfe von transfizierten MEL-Zellen untersucht. So scheint Dok2 einen Einfluss auf den Klf1 (Krüppel-like Faktor1) Transkriptionsfaktor zu haben, während Aifm2 auf die Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin Einfluss nimmt (329, 330). Weiterhin gehört das MEL-Zellmodell, zusammen mit den HL-60 sowie den K562 Zellen, zu den am häufigsten verwendeten Modellen auf dem Gebiet der Leukämieforschung (338).

Um den Einfluss der Gpx4 auf die *in vitro* Erythropoese von MEL-Zellen untersuchen zu können, wurde ein in der AG Kühn zur Verfügung stehendes Zellmodell verwendet, in dem die Expression der Gpx4 durch die RNAi Technologie zu mehr als 50 % reduziert werden konnte. Mit Hilfe eines pSUPER RNAi-Vektors integrierten wir eine Gpx4-Antisense Sequenz in ein Plasmid, welches nach Transfektion zu einem stabilen Knockdown der Gpx4 in den selektierten MEL-Zellen führte. Ähnliche Transfektionsversuche wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen angewandt, um den Einfluss des Protoonkogens *c-myc* (360), des Transkriptionsfaktors PU.1 (361) sowie des Proteins *Aifm2* (330) auf die *in vitro* Erythropoese zu untersuchen.

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihen wurde mit Hilfe der qRT-PCR die Expression der Gpx4 in nicht-transfizierten MEL-Zellklonen (MEL-745A Cl. DS19) bestätigt. In diesen Zellen werden alle drei Isoformen (zytosolisch, mitochondrial, nukleär) exprimiert.

### **5.1.2. Allgemeine Charakterisierung von MEL-Zellen mit stabilem Knockdown der Gpx4 Expression**

Um unser Zellmodell für die geplanten Untersuchungen zur *in vitro* Erythropoese einsetzen zu können, mussten die transfizierten Zellen zunächst hinsichtlich ihrer basalen Vitalparameter untersucht werden. Zunächst wurden die stabil transfizierten MEL-Zellen mit Hilfe des Trypanblau-Tests (308) auf ihre Vitalität untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Gpx4 Knockdown MEL-Zellen sich ähnlich verhielten, wie die MOCK-transfizierten MEL-Zellen. Anschließend haben wir uns davon überzeugt, dass der beabsichtigte Expressionsknockdown der Gpx4 auch wirklich nachweisbar war. Mit Hilfe der qRT-PCR sowie der Westernblot-Methode konnten wir den Expressionsknockdown der Gpx4 auf mRNA und der Proteinebene zweifelsfrei nachweisen. Ähnliche Ergebnisse erzielten andere Arbeitsgruppen bei vergleichbaren Transfektionsuntersuchungen mit MEL-Zellen (330, 362).

Die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen zur Quantifizierung der katalytischen Aktivität erfolgten mit Hilfe eines gekoppelten optischen Tests unter Verwendung von Phospholipidhydroperoxid als Substrat. Unter allen Gpx-Isoformen ist nur die Gpx4 in der Lage, dieses Substrat unter Verbrauch von Glutathion zu reduzieren (316). Um auszuschließen, dass unsere Aktivitätsmessungen durch andere Gpx-Isoformen verfälscht werden, haben wir Phospholipidhydroperoxid mit Hilfe der Sojabohnen-LOX präpariert, gereinigt und anschließend für unsere Messungen als Substrat verwendet. Mit vergleichenden Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität der Gpx4 durch die angewandte Knockdown Strategie um mehr als 50 % reduziert werden konnte. Ein ähnliches Vorgehen ist bereits durch Garry et al. bei der Untersuchung an murinen Fibroblastenzellen angewandt worden (178). Unter Verwendung eines vergleichbaren Aktivitätsassays wurden durch Brutsch et al. *ex vivo* Messungen zur Gpx4 Aktivität durchgeführt. Hier wurde die Enzymaktivität in murinem Testis, Gehirn sowie dem Nierengewebe untersucht (183).

### **5.1.3. Induktion der erythroiden Differenzierung in RNAi stabil transfizierten MEL-Zellklonen**

Die Zugabe von DMSO zu MEL-Zellen führt zur terminalen erythroiden Differenzierung (76). Diese zeigt sich unter anderem durch die vermehrte Expression Erythropoese-relevanter Gene, wie zum Beispiel Globin mRNA (81). Bereits andere



Arbeitsgruppen haben den Einfluss eines Knockdowns verschiedener Gene auf die Hämoglobinsynthese in den MEL-Zellen untersucht. So führt ein shRNA induzierter Knockdown eines bestimmten ABC-Transporters (Abcb10) zu einer verzögerten Hämoglobinbildung (363).

Im Rahmen unserer experimentellen Strategie wollten wir herausfinden, ob sich MEL-Zellen mit reduzierter Expression der Gpx4 ähnlich wie MOCK-transfizierte Zellen entlang der erythroiden Reihe differenzieren können. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde die mRNA Expression zweier, an der Hämoglobin-Synthese beteiligter Gene, Hba-a1 und Alas2 analysiert. Zu Versuchsbeginn wurde bestätigt, dass sowohl die MOCK RNAi als auch die Gpx4 RNAi Zellen die untersuchten Markergene Hba-a1 und Alas2 exprimieren (Abb.13;A-C + Abb.14;A-B). Weiterhin wird die Gpx4 in den MOCK RNAi Zellen exprimiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen durch die Zugabe von DMSO (2 % Endkonzentration). Sowohl die Kontrollzellen als auch die Gpx4 RNAi Zellen lassen sich durch die Zugabe von DMSO stimulieren. Nachdem diese einleitenden Untersuchungen durchgeführt worden sind, verglichen wir die Expressionsniveaus der Markergene zwischen den Kontroll- sowie dem Gpx4 RNAi Zellen (Abb.15). Hieraus lässt sich schließen, dass ein Knockdown der Gpx4 Expression einen verzögernden Einfluss auf die ersten Schritte der Hämoglobinsynthese hat. Zu späteren Zeitpunkten wurde dieser Effekt jedoch kompensiert.

### **5.2. Hämoglobinbestimmung in RNAi transfizierten MEL-Zellklonen**

Werden MEL-Zellkulturen unter Zugabe von Serum und DMSO kultiviert, zeigen sie eine Hämoglobinexpression, welche mit denen in murinen Retikulozyten vergleichbar ist (84). Die Messung von Hämoglobin ist neben der Bestimmung der mRNA Expression somit ein Marker für die erfolgreiche Differenzierung der MEL-Zellen. In den hier untersuchten stabilen Transfektanten war die mRNA des Hämoglobin- $\alpha$ -Gens sowohl in den MOCK- als auch den Gpx4 Knockdown Zellen nachzuweisen. Die Bestimmung des Proteins Hämoglobin in den Zellen erfolgte mit Hilfe einer spektrophotometrischen Messung (86). Die beiden unstimulierten Zelltransfektanten (Gpx4 und MOCK RNAi) beinhalten initial sehr wenig Hämoglobin ohne signifikanten Unterschied. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die wenig bis gar kein Hämoglobin in unstimulierten MEL-Zellen nachwiesen (356). Durch die Zugabe von DMSO zeigt sich nach einer kurzen Latenzperiode am dritten Tag eine vermehrte Hämoglobinmenge in den MOCK-Transfektanten. Im Gegensatz dazu blieb die Hämoglobinkonzentration in

den Knockdown Zellen auf niedrigem Niveau. Damit scheint der Gpx4 Knockdown einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen zu haben.

### **5.3. Einfluss des Knockdowns der Gpx4 auf das Proliferationsverhalten von MEL-Zellen**

Bei früheren Untersuchungen mit murinen Erythroleukämie Zellen (MEL-Zellen) wurde zu Beginn der Differenzierung der Zellen ein Proliferationsstopp beschrieben. Mit der vermehrten Expression Erythropoese-relevanter Gene kam es zum verminderten Wachstum der Zellen (338). Bereits bei der Einsaat sowie dem Splitting der transfizierten Gpx4 Knockdown Zellen zeigte sich eine höhere Zelldichte sowie ein schnellerer Farbumschlag des pH-abhängigen RPMI-Mediums. Zur Quantifizierung dieses Phänomens wurde eine Wachstumskurve der transfizierten Gpx4 RNAi Zellen sowie der entsprechenden MOCK-Variante angelegt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit einem Knockdown der Gpx4 eine größere Proliferationskapazität besitzen als die entsprechenden MOCK-transfizierten Zellen. Zudem ließ sich eine Verkürzung der Verdopplungszeit der hier untersuchten Gpx4 RNAi Zellen gegenüber der MEL-745A cl. DS19 Linie feststellen. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der initiale Differenzierungsarrest der Gpx4 RNAi Zellen im Ausgleich zu einer vermehrten Proliferation mit analog verzögertem Proliferationsstopp in diesen Zellen führt.

### **5.4. Allgemeine Charakterisierung der Erythropoese in Mauslinien mit verändertem Gpx4 und Alox15 Genotyp**

Die Erythropoese ist ein komplexer Prozess bei dem sich myeloische Vorläufer zu reifen Erythrozyten differenzieren (364). Beim Menschen findet sie hauptsächlich im Knochenmark statt (9, 365). Bei der Maus dienen neben dem Knochenmark auch Leber und Milz als extramedulläre hämatopoetische Syntheseorte (366). Die Retikulozyten-Erythrozyten-Transition, die durch den Verlust des Nukleus und der Mitochondrien charakterisiert ist, stellt einen späten Prozess der Erythropoese dar (64). Der Verlust der Mitochondrien geht einher mit einer drastischen Veränderung des Energiemetabolismus. Junge Retikulozyten enthalten noch funktionelle Mitochondrien, die rund 80 % des ATPs für das Überleben der Zelle generieren (64). Reife Erythrozyten hingegen gewinnen ihre Energie aus der Umwandlung von Glucose zu Laktat (367). Die Alox15 ist beteiligt am Abbau der Mitochondrien. Sie initiiert über die Oxidation von mitochondrialen Membranlipiden den Abbau der Organellen (64, 66). Bei *in vitro*

Untersuchungen an Kaninchenretikulozyten konnte eine gegenläufige biologische Dynamik der enzymatischen Aktivität der Alox15 und dem graduellen reifungsbedingten Abbau der Mitochondrien nachgewiesen werden (368). Wurde die Alox15 durch spezifische Hemmstoffe gehemmt, kam es zu einer Verzögerung dieses Vorgangs (64). Trotz dieser Daten wiesen die später gezüchteten Alox15 Knockout (Alox15<sup>-/-</sup>) Tiere keine auffälligen hämatopoetischen Parameter im Blut auf (191, 358). Im Jahr 2010 zeigten Untersuchung an hämatopoetischen Stammzellen, dass die Alox15 durchaus einen Einfluss auf die Hämatopoese hat. Im Knochenmark von Mäuse mit Alox15 Knockout führt die Reduktion der Lipoxygenaseprodukte zu einer deutlich verminderten Erneuerungskapazität der HSC (302).

### **5.4.1. Einfluss der systemischen homozygoten Inaktivierung der Alox15 auf die basalen Blutparameter der Maus**

Fasst man die bisher veröffentlichten Daten zur möglichen Rolle der Alox15 bei der Erythropoese zusammen, musste man feststellen, dass die Datenlage widersprüchlich war. Deshalb entschlossen wir uns, in detaillierten Studien zu untersuchen, ob die verfügbaren Alox15<sup>-/-</sup> Mäuse nicht doch einen subtil defekten erythropoetischen Phänotyp aufweisen. Es zeigte sich, dass Alox15 defiziente Mäuse eine verminderte Erythrozytenzahl bei gleichzeitig erhöhtem mittleren korpuskulären Hämoglobingehalt (MCH) haben. Zudem sind die Retikulozytenzahlen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren signifikant erhöht. Obwohl sich diese Werte alle im Normbereich bewegen (312), konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Alox15 durchaus einen Einfluss auf die Erythropoese der Maus hat, auch wenn sie, wie andere Ergebnisse nahe legen, nicht essentiell für diesen Prozess ist (191).

### **5.4.2. Bestimmung der strukturellen Integrität von Erythrozyten in Mäusen mit systemischem Knockout der Alox15**

Neben den Veränderungen der basalen Blutparameter konnten wir feststellen, dass die Alox15-Defizienz zu einem größeren Anteil an strukturell veränderten Erythrozyten führt. Zum einen war der relative Anteil von Echinozyten/Akanthozyten bei Alox15<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht. Zum anderen konnte in der Fluoreszenzmikroskopie eine verstärkte Anfärbbarkeit mit Annexin V festgestellt werden (Abb.20+21). Diese

veränderte fluoreszierende Anfärbung der Zellen ließ uns auf eine veränderte Asymmetrie der Plasmamembran schließen, welche mit einer reduzierten Lebensspanne der Erythrozyten einhergehen sollte. Da eine Bestimmung der *in vivo* Lebensspanne der roten Blutzellen methodisch anspruchsvoll ist und einen gesonderten Tierversuchsantrag erfordert, haben wir uns dazu entschlossen, die *ex vivo* Lebensdauer der roten Blutzellen zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden die roten Blutzellen Wildtypmäusen und Alox15<sup>-/-</sup> Tieren entnommen, *in vitro* kultiviert und die Spontanhämolyse zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierungsperiode gemessen. Hier zeigte sich eine statistisch signifikant verminderte Überlebensfähigkeit der Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten (Abb.28). Obwohl die beobachteten funktionellen und strukturellen Auffälligkeiten in den Alox15-defizienten Erythrozyten statistisch signifikant waren, ist ihr Ausmaß eher subtil. Andererseits konnten auf der Basis vorhergehender Resultate keine drastischen Effekte erwartet werden. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass der reifungsabhängige Abbau der Mitochondrien im Rahmen der späten Erythropoese über verschiedene Mechanismen verläuft, und dass die Alox15 abhängigen Prozesse nur einen von mehreren Abläufen darstellen (64, 369). Offensichtlich basiert der gesamte Prozess auf einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen. Wenn die Alox15-abhängigen Abläufe aufgrund eines Knockouts des Schlüsselenzyms nicht mehr funktionsfähig sind, können Alox15-unabhängige Prozesse einspringen und den Defekt kompensieren.

### **5.4.3. Auswirkungen der diagnostischen Blutentnahme auf die Aktivität und mRNA Expression der Alox15 in verschiedenen Geweben**

Eine repetitive Blutentnahme bei Kaninchen führt zu einer experimentellen Anämie mit konsekutivem Anstieg der Expression der 12/15-Lipoxygenase (301, 341). Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden den hier verwendeten Wildtypen (C57BL/6J) rund 6 % des Blutvolumens, bezogen auf das Körpergewicht, entnommen. Diese diagnostische Blutentnahme, die zur Bestimmung der hämatologischen Parameter nötig war, sorgte für einen Anstieg der mRNA Expression der Alox15 in Blutzellen und der Milz. Simultan dazu konnte ein Anstieg der katalytischen Aktivität des Enzyms in der Milz sowie den Blutzellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass bereits dieser relativ milde hämatopoetische Stimulus ausreichend ist, um das blutbildende System der Maus anzuregen. Ein Anstieg der Alox15 Aktivität in den Retikulozyten nach Blutverlust wurde bereits von Kühn et al. (299) gezeigt und lässt in diesem Versuch auf eine vermehrte

Anzahl von Retikulozyten im Blut schließen. Auch die Milz als extramedulläres hämatopoetisches System in der Maus (370-372) strebt eine vermehrte Bildung von Retikulozyten an. Bei Blutverlust ist sie vornehmlicher Ort der Stresserythropoese (343, 373). Bei großen Stressreizen kommt es initial zur vermehrten Ausschüttung von Retikulozyten aus dem Knochenmark, um den aktuellen Bedarf zu decken. Im Anschluss erfolgt die schnelle Ausweitung der Vorläuferzellen zur Deckung des Bedarfs (374). Dies könnten den signifikanten Abfall der Alox15 Aktivität dort erklären.

#### **5.4.4. Blutparameter der Maus nach diagnostischer Blutentnahme in Tieren mit systemischem Knockout der Alox15**

Ein Vergleich der Blutparameter bei Alox15<sup>-/-</sup> Tieren ohne vorherige Blutentnahme und 24 Stunden nach diagnostischer Entnahme von rund 6 % des Blutvolumens zeigte einen zu erwartenden Abfall der untersuchten Blutparameter. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Alox15 Knockout (Alox15<sup>-/-</sup>) Tieren ergaben sich hierbei jedoch nicht (Abb.25). Diese Daten deuten darauf hin, dass das blutbildende System der Alox15<sup>-/-</sup> Tiere keine reduzierte Kompensationskapazität aufweist, wenn es durch eine diagnostische Blutentnahme angeregt wird.

Nicht nur während der *steady state* Erythropoese, sondern auch während der Stresserythropoese spielt Erythropoetin eine wichtige Rolle bei der Bildung neuer Erythrozyten (350). Die vorangegangenen Versuche implizieren, dass bereits der eine diagnostische Blutentnahme ausreichend ist, um eine Reaktion im erythropoetischen System zu induzieren. Somit wurde im Folgenden die Expression des Glykoprotein-Hormons Erythropoetin (Epo) bestimmt. Tiere ohne diagnostische Blutentnahme zeigen, unabhängig von ihrem Genotyp, keinen Unterschied in der Epo-Expression. Sowohl bei Wildtyptieren als auch im Alox15-defizienten Mäusen kommt es nach Blutentnahme zum Anstieg der mRNA Expression von Epo. Der Anstieg im Alox15 Knockout (Alox15<sup>-/-</sup>) ist dabei größer als der bei Wildtyptieren (C57BL/6J) ohne diagnostische Blutentnahme (Abb.26;**C+D**).

Auch der Anstieg der Epo mRNA in der Niere lässt auf einen vermehrten Bedarf durch die Stressinduktion einer diagnostischen Blutentnahme schließen. In der Literatur werden neben Erythropoetin weitere Faktoren diskutiert, die zur schnellen Expansion der erythroiden Vorläuferzellen in der Milz unter Stressbedingungen führen. Zu nennen sind hier unter anderem der *bone morphogenic factor 4* (BMP4) sowie die Proteine des

Hedgehog Signalweges (375). In weiterführenden Versuchen könnte untersucht werden, wie sich andere Marker der Stresserythropoese unter den gegebenen experimentellen Bedingungen verhalten.

### **5.4.5. Vergleich der Organgewichte in Mäusen mit systemischen homozygoten Knockout der Alox15**

Neben der Funktion bei der Erythrozytenreifung wird eine Rolle der Alox15 im Rahmen von myeloproliferativen Erkrankungen diskutiert. So zeigte die Arbeitsgruppe um Middleton et al., dass die Expression der Alox15 zu einem verminderten Wachstum von CML-Zellen *in vitro* führt (376). Weiterhin zeichnete sich bei allen untersuchten Alox15-defizienten Tieren (Alox15<sup>-/-</sup>) eine, wenn auch knapp signifikante, Splenomegalie mit erhöhter Anzahl von Follikeln sowie eine reduzierte Lebensspanne im Vergleich zu den Kontrolltieren ab (376). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse bis dato jedoch nicht bestätigen (377).

In den hier durchgeführten Versuchen verglichen wir die relativen Organgewichte von Milz und Niere bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Tiere mit Alox15 Defizienz leicht erhöhte relative Organgewichte aufweisen. Diese Veränderungen könnten als Kompensationsmechanismen des hämatopoetischen Systems durch den Verlust der Alox15 interpretiert werden. Für die Gewichtszunahme der Milz bei Alox15<sup>-/-</sup> Tieren könnten zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht werden: **i)** Der vermehrte Bedarf an erythropoetischen Zellen wird durch eine verstärkte Stresserythropoese in der Milz erreicht. **ii)** Durch eine reduzierte *in vivo* Lebensdauer der Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten muss die Milz verstärkt rote Blutzellen abbauen, was mit einer Vergrößerung des Organs zusammenhängen könnte. Interessanterweise wiesen auch Mäuse, bei denen die Expression anderer erythropoetisch wirksamer Proteine ausgeschaltet wurde eine Splenomegalie auf (378, 379).

### **5.4.6. Messung der osmotischen Stabilität der Erythrozyten von Mäusen mit Alox15 Defizienz**

Um feststellen zu können, ob ein homozygoter systemischer Knockout der Alox15 einen Einfluss auf die Funktionalität der Erythrozyten hat, haben wir deren osmotische Resistenz *ex vivo* getestet. Werden die roten Blutzellen in einen hypotonen Puffer gegeben, nehmen die Zellen aufgrund des onkotischen Drucks des intrazellulären Hämoglobins verstärkt Wasser auf (380). Dies führt dazu, dass sich die Zellen zunächst

aufblähen und schließlich platzen. Ist die Plasmamembran der Zellen nicht regulär strukturiert, platzen die Zellen schon bei leicht veränderten osmotischen Bedingungen. Damit spielt die Bestimmung der osmotischen Resistenz von roten Blutzellen bei der Diagnostik hereditärer Membranfunktionsstörungen eine Rolle (351). So liegt z.B. eine verminderte osmotische Resistenz von Erythrozyten bei der hereditären Sphärozytose vor (381). Die Erythrozyten der Alox15 Knockout (Alox15<sup>-/-</sup>) Mäuse zeigen ebenfalls eine signifikant erhöhte Anfälligkeit für osmotischen Stress (Abb.27). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Erythrozyten aus Tieren mit einem Knockout der Proteinkinase MSK1/2 (382) festgestellt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Funktionalität der Erythrozyten von Alox15 Knockout Mäusen (Alox15<sup>-/-</sup>) beeinträchtigt wird, was zu einer verminderten Lebensdauer der Zellen führen sollte.

### **5.4.7. Bestimmung der *ex vivo* Lebensspanne von Erythrozyten in Tieren mit systemischen Alox15 Knockout**

Wie für jede andere kernhaltige Zelle ist es auch für die kernlosen Erythrozyten wichtig, einen kontrollierten Mechanismus für die Entsorgung intrazellulärer Bestandteile zu haben (383). Der programmierte Zelltod in Erythrozyten wird auch als Eryptose bezeichnet. Es kommt hierbei zu einer Größenabnahme der Zellen sowie einem Verlust der Phospholipid-Asymmetrie der Plasmamembran (322). Der Vorgang ist wichtig, um ein unkontrolliertes Zerplatzen der Zellen und somit die Hämolyse mit weiteren Endorganschäden zu vermeiden (384, 385). In einigen hereditären, das Blutbild betreffende Erkrankungen, wie z.B. Thalassämie, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel oder auch der Sichelzellanämie, verkürzt sich die Lebensspanne von Erythrozyten (386).

Um bestimmen zu können, ob auch ein systemischer Knockout der Alox15 einen Einfluss auf die *ex vivo* Lebensspanne der roten Blutzellen hat, wurden Erythrozyten aus Alox15<sup>-/-</sup> Tieren sowie Wildtypmäusen entnommen und für 11 Tage kultiviert (318). Im Anschluss ist der Grad der Hämolyse zwischen den Genotypen verglichen worden. Hier konnte gezeigt werden, dass Alox15<sup>-/-</sup> Tiere mit der Zeit ein höheres Maß an Hämolyse aufweisen als die Wildtyptiere. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass ein systemischer homozygoter Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) neben einer größeren osmotischen Instabilität (4.4.1.6.) auch zu einer vermehrten *in vitro* Eryptose führt.

### **5.4.8. Transgene Expression der humanen ALOX15 in Tieren mit systemischen Knockout der endogenen Alox15**

In den folgenden Untersuchungen wurde mit Hilfe eines  $\alpha$ P2 Promotors die humane ALOX15 transgen in den Tieren exprimiert (Alox15<sup>-/-</sup>+ $\alpha$ P2-ALOX15). Mit Hilfe der qRT-PCR wurde die Expression der humanen sowie murinen Form der Alox15 quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass das humane Transgen in den gentechnisch veränderten Tieren auf einem ähnlich hohen Niveau exprimiert wurde, wie die endogene Alox15 in Wildtyptieren (Abb.29). Es liegt also keine Überexpression des Transgens vor. Diese Beobachtung ist von biologischer Relevanz, da es bei einer massiven Überexpression des Transgens zu ungewollten Nebeneffekten kommen könnte. Wenn die Alox15 auf sehr hohem Niveau exprimiert wird, kann das zu Zellschädigungen führen (66, 387). Obwohl humane und murine ALOX15 Orthologe eine Reihe von katalytischen Eigenschaften miteinander teilen, besitzen sie unterschiedliche Reaktionsspezifitäten mit Arachidonsäure. Während die murine Alox15 Arachidonsäure vornehmlich zu 12-Hydroperoxidderivaten (12-HpETE) umwandelt, bildet die humane ALOX15 vorzugsweise 15-HpETE als Hauptprodukt (388). Dies zeigte sich auch deutlich in der Quantifizierung der Reaktionsprodukte der beiden Alox15 Orthologe (Abb.30). In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der homozygote Knockout der Alox15 (Alox15<sup>-/-</sup>) zu einem signifikanten Abfall der Erythrozytenzahl mit Hyperchromie und Retikulozytose führt (Abb.19). Wird von diesen Tieren die humane ALOX15 transgen exprimiert, sollten funktionelle Defekte des Alox15 Knockouts zumindest teilweise rückgängig gemacht werden. Wir konnten nachweisen, dass der hyperchrome Effekt des Alox15 Knockouts durch die transgene Expression der ALOX15 zu weiten Teilen kompensiert wurde (Abb.31;C). Weiterhin reduziert sich durch die transgene Expression der ALOX15 auch die vorzeitige Hämolyse im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abb.32). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass die Reaktionsspezifität der ALOX15 und somit auch das Muster der Oxygenierungsprodukte keine große Rolle bei der Erythropoese spielt.

### **5.4.9. Einfluss der heterozygoten Expression der Gpx4 auf die Erythropoese der Maus**

Bereits einige Arbeiten in der Vergangenheit wiesen auf einen Zusammenhang zwischen dem Selenoproteinen und der Erythropoese hin. So führte eine Selen-arme Diät bei Mäusen zu charakteristischen phänotypischen Auffälligkeiten (170). In einer neueren



Studie führt ein induzierbarer Knockout des Selenoproteins Gpx4 im hämatopoetischen System zur Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies, was eine Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen induziert (130). Diese Versuche legen nahe, dass ein Verlust der Gpx4 einen Einfluss auf das erythropoetische System hat. Der initial beschriebene Versuch mit transfizierten MEL-Zellen lässt ebenfalls auf eine Rolle der Gpx4 während der Differenzierung der Erythrozyten schließen.

Mäuse mit einem homozygoten Knockout der Gpx4 sind nicht lebensfähig (159). Heterozygote Tiere, die eine katalytisch inaktive Gpx4 Enzymvariante exprimieren, sind lebensfähig und zeigen keine größeren phänotypischen Auffälligkeiten (183). Dieses bereits in der AG Kühn etablierte Mausmodell wurde genutzt, um den Einfluss des Enzyms auf das murine erythropoetische System näher zu untersuchen. In anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer hämatopoetischer Knockout der Gpx4 sowohl einen hämatopoetischen Phänotyp hervorruft als auch Veränderungen des Milzgewichts sowie der Erythropoetinkonzentrationen im Blut induziert (130, 170). Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir feststellen, dass ein heterozygoter Knockin der Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) nicht ausreichend war, um hämatopoetische Veränderungen zu induzieren. Ein Vergleich zu  $Gpx4^{U46A/+}$  Mäusen mit entsprechenden Wildtyp-Tieren zeigte keine Unterschiede in der Erythrozyten- sowie Retikulozytenzahl (Abb.33). Auch die Nieren und Milz wiesen keinen Größen- oder Gewichtsunterschied auf (Abb.34). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 Variante nicht ausreichend ist, einen hämatopoetischen Phänotyp zu induzieren.

#### **5.4.10. Vergleich der Organgewichte sowie der Epo Expression in Mäusen mit heterozygotem Knockin der Gpx4**

Ebenso wie bei den Alox15 Knockout Tieren ( $Alox15^{-/-}$ ) wurde auch bei den Tieren mit heterozygotem Knockin der katalytisch inaktiven Gpx4 ( $Gpx4^{U46A/+}$ ) das Gewicht von Niere und Milz bezogen auf das Körpergewicht bestimmt.

Wird zusätzlich zum heterozygoten Knockin der Gpx4 die Alox15 systemisch inaktiviert ( $Gpx4^{U46A/+}Alox15^{-/-}$ ) zeigt sich ein signifikanter Abfall der Erythrozytenzahl in den Tieren. Diese Daten belegen, dass eine heterozygote Gpx4 Defizienz den defekten erythropoetischen Phänotyp der  $Alox15^{-/-}$  Mäuse weder verstärkt noch abschwächt, wie das in zellulären Systemen beobachtet wurde (169). Vergleicht man die relativen

Organgewichte von Milz und Niere zwischen  $Gpx^{U46A/+}$  Mäusen und  $Gpx^{U46A/+}Alox15^{-/-}$  Tieren, kommt es auch hier zu einer Zunahme der relativen Organgewichte von Milz und Niere bei  $Gpx^{U46A/+}Alox15^{-/-}$  Tieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Gewichtszunahme der beiden Organe, die durch die Alox15 Defizienz induziert wurde, durch die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 nicht wesentlich beeinflusst wurde.

### **5.4.11. Beurteilung verschiedener erythropoetischer Parameter sowie von Organgewichten bei Mäusen mit einer zusätzlichen homozygoten Inaktivierung der Alox15 in heterozygoten $Gpx^{U46A/+}$ -Mäusen**

Wird in  $Gpx4$ -defizienten Mäusen die Alox15 homozygot ausgeknockt ( $Gpx^{U46A/+}Alox15^{-/-}$ ), induziert diese genetische Manipulation einen ähnlichen signifikanten Abfall der Erythrozytenzahl und eine Retikulozytose, die allerdings statistisch nicht signifikant war (Abb.35). Weiterhin führt die zusätzliche Defizienz der Alox15 ( $Gpx^{U46A/+}Alox15^{-/-}$ ) zu einem signifikanten Anstieg der Gewichte von Milz und Niere (Abb.36;**A+B**). Diese Daten belegen, dass die Veränderungen der hämatopoetischen Parameter, die durch die Alox15 Defizienz induziert wurden, durch die heterozygote Expression einer katalytisch inaktiven Gpx4 nicht wesentlich beeinflusst wurden.

## **5.5. Limitationen der Arbeit**

### **5.5.1. Allgemeine Limitationen**

Die vorliegende Dissertation sollte die funktionelle Bedeutung des Lipidperoxidstoffwechsels auf die Erythropoese untersuchen. In dieser auf experimenteller Forschung basierenden Arbeit wurde versucht, die zu klärenden Sachverhalten sowohl anhand von Zell- als auch von Tierversuchen darzulegen. Zellversuche sind eine einfache Methode, um Sachverhalte auf zellulärer Ebene darzustellen. Sie geben häufig Hinweise für weitere Forschungsansätze. Jedoch ist die Übertragbarkeit vom zellulären System auf komplexe Individuen häufig eingeschränkt. So ist das hier verwendete System der MEL-Zellen nicht sensible auf die Stimulation mit Erythropoetin, sondern von anderen Stimulantien abhängig. Die durchgeführten Zellversuche wurden zudem nach einem eng gesteckten zeitlichen Rahmen von maximal 6 Tagen konzipiert. Denkbar wäre somit auch ein längerer Verlauf.

In den durchgeführten Versuchen mit genetisch veränderten Mäusen wurden verschiedene Parameter (basale Blutparameter, Höhe der Erythropoetin sowie auch Organgewichte) miteinander verglichen. Ziel hierbei war es, generelle Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Genotypen herauszuarbeiten. Eine tiefergehende Beantwortung der sich daraus ergebenden Fragen wurde meist nicht verfolgt und bietet Ansatz für weitere Forschungsarbeiten. Sowohl bei den Versuchen mit den transfizierten MEL-Zellklonen als auch in den unterschiedlichen murinen Genotypen war die Stichprobenanzahl überschaubar. Dennoch reichten die Proben aus, um durchaus signifikante Ergebnisse zu erzielen, welche durch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zum Teil bestätigt werden konnten.

Ein weiterer Kritikpunkt der durchgeführten Versuche ist, dass nicht Wildtyp-Wurfgeschwister als Kontrollen verwendet wurden, sondern kommerzielle C57/BL6-Mäuse. Die hier genutzten Alox15 Knockout Tiere (Alox15<sup>-/-</sup>) wurden 7x in einen Wildtyp-Black6 Hintergrund (C57BL/6) zurückgekreuzt und zeigen so einen gemischten genetischen Hintergrund. Trotz der Kenntnis, dass Wurfgeschwister möglicherweise bessere Kontrolltiere abgeben, wurden für diese Versuche kommerzielle Wildtypen gewählt. Ausschlaggebend dafür waren voraus gegangene Versuche anderer Arbeitsgruppen, die ein ähnliches Vergleichsverfahren gewählt haben (191). Zudem wurde ein ähnlich milder erythropoetischer Phänotyp in einer weiteren Alox15 Knockout Kolonie beschrieben, wo ebenfalls keine Wurfgeschwister verwendet wurden (302). Ein zusätzlicher Kritikpunkt greift noch viel weiter in die Struktur des von Sun et al. konzipierten Alox15 Knockout Modells zurück (191). Bei dem hier beschriebenen Knockout in der Keimbahn können weitere Mutationen integriert worden sein, die neben dem Knockout der Alox15 auch andere Genprodukte betreffen könnten. Des Weiteren beinhaltet die Verwendung konventioneller Knockoutstrategien das Risiko, dass embryonale Stammzellen selektiert worden sind, die es geschafft haben, mit der Inaktivierung des Alox15 Gens umzugehen. Diese Zellen werden dann zur Herstellung der genetisch veränderten Tiere verwendet. Dieser Selektionsschritt wird bei konditionalen Knockoutstrategien nicht mehr verwendet.

### 5.5.2. Methodenkritik

Für die Verwendung eines Zellmodells spricht die einfache Durchführbarkeit sowie die erleichterte Reproduzierbarkeit der Versuche. Andererseits ist ein solches Modell auch häufig anfällig für interindividuelle Schwankungen. So kann trotz großer

Achtsamkeit beim sterilen Arbeiten eine Kontamination der Zellen zu veränderten Ergebnissen führen. Weiterhin spielt die Erfahrung des Untersuchers eine Rolle bei der Durchführung von Zellexperimenten. Gerade bei Wiederholungsversuchen ist die Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen wichtig. Bei der Transfektion der hier genutzten MEL-Zellen wurden Klone willkürlich selektiert. Eine Kontrolle an welcher Stelle die siRNA integriert wurde, ist nicht erfolgt. Somit ist nicht eindeutig auszuschließen, dass durch die Integration des RNAi Konstruktes weitere genetische Manipulationen erfolgt sind. Durch die Auswahl mehrerer stabiler Klone vor Beginn des eigentlichen Versuches sollte dieser Fehler minimiert werden.

Die Quantifizierung der Anzahl von transfizierten MEL-Zellen basiert auf der Zellzählung mittels Hämozytometer. Dies ist eine subjektive Methode und hängt unter anderem auch von der Erfahrung des Betrachters ab. Um eine große Deviation der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Zählungen doppelt und nur von einem Untersucher ausgeführt.

Die hier durchgeführten *in vivo* Versuche wurden ausschließlich an männlichen Individuen durchgeführt. Eine Aussage über den Einfluss der Gpx4 sowie der Alox15 auf die Erythropoese in weiblichen Tieren ist somit nicht möglich. Weiterhin haben auch die Tageszeit sowie die Durchführung einer Blutentnahme Auswirkungen auf die untersuchten Blutparameter. In der hier durchgeführten Arbeit wurde versucht, durch festgelegte Standards und Mengen sowie geschultes Personal möglichst gleichbleibende Bedingungen für die Blutentnahmen zu schaffen. Die Lagerung der Blutproben wurde auf ein minimales Zeitfenster beschränkt und die Analyse möglichst noch am selben Tag durchgeführt.

### 5.6. Ausblick

Aus anderen Forschungsarbeiten lässt sich entnehmen, dass ein erythroid-spezifischer homozygoter Knockout der Gpx4 zu einem vermehrten Abbau von erythroiden Vorläuferzellen und damit zur Anämie führt. Weiterhin zeigte sich die Stresserythropoese beeinträchtigt. In den hier durchgeführten zellulären Untersuchungen wurde die Auswirkung eines Gpx4 Knockdowns *in vitro* sowie der Effekt eines heterozygoten Knockin der katalytisch inaktiven Gpx4 (Gpx4<sup>U46A/+</sup>) *in vivo* untersucht. Ferner wurde durch *in vivo* Experimente der Einfluss der Alox15 auf das erythropoetische System von Mäusen überprüft. Aufgrund der begrenzten Zeit war es nicht möglich, alle

in diesem Zusammenhang auftauchenden Probleme zu untersuchen. Die offenen Fragen könnten jedoch in weiterführenden Experimenten adressiert werden.

So wäre es z.B. sinnvoll, andere an der Erythropoese-beteiligte Gene im *in vitro* Zellsystem der Gpx4-defizienten MEL-Zellen hinsichtlich ihres Expressionsniveaus zu charakterisieren. Zu nennen wären hierbei, u.a. der *Erythroid Krüppel-like factor* (EKLF), der *Stemcell leukemia* (SCL) Faktor oder auch das  $\beta$ -Hämoglobin. Die entsprechenden Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Erythropoese. Bis jetzt wurde jedoch noch nicht untersucht, ob eine funktionelle Inaktivierung der Gpx4 zu einer Veränderung der Expression dieser Gene führt. Einen umfassenden Ansatz zur Charakterisierung der Genexpressionsveränderungen, die durch den Knockdown der Gpx4 Expression in MEL-Zellen induziert werden, stellen genomweite Mikroarray-Analysen dar. Dabei könnten in einem Experiment das komplette Genexpressionsmuster von Gpx4-defizienten MEL-Zellen und entsprechenden Kontrolltransfektanten untersucht und miteinander verglichen werden. Solche Experimente wurden von der Arbeitsgruppe zwar initiiert, mussten aber aufgrund der Auflösung der entsprechenden Abteilung der Charité abgebrochen werden. Eine andere Herangehensweise wäre die Untersuchung der zellulären Proteome beider Zelllinien mit Hilfe der Massenspektroskopie (389).

Ein Verlust der Gpx4 im hämatopoetischen System führt nach den Ergebnissen von Canli et al. zu einer vermehrten Nekroptose, die durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird (130). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, ob Zellen mit stabilem Knockdown der Gpx4 ebenfalls größere Mengen an ROS bilden und damit ein verändertes Apoptoseverhalten zeigen. Vorstellbar wären hier neben der Anfärbung der Zellen mit ROS-sensitiven Farbstoffen sowie eine durchflusszytometrische Untersuchung mit Bestimmung der apoptotischen Zellen mittels Trypanblau (390, 391).

Während der hier durchgeführten *in vivo* Versuchen an genetisch veränderten Mäusen konnte gezeigt werden, dass der systemische homozygote Knockout der Alox15 zu einem defekten erythroiden Phänotyp führt. Die geringe, aber statistisch signifikante Vergrößerung von Milz und Niere lassen die Vermutung zu, dass es sich bei der Organvergrößerung um eine kompensatorische Aktivierung des hämatopoetischen Systems handelt. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten z.B. die strukturellen Ursachen der Organvergrößerung genauer untersucht werden. Mittels H.E.-Färbung könnten z.B. die Größenverhältnisse der roten und weißen Pulpa der Milz verglichen

werden. Einen indirekten Hinweis auf erhöhten Umsatz von Erythrozyten könnte der Eisengehalt der Pulpazellen liefern. Eine Eisenfärbung wäre somit ebenfalls denkbar. Somit könnte auch die Frage geklärt werden, ob die erhöhte osmotische Instabilität der Alox15<sup>-/-</sup> Erythrozyten zu einem vermehrten Zellabbau führt. In der Niere sind spezielle peritubuläre Zellen für die Erythropoetin-Synthese zuständig. Ein Vergleich der Anzahl der Epo-produzierenden Zellen wäre mit Hilfe der Immunmarkierung, wie sie von Maxwell et al. beschrieben wird, denkbar (392). Wie die qRT-PCR Ergebnisse gezeigt haben, ist auch die mRNA von Erythropoetin in den Nieren der Tiere unterschiedlich ausgeprägt. Ein nächster möglicher Schritt wäre die Analyse der tatsächlichen Epo-Level im Serum der Tiere.

Der Fokus dieser Arbeit lag vornehmlich auf den Parametern des erythropoetischen Systems. Im Rahmen der Untersuchung des „kleinen Blutbildes“ erfolgte auch die Bestimmung der Leukozyten. Diese zeigten unter dem Einfluss des homozygoten Knockouts der Alox15 ebenfalls signifikante Veränderungen. Untersuchungen von Kinder et al. mit dem Fokus auf die Stammzellfunktion haben ähnliche Beobachtungen beschrieben (302). Um weiter differenzieren zu können, welche Zellen der Leukozyten zu den signifikanten Veränderungen führen, wäre die Bestimmung eines Differentialblutbildes denkbar. Der Einfluss der Alox15 könnte somit nicht nur auf die Stammzellfunktion sowie die Erythropoese beschränkt sein, sondern auch, wie bereits in einigen Arbeiten angedeutet, auf die Leukozytopoese.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Scheerer P, Borchert A, Krauss N, Wessner H, Gerth C, Hohne W, Kuhn H. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*. 2007;46(31):9041-9.
2. Springuel L, Renauld JC, Knoops L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications. *Haematologica*. 2015;100(10):1240-53.
3. Hammel M, Walther M, Prassl R, Kuhn H. Structural flexibility of the N-terminal beta-barrel domain of 15-lipoxygenase-1 probed by small angle X-ray scattering. Functional consequences for activity regulation and membrane binding. *Journal of molecular biology*. 2004;343(4):917-29.
4. Kühn H, Gehring T, Schröter A, Heydeck D. Cytokine-Dependent Expression Regulation of ALOX15. *Journal of Cytokine Biology*. 2016;1(2).
5. MackKey MC. Cell kinetic status of haematopoietic stem cells. *Cell Prolif*. 2001;34(2):71-83.
6. Mazur EM, Cohen JL. Basic concepts of hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1989;46(3):250-6.
7. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241(4861):58-62.
8. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978;4(1-2):7-25.
9. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-5.
10. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
11. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1(8):661-73.
12. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(25):14541-6.
13. Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, Lipka DB, Reyes A, Wang Q, Weichenhan D, Lier A, von Paleske L, Renders S, Wunsche P, Zeisberger P, Brocks D, Gu L, Herrmann C, Haas S, Essers MAG, Brors B, Eils R, Huber W, Milsom MD, Plass C, Krijgsveld J, Trumpp A. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell stem cell*. 2014;15(4):507-22.
14. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91(5):661-72.
15. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Gottgens B, Passegue E. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell stem cell*. 2015;17(1):35-46.
16. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. 2001;31(6):1900-9.
17. Deftos ML, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity*. 2000;13(1):73-84.
18. Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in immunology*. 2008;20(1):67-82.
19. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-7.
20. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
21. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968;128(3):415-35.

22. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature immunology*. 2013;14(8):821-30.
23. Menezes S, Melandri D, Anselmi G, Perchet T, Loschko J, Dubrot J, Patel R, Gautier EL, Hugues S, Longhi MP, Henry JY, Quezada SA, Lauvau G, Lennon-Dumenil AM, Gutierrez-Martinez E, Bessis A, Gomez-Perdiguerro E, Jacome-Galarza CE, Garner H, Geissmann F, Golub R, Nussenzweig MC, Guermonprez P. The Heterogeneity of Ly6C(hi) Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS(+) Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity*. 2016;45(6):1205-18.
24. Machlus KR, Italiano JE, Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785-96.
25. Gaertner F, Massberg S. Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity. *Seminars in immunology*. 2016;28(6):561-9.
26. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):a011601.
27. Franco RS. Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2012;39(5):302-7.
28. Ferkowicz MJ, Starr M, Xie X, Li W, Johnson SA, Shelley WC, Morrison PR, Yoder MC. CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development*. 2003;130(18):4393-403.
29. Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M, Peschle C. Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac---liver transition. *J Clin Invest*. 1986;78(1):51-60.
30. Dommergues M, Aubény E, Dumez Y, Durandy A, Coulombel L. Hematopoiesis in the human yolk sac: quantitation of erythroid and granulopoietic progenitors between 3.5 and 8 weeks of development. *Bone marrow transplantation*. 1992;9 Suppl 1:23-7.
31. Craig ML, Russell ES. A DEVELOPMENTAL CHANGE IN HEMOGLOBINS CORRELATED WITH AN EMBRYONIC RED CELL POPULATION IN THE MOUSE. *Developmental biology*. 1964;10:191-201.
32. Moore MA, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology*. 1970;18(3):279-96.
33. Ji RP, Phoon CK, Aristizabal O, McGrath KE, Palis J, Turnbull DH. Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ Res*. 2003;92(2):133-5.
34. McGrath KE, Frame JM, Fromm GJ, Koniski AD, Kingsley PD, Little J, Bulger M, Palis J. A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the beta-globin locus in the mammalian embryo. *Blood*. 2011;117(17):4600-8.
35. Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*. 2000;95(7):2284-8.
36. Tavian M, Hallais MF, Péault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development*. 1999;126(4):793-803.
37. Tavian M, Péault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International journal of developmental biology*. 2005;49(2-3):243-50.
38. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes & development*. 1996;10(2):154-64.
39. Malik J, Kim AR, Tyre KA, Cherukuri AR, Palis J. Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts. *Haematologica*. 2013;98(11):1778-87.
40. Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2004;2(3):E75.
41. Fantoni A, Bank A, Marks PA. Globin composition and synthesis of hemoglobins in developing fetal mice erythroid cells. *Science*. 1967;157(3794):1327-9.



42. Brotherton TW, Chui DH, Gauldie J, Patterson M. Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development. 1979;76(6):2853-7.
43. Enver T, Raich N, Ebens AJ, Papayannopoulou T, Costantini F, Stamatoyannopoulos G. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature*. 1990;344(6264):309-13.
44. Wang X, Thein SL. Switching from fetal to adult hemoglobin. *Nature genetics*. 2018;50(4):478-80.
45. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371(6494):221-6.
46. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997;89(10):3636-43.
47. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991;349(6306):257-60.
48. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*. 1995;121(1):163-72.
49. Takahashi S, Onodera K, Motohashi H, Suwabe N, Hayashi N, Yanai N, Nabesima Y, Yamamoto M. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12611-5.
50. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes & development*. 1998;12(8):1176-88.
51. Deconinck AE, Mead PE, Tevosian SG, Crispino JD, Katz SG, Zon LI, Orkin SH. FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development*. 2000;127(10):2031-40.
52. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
53. Lee SH, Crocker PR, Westaby S, Key N, Mason DY, Gordon S, Weatherall DJ. Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. *J Exp Med*. 1988;168(3):1193-8.
54. Kroschwald P, Kroschwald A, Kuhn H, Ludwig P, Thiele BJ, Hohne M, Schewe T, Rapoport SM. Occurrence of the erythroid cell specific arachidonate 15-lipoxygenase in human reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;160(2):954-60.
55. Yokoyama T, Kitagawa H, Takeuchi T, Tsukahara S, Kannan Y. No apoptotic cell death of erythroid cells of erythroblastic islands in bone marrow of healthy rats. *J Vet Med Sci*. 2002;64(10):913-9.
56. Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Vet Med Sci*. 2003;65(4):449-52.
57. Lodish HF, Desalu O. Regulation of synthesis of non-globin proteins in cell-free extracts of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*. 1973;248(10):3420-7.
58. Coghill E, Eccleston S, Fox V, Cerruti L, Brown C, Cunningham J, Jane S, Perkins A. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. *Blood*. 2001;97(6):1861-8.
59. Harigae H, Suwabe N, Weinstock PH, Nagai M, Fujita H, Yamamoto M, Sassa S. Deficient heme and globin synthesis in embryonic stem cells lacking the erythroid-specific delta-aminolevulinic acid synthase gene. *Blood*. 1998;91(3):798-805.
60. Hardison RC. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a011627.
61. Griffiths RE, Kupzig S, Cogan N, Mankelov TJ, Betin VM, Trakarnsanga K, Massey EJ, Parsons SF, Anstee DJ, Lane JD. The ins and outs of human reticulocyte maturation: autophagy and the endosome/exosome pathway. *Autophagy*. 2012;8(7):1150-1.

62. Skadberg O, Brun A, Sandberg S. Human reticulocytes isolated from peripheral blood: maturation time and hemoglobin synthesis. *Laboratory hematology : official publication of the International Society for Laboratory Hematology*. 2003;9(4):198-206.
63. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med*. 2015;35(1):133-63.
64. Rapoport SM, Schewe T. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1986;864(3-4):471-95.
65. Schewe T, Rapoport SM, Kühn H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 1986;58:191-272.
66. Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport SM. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett*. 1975;60(1):149-52.
67. Dubiel W, Rapoport SM. ATP-dependent proteolysis of mitochondria of reticulocytes. *Revisión sobre biología celular : RBC*. 1989;21:505-21.
68. Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nature reviews Nephrology*. 2015;11(7):394-410.
69. Friend C. CELL-FREE TRANSMISSION IN ADULT SWISS MICE OF A DISEASE HAVING THE CHARACTER OF A LEUKEMIA. *The Journal of Experimental Medicine*. 1957;105(4):307-18.
70. Tai CK, Kasahara N. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:3083-95.
71. Singer D, Cooper M, Maniatis GM, Marks PA, Rifkind RA. Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974;71(7):2668-70.
72. Friend C, Patuleia MC, De Harven E. Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *National Cancer Institute monograph*. 1966;22:505-22.
73. Mirand EA. Murine viral-induced polycythemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1968;149(1):486-96.
74. Mirand EA, Steeves RA, Lange RD, Grace JT, Jr. Virus-induced polycythemia in mice: erythropoiesis without erythropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968;128(3):844-9.
75. Mager D, MacDonald ME, Robson IB, Mak TW, Bernstein A. Clonal analysis of the late stages of erythroleukemia induced by two distinct strains of Friend leukemia virus. *Mol Cell Biol*. 1981;1(8):721-30.
76. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(2):378-82.
77. Reuben RC, Wife RL, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. 1976;73(3):862-6.
78. Leder A, Leder P. Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell*. 1975;5(3):319-22.
79. Garg LC, Brown JC. Friend erythroleukemia cell differentiation: induction by retinoids. *Differentiation; research in biological diversity*. 1983;25(1):79-83.
80. Ross J, Ikawa Y, Leder P. Globin messenger-RNA induction during erythroid differentiation of cultured leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(12):3620-3.
81. Ross J, Gielen J, Packman S, Ikawa Y, Leder P. Globin gene expression in cultured erythroleukemic cells. *Journal of molecular biology*. 1974;87(4):697-714.
82. Ebert PS, Ikawa Y. Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase during erythroid differentiation of cultured leukemia cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1974;146(2):601-4.
83. Eisen H, Bach R, Emery R. Induction of spectrin in erythroleukemic cells transformed by Friend virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(9):3898-902.
84. Volloch V, Housman D. Terminal differentiation of murine erythroleukemia cells: physical stabilization of end-stage cells. *J Cell Biol*. 1982;93(2):390-4.

85. Hyman T, Rothmann C, Heller A, Malik Z, Salzberg S. Structural characterization of erythroid and megakaryocytic differentiation in Friend erythroleukemia cells. *Exp Hematol.* 2001;29(5):563-71.
86. Hafid-Medheb K, Augery-Bourget Y, Minatchy MN, Hanania N, Robert-Lezenes J. Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood.* 2003;101(7):2575-83.
87. Atar O, Levi BZ. PU.1 silencing leads to terminal differentiation of erythroleukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(4):1288-92.
88. Burda P, Curik N, Kokavec J, Basova P, Mikulenková D, Skoultchi AI, Zavadil J, Stopka T. PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Molecular cancer research : MCR.* 2009;7(10):1693-703.
89. Kim MY, Choi S, Lee SE, Kim JS, Son SH, Lim YS, Kim BJ, Ryu BY, Uversky VN, Lee YJ, Kim CG. Development of a MEL Cell-Derived Allograft Mouse Model for Cancer Research. *Cancers.* 2019;11(11).
90. Zachara BA. Mammalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1992;6(3):137-51.
91. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(15):2457-78.
92. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003;300(5624):1439-43.
93. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal.* 2008;275(15):3959-70.
94. Flohe L, Loschen G, Gunzler WA, Eichele E. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie.* 1972;353(6):987-99.
95. Martinez JI, Garcia RD, Galarza AM. The kinetic mechanism of glutathione peroxidase from human platelets. *Thromb Res.* 1982;27(2):197-203.
96. Flohé L. Glutathione Peroxidase. In: Simic MG, Taylor KA, Ward JF, von Sonntag C, editors. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine.* Boston, MA: Springer US; 1988. p. 663-8.
97. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes<sup>1</sup> <sup>1</sup>This article is part of a series of reviews on "Regulatory and Cytoprotective Aspects of Lipid Hydroperoxide Metabolism." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002;33(2):154-72.
98. Kuhn 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.
99. 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. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids.* 2018;1863(9):1095-107.
100. Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(9):1501-14.
101. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem.* 1957;229(1):189-97.
102. Zakowski JJ, Tappel AL. Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1978;526(1):65-76.
103. Singh AK, Dhaunsi GS, Gupta MP, Orak JK, Asayama K, Singh I. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys.* 1994;315(2):331-8.
104. 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.
105. Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci.* 1999;6(3):151-60.

106. Won HY, Sohn JH, Min HJ, Lee K, Woo HA, Ho YS, Park JW, Rhee SG, Hwang ES. Glutathione peroxidase 1 deficiency attenuates allergen-induced airway inflammation by suppressing Th2 and Th17 cell development. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(5):575-87.
107. Chu FF, Doroshow 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.
108. Florian S, Wingler K, Schmehl K, Jacobasch G, Kreuzer OJ, Meyerhof W, Brigelius-Flohe R. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res*. 2001;35(6):655-63.
109. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):951-65.
110. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1987;256(2):677-86.
111. Yoshimura S, Watanabe K, Suemizu H, Onozawa T, Mizoguchi J, Tsuda K, Hatta H, Moriuchi T. Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. *J Biochem*. 1991;109(6):918-23.
112. Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH, Doan K, Liu XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung, and breast in humans and rodents. *Blood*. 1992;79(12):3233-8.
113. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol*. 1994;266(2 Pt 1):C367-75.
114. Schwaab V, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. GPx3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. *Mol Reprod Dev*. 1998;51(4):362-72.
115. Schmutzler C, Mentrup B, Schomburg L, Hoang-Vu C, Herzog V, Kohrle J. Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. *Biol Chem*. 2007;388(10):1053-9.
116. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997;190(2):227-35.
117. Tham DM, Whitin JC, Kim KK, Zhu SX, Cohen HJ. Expression of extracellular glutathione peroxidase in human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol*. 1998;275(6):G1463-71.
118. Kingsley PD, Whitin JC, Cohen HJ, Palis J. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin. *Mol Reprod Dev*. 1998;49(4):343-55.
119. 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.
120. Ghyselinck NB, Jimenez C, Lefrancois AM, Dufaure JP. Molecular cloning of a cDNA for androgen-regulated proteins secreted by the mouse epididymis. *Journal of molecular endocrinology*. 1990;4(1):5-12.
121. Ghyselinck NB, Dufaure JP. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(23):7144.
122. Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, Conrad M, Drevet JR, Kocer A. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e38565.
123. Dear TN, Campbell K, Rabbitts TH. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry*. 1991;30(43):10376-82.
124. Tanaka C, Coling DE, Manohar S, Chen GD, Hu BH, Salvi R, Henderson D. Expression pattern of oxidative stress and antioxidant defense-related genes in the aging Fischer 344/NHsd rat cochlea. *Neurobiology of aging*. 2012;33(8):1842.e1-14.

125. Utomo A, Jiang X, Furuta S, Yun J, Levin DS, Wang YC, Desai KV, Green JE, Chen PL, Lee WH. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43522-9.
126. Peng DF, Razvi M, Chen H, Washington K, Roessner A, Schneider-Stock R, El-Rifai W. DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut.* 2009;58(1):5-15.
127. Chen Z, Hu T, Zhu S, Mukaisho K, El-Rifai W, Peng DF. Glutathione peroxidase 7 suppresses cancer cell growth and is hypermethylated in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017;8(33):54345-56.
128. Peng D, Belkhir A, Hu T, Chaturvedi R, Asim M, Wilson KT, Zaika A, El-Rifai W. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. *Gut.* 2012;61(9):1250-60.
129. Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S, Willey JC, Coy E, Frampton MW, Watkins RH, Khullar P, Xu YL, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 1):L173-82.
130. Canli O, Alankus YB, Grootjans S, Vegi N, Hultner L, Hoppe PS, Schroeder T, Vandenabeele P, Bornkamm GW, Greten FR. Glutathione peroxidase 4 prevents necroptosis in mouse erythroid precursors. *Blood.* 2016;127(1):139-48.
131. Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y. Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells. *J Biol Chem.* 2012;287(10):7675-82.
132. 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.
133. 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. *Journal of molecular biology.* 2011;406(3):503-15.
134. Yoboue ED, Rimessi A, Anelli T, Pinton P, Sitia R. Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(9):583-95.
135. Mehmeti I, Lortz S, Avezov E, Jorns A, Lenzen S. ER-resident antioxidative GPx7 and GPx8 enzyme isoforms protect insulin-secreting INS-1E beta-cells against lipotoxicity by improving the ER antioxidative capacity. *Free Radic Biol Med.* 2017;112:121-30.
136. 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.
137. 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. *Biochemical and molecular medicine.* 1996;59(2):118-24.
138. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999;285(5432):1393-6.
139. Roveri A, Maiorino M, Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* 1994;233:202-12.
140. Lei XG, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr.* 1995;125(6):1438-46.
141. Mitchell JH, Nicol F, Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and iodine deficiencies: effects on brain and brown adipose tissue selenoenzyme activity and expression. *The Journal of endocrinology.* 1997;155(2):255-63.

142. Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem.* 1992;267(9):6142-6.
143. Ren B, Huang W, Akesson B, Ladenstein R. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *Journal of molecular biology.* 1997;268(5):869-85.
144. Aumann KD, Bedorf N, Brigelius-Flohe R, Schomburg D, Flohe L. Glutathione peroxidase revisited--simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomed Environ Sci.* 1997;10(2-3):136-55.
145. Mauri P, Benazzi L, Flohe 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.
146. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohe R, Doria D, van den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohe L. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological chemistry Hoppe-Seyler.* 1995;376(11):651-60.
147. Martin JL. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure (London, England : 1993).* 1995;3(3):245-50.
148. Maiorino M, Ursini F, Bosello V, Toppo S, Tosatto SC, Mauri P, Becker K, Roveri A, Bulato C, Benazzi L, De Palma A, Flohe L. The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *Journal of molecular biology.* 2007;365(4):1033-46.
149. EPP O, LADENSTEIN R, WENDEL A. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. 1983;133(1):51-69.
150. Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Blöcker H, Gross G, Kiess M, Klöppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Usani F. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry.* 1994;269(10):7342-8.
151. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem.* 1995;270(45):26993-9.
152. 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.
153. Schneider M, Vogt Weisenhorn DM, Seiler A, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M. Embryonic expression profile of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene expression patterns : GEP.* 2006;6(5):489-94.
154. Hartl FU, Pfanner N, Nicholson DW, Neupert W. Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta.* 1989;988(1):1-45.
155. Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumuller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabe 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.
156. 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.
157. Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1036(2):88-94.
158. Wingler K, Bocher M, Flohe L, Kollmus H, Brigelius-Flohe R. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem.* 1999;259(1-2):149-57.
159. 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.

160. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(4):496-502.
161. Savaskan NE, Borchert A, Brauer AU, Kuhn H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(2):191-201.
162. Maiorino M, Wissing JB, Brigelius-Flohe R, Calabrese F, Roveri A, Steinert P, Ursini F, Flohe L. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 1998;12(13):1359-70.
163. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of andrology.* 1989;10(3):214-20.
164. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol.* 2005;25(17):7637-44.
165. Weitzel F, Wendel A. Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J Biol Chem.* 1993;268(9):6288-92.
166. Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T, Kuhn H. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J Biol Chem.* 1996;271(9):4653-8.
167. Sutherland M, Shankaranarayanan P, Schewe T, Nigam S. Evidence for the presence of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human platelets: implications for its involvement in the regulatory network of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Biochemical Journal.* 2001;353(Pt 1):91-100.
168. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1998;273(4):1990-7.
169. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism.* 2008;8(3):237-48.
170. Kaushal N, Hegde S, Lumadue J, Paulson RF, Prabhu KS. The regulation of erythropoiesis by selenium in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(8):1403-12.
171. Altamura S, Vegi NM, Hoppe PS, Schroeder T, Aichler M, Walch A, Okreglicka K, Hultner L, Schneider M, Ladinig C, Kuklik-Roos C, Mysliwicz J, Janik D, Neff F, Rathkolb B, Hrabe de Angelis M, Buske C, da Silva AR, Muedder K, Conrad M, Ganz T, Kopf M, Muckenthaler MU, Bornkamm GW. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E control reticulocyte maturation, stress erythropoiesis and iron homeostasis. *Haematologica.* 2019.
172. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* 2016;26(3):165-76.
173. Hambright WS, Fonseca RS, Chen L, Na R, Ran Q. Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol.* 2017;12:8-17.
174. Chen L, Hambright WS, Na R, Ran Q. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J Biol Chem.* 2015;290(47):28097-106.
175. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox Biol.* 2016;9:22-31.
176. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Forster H, Yefremova O, Heinrichmeyer

- M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 2014;16(12):1180-91.
177. Ye Z, Liu W, Zhuo Q, Hu Q, Liu M, Sun Q, Zhang Z, Fan G, Xu W, Ji S, Yu X, Qin Y, Xu X. Ferroptosis: Final destination for cancer? *Cell Prolif.* 2020;53(3):e12761.
178. Garry MR, Kavanagh TJ, Faustman EM, Sidhu JS, Liao R, Ware C, Vliet PA, Deeb SS. Sensitivity of mouse lung fibroblasts heterozygous for GPx4 to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(6):1075-87.
179. Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, Richardson A, Ran Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1820-7.
180. 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.
181. Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod.* 2001;64(2):674-83.
182. Ingold I, Aichler M, Yefremova E, Roveri A, Buday K, Doll S, Tasdemir A, Hoffard N, Wurst W, Walch A, Ursini F, Friedmann Angeli JP, Conrad M. Expression of a Catalytically Inactive Mutant Form of Glutathione Peroxidase 4 (Gpx4) Confers a Dominant-negative Effect in Male Fertility. *J Biol Chem.* 2015;290(23):14668-78.
183. Brutsch SH, Wang CC, Li L, Stender H, Neziroglu N, Richter C, Kuhn H, Borchert A. Expression of inactive glutathione peroxidase 4 leads to embryonic lethality, and inactivation of the Alox15 gene does not rescue such knock-in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(4):281-93.
184. Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(2):161-74.
185. Hansen J, Garreta A, Benincasa M, Fusté MC, Busquets M, Manresa A. Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2013;97(11):4737-47.
186. Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Progress in lipid research.* 2015;57:13-39.
187. Vance RE, Hong S, Gronert K, Serhan CN, Mekalanos JJ. The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(7):2135-9.
188. Aldrovandi M, Banthiya S, Meckelmann S, Zhou Y, Heydeck D, O'Donnell VB, Kuhn H. Specific oxygenation of plasma membrane phospholipids by *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase induces structural and functional alterations in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids.* 2018;1863(2):152-64.
189. Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1974;71(9):3400-4.
190. Sloane DL, Dixon RA, Craik CS, Sigal E. Expression of cloned human 15-lipoxygenase in eukaryotic and prokaryotic systems. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research.* 1991;21a:25-8.
191. Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1996;271(39):24055-62.
192. Sloane DL, Leung R, Craik CS, Sigal E. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature.* 1991;354(6349):149-52.
193. Johannesson M, Backman L, Claesson HE, Forsell PK. Cloning, purification and characterization of non-human primate 12/15-lipoxygenases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;82(2-3):121-9.



194. Adel S, Karst F, González-Lafont À, Pekárová M, Saura P, Masgrau L, Lluch JM, Stehling S, Horn T, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary alteration of ALOX15 specificity optimizes the biosynthesis of antiinflammatory and proresolving lipoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(30):E4266-E75.
195. Kuhn H, Humeniuk L, Kozlov N, Roigas S, Adel S, Heydeck D. The evolutionary hypothesis of reaction specificity of mammalian ALOX15 orthologs. *Progress in lipid research*. 2018;72:55-74.
196. Funk CD, Chen XS, Johnson EN, Zhao L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68-69:303-12.
197. Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(4):857-61.
198. Funk CD, Hoshiko S, Matsumoto T, Rdmark O, Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(8):2587-91.
199. Spanbroek R, Hildner M, Steinhilber D, Fusenig N, Yoneda K, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. *Blood*. 2000;96(12):3857-65.
200. Funk CD, Furci L, FitzGerald GA. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythroleukemia cell 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(15):5638-42.
201. Virmani J, Johnson EN, Klein-Szanto AJ, Funk CD. Role of 'platelet-type' 12-lipoxygenase in skin carcinogenesis. *Cancer letters*. 2001;162(2):161-5.
202. Sigal E, Grunberger D, Cashman JR, Craik CS, Caughey GH, Nadel JA. Arachidonate 15-lipoxygenase from human eosinophil-enriched leukocytes: partial purification and properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;150(1):376-83.
203. Sigal E, Dicharry S, Highland E, Finkbeiner WE. Cloning of human airway 15-lipoxygenase: identity to the reticulocyte enzyme and expression in epithelium. *Am J Physiol*. 1992;262(4 Pt 1):L392-8.
204. Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(1):217-21.
205. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(12):6148-52.
206. Hammarstrom S, Hamberg M, Samuelsson B, Duell EA, Stawiski M, Voorhees JJ. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(12):5130-4.
207. Boeglin WE, Kim RB, Brash AR. A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(12):6744-9.
208. Krieg P, Furstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):390-400.
209. Shimizu T, Izumi T, Seyama Y, Tadokoro K, Rådmark O, Samuelsson B. Characterization of leukotriene A4 synthase from murine mast cells: evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(12):4175-9.
210. Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. *Redox Biol*. 2015;6:297-310.
211. Johnson EN, Brass LF, Funk CD. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):3100-5.

212. Krieg P, Kinzig A, Ress-Loschke M, Vogel S, Vanlandingham B, Stephan M, Lehmann WD, Marks F, Furstenberger G. 12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development. *Molecular carcinogenesis*. 1995;14(2):118-29.
213. Jisaka M, Kim RB, Boeglin WE, Nanney LB, Brash AR. Molecular cloning and functional expression of a phorbol ester-inducible 8S-lipoxygenase from mouse skin. *J Biol Chem*. 1997;272(39):24410-6.
214. Meruvu S, Walther M, Ivanov I, Hammarstrom S, Furstenberger G, Krieg P, Reddanna P, Kuhn H. Sequence determinants for the reaction specificity of murine (12R)-lipoxygenase: targeted substrate modification and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(44):36633-41.
215. Kinzig A, Heidt M, Furstenberger G, Marks F, Krieg P. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of a novel murine epidermis-type lipoxygenase. *Genomics*. 1999;58(2):158-64.
216. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. Human and mouse eLOX3 have distinct substrate specificities: implications for their linkage with lipoxygenases in skin. *Arch Biochem Biophys*. 2006;455(2):188-96.
217. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Progress in lipid research*. 2019;73:28-45.
218. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-6.
219. Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*. 2015;573(1):1-32.
220. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):308-30.
221. Mancini AD, Di Battista JA. The cardinal role of the phospholipase A(2)/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E(2) (PCPP) axis in inflammostasis. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2011;60(12):1083-92.
222. Pistorius EK, Axelrod B. Iron, an essential component of lipoxygenase. *J Biol Chem*. 1974;249(10):3183-6.
223. Funk MO, Carroll RT, Thompson JF, Sands RH, Dunham WR. Role of iron in lipoxygenase catalysis. *J Am Chem Soc*. 1990;112(13):5375-6.
224. Lehnert N, Solomon EI. Density-functional investigation on the mechanism of H-atom abstraction by lipoxygenase. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 2003;8(3):294-305.
225. Wecksler AT, Jacquot C, van der Donk WA, Holman TR. Mechanistic investigations of human reticulocyte 15- and platelet 12-lipoxygenases with arachidonic acid. *Biochemistry*. 2009;48(26):6259-67.
226. Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chemical Reviews*. 2011;111(10):5866-98.
227. Wecksler AT, Kenyon V, Deschamps JD, Holman TR. Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation. *Biochemistry*. 2008;47(28):7364-75.
228. Bryant RW, Bailey JM, Schewe T, Rapoport SM. Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *J Biol Chem*. 1982;257(11):6050-5.
229. Kühn H, Barnett J, Grunberger D, Baecker P, Chow J, Nguyen B, Bursztyn-Pettegrew H, Chan H, Sigal E. Overexpression, purification and characterization of human recombinant 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1169(1):80-9.
230. Belkner J, Wiesner R, Kuhn H, Lankin VZ. The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett*. 1991;279(1):110-4.
231. Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem*. 1990;265(30):18351-61.

232. Takahashi Y, Glasgow WC, Suzuki H, Taketani Y, Yamamoto S, Anton M, Kuhn H, Brash AR. Investigation of the oxygenation of phospholipids by the porcine leukocyte and human platelet arachidonate 12-lipoxygenases. *Eur J Biochem.* 1993;218(1):165-71.
233. Pekárová M, Kuhn H, Bezáková L, Ufer C, Heydeck D. Mutagenesis of triad determinants of rat Alox15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation. *Arch Biochem Biophys.* 2015;571:50-7.
234. Schewe T, Wiesner R, Rapoport SM. Lipoxygenase from rabbit reticulocytes. *Methods in enzymology.* 1981;71 Pt C:430-41.
235. De Marzo N, Sloane DL, Dicharry S, Highland E, Sigal E. Cloning and expression of an airway epithelial 12-lipoxygenase. *Am J Physiol.* 1992;262(2 Pt 1):L198-207.
236. Yokoyama C, Shinjo F, Yoshimoto T, Yamamoto S, Oates JA, Brash AR. Arachidonate 12-lipoxygenase purified from porcine leukocytes by immunoaffinity chromatography and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem.* 1986;261(35):16714-21.
237. Nadel JA, Conrad DJ, Ueki IF, Schuster A, Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest.* 1991;87(4):1139-45.
238. Lei ZM, Rao CV. The expression of 15-lipoxygenase gene and the presence of functional enzyme in cytoplasm and nuclei of pregnancy human myometria. *Endocrinology.* 1992;130(2):861-70.
239. Huo Y, Zhao L, Hyman MC, Shashkin P, Harry BL, Burcin T, Forlow SB, Stark MA, Smith DF, Clarke S, Srinivasan S, Hedrick CC, Pratico D, Witztum JL, Nadler JL, Funk CD, Ley K. Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;110(14):2024-31.
240. Kuhn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Progress in lipid research.* 2006;45(4):334-56.
241. Freire-Moar J, Alavi-Nassab A, Ng M, Mulkins M, Sigal E. Cloning and characterization of a murine macrophage lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1254(1):112-6.
242. Fischer KA, Van Leyen K, Lovercamp KW, Manandhar G, Sutovsky M, Feng D, Safranski T, Sutovsky P. 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction (Cambridge, England).* 2005;130(2):213-22.
243. Nishiyama M, Watanabe T, Ueda N, Tsukamoto H, Watanabe K. Arachidonate 12-lipoxygenase is localized in neurons, glial cells, and endothelial cells of the canine brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 1993;41(1):111-7.
244. Sloane DL, Browner MF, Dauter Z, Wilson K, Fletterick RJ, Sigal E. Purification and crystallization of 15-lipoxygenase from rabbit reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(2):507-13.
245. Theorell H, Holman RT, Akeson A. Crystalline lipoxidase. *Acta chemica Scandinavica.* 1947;1(6):571-6.
246. Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nature structural biology.* 1997;4(12):1003-9.
247. Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W. Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins.* 2008;70(3):1023-32.
248. Offenbacher AR, Holman TR. Fatty Acid Allosteric Regulation of C-H Activation in Plant and Animal Lipoxygenases. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2020;25(15).
249. Romanov S, Wiesner R, Myagkova G, Kuhn H, Ivanov I. Affinity labeling of the rabbit 12/15-lipoxygenase using azido derivatives of arachidonic acid. *Biochemistry.* 2006;45(11):3554-62.
250. Saam J, Ivanov I, Walther M, Holzhutter HG, Kuhn H. Molecular dioxygen enters the active site of 12/15-lipoxygenase via dynamic oxygen access channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(33):13319-24.
251. Kuban RJ, Wiesner R, Rathman J, Veldink G, Nolting H, Sole VA, Kuhn H. The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases. *Biochemical Journal.* 1998;332 ( Pt 1):237-42.

252. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*. 1990;343(6260):771-4.
253. Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kuhn H. Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood*. 1998;91(1):64-74.
254. Walther M, Anton M, Wiedmann M, Fletterick R, Kuhn H. The N-terminal domain of the reticulocyte-type 15-lipoxygenase is not essential for enzymatic activity but contains determinants for membrane binding. *J Biol Chem*. 2002;277(30):27360-6.
255. Walther M, Hofheinz K, Vogel R, Roffeis J, Kühn H. The N-terminal  $\beta$ -barrel domain of mammalian lipoxygenases including mouse 5-lipoxygenase is not essential for catalytic activity and membrane binding but exhibits regulatory functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011;516(1):1-9.
256. Walther M, Wiesner R, Kuhn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. *J Biol Chem*. 2004;279(5):3717-25.
257. Moin ST, Hofer TS, Sattar R, Ul-Haq Z. Molecular dynamics simulation of mammalian 15S-lipoxygenase with AMBER force field. *European biophysics journal : EBJ*. 2011;40(6):715-26.
258. Shang W, Ivanov I, Svergun DI, Borbulevych OY, Aleem AM, Stehling S, Jankun J, Kuhn H, Skrzypczak-Jankun E. Probing dimerization and structural flexibility of mammalian lipoxygenases by small-angle X-ray scattering. *Journal of molecular biology*. 2011;409(4):654-68.
259. Segraves EN, Holman TR. Kinetic investigations of the rate-limiting step in human 12- and 15-lipoxygenase. *Biochemistry*. 2003;42(18):5236-43.
260. Mei G, Di Venere A, Nicolai E, Angelucci CB, Ivanov I, Sabatucci A, Dainese E, Kuhn H, Maccarrone M. Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability. *Biochemistry*. 2008;47(35):9234-42.
261. Vogel R, Jansen C, Roffeis J, Reddanna P, Forsell P, Claesson HE, Kuhn H, Walther M. Applicability of the triad concept for the positional specificity of mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem*. 2010;285(8):5369-76.
262. Borngräber S, Kuban RJ, Anton M, Kühn H. Phenylalanine 353 is a primary determinant for the positional specificity of mammalian 15-lipoxygenases. *Journal of molecular biology*. 1996;264(5):1145-53.
263. Sloane DL, Leung R, Barnett J, Craik CS, Sigal E. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein engineering*. 1995;8(3):275-82.
264. Borngräber S, Browner M, Gillmor S, Gerth C, Anton M, Fletterick R, Kühn H. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37345-50.
265. Suzuki H, Kishimoto K, Yoshimoto T, Yamamoto S, Kanai F, Ebina Y, Miyatake A, Tanabe T. Site-directed mutagenesis studies on the iron-binding domain and the determinant for the substrate oxygenation site of porcine leukocyte arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1210(3):308-16.
266. Romano M. Lipoxin and aspirin-triggered lipoxins. *TheScientificWorldJournal*. 2010;10:1048-64.
267. Brash AR, Yu Z, Boeglin WE, Schneider C. The hepxilin connection in the epidermis. *The FEBS journal*. 2007;274(14):3494-502.
268. Deng B, Wang CW, Arnardottir HH, Li Y, Cheng CY, Dalli J, Serhan CN. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One*. 2014;9(7):e102362.
269. Yoo S, Lim JY, Hwang SW. Resolvins: Endogenously-Generated Potent Painkilling Substances and their Therapeutic Perspectives. *Current neuropharmacology*. 2013;11(6):664-76.

270. Kuhn H. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Progress in lipid research*. 1996;35(3):203-26.
271. Powell WS, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):340-55.
272. Grandordy BM, Lacroix H, Mavoungou E, Krilis S, Crea AE, Spur BW, Lee TH. Lipoxin A4 inhibits phosphoinositide hydrolysis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;167(3):1022-9.
273. Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M, Serhan CN. Anti-inflammatory actions of lipoxin A(4) stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood*. 1999;94(12):4132-42.
274. Nagaya T, Kawata K, Kamekura R, Jitsukawa S, Kubo T, Kamei M, Ogasawara N, Takano KI, Himi T, Ichimiya S. Lipid mediators foster the differentiation of T follicular helper cells. *Immunol Lett*. 2017;181:51-7.
275. Kronke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtyssek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J, Baenckler HW, van den Berg W, Voll RE, Kuhn H, Joosten LA, Schett G. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*. 2009;183(5):3383-9.
276. Higgs GA, Salmon JA, Spayne JA. The inflammatory effects of hydroperoxy and hydroxy acid products of arachidonate lipoxygenase in rabbit skin. *British journal of pharmacology*. 1981;74(2):429-33.
277. Zarbock A, Distasi MR, Smith E, Sanders JM, Kronke G, Harry BL, von Vietinghoff S, Buscher K, Nadler JL, Ley K. Improved survival and reduced vascular permeability by eliminating or blocking 12/15-lipoxygenase in mouse models of acute lung injury (ALI). *J Immunol*. 2009;183(7):4715-22.
278. Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST. 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(4):1201-4.
279. Kroschwald S, Chiu CY, Heydeck D, Rohwer N, Gehring T, Seifert U, Lux A, Rothe M, Weylandt KH, Kuhn H. Female mice carrying a defective Alox15 gene are protected from experimental colitis via sustained maintenance of the intestinal epithelial barrier function. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2018;1863(8):866-80.
280. Uderhardt S, Herrmann M, Oskolkova OV, Aschermann S, Bicker W, Ipseiz N, Sarter K, Frey B, Rothe T, Voll R, Nimmerjahn F, Bochkov VN, Schett G, Kronke G. 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity*. 2012;36(5):834-46.
281. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(5):280-9.
282. Nozawa K, Tuck ML, Golub M, Eggena P, Nadler JL, Stern N. Inhibition of lipoxygenase pathway reduces blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1990;259(6 Pt 2):H1774-80.
283. Chawengsub Y, Gauthier KM, Campbell WB. Role of arachidonic acid lipoxygenase metabolites in the regulation of vascular tone. 2009;297(2):H495-H507.
284. Reddy MA, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Reduced growth factor responses in vascular smooth muscle cells derived from 12/15-lipoxygenase-deficient mice. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2003;41(6):1294-300.
285. Kundumani-Sridharan V, Dyukova E, Hansen DE, 3rd, Rao GN. 12/15-Lipoxygenase mediates high-fat diet-induced endothelial tight junction disruption and monocyte transmigration: a new role for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid in endothelial cell dysfunction. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15830-42.

286. Kühn H, Belkner J, Suzuki H, Yamamoto S. Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities. *Journal of lipid research*. 1994;35(10):1749-59.
287. Kuhn H, Belkner J, Zaiss S, Fahrenklempner T, Wohlfeil S. Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis. *J Exp Med*. 1994;179(6):1903-11.
288. Takahashi Y, Zhu H, Xu W, Murakami T, Iwasaki T, Hattori H, Yoshimoto T. Selective uptake and efflux of cholesteryl linoleate in LDL by macrophages expressing 12/15-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(1):128-35.
289. Kotla S, Singh NK, Traylor JG, Orr AW, Rao GN. ROS-dependent Syk and Pyk2-mediated STAT1 activation is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced CD36 expression and foam cell formation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;76:147-62.
290. Kim GH, Ryan JJ, Archer SL. The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(15):1920-36.
291. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37(12):3014-8.
292. Yigitkanli K, Zheng Y, Pekcec A, Lo EH, van Leyen K. Increased 12/15-Lipoxygenase Leads to Widespread Brain Injury Following Global Cerebral Ischemia. *Translational stroke research*. 2017;8(2):194-202.
293. Gaberel T, Gakuba C, Zheng Y, Lepine M, Lo EH, van Leyen K. Impact of 12/15-Lipoxygenase on Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2019;50(2):520-3.
294. Karatas H, Eun Jung J, Lo EH, van Leyen K. Inhibiting 12/15-lipoxygenase to treat acute stroke in permanent and tPA induced thrombolysis models. *Brain Res*. 2018;1678:123-8.
295. Pratico D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, Trojanowski JQ, Lee VM. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *The American Journal of Pathology*. 2004;164(5):1655-62.
296. Succol F, Praticò D. A role for 12/15 lipoxygenase in the amyloid beta precursor protein metabolism. *Journal of neurochemistry*. 2007;103(1):380-7.
297. Joshi YB, Giannopoulos PF, Praticò D. The 12/15-lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2015;36(3):181-6.
298. Moore K, Lovercamp K, Feng D, Antelman J, Sutovsky M, Manandhar G, van Leyen K, Safranski T, Sutovsky P. Altered epididymal sperm maturation and cytoplasmic droplet migration in subfertile male Alox15 mice. *Cell and tissue research*. 2010;340(3):569-81.
299. Kuhn H, Brash AR. Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells. *J Biol Chem*. 1990;265(3):1454-8.
300. Schewe T, Halangk W, Hiebsch C, Rapoport S. Degradation of mitochondria by cytosolic factors in reticulocytes. *Acta biologica et medica Germanica*. 1977;36(3-4):363-72.
301. Rapoport SM, Schewe T, Wiesner R, Halangk W, Ludwig P, Janicke-Hohne M, Tannert C, Hiebsch C, Klatt D. The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem*. 1979;96(3):545-61.
302. Kinder M, Wei C, Shelat SG, Kundu M, Zhao L, Blair IA, Pure E. Hematopoietic stem cell function requires 12/15-lipoxygenase-dependent fatty acid metabolism. *Blood*. 2010;115(24):5012-22.
303. Habouri L, El Mansouri FE, Ouhaddi Y, Lussier B, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Benderdour M, Fahmi H. Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2017;25(10):1719-28.
304. Sears DD, Miles PD, Chapman J, Ofrecio JM, Almazan F, Thapar D, Miller YI. 12/15-Lipoxygenase Is Required for the Early Onset of High Fat Diet-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *PLOS ONE*. 2009;4(9):e7250.
305. Nunemaker CS, Chen M, Pei H, Kimble SD, Keller SR, Carter JD, Yang Z, Smith KM, Wu R, Bevard MH, Garmey JC, Nadler JL. 12-Lipoxygenase-knockout mice are resistant to inflammatory effects of obesity induced by Western diet. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(5):E1065-75.

306. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3289-303.
307. Olsen LF, Issinger OG, Guerra B. The Yin and Yang of redox regulation. *Redox report : communications in free radical research*. 2013;18(6):245-52.
308. Tennant JR. EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. *Transplantation*. 1964;2:685-94.
309. Brutsch SH, Rademacher M, Roth SR, Muller 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):23578-88.
310. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 2000;29(1):52, 4.
311. Bauche IB, El Mkaadem SA, Pottier AM, Senou M, Many MC, Rezsohazy R, Penicaud L, Maeda N, Funahashi T, Brichard SM. Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 2007;148(4):1539-49.
312. Raabe BM, Artwohl JE, Purcell JE, Lovaglio J, Fortman JD. Effects of Weekly Blood Collection in C57BL/6 Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2011;50(5):680-5.
313. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
314. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
315. Borchert A, Kuttner G, Giessmann E, Wang CC, Wessner H, Volkmer R, Hohne W, Kuhn H. Defining the immunoreactive epitope for the monoclonal anti-human glutathione peroxidase-4 antibody anti-hGPx4 Mab63-1. *Immunol Lett*. 2010;133(2):85-93.
316. Maiorino M, Gregolin C, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. 1990;186:448-57.
317. Salvagno GL, Demonte D, Dima F, Bovo C, Lippi G. Stability of refrigerated whole blood samples for osmotic fragility test. *Hematology, transfusion and cell therapy*. 2019.
318. Bigdelou P, Farnoud AM. Induction of Eryptosis in Red Blood Cells Using a Calcium Ionophore. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2020(155).
319. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64(2):109-30.
320. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *The Review of scientific instruments*. 1972;43(3):404-9.
321. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today*. 1993;14(3):131-6.
322. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell death and differentiation*. 2001;8(12):1143-56.
323. Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1973;323(2):178-93.
324. Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(6):3077-81.
325. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000;405(6782):85-90.
326. Bain BJ. Diagnosis from the blood smear. *The New England journal of medicine*. 2005;353(5):498-507.

327. Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010;401(2):318-20.
328. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1985;839(1):62-70.
329. Tanaka Y, Kulkeaw K, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, Shirasawa S, Sugiyama D. Dok2 likely down-regulates Klf1 in mouse erythroleukemia cells. *Anticancer research.* 2014;34(8):4561-7.
330. Kojima N, Tanaka Y, Kulkeaw K, Nakanishi Y, Shirasawa S, Sugiyama D. Apoptosis-inducing Factor, Mitochondrion-associated 2, Regulates Klf1 in a Mouse Erythroleukemia Cell Line. *Anticancer research.* 2015;35(8):4493-9.
331. Yamamoto M, Yew NS, Federspiel M, Dodgson JB, Hayashi N, Engel JD. Isolation of recombinant cDNAs encoding chicken erythroid delta-aminolevulinate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1985;82(11):3702-6.
332. Riddle RD, Yamamoto M, Engel JD. Expression of delta-aminolevulinate synthase in avian cells: separate genes encode erythroid-specific and nonspecific isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989;86(3):792-6.
333. Fujita H, Yamamoto M, Yamagami T, Hayashi N, Sassa S. Erythroleukemia differentiation. Distinctive responses of the erythroid-specific and the nonspecific delta-aminolevulinate synthase mRNA. *J Biol Chem.* 1991;266(26):17494-502.
334. Orkin SH, Swan D, Leder P. Differential expression of alpha- and beta-globin genes during differentiation of cultured erythroleukemic cells. *J Biol Chem.* 1975;250(22):8753-60.
335. Mollan TL, Yu X, Weiss MJ, Olson JS. The role of alpha-hemoglobin stabilizing protein in redox chemistry, denaturation, and hemoglobin assembly. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(2):219-31.
336. Prats C, Giro A, Ferrer J, Lopez D, Vives-Rego J. Analysis and IBM simulation of the stages in bacterial lag phase: basis for an updated definition. *Journal of theoretical biology.* 2008;252(1):56-68.
337. Fritsche O. Wachstum und Vermehrung Wachstumsphasen. In: Fritsche O, editor. *Mikrobiologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. p. 45-69.
338. Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacology & therapeutics.* 2003;100(3):257-90.
339. Schewe T, Kroschwald P, Kroschwald A, Ludwig P, Kuhn H. The erythroid arachidonate 15-lipoxygenase in rat reticulocytes. *Biomed Biochim Acta.* 1990;49(2-3):S42-6.
340. Kroschwald P, Kroschwald A, Wiesner R, Schewe T, Kuhn H. The occurrence of a lipoxygenase pathway in reticulocytes of various species. *Biomed Biochim Acta.* 1986;45(10):1237-47.
341. Kuhn H, Heydeck D, Brinckman R, Trebus F. Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. *Lipids.* 1999;34 Suppl:S273-9.
342. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell.* 2008;135(6):1118-29.
343. Bennett LF, Liao C, Paulson RF. Stress Erythropoiesis Model Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ).* 2018;1698:91-102.
344. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis. *Current opinion in hematology.* 2007;14(3):215-24.
345. Ploemacher RE, van Soest PL, Vos O. Kinetics of erythropoiesis in the liver induced in adult mice by phenylhydrazine. *Scandinavian journal of haematology.* 1977;19(5):424-34.
346. Harandi OF, Hedge S, Wu DC, McKeone D, Paulson RF. Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4507-19.



347. Lenox LE, Shi L, Hegde S, Paulson RF. Extramedullary erythropoiesis in the adult liver requires BMP-4/Smad5-dependent signaling. *Exp Hematol.* 2009;37(5):549-58.
348. Millot S, Andrieu V, Letteron P, Lyoumi S, Hurtado-Nedelec M, Karim Z, Thibaudeau O, Bennada S, Charrier JL, Lasocki S, Beaumont C. Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood.* 2010;116(26):6072-81.
349. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest.* 1988;81(2):620-3.
350. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood.* 1999;94(6):1864-77.
351. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *International journal of laboratory hematology.* 2013;35(3):237-43.
352. Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Zgodzinska A, Lazowska M, Kotula I. Flow cytometric osmotic fragility test: Increased assay sensitivity for clinical application in pediatric hematology. *Cytometry Part B, Clinical cytometry.* 2018;94(1):189-95.
353. Liao C, Hardison RC, Kennett MJ, Carlson BA, Paulson RF, Prabhu KS. Selenoproteins regulate stress erythroid progenitors and spleen microenvironment during stress erythropoiesis. *Blood.* 2018;131(23):2568-80.
354. Sattler W, Maiorino M, Stocker R. Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys.* 1994;309(2):214-21.
355. Tsiftoglou AS, Sartorelli AC. Dimethyl sulfoxide-induced differentiation of Friend erythroleukemia cells in the absence of cytokinesis. *Cancer Res.* 1979;39(10):4058-63.
356. Tsiftoglou AS, Wong W. Molecular and cellular mechanisms of leukemic hemopoietic cell differentiation: an analysis of the Friend system. *Anticancer research.* 1985;5(1):81-99.
357. Cozza G, Rossetto M, Bosello-Travain V, Maiorino M, Roveri A, Toppo S, Zaccarin M, Zennaro L, Ursini F. Glutathione peroxidase 4-catalyzed reduction of lipid hydroperoxides in membranes: The polar head of membrane phospholipids binds the enzyme and addresses the fatty acid hydroperoxide group toward the redox center. *Free Radic Biol Med.* 2017;112:1-11.
358. Poeckel D, Zemski Berry KA, Murphy RC, Funk CD. Dual 12/15- and 5-lipoxygenase deficiency in macrophages alters arachidonic acid metabolism and attenuates peritonitis and atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Biol Chem.* 2009;284(31):21077-89.
359. Sheffery M, Marks PA, Rifkind RA. Gene expression in murine erythroleukemia cells. Transcriptional control and chromatin structure of the alpha 1-globin gene. *Journal of molecular biology.* 1984;172(4):417-36.
360. Lachman HM, Cheng GH, Skoultchi AI. Transfection of mouse erythroleukemia cells with myc sequences changes the rate of induced commitment to differentiate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1986;83(17):6480-4.
361. Rao G, Rekhman N, Cheng G, Krasikov T, Skoultchi AI. Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. *Oncogene.* 1997;14(1):123-31.
362. Panigaj M, Glier H, Wildova M, Holada K. Expression of prion protein in mouse erythroid progenitors and differentiating murine erythroleukemia cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e24599.
363. Seguin A, Takahashi-Makise N, Yien YY, Huston NC, Whitman JC, Musso G, Wallace JA, Bradley T, Bergonia HA, Kafina MD, Matsumoto M, Igarashi K, Phillips JD, Paw BH, Kaplan J, Ward DM. Reductions in the mitochondrial ABC transporter Abcb10 affect the transcriptional profile of heme biosynthesis genes. *J Biol Chem.* 2017;292(39):16284-99.
364. Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB life.* 2009;61(8):800-30.
365. Gong JK. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science.* 1978;199(4336):1443-5.
366. O'Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, Vernet A, Hall CD, Sun CC, Yildirim E, Staropoli JF, Lee JT, Brown DE. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comparative medicine.* 2015;65(2):96-113.

367. Rapoport TA, Heinrich R, Rapoport SM. The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. *Biochemical Journal*. 1976;154(2):449-69.
368. Höhne M, Bayer D, Prehn S, Schewe T, Rapoport SM. In vitro maturation of rabbit reticulocytes. III. Response of lipoxygenase. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(9):1129-34.
369. Rapoport S, Schmidt J, Prehn S. Maturation of rabbit reticulocytes: susceptibility of mitochondria to ATP-dependent proteolysis is determined by the maturational state of reticulocyte. *FEBS Lett*. 1985;183(2):370-4.
370. Linkenheimer WH, Grant WC, Hall RH, Berger H. Effect of erythropoiesis on P32 uptake by deoxyribonucleic acid of spleen in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;100(2):225-7.
371. Popp RA, Congdon CC, Goodman JW. Spleen weight as a measure of marrow cell growth in irradiated mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1965;120(2):395-8.
372. Chen Y, Xiang J, Qian F, Tukaramrao DB, Ruan B, Hao S, Prabhu KS, Paulson RF. Epo-receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. *Blood*. 2020.
373. Paulson RF, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Current opinion in hematology*. 2011;18(3):139-45.
374. Kim TS, Hanak M, Trampont PC, Braciale TJ. Stress-associated erythropoiesis initiation is regulated by type 1 conventional dendritic cells. *J Clin Invest*. 2015;125(10):3965-80.
375. Perry JM, Harandi OF, Porayette P, Hegde S, Kannan AK, Paulson RF. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood*. 2009;113(4):911-8.
376. Middleton MK, Zukas AM, Rubinstein T, Jacob M, Zhu P, Zhao L, Blair I, Pure E. Identification of 12/15-lipoxygenase as a suppressor of myeloproliferative disease. *J Exp Med*. 2006;203(11):2529-40.
377. Taylor PR, Heydeck D, Jones GW, Krönke G, Funk CD, Knapper S, Adams D, Kühn H, O'Donnell VB. Development of myeloproliferative disease in 12/15-lipoxygenase deficiency. *Blood*. 2012;119(25):6173-4; author reply 4-5.
378. Nakano M, Ohneda K, Yamamoto-Mukai H, Shimizu R, Ohneda O, Ohmura S, Suzuki M, Tsukamoto S, Yanagawa T, Yoshida H, Takakuwa Y, Yamamoto M. Transgenic over-expression of GATA-1 mutant lacking N-finger domain causes hemolytic syndrome in mouse erythroid cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2005;10(1):47-62.
379. Foretz M, Guihard S, Leclerc J, Fauveau V, Couty JP, Andris F, Gaudry M, Andreelli F, Vaulont S, Viollet B. Maintenance of red blood cell integrity by AMP-activated protein kinase alpha1 catalytic subunit. *FEBS Lett*. 2010;584(16):3667-71.
380. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939-48.
381. Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis--defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Seminars in hematology*. 2004;41(2):118-41.
382. Lang E, Bissinger R, Fajol A, Salker MS, Singh Y, Zelenak C, Ghashghaeinia M, Gu S, Jilani K, Lupescu A, Reyskens KM, Ackermann TF, Föllner M, Schleicher E, Sheffield WP, Arthur JS, Lang F, Qadri SM. Accelerated apoptotic death and in vivo turnover of erythrocytes in mice lacking functional mitogen- and stress-activated kinase MSK1/2. *Sci Rep*. 2015;5:17316.
383. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2005;15(5):195-202.
384. Lim SK, Kim H, Lim SK, bin Ali A, Lim YK, Wang Y, Chong SM, Costantini F, Baumman H. Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood*. 1998;92(6):1870-7.
385. Föllner M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB life*. 2008;60(10):661-8.

386. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2002;12(5-6):365-72.
387. van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature*. 1998;395(6700):392-5.
388. Kutzner L, Goloshchapova K, Heydeck D, Stehling S, Kuhn H, Schebb NH. Mammalian ALOX15 orthologs exhibit pronounced dual positional specificity with docosahexaenoic acid. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*. 2017;1862(7):666-75.
389. Petrak J, Myslivcova D, Man P, Cmejlova J, Cmejla R, Vyoral D. Proteomic analysis of erythroid differentiation induced by hexamethylene bisacetamide in murine erythroleukemia cells. *Exp Hematol*. 2007;35(2):193-202.
390. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourão FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, Rocha-Vieira E, Brito-Melo GE. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2014;47(4):307-15.
391. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*. 2015;111:A3.B.1-a3.B.
392. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Sites of erythropoietin production. *Kidney international*. 1997;51(2):393-401.

## **7. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Marlena Rademacher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Funktionelle Bedeutung des Lipidperoxidstoffwechsels bei der Erythropoese*“ 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 dem Erstbetreuer, 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.“

Winsen, den 26.03.2021

---

Unterschrift

### 8. Anteilserklärung

Marlena Rademacher hatte folgenden Anteil an der vorgelegten Publikation:

**RADEMACHER, M, KUHN, H, BORCHERT, A. Systemic deficiency of mouse arachidonate 15-lipoxygenase induces defective erythropoiesis and transgenic expression of the human enzyme rescues this phenotype. *The FASEB Journal*. 2020; 34: 14318– 14335. <https://doi.org/10.1096/fj.202000408RR>**

Alle Autoren haben bei der Planung und Konzeption der Publikation mitgewirkt. Die Festlegung der Forschungsstrategie erfolgte in gemeinsamer Arbeit durch die Autoren.

Die beschriebenen Experimente dieser Publikation wurden überwiegend von **M.R.** durchgeführt. Hierzu zählen die Genotypisierung der beschriebenen Tiere, die Entnahme und Aufbereitung der Organe, die Präparation und Isolation der RNA sowie die Durchführung der qRT PCR. Darüber hinaus verglich **M.R.** die verschiedenen Blutparameter als auch Organgewichte in den untersuchten Tieren. Auch die Bestimmung der Erythropoetin-Expression erfolgte durch **M.R.** Die Bildaufnahmen der Milz und Nieren wurden ebenfalls von **M.R.** erstellt.

Die Hellfeldmikroskopie, die FACS Analyse, die Expressionsbestimmung der Alox15 in verschiedenen Geweben, die Bestimmung der Oxygenierungsprodukte sowie der Menge an 12(S)-HETE in den Geweben wurden in Zusammenarbeit von **M.R.** und A.B. durchgeführt. Auch die Hämolysebestimmung und die osmotische Stabilität wurde durch **M.R.** und A.B. durchgeführt. Zudem erfolgte die Bestimmung der ALOX Produkte des Knochenmarks in Zusammenarbeit durch **M.R.** mit A.B. und H.K.

Die Datenauswertung aller beschriebenen Experimente hat **M.R.**, unter Supervision von A.B. und H.K. erstellt. Die Abbildungen 1, 3 A+D, 4, 5 sowie 8 wurden durch **M.R.** konzipiert und in der finalen Version des Manuskripts durch A.B. weiter bearbeitet. Die Konzeption der restlichen Abbildungen (2, 6 und 7) wurden durch **M.R.** und A.B. gemeinsam erstellt. Auf der Grundlage dieser Abbildungen und Daten erfolgte im Anschluss die Erstellung des finalen Entwurfes des Manuskripts durch A.B. und H.K.. Dieser wurde dann an alle Koautoren zur Ergänzung und Verbesserung geschickt.

## Anteilserklärung

---

Die Endredaktion wurde von **M.R.**, A.B. sowie H.K. gemeinsam durchgeführt. An der Revision des Manuskripts mit entsprechenden Gutachterkommentaren sowie an den Ergänzungen waren **M.R.**, A.B. sowie H.K. beteiligt.

26.03.2021

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

### 9. Lebenslauf

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

Winsen, den 26.03.2021

---

Marlena Rademacher



10. Komplette Publikationsliste

1. RADEMACHER, M, KUHN, H, BORCHERT, A. **Systemic deficiency of mouse arachidonate 15-lipoxygenase induces defective erythropoiesis and transgenic expression of the human enzyme rescues this phenotype.** *The FASEB Journal*. 2020; 34: 14318– 14335. <https://doi.org/10.1096/fj.202000408RR>
  
2. BORCHERT, A., KALMS, J., ROTH, S. R., RADEMACHER, M., SCHMIDT, A., HOLZHUTTER, H. G., KUHN, H. & SCHEERER, P. 2018. **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*, 1863, 1095-1107.
  
3. BRUTSCH, S. H., RADEMACHER, M., ROTH, S. R., MULLER, K., EDER, S., VIERTEL, D., FRANZ, C., KUHN, H. & BORCHERT, A. 2016. **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*, 291, 23578-23588

### 11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn für die Bereitstellung dieses interessanten Promotionsthemas bedanken. Auch möchte ich meinen Dank für die gute Betreuung, die Denkanstöße sowie die konstruktive Kritik aussprechen.

Mein besonderer Dank geht zudem an Frau Dr. rer. nat. Astrid Borchert für ihre großartige Unterstützung, Motivation, Geduld und die zahlreichen Tipps während meiner gesamten Zeit als Promovendin. Aber auch für die schönen Stunden fernab der Pipetten, Zellkulturen und Mäuse.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten AG Kühn für die wunderbare Zusammenarbeit und die schönen gemeinsamen Stunden im Labor. Mein besonderer Dank geht hierbei an Frau Sabine Stehling, Frau Dr. rer. nat. Dagmar Heydeck, Frau Sophia R. Roth, Frau Simone-Hanna Brütsch, Frau Sophie Roigas sowie den anderen Kollegen aus der AG der Lipoxygenase Forschung. Selbst an langen Arbeitstagen herrschte eine gute Stimmung.

Frau Dr. Eugenia Marbach-Breitrück danke ich für die vielen konstruktiven Diskussionen und Vorschläge sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit. Ferner bedanke ich mich für die Freundschaft, die sich in dieser Zeit entwickelt hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Diese Zeit wäre nicht möglich gewesen ohne die netten Worte und Nachrichten, die vielen offenen Ohren und die unendliche Geduld, wenn es doch mal wieder länger wurde. Weiterhin danke ich meinem Freund für den Beistand während der gesamten Zeit und natürlich die technischen Hilfestellungen, wenn der PC mal wieder nicht so wollte wie ich.

Zum Schluss möchte ich mich meinen besonderen Dank meinen Eltern gegenüber aussprechen. Ohne deren unglaubliche Unterstützung (sei es emotional oder finanziell) ich nicht an die Stelle gelangt wäre, an der ich heute stehe.